

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

PARVOVIROSIS CANINA, UNA NUEVA VARIANTE: ¿UN NUEVO DESAFÍO?

Por

Bach. Ivana Libertad CANO PORTELA

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: H, I, C y T de los Alimentos de Origen Animal

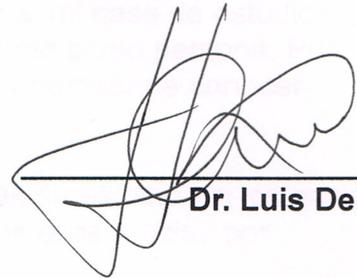
MODALIDAD: Revisión Monográfica.

**MONTEVIDEO - URUGUAY
2013**

PÁGINA DE APROBACIÓN:

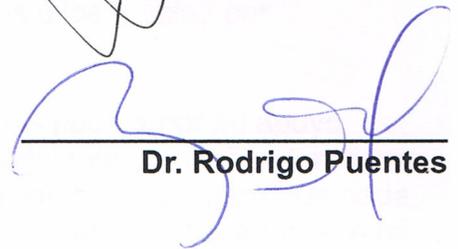
Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



Dr. Luis Delucchi

Segundo miembro (Tutor):



Dr. Rodrigo Puentes

Tercer miembro:



Dra. María del Carmen Cuns

Fecha:

27 de Diciembre de 2013

Autor:



Bach. Ivana Cano

419937

FACULTAD DE VETERINARIA

Aprobado con 10 (diez) 

AGRADECIMIENTOS:

En primer lugar quiero agradecer este trabajo a mi tutor, Rodrigo, quien con su dedicación, motivación y sobretodo paciencia me ha ayudado a terminar un ciclo en mi vida.

Un agradecimiento también a la Facultad de Veterinaria, mi casa de estudios, por brindarme todo para crecer como profesional y sobretodo como persona. Por ofrecerme la oportunidad de conocer la profesión y por permitirme conocer excelentes compañeros de vida y estudio.

Agradezco a mis amigos, a los que compartieron horas de estudio y a los que supieron esperarme cuando tenía que estudiar. A todos ellos gracias por acompañarme y estar siempre conmigo.

Pero principalmente quiero agradecer a mi familia, a mis padres por su apoyo incondicional. Mi padre siempre empujándome hacia adelante y enseñándome una visión objetiva de las cosas y mi madre con su dedicación día a día para que nada me falte y haciendo que los momentos difíciles siempre sean más llevaderos. A mi compañero de vida, Gonza y a mi hijo León quienes con su amor son mi motivación e impulso para terminar esta etapa de mi vida y seguir adelante.

Gracias a todos ellos por sacrificar su tiempo y ayudarme a cumplir mi sueño, este trabajo tiene un poco de cada uno que estuvo a mi lado e hizo posible su realización.

TABLA DE CONTENIDO:

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	5
1. RESUMEN	6
2. SUMMARY	7
3. OBJETIVOS	8
4. CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS	9
5. ORIGEN DE CPV-2 Y SUS VARIANTES	11
6. VARIANTES DE CPV-2 PRESENTES EN URUGUAY Y LA REGIÓN	14
7. PATOGÉNESIS Y SIGNOS CLÍNICOS	17
8. DIFERENCIAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS SEGÚN LAS DIFERENTES VARIANTES DEL VIRUS	18
9. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE CPV	19
10. RESPUESTA INMUNE PROTECTORA CONTRA PARVOVIRUS	22
11. EFICACIA DE LAS VACUNAS ACTUALES CONTRA LAS NUEVAS VARIANTES DEL VIRUS	24
12. CONCLUSIONES	29
13. BIBLIOGRAFÍA	31

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS:

	Página
Fig. 1: Imagen de la partícula viral de CPV	09
Fig. 2: Evolución de CPV	12
Fig. 3: Relación entre la sintomatología clínica en función de los títulos de anticuerpos maternos	22
Fig. 4: Reacción cruzada in vitro utilizando SN e IHA entre cepas homólogas y heterólogas de CPV	25
TABLA 1: Comparación de las técnicas de IC, HA, VI, PCR y qPCR para detección de CPV en materia fecal	20
TABLA 2: Porcentaje de perros con historia previa de vacunación	26
TABLA 3: Patógenos detectados en caninos con diarrea y con historia de vacunación contra CPV	28

1. Resumen:

La Parvovirus Canina es una de las virosis más importantes en el Uruguay y el mundo. Afecta a los cachorros produciendo signos clásicos de una gastroenteritis, muchas veces hemorrágica, la cual también puede producir miocarditis y puede llevar a la muerte del animal. Es producida por el Parvovirus Canino tipo 2 (CPV-2), virus de la familia *Parvoviridae*. El CPV-2 emergió en el año 1978, teniendo rápida distribución mundial y causando una severa enfermedad en perros. Se cree que se originó de una variante del virus de la Panleucopenia felina (FPV) o de los FPV-like provenientes de carnívoros salvajes. Después de su surgimiento, CPV-2 fue sustituido rápidamente por 2 variantes CPV-2a y CPV-2b, las cuales se diseminaron en las poblaciones de perros alrededor del mundo. En el año 2000, en Italia, fue detectada otra nueva variante del CPV llamada CPV-2c. La distribución de esta última variante del virus ha alcanzado muchos países del mundo de forma muy rápida, incluyendo Uruguay y países de la región como Brasil y Argentina. Los animales infectados con esta variante 2c presentan algunas particularidades con respecto a la afección clínica y el rango de mortalidad, no existiendo aun suficientes investigaciones sobre las diferencias patológicas y epidemiológicas de esta nueva variante. La emergencia y la difusión de las variantes de CPV con diferentes propiedades antigénicas y epidemiológicas plantea una considerable amenaza sanitaria a nivel mundial. En consecuencia, el monitoreo de CPV aislados a campo ha sido fundamental para entender la evolución del virus y para desarrollar medidas preventivas destinadas a controlar la propagación de las nuevas y viejas variantes. En términos de protección, aún existe discusión entre la protección contra cepas homólogas o heterólogas de Parvovirus canino. Existen controversias sobre la eficacia de las vacunas basadas en la cepa original (CPV-2) y su protección contra las nuevas variantes. Algunos autores han demostrado la eficacia de las vacunas en la protección cruzada, mientras que otros demuestran lo contrario. Se han encontrado además, animales infectados naturalmente con CPV-2c, que habían sido vacunados previamente. Estos y otros trabajos dejan abierta la discusión sobre la utilización de las cepas actualmente circulantes en la región para la fabricación de vacunas que protejan contra esta enfermedad. Por todo lo expresado, es necesaria una recopilación de los trabajos existentes a modo de actualización del tema y discusión de los puntos controversiales para la práctica y los desafíos diarios a los que se enfrenta el médico veterinario en Uruguay y la región.

2. Summary:

The Canine Parvovirus is one of the most important viruses in Uruguay and the world. It affects puppies producing classic signs of gastroenteritis, often hemorrhagic, which could also cause myocarditis and can lead to the death of the animal. It is produced by the Canine Parvovirus type 2 (CPV-2), virus of the *Parvoviridae*'s family. The CPV-2 emerged in 1978, taking rapid global distribution and causing a severe disease in dogs. It is believed to have originated from a variant of feline panleukopenia virus (FPV) or FPV-like from wild carnivores. After its emergence, CPV-2 was quickly replaced by two variants CPV-2a and CPV-2b, which is spread in populations of dogs around the world. In 2000, in Italy, it was detected a new variant called CPV CPV-2c. The distribution of this latest variant of the virus has reached many countries very quickly, including Uruguay and other countries in the region such as Brazil and Argentina. Animals infected with this variant 2c have special characteristics with respect to the clinical condition and the range of mortality, there isn't enough research on pathological and epidemiological differences of this new variant. The emergence and spread of CPV variants with different antigenic and epidemiological properties poses a significant health threat worldwide. Consequently, monitoring of field CPV isolated has been fundamental to understanding the evolution of the virus and to develop preventive measures to control the spread of the new and old variants. In terms of protection, there is still debate between the protection against homologous or heterologous canine Parvovirus strains. There are controversies about the effectiveness of vaccines based on the original strain (CPV-2) and the protection against new variants. Some authors have demonstrated the efficacy of vaccines in cross-protection, while others show the opposite. They have further found, animals naturally infected with CPV-2c, which had been previously vaccinated. These and other studies leave open the discussion on the use of currently circulating strains in the region for the production of vaccines that protect against this disease. For all the above expressed, it is necessary a compilation of existing studies as an update of the topic and discussion of controversial issues for the practice and the daily challenges faced by veterinarians in Uruguay and the region.

3. Objetivo general:

Realizar una revisión bibliográfica sobre la situación actual a nivel mundial y regional de la Parvovirus canina y la importancia de las nuevas variantes virales circulantes.

3.1. Objetivos específicos:

- 3.1.1. Describir las características principales del virus y su evolución; y determinar las variantes presentes en Uruguay y la región.
- 3.1.2. Describir cómo afecta la evolución viral al cuadro clínico y la patogenicidad del virus.
- 3.1.3. Revisar los métodos de diagnóstico de la enfermedad y describir cuál es el más efectivo para la detección de la nueva variante del CPV-2.
- 3.1.4. Evaluar la eficacia de los planes de vacunación actuales contra las nuevas variantes del CPV-2 y la respuesta inmune protectora.

4. Características del virus:

Parvovirus Canino Tipo 2 (CPV-2) pertenece a la familia *Parvoviridae*, es una familia de virus pequeños, desnudos, con una cápside de forma icosaédrica y un tamaño aproximado de 18 a 26 nm (Fig.1). Dentro de esta familia, el CPV-2, pertenece a los virus del tipo autónomo, es decir, que son capaces de replicarse por sí mismos dentro del núcleo celular. Esta incapacidad de inducir la replicación de la célula, hace que la multiplicación ocurra solamente en aquellas en fase S del ciclo celular, lo que determina en parte, el tropismo del virus. También presentan características hemaglutinantes gracias al antígeno VP2, efecto citopático a nivel del núcleo celular, y formación de cuerpos de inclusión intracelulares (Flint y col., 2003).

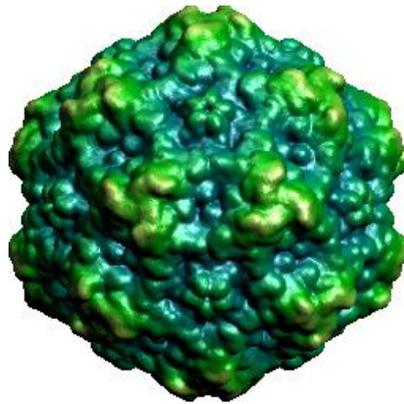


Fig. 1. Imagen de la partícula viral de Parvovirus Canino extraída del *International Committee on Taxonomy of Viruses* (<http://www.ictvonline.org/>) donde se observa la estructura icosaédrica del virus.

Dentro de la familia *Parvoviridae* existen dos subfamilias, la *Densovirinae* y la *Parvovirinae*, dentro de esta última, el CPV-2 pertenece al género *Parvovirus* (Flint y col., 2003). Los miembros de este género infectan una gran variedad de mamíferos incluyendo cerdos, varios miembros dentro del orden *Carnívora* y varios roedores, y están caracterizados por poseer hospederos más o menos específicos (Cotmore y col., 1987; Murphy y col., 1995). Es así que existe Parvovirus Bovino (BPV), Parvovirus del Pollo (ChPV), Parvovirus Porcino (PPV), entre otros. En este género, los carnívoros son infectados por tres parvovirus muy relacionados a los que se les llama “Parvovirus de Carnívoros”, Parvovirus Canino (CPV), Virus de la Panleucopenia Felina (FPV) y Virus de la Enteritis del Visón (MEV). Caninos y visones son además hospederos de otros virus relacionados de la misma subfamilia, el Virus Diminuto Canino (CPV tipo-1 o MVC) y el Virus de la Enfermedad de los Visones Aleutianos (AMDV). De todos modos no aparecen interacciones inmunológicas, epidemiológicas o patológicas entre CPV-1 o AMDV y CPV-2, FPV o MEV respectivamente entre sus hospederos (Hoelzer y col., 2010).

CPV-2 es un virus ADN de hebra simple de aproximadamente 5200 nucleótidos de polaridad negativa. Su genoma codifica para dos grupos de proteínas: las no estructurales (NS1 y NS2) y las estructurales (VP1 y VP2) (Reed y col., 1988). La proteína NS1 está formada por 668 aminoácidos y actúa en la producción de la progenie viral, desde la replicación y empaquetamiento del ADN, hasta en la

producción del efecto citopático (Caillet-Fauquet y col., 1990; Li y col., 1990; Vanacker, y col., 1993; Op De Beeck y col., 1995). La proteína NS2 está formada por 97 aminoácidos, sus funciones y propiedades aún no son tan conocidas, sin embargo se sabe que está implicada en procesos de amplificación del ADN, transcripción del ARN viral, formación de la cápside y empaquetamiento del ADN dentro del virión (Naeger y col., 1993; Cotmore y col., 1997).

Las proteínas estructurales forman la estructura morfológica del virus, 10% la VP1 y 90% la VP2. La estructura consta de una cápside icosaédrica de 26 nm de diámetro sin envoltura lipídica (virus desnudo) (McKenna y col., 1999). Estas proteínas son reconocidas por el sistema inmune del huésped siendo el principal sitio antigénico del virus con alta variación. La cápside también juega un gran rol determinando los rangos de hospederos y el tropismo tisular del virus (Hueffer y Parrish, 2003a). El análisis de las variaciones en estas proteínas estructurales, permiten estudiar la evolución del virus (Reed y col., 1988).

5. Origen de CPV-2 y sus variantes:

CPV-2 emergió como un nuevo patógeno a finales de los años 70, con una rápida distribución mundial y causando una severa enfermedad en perros. Se cree que se originó de una variante del virus de la Panleucopenia felina (FPV) o de los FPV – like provenientes de carnívoros salvajes. Para esto se han propuesto varias hipótesis; estas incluyen una mutación directa del FPV, una mutación del FPV vaccinal, o una adaptación a nuevos hospederos en carnívoros salvajes como zorros o hurones (Truyen y col., 1998a y b).

Pruebas serológicas realizadas en caninos de Europa o Eurasia, demostraron que estos fueron infectados con CPV-2 antes del año 1978 (entre 1974 y 1976), después de lo cual el virus se distribuyó en perros de todo el mundo durante la primer mitad de 1978 (Truyen y col., 1994; Parrish, 1999). La cepa específica ancestral del virus que dio origen al CPV aun no ha sido identificada, pero CPV deriva claramente de un FPV o de un virus estrechamente relacionado de carnívoros salvajes como zorros o visones (FPV-like). Este rol de reservorios salvajes en la emergencia del CPV es una hipótesis propuesta, pero todavía no existe evidencia concluyente al respecto (Truyen y col., 1998b; Steinel y col., 2001).

La cepa original del virus de 1978 fue designada como CPV-2 para diferenciarla del CPV-1 o Virus diminuto de los caninos (MVC) descrito en 1970 y con quien no comparte relación antigénica pero si mucho de los signos clínicos de la enfermedad (Macartney y col., 1988a; Binn y col., 2004). Es probable que el CPV-2 se haya originado como una variante del virus de la Panleucopenia Felina (FPV), el cual infecta gatos, mapaches y visones, pero no perros ni cultivos celulares provenientes de éstos (Truyen y col., 1995). Estos dos virus difieren solamente en un 0,5% de sus genomas, y las propiedades de infección características de CPV-2 están controladas por un pequeño número de cambios en aminoácidos de la superficie de la cápside (Hueffer y col., 2003b). Dos cambios observados en las posiciones 93 y 323 de la proteína VP2 de CPV-2 con respecto a FPV, pueden haber sido los responsables de la capacidad de infectar caninos (Hueffer y col., 2003b). A su vez los cambios en los residuos 80, 564 y 568, que se encuentran en proximidad en la estructura de la cápside, le impiden, al menos en parte, replicar en gatos o en cultivos de tejidos de estos (Truyen y Parrish, 1992; Truyen y col., 1996). Así mismo, cambios ocurridos en la posición 300 de la VP2 también se vieron involucrados en el cambio de rango de huésped (Hueffer y col., 2003b).

La rápida generación de nuevas variantes del CPV son causa de una alta tasa de mutaciones que han ocurrido desde el origen del virus y de la existencia de distintas presiones de selección (Shackelton y col., 2005). Durante 1979 emergió la primer variante del virus, denominada CPV-2a reconocida mediante el uso de anticuerpos monoclonales. Durante 1979 y 1980, esta nueva cepa reemplazó al original CPV-2 y se diseminó a nivel mundial (Parrish 1994; Hoelzer y col., 2008). El Parvovirus canino tipo - 2a, a diferencia de la cepa original, tiene una mayor capacidad de infección y puede producir enfermedad tanto en gatos como en perros (Truyen y col., 1996).

En 1984 surgió la siguiente variante del virus, designada como CPV-2b, la cual circula actualmente junto con la CPV-2a en las poblaciones de perros alrededor del

mundo. Este perdió su capacidad de unión a células felinas, por lo que causa enfermedad únicamente en perros (Hueffer y col., 2003b).

Anteriormente CPV-2a y CPV-2b se diferenciaban de la cepa original en 6 cambios aminoacídicos en la proteína VP2 de la cápside. Cinco de estos cambios están presentes en ambas nuevas variantes (posición 87, 101, 103, 300 y 305), el sexto cambio es específico para CPV-2a y CPV-2b (posición 555 para 2a, y 426 para 2b) (Parrish y col., 1991b). Actualmente una reversión de las nuevas variantes en la posición 555 de la VP2, desde el aminoácido "Ile" hacia "Val" originalmente presente en CPV-2, restringe las diferencias entre CPV-2a y CPV-2b a un solo cambio aminoacídico en la posición 426 (de "Asn" a "Asp"). Esto también disminuye a solo cinco posiciones aminoacídicas compartidas en CPV-2a y CPV-2b, que difieren de la cepa original CPV-2 (Martella y col., 2005b). La posición 426 de la VP2 constituye el mayor sitio antigénico (epítipo A), reconocido por los receptores celulares y por los anticuerpos neutralizantes (Parrish y col., 1991b). Estas variaciones en los aminoácidos son las responsables de los cambios en las propiedades antigénicas y en los rangos de hospederos (Parrish, 1991a; Truyen y col., 1995).

Una nueva sustitución en la misma posición aminoacídica 426 de VP2, cambió desde "Asp" a "Glu", produciendo una nueva variante del virus, la CPV-2c o también llamada "mutante Glu-426". Esta nueva variante surgió en Italia en el año 2000, y al igual que las anteriores, presentó una rápida distribución en las poblaciones caninas (Buonavoglia y col., 2001) (Fig. 2). Se terminó de reconocer como nueva variante en el año 2004, cuando se desarrollaron anticuerpos monoclonales específicos para su reconocimiento en ensayos de inhibición de la hemaglutinación (Nakamura y col., 2004).

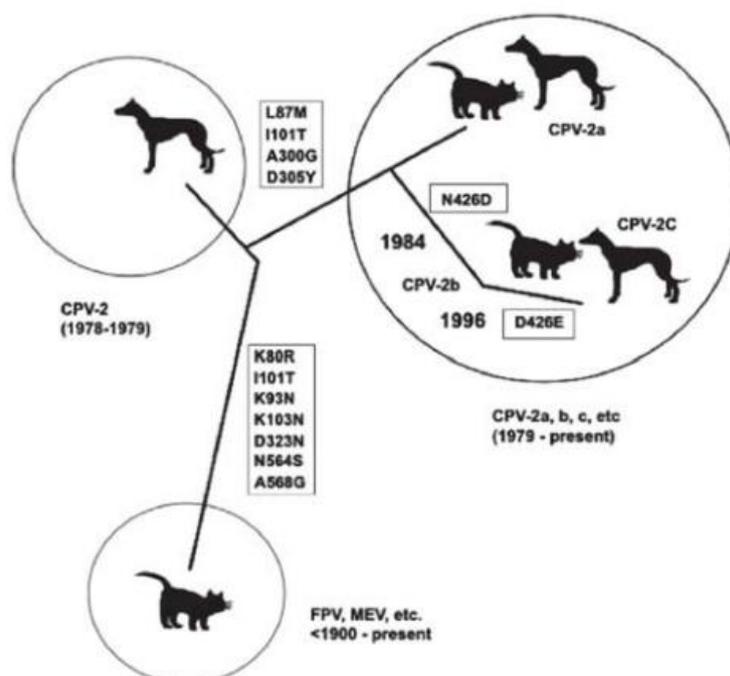


Fig. 2. Evolución de Parvovirus canino (CPV). Relación genética, rangos de hospederos y año de aparición del virus de la Panleucopenia Felina (FPV), CPV y parvovirus relacionados. El virus original causante de la Parvovirus canina (CPV-2)

se extinguió, y fue reemplazado por las nuevas variantes CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c. Extraído de Hoelzer y Parrish (2010).

CPV-2c está reemplazando progresivamente los otros tipos de CPV presentes. En Italia, en el año 2005, esta nueva variante antigénica alcanzó una frecuencia de aparición del 60 % sobre las anteriores. Esto fue detectado gracias a estudios antigénicos y genéticos que mostraron un gran aumento de la presencia del virus dentro de la población canina (Decaro y col., 2005c; Martella y col., 2005b).

La nueva variante del virus también fue encontrada en Vietnam (Nakamura y col., 2004), España (Decaro y col., 2006b), Alemania (Shackelton y col., 2005), Reino Unido (Decaro y col., 2007a) y posteriormente en Uruguay (Pérez y col., 2007), siendo esta última el primer registro fuera de Eurasia. Luego de esta primer aparición en América se ha detectado en muestras provenientes de diferentes zonas de Estados Unidos (Hong y col., 2007), Argentina (Calderon y col., 2009) y Brasil (Pereira y col., 2008; Castro y col., 2010).

La emergencia y la difusión de las variantes de CPV con diferentes propiedades antigénicas y epidemiológicas no solo tienen relevancia evolutiva, sino también plantea una considerable amenaza sanitaria a nivel mundial. En consecuencia, el monitoreo de CPV aislados a campo ha sido fundamental para entender la evolución del virus y para desarrollar medidas preventivas destinadas a controlar la propagación de las nuevas y viejas variantes (Pérez y col., 2007).

6. Variantes de CPV-2 presentes en Uruguay y la región:

Según la anamnesis y los signos clínicos de la enfermedad, la misma estaría presente en Uruguay desde hace ya varias décadas (1980). En un trabajo realizado durante el 2006 donde se analizaron 30 muestras provenientes de caninos de diferentes departamentos de Uruguay (Montevideo, Canelones, San José y Lavalleja), 25 de las 30 muestras analizadas resultaron positivas a la presencia de CPV-2. De las cuales, la principal variante detectada fue CPV-2c en 24 de las muestras y una sola de las muestra resultó ser CPV-2a (Pérez y col., 2007). En otro trabajo realizado entre el 2007 y el 2009 todas las muestras colectadas (n=98) fueron de la variante CPV-2c. Pero en 2010 emergió una cepa divergente CPV-2a en la población homogénea de CPV-2c y alcanzó una frecuencia de 38% para finales de ese año (Pérez y col., 2012).

Un análisis filogenético comparativo con las cepas de todo el mundo condujo a entender el origen geográfico del CPV-2c uruguayo. La cercana relación entre la cepa CPV-2c europea y sudamericana indica que estas tienen el mismo origen. Un origen común podría explicar por qué la cepa CPV-2c más representativa en Uruguay es 100% idéntica en la región antigénica de la VP2 con cepas de CPV-2c colectadas de varios países europeos. Esto lleva a pensar que cepas europeas y sudamericanas de CPV-2c se originaron en Europa y luego invadieron Sudamérica (Maya y col., 2013).

En Argentina se realizó un trabajo con 38 hisopados rectales de animales que mostraban sintomatología de Parvovirus. Por la técnica de PCR, se identificó la presencia del virus y las variantes actuantes. De los 38 animales testeados, 27 revelaron resultados positivos a CPV. De estos 27, 9 fueron identificados como CPV-2a, 4 como CPV-2b y 14 como CPV-2c. Esto demuestra la presencia de las tres nuevas variantes del virus que circulan en la población canina de Argentina y la alta prevalencia de la más reciente variante CPV-2c (Calderón y col., 2009). Estudios más recientes en el mismo país, muestra que CPV-2c se convirtió en la variante predominante desde el año 2008, con un 91% de incidencia en las muestras positivas analizadas, mientras CPV-2a y CPV-2b representaron solo un 3,6% y 5,4% respectivamente (Calderón y col., 2011)

Análisis de la secuencia en variantes de CPV-2 presentes en Argentina muestran la aparición de una nueva mutación en la proteína VP2, "T440A", restringido a la variante local de CPV-2c, la cual presenta una reciente aparición en la región ya que se demostró en muestras colectadas durante los años 2009 y 2010 y no en años anteriores (Calderón y col., 2011). También se ha observado con estudios filogenéticos que la variante CPV-2c circulante en Argentina muestra alta identidad con la variante 2b europea (99,3 – 99,8%), sugiriendo que esta proviene de cepas de CPV-2b europeas y no Argentinas. Lo contrario a lo sucedido con la variante CPV-2b, la cual muestra gran identidad con la 2a Argentina (99,8%), indicando que posiblemente evolucionara de esta (Calderón y col., 2012).

Por otro lado, análisis de la secuencia genética de VP1/VP2 de 29 muestras obtenidas de perros con sintomatología de CPV-2, provenientes de diferentes regiones de Brasil entre los años 1980 y 2005, revelaron que la variante antigénica predominante fue CPV-2a (Pereira y col., 2008). Otro estudio realizado en el Sur de

Brasil, con 32 muestras provenientes de cachorros no vacunados, entre los años 1995 y 2009, indican la presencia de la nueva variante CPV-2c la cual muestra alta identidad (100%) con las cepas CPV-2c de América del Sur. Todas las muestras colectadas entre 1995 y 2003 fueron caracterizadas como CPV-2a, entre 2004 y 2006 se detectaron las variantes CPV-2a (50%) y CPV-2b (50%), y luego del 2006 la mayoría fueron positivas para CPV-2b. Una sola muestra reveló la presencia de CPV-2c. También fue observado luego del 2004 la mutación en el residuo 440 de la VP2 (inserción de "A") en todas las variantes CPV-2a detectadas. Este trabajo muestra un patrón de evolución del virus similar al ocurrido en el resto de los países de la región y del mundo (Castro y col., 2010).

Estos estudios señalan una rápida distribución de la variante CPV-2c desde su emergencia y una fuerte sustitución de esta sobre los tipos anteriores. También demuestran la no presencia del virus original (CPV-2) a no ser las utilizadas en la formulación de vacunas. Lo que está sucediendo en la región es similar a lo sucedido en Italia, donde luego de la emergencia del CPV-2c, la proporción con las otras variantes era de un 17% en el año 2000, siendo en el 2004 un 60% (Martella y col., 2005b). Demostrando así una fuerte habilidad de la variante CPV-2c para reemplazar y eliminar otras viejas variantes del virus.

La alta prevalencia de CPV-2c detectada en Uruguay durante los años 2006 – 2009 sugiere que, luego de su emergencia, CPV-2c se expandió y reemplazó la población viral existente. Aunque no hay registros del tipo antigénico que circulaba en Uruguay antes del 2006, puede hacerse una inferencia observando la dinámica de CPV en los países vecinos (Maya y col., 2013). Como ya fue mencionado, en Argentina CPV-2c fue detectado por primera vez en el 2003 y reemplazó completamente a las cepas anteriores entre 2008 y 2010 (Calderon y col., 2009 y 2011). En Brasil, la primer detección de CPV-2c fue en el 2008 y alcanzó una frecuencia cercana al 80% durante el 2008 y 2010 (Castro y col. 2011; Streck y col. 2009; Pinto y col. 2012). Antes de la emergencia del CPV-2c, CPV-2a y 2b eran las variantes circulantes en ambos países (Calderon y col., 2009; Pereira y col., 2007). Uruguay debe haber tenido una población similar de CPV-2a y 2b, y en este contexto, la cepa CPV-2a colectada en el 2006 debe considerarse una reliquia de estas viejas cepas de CPV-2 que circulaban en las poblaciones uruguayas de perros antes de la emergencia de CPV-2c en el país. Estas hipótesis se basan en las relaciones filogenéticas entre las cepas CPV-2a uruguayas con CPV-2a y 2b de Brasil y Argentina (Maya y col., 2013).

Recientemente, la gradual diversificación de la población de CPV-2c uruguayo fue alterada por la emergencia de una nueva cepa CPV-2a. Esta variante fue detectada por primera vez en abril del 2010 con una frecuencia de 38% durante ese año (Pérez y col., 2012). Durante el 2011, CPV-2a continuó en aumento, alcanzando una frecuencia de 85%, siendo este el primer reporte mundial donde en una población de perros con prevalencia de la cepa CPV-2c, es reemplazada por una nueva variante, en este caso, CPV-2a (Maya y col., 2013). Esta emergencia fue consecuencia de la invasión de una cepa extranjera. La cepa CPV-2a uruguayas no está relacionada filogenéticamente con las cepas del Sur o Norteamérica, incluida la cepa CPV-2a uruguayas del 2006, sin embargo está muy relacionada o es casi completamente idéntica con una cepa asiática recientemente aislada (Nakamura y col., 2004; Phrmoi y col., 2010; Zhang y col., 2010).

Estos hallazgos sugieren que en la última década, Uruguay ha experimentado dos sucesivos eventos de invasiones por cepas de CPV-2c y CPV-2a con orígenes europeo y asiático respectivamente. Esto refuerza la hipótesis de que los eventos migratorios de CPV no son raros en ciertas regiones geográficas e indican que las cepas circulantes pueden ser tan invasivas como se muestra en las tempranas fases de epidemia de CPV (Maya y col., 2013).

7. Patogénesis y signos clínicos:

Los cachorros son infectados por el CPV-2 a través de la ruta oronasal y luego de su replicación inicial en el tejido linfoide, alcanza el epitelio germinal de las criptas del intestino delgado mediante linfocitos infectados, causando diarrea. La infección de los leucocitos circulantes y de los tejidos linfoides induce una aguda linfopenia, asociada muchas veces con neutropenia (Pollock, 1982a; Appel y Parrish, 1987).

Luego de 3 – 10 días se desarrollan los signos clínicos, caracterizados principalmente por enteritis hemorrágica aguda. Los signos consisten en disminución del apetito, depresión, vómitos, deshidratación, fiebre y diarrea (desde mucoide hasta hemorrágica). La leucopenia es un hallazgo constante, con conteos de glóbulos blancos por debajo de 2000-3000 células/ μ l de sangre. Esta marcada leucopenia puede llevar a infecciones secundarias por bacterias oportunistas, principalmente en el tracto respiratorio. La viremia puede alcanzar títulos muy altos de ADN viral y persistir por varias semanas, incluso luego de que el virus haya desaparecido del contenido intestinal. El rango de mortalidad es muy alto en cachorros (por encima de 70%), pero en adultos generalmente no supera el 1% (Decaro y col., 2005b; Decaro y col., 2007b).

En cachorros seronegativos de 2 a 3 semanas de edad, el CPV-2 puede replicarse en células cardíacas induciendo una miocarditis fatal, sin embargo esta forma de manifestación no es muy común ya que los cachorros tan pequeños se encuentran protegidos por anticuerpos maternos (Greene y Decaro, 2011).

Los parvovirus solo infectan células del huésped que están en activa fase de división, por esto, las manifestaciones clínicas de la enfermedad son fuertemente dependientes de la edad del huésped, y los signos son similares tanto en animales silvestres como domésticos (Parrish, 1995).

Estudios sobre la distribución del virus en el cuerpo del animal revelan que existe una gran distribución del virus por el organismo (cerebro, cerebelo, médula oblonga, tonsilas, linfonódulos retrofaríngeos y mesentéricos, timo, miocardio, pulmones, hígado, bazo, riñones, vejiga, médula ósea, yeyuno, colon y recto) con mayor preferencia en tejido linfoide y menor por el tracto urinario. En las heces se observan títulos menores en comparación con los de los órganos internos (Decaro y col., 2007b).

Enteritis hemorrágica del intestino delgado y aumento de nódulos linfáticos mesentéricos y placas de Peyer son las lesiones más encontradas en perros tras la muerte a consecuencia de una infección con CPV. Histopatológicamente, el intestino delgado es afectado por necrosis multifocal de las criptas y cuerpos de inclusión intranuclear. Además de una marcada disminución de linfocitos en las placas de Peyer, nódulos linfáticos, bazo y timo (Greene y Decaro, 2011).

8. Diferencias clínico-patológicas según las diferentes variantes del virus:

La distribución del virus en el organismo del perro tiene un similar comportamiento entre las variantes, con mayor o menor preferencia por los diferentes tejidos según la cepa actuante. En el caso de CPV-2c existe más preferencia por tejido tonsilar, en CPV-2b por el bazo y CPV-2a por la médula ósea (Decaro y col., 2007b).

Con respecto a la patogenicidad de las diferentes variantes, se ha comprobado que las cepas CPV-2a y CPV-2b producen una enfermedad más severa que la producida por la cepa original (CPV-2) (Decaro y col., 2005b). También está demostrado que estas dos nuevas variantes son eliminadas en mayor cantidad en materia fecal en comparación con la cepa original (CPV-2) (Carmichael, 1994).

Otro estudio realizando infecciones experimentales, ha demostrado que la variante CPV-2a es más patogénica comparada con la CPV-2b. Existiendo diferencias en el porcentaje de mortalidad (80-60% en CPV-2a y 20% en CPV-2b), mayor presentación de signos clínicos en CPV-2a y menor tiempo de exhibición de los mismos. Además de mostrar lesiones histopatológicas más severas en CPV-2a. Sin embargo la producción de anticuerpos es mayor en la cepa CPV-2b, comparado con CPV-2a (Moon y col., 2008).

En un estudio realizado con 6 cachorros infectados con la variante CPV-2c, se caracterizó a la enfermedad con un curso de mediana prolongación (5 a 7 días) y rápida recuperación. No se evidenciaron vómitos ni diarrea hemorrágica, pero sí diarrea mucoide a los 3,5 días, fiebre, depresión y disminución del apetito. Todos los cachorros mostraron una relativa leucopenia y linfopenia entre los días 9 a 13 (Decaro y col., 2005b).

Con respecto a la patogenicidad de las cepas virales *in vitro*, en cultivos celulares infectados con CPV-2 y CPV-2c, se encontró que la variante CPV-2c produce menor efecto citopático en cultivos de la línea CRFK (origen felino) que en cultivos primarios obtenidos a partir de corazón fetal canino (FCH). En cuanto la cepa original (CPV-2) no mostró diferencias en el efecto citopático producido entre estos dos cultivos (Puentes y col., 2012b).

9. Métodos de diagnóstico de CPV:

Si bien es sabido que en la práctica, la gran mayoría de las clínicas veterinarias del país utilizan la anamnesis y la sintomatología como herramientas para realizar el diagnóstico de parvovirus, existen distintos patógenos que pueden causar cuadros clínicos similares de enteritis en caninos como Coronavirus, Adenovirus, Morbilivirus, Rotavirus, Coccidias, entre otros (Pollock y Carmichael, 1982b). Es importante tener un diagnóstico rápido y certero de la enfermedad, para prevenir la propagación de la misma, por esto, para el diagnóstico definitivo es necesario utilizar técnicas de laboratorio eficaces.

Se han desarrollado muchos métodos de laboratorio para el diagnóstico de la infección por CPV. Generalmente estos métodos se realizan en las heces de perros afectados (o en el contenido intestinal si el animal está muerto). En estados avanzados de infección, muestras de sangre con anticoagulante (EDTA) pueden ser útiles para el diagnóstico ya que la viremia en CPV es excepcionalmente duradera (Decaro y col., 2005a, b).

La prueba de Inmunocromatografía (IC) es el método de diagnóstico a campo más rápido y común usado en la práctica ya que el procedimiento es simple y rápido y puede ser llevado a cabo por veterinarios así como los dueños de los animales para obtener un diagnóstico inmediato de CPV (Esfandiari y Klingeborn, 2000). Sin embargo se necesitan grandes cargas de antígeno viral para producir claramente una banda visible y la interpretación del resultado puede ser afectada por la subjetividad del operador. Esto es muy común cuando la carga de virus es baja (Desario y col., 2005). En un trabajo realizado por Puentes y col. (2010), se comparó el diagnóstico clínico realizado por veterinarios y el test de IC comercialmente disponible en Uruguay, determinando que aproximadamente el 50% de los resultados clínicos presuntivos de CPV, arrojaban resultados negativos por IC. En este mismo sentido, Desario y col. (2005) compararon las pruebas de Inmunocromatografía (IC) con las técnicas moleculares para el diagnóstico viral, observando que la sensibilidad de la IC no excede el 50% con respecto a los métodos basados en la detección del ácido nucleico; sin embargo la especificidad fue de 100%. La pobre sensibilidad de la técnica de IC fue asociada con la baja carga del virus en las heces durante estadios avanzados de infección y/o la alta presencia de títulos de anticuerpos contra CPV en la luz intestinal que pudieron secuestrar gran cantidad de partículas virales. Marulappa y Kapil (2009) desarrollaron un test de inmunocromatografía para detectar antígenos de CPV en las heces y para cuantificar anticuerpos contra CPV en el suero (*Slide agglutination test* –SAT- para el antígeno y *Slide inhibition test* –SIT- para los anticuerpos). Estos ensayos rápidos son muy útiles por su aplicación a campo y para el manejo de criaderos. La técnica SIT puede ser utilizada para refinar el tiempo de vacunación contra CPV en cachorros. Por ejemplo, si el cachorro tiene altos niveles de anticuerpos maternos, este puede ser vacunado más tarde. Pero el cachorro puede ser vacunado luego de un resultado negativo o bajo de anticuerpos contra CPV. De esta forma se hace más efectiva la vacunación contra CPV. La técnica SAT también puede ser utilizada para la detección rápida de contaminación ambiental con CPV, para verificar la eficacia de descontaminación en un área. Ambos test son prácticos para su uso en criaderos debido a que los reactivos son fáciles de conseguir, su costo es bajo y puede ser utilizado en todos los animales del criadero para chequear

su nivel de anticuerpos contra CPV, y la técnica es rápida de implementar (Marulappa y Kapil, 2009).

Otros métodos que se han utilizados para el diagnóstico a partir de materia fecal de animales enfermos, han sido el aislamiento viral, Hemoaglutinación y ELISA. Estos métodos tienen la desventaja que exigen equipamientos de laboratorio, muchas veces no disponibles en clínicas veterinarias (Puentes y col., 2010, 2012a; Marulappa y Kapil, 2009; Desario y col., 2005). La hemoaglutinación (HA) y el aislamiento viral (VI) son técnicas que deben ser realizadas en laboratorios especializados y su mayor desventaja es su menor sensibilidad, probablemente causada por los anticuerpos presentes en la luz intestinal de los perros infectados, los cuales pueden unirse a viriones y prevenir tanto la HA como también la unión del virus a los receptores celulares (Desario y col., 2005). Esto ha sido demostrado en infecciones naturales y experimentales, donde CPV es detectable por estas técnicas solamente unos pocos días luego de la infección, pudiendo dar además resultados falso-negativos a pesar de haberse encontrado alta carga de ADN viral (Decaro y col., 2005a, b).

En los últimos años se han desarrollado técnicas moleculares con alta sensibilidad para la detección de CPV-2 como ser la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) y la *Real Time* PCR (qPCR), siendo esta última capaz de detectar y cuantificar ADN viral en materia fecal de animales infectados, con alta sensibilidad y especificidad y menor tiempo que la PCR convencional. La qPCR posee también un mayor rendimiento que la PCR convencional ya que permite el procesado de varias muestras simultáneamente (Decaro y col., 2005c; Streck y col., 2013). La alta sensibilidad y reproducibilidad de la técnica qPCR permite la identificación de bajos títulos de CPV eliminados en las heces de perros, ayudando a adoptar adecuadas medidas de profilaxis para prevenir la infección por CPV, especialmente en criaderos y refugios, donde este virus es responsable generalmente de dramáticas epizootias (Kumar y Nandi, 2010). Esta técnica fue utilizada con éxito en estudios de la patogénesis del virus tanto en infecciones naturales (Decaro y col., 2005b) como en experimentales (Decaro y col., 2005a) y fue también utilizada para evaluar la distribución del virus en diferentes tejidos (Decaro y col., 2007b). En conclusión, estas técnicas moleculares han demostrado ser mucho más sensibles a las que se han utilizado más comúnmente para detectar CPV (Tabla 1).

Tabla 1: Imagen extraída de Desario y col., 2005, donde se comparan las técnicas de Inmuncromatografía (IC), Hemaglutinación (HA), aislamiento viral (VI), PCR convencional y Real time PCR para la detección de CPV en materia fecal.

Results of the five laboratory tests used for the detection of CPV-2 in the faeces of diarrhoeic dogs

Samples	IC	HA	VI	PCR ^a	Real-time ^b
Positive	41	50	54	68	73
Negative	48	39	35	21	16

IC, immunochromatographic test; HA, haemagglutination assay; VI, virus isolation on cell cultures.

^a Buonavoglia et al. (2001).

^b Decaro et al. (2005).

Finalmente, la caracterización del virus es particularmente interesante desde el punto de vista epidemiológico o para diferenciar cepas vacinales de cepas de campo. Una técnica utilizada históricamente con este fin, fue la Inhibición de la hemaglutinación (IHA), donde se desarrollaron métodos que lograron diferenciar la variante 2c de la 2b del CPV (Nakamura y col., 2004). Sin embargo estas técnicas solo pudieron ser aplicadas en muestras de heces con óptima actividad hemaglutinante o con aislamientos de virus obtenidos de cultivos celulares. Solo especímenes obtenidos con títulos mayores o iguales a 1:64 pudieron ser caracterizados, pero sin embargo, muchas muestras con altos títulos de ADN viral resultaron negativos o pobremente positivos para la hemaglutinación (Decaro y col., 2005c; Desario y col., 2005). Actualmente, la secuenciación genética de fragmentos amplificados del genoma viral, es el método más adecuado para la caracterización de CPV, el cual está siendo utilizado para conocer la distribución de las variantes del virus en distintas regiones geográficas y comprender así su evolución (Maya y col., 2013; Kaelber y col., 2012).

10. Respuesta inmune protectora contra Parvovirus:

La respuesta inmune protectora contra Parvovirus Canino es predominantemente humoral, siendo los anticuerpos capaces de neutralizar la mayoría de las partículas virales. La importancia de los anticuerpos en la protección contra la infección, ha sido demostrada por la efectividad de la inmunidad materna mediada por anticuerpos, que confiere eficientemente protección contra Parvovirus. Se ha visto claramente que la inmunidad mediada por células, juega un rol importante y tiene que ver fundamentalmente con la recuperación de la enfermedad (Hoelzer y Parrish, 2010).

En cachorros, los anticuerpos derivados de la madre (MDA), representan la mayor protección contra la infección por CPV, pero al mismo tiempo estos anticuerpos interfieren con la vacunación contra el virus (Gooding y Robinson, 1982; Chappuis, 1998). Los anticuerpos son transferidos de la madre a su descendencia principalmente a través de la placenta y el calostro. Aunque también títulos considerables de anticuerpos contra CPV han sido observados en la leche, estos probablemente proporcionan alguna protección en la mucosa intestinal frente a la infección por CPV (Decaro y col., 2004). La inmunidad derivada de la madre protege fuertemente a los animales jóvenes contra la infección por CPV secuestrando el virus antes de la aparición de la viremia, previniendo así la colonización del epitelio intestinal (Macartney y col., 1988b). En un trabajo realizado en perros con diferentes títulos de anticuerpos hemoaglutinantes, se demostró que los grupos con títulos de 320 y 160 no desarrollaron signos clínicos considerables luego de la infección por CPV. En los perros con títulos de 80 ocurrieron síntomas leves de diarrea, depresión y anorexia en los días 4 a 9 post infección. Síntomas más severos, que incluyeron vómitos, fiebre y diarrea al día 4 a 9 post infección, ocurrieron en los perros con títulos de 40 y en los del grupo con títulos menores a 10. En este último grupo además fue registrada una transitoria leucopenia con 40 – 45% de reducción del recuento de glóbulos blancos. El grupo con títulos de anticuerpos de 320 fue el único donde no se encontró el virus en las heces en ningún momento (Fig. 3). Por lo tanto, con esto se puede observar que la severidad de los signos clínicos es inversamente proporcional a los títulos de anticuerpos presentes al momento del desafío (Decaro y col., 2005a).

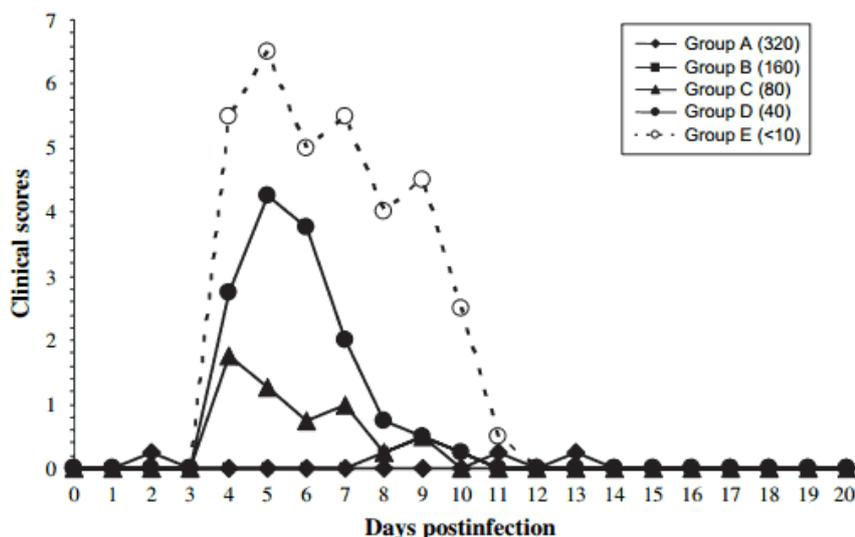


Fig 3: Imagen extraída de Decaro y col., 2005a, donde se observan la relación entre la sintomatología clínica de Parvovirus canina en función de los títulos de anticuerpos maternos medidos por Inhibición de la Hemaglutinación. A mayor título de anticuerpos, menor sintomatología evidente luego de la infección

Como consecuencia de la protección que brinda los anticuerpos maternos al momento de la infección de un cachorro, también se observa una declinación de los anticuerpos maternos circulantes, que podría explicarse por la formación de complejos inmunes tanto a nivel sanguíneo como en la mucosa intestinal, secuestrando el virus desafiante en activa replicación, limitando y retrasando la replicación viral y su eliminación fecal (Macartney y col., 1988b).

Se ha reportado que las variantes 2a y 2b del parvovirus son eliminadas en heces en títulos mucho más altos que la variante original (CPV-2), probablemente como consecuencia de la adaptación de las variantes al hospedero. Para esto, las variantes 2a y 2b del CPV debieron haber generado la habilidad de replicarse en cachorros con altos títulos de MDA los cuales previenen la replicación de la variante original de CPV (Carmichael, 1994; Decaro y col., 2005a).

Del punto de vista de la respuesta inmune generada por caninos expuestos al virus de forma natural, en un estudio realizado en Uruguay con 142 animales adultos sin antecedentes de vacunación, se encontró que un 89,4% y 91% fueron seropositivos a CPV-2 y CPV-2c respectivamente, con títulos hemaglutinantes promedios de 1/930 y 1/1370 (Eliopulos y col., 2010). Esto demuestra el alto porcentaje de inmunización natural que ocurre con CPV en estos animales y si bien ya no se detecta la variante CPV-2 en la naturaleza, existen reacciones cruzadas entre esta y las nuevas variantes, lo que explica el alto porcentaje encontrado en este trabajo. Por otro lado, si consideramos como títulos protectores por hemaglutinación aquellos mayores o iguales a 1/80, la población estudiada estaría, en promedio, ampliamente protegida de forma natural contra la enfermedad (Eliopulos y col., 2010).

11. Eficacia de las vacunas actuales contra las nuevas variantes de virus:

A finales de 1970 y principio de 1980 ambas vacunas vivas e inactivadas de FPL fueron usadas para proteger a perros contra la enfermedad causada por CPV, debido a que los antígenos compartidos estimulaban una suficiente protección cruzada entre ambos virus (Chalmers y col., 1999). Sin embargo, los niveles de protección que ofrecían eran pobres y con corta duración de inmunidad. Estas vacunas fueron reemplazadas con vacunas conteniendo CPV vivas atenuadas, las cuales proporcionaron una excelente protección y una larga duración de la inmunidad. Actualmente las vacunas vivas atenuadas en su mayoría son producidas con las cepas CPV-2 y algunas son fabricadas con la variante 2b. Desde que el virus tipo 2 fue enteramente reemplazado a campo por los virus 2a, 2b y ahora 2c, existe actualmente una preocupación mundial sobre el nivel de protección que ofrece las vacunas atenuadas del tipo 2 original (Pratelli y col., 2001; Truyen, 1999).

Sin embargo, estas diferencias antigénicas, no serían la única causa de una falla en la protección de animales vacunados contra CPV. Otros factores que también juegan un rol clave en la correcta inmunización de los cachorros están relacionados con la interferencia de la inmunidad pasiva, el estado de salud de los animales (sobre todo la parasitosis y la nutrición), la cantidad de dosis de vacunas administradas y el tiempo entre la última inmunización y la exposición al virus (Puentes, 2012b).

En relación a la interferencia de la inmunidad pasiva y la vacunación, si bien desde hace muchos años se conoce que existe una clara interferencia de la inmunidad materna frente a la vacunación y que se han establecidos que títulos de IHA mayores o iguales a 20 pueden causar fallas en la inmunización mediante vacunación contra CPV (Pollock y Carmichael, 1982b), algunos trabajos recientes han demostrado que a pesar de que exista interferencia, la mayoría de los animales seroconvierten adecuadamente. De Cramer y col. (2011) realizaron un experimento con 121 cachorros de 3 razas (Rottweilers, Ovejeros Alemanes y Mastiff Sudafricano) los cuales fueron divididos en grupos y vacunados unos a las 4 semanas de vida con una vacuna monovalente conteniendo la cepa 2 (Primodog – Merial – Francia) y otros a las 6 semanas con una vacuna polivalente (Eurican DA2PPi2 – Merial – Francia). A pesar de los altos títulos de anticuerpos maternos, el 80% de los animales vacunados a las 4 semanas seroconvirtieron con valores mayores o iguales al mínimo valor de anticuerpos establecido para proteger contra CPV. El 20% restante de este grupo seroconvirtieron en la segunda dosis de vacunación. Este trabajo demuestra claramente que esa interferencia puede ser relativa y los cachorros con títulos de anticuerpos maternos, podrían responder adecuadamente a la vacunación contra CPV, generando títulos capaces de protegerlo frente a la exposición al patógeno. En este sentido, se ha establecido que los títulos de anticuerpos maternos en los cachorros descienden aproximadamente entre los días 40 y 69, según la exposición que tenga el animal a virus de calle (Iida y col., 1990). Por lo tanto, es por eso que se sugiere que la primera inmunización contra CPV sea a partir del día 30, teniendo en cuenta que aun persistiendo los anticuerpos maternos, los cachorros podrían responder adecuadamente a la vacunación. La misma realizada más tarde, podría suponer una infección de los animales, por una baja de la inmunidad materna que podría ser fatal.

La interferencia de los anticuerpos maternos con la inmunización activa contra CPV ha sido parcialmente superada utilizando ya sea vacunas con alto título (Burtonboy y col., 1991; Hoare y col., 1997) o con vacunación intranasal (Buonavoglia y col., 1994; Martella y col., 2005a). La vacunación intranasal, si bien no es utilizada en la práctica veterinaria, es capaz de provocar una respuesta inmune en animales con títulos de MDA de IHA de 160 (Martella y col., 2005a). Esto sugiere que existe una replicación activa de la cepa vacunal en el epitelio de la orofaringe de estos cachorros, a pesar de la presencia de altos títulos de MDA.

En otro sentido, en cuanto a la protección de las vacunas y las nuevas variantes del virus, varios autores han demostrado marcadas diferencias en los títulos de anticuerpos por seroneutralización *in vitro*, entre cepas homólogas y cepas heterólogas, encontrándose mayores diferencias entre cepas 2 y las variantes 2a y 2b, que entre las mismas variantes (2a y 2b) (Pratelli y col., 2001, Ohshima y col., 2008, Cavalli y col., 2008) (Fig. 4). Además, estudios con anticuerpos monoclonales, han demostrado que cada nueva variante antigénica ha perdido al menos un epítipo neutralizante comparado con la ex variante, lo que podría significar de alguna manera diferencias del punto de vista inmunológico (Strassheim y col., 1994; Pereira y col., 2007).

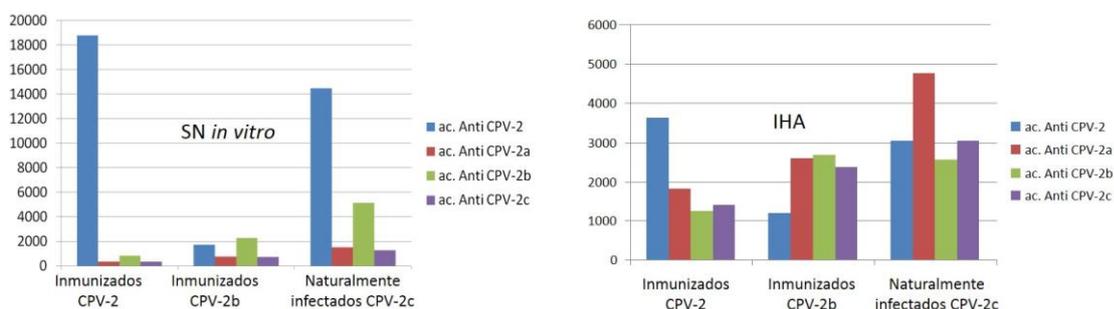


Fig 4: Imagen realizada por Puentes (2012c) con datos extraídos de Cavalli y col., 2008, donde se muestran la reacción cruzada *in vitro* utilizando Seroneutralización (SN) e Inhibición de la Hemaglutinación (IHA) entre cepas homólogas y heterólogas de CPV.

Sumado a estas significativas diferencias en cuanto a la reacción cruzada *in vitro* entre cepas de CPV (lo que podría suponer una efectividad limitada de la vacunación), también se han encontrado animales infectados naturalmente con el virus, que tenían historia de vacunación previa (Pérez y col., 2007; Calderón y col., 2009; Puentes y col., 2012b) (Tabla 2). En un trabajo realizado por Castro y col. (2011), fueron analizadas un total de 37 muestras fecales de cachorros con historial de vacunación contra CPV, los cuales presentaban signos clínicos de gastroenteritis y confirmación de infección por CPV en pruebas de laboratorio. La mayoría de las muestras eran de cachorros mayores a 4 meses, 20 de estos vacunados con vacunas multivalente de CPV-2, otros 3 vacunados con CPV-2b, para los 14 restantes no se conocía el tipo de vacuna administrada. En los 3 cachorros vacunados con la cepa CPV-2b, se encontró la variante CPV-2a y CPV-2b, en los cuales no se encontró la mutación en el nucleótido 4494 (A – G), que es

característica de la cepa vaccinal, confirmando que la infección fue por cepas de campo y no causada por los virus de la vacuna.

Tabla 2: Imagen extraída de Calderón y col., 2009 donde se observan el alto porcentaje de perros con CPV que habían sido vacunados previamente (81%). De estos, el 50% tenían la cepa CPV-2c en muestras de materia fecal.

Age, gender, vaccination records and clinical signs of dogs infected with CPV.

Strain	Year	Age (month)	Sex	Breed	Vaccination status	Clinical signs	CPV strain	Procedence
Arg 1	2002	NA	NA	R	NA	NA	CPV2a	NA
Arg 2	2003	4	F	D	V (C)	+	CPV2a	Buenos Aires
Arg 3	2003	6	M	R	NV	+	CPV2b	Buenos Aires
Arg 4	2003	4	M	LR	V (I)	+	CPV2a	Buenos Aires
Arg 5	2003	135	M	NA	V (C)	+	CPV2b	Buenos Aires
Arg 6	2003	5	M	MB	V (C)	+	CPV2a	Buenos Aires
Arg 7	2003	NA	F	MB	V (NA)	+	CPV2a	Buenos Aires
Arg 8	2003	6	F	C	V (C)	+	CPV2c	Buenos Aires
Arg 9	2003	5	M	MB	NV	+	CPV2a	Buenos Aires
Arg 10	2003	4	F	R	V (C)	+	CPV2b	Buenos Aires
Arg 11	2003	4	F	MB	V (C)	+	CPV2a	Buenos Aires
Arg 12	2005	NA	M	AD	NA	NA	CPV2c	Buenos Aires
Arg 13	2005	NA	NA	NA	NV	NA	CPV2c	Buenos Aires
Arg 14	2007	1	M	ST	V (C)	+	CPV2c	Bahía Blanca
Arg 15	2007	NA	M	SFT	V (NA)	+	CPV2c	Bahía Blanca
Arg 16	2007	3	M	YT	V (C)	NA	CPV2b	Mar del Plata
Arg 17	2007	3	F	P	V (C)	NA	CPV2a	Mar del Plata
Arg 18	2007	2	M	MP	V (C)	+	CPV2a	Mar del Plata
Arg 19	2008	2	M	R	V (C)	+	CPV2c	Buenos Aires
Arg 20	2008	2	NA	AD	V (C)	+	CPV2c	Bahía Blanca
Arg 21	2008	2	NA	AD	V (C)	+	CPV2c	Bahía Blanca
Arg 22	2008	2	NA	AD	V (C)	+	CPV2c	Bahía Blanca
Arg 23	2008	2	NA	AD	V (C)	+	CPV2c	Bahía Blanca
Arg 24	2008	5	M	MB	V (C)	+	CPV2c	Buenos Aires
Arg 25	2008	2	F	MS	V (C)	+	CPV2c	Tandil
Arg 26	2008	2	M	GS	V (C)	+	CPV2c	Río Negro
Arg 27	2008	2	M	GS	V (C)	+	CPV2c	Río Negro

F: female; M: male; MB: mixed breed; LR: Labrador Retriever; GS: German Shepherd; R: Rottweiler; D: Doberman; AD: Argentine Dogo; MS: Miniature Schnauzer; ST: Sky Terrier; YT: Yorkshire Terrier; SFT: Smooth Fox Terrier; C: Cocker; P: Poodle; MP: Miniature Poodle; V: vaccinated; NV: non-vaccinated; C: complete vaccination according to its age; I: incomplete vaccination; NA: no information available; Y: yes.

Sin embargo, por otro lado y contradiciendo estos hallazgos, varios autores demuestran que existe suficiente protección cruzada entre las cepas 2 y las nuevas variantes virales frente a la infección con CPV, lo que supone pensar que las vacunas siguen siendo vigentes y protegen contra las nuevas variantes que han aparecido de CPV. Greenwood y col. (1995) demostraron que vacunas atenuadas con CPV-2, son capaces de proteger a perros contra desafíos de campo de cepas 2a y 2b. Spibey y col. (2008) también demostraron en un ensayo a campo que, perros vacunados con una sola dosis de una vacuna comercial con CPV-2 (Nobivac – Intervet) estuvieron protegidos contra los desafíos con el tipo 2c salvaje; asimismo, esta cepa aislada fue capaz de causar una severa enteritis y una marcada leucopenia en perros no vacunados. También se demostró que la vacuna, además de proteger a los perros contra la enfermedad, previene la eliminación del virus por las heces. Con respecto a la protección, los títulos de anticuerpos en los perros vacunados fueron tan altos como aquellos en los perros no vacunados y recuperados. Este trabajo demuestra que a pesar de las diferencias entre la cepa original tipo 2 y las variantes 2a, 2b y 2c, los perros vacunados con una vacuna del tipo 2, llegan a generar una fuerte respuesta inmune contra CPV y están plenamente protegidos contra los desafíos de campo (Spibey y col., 2008).

Otro trabajo experimental realizado recientemente por Wilson y col. (2013) demuestra que la vacunación con la cepa CPV-2b de una vacuna comercial (Duramune DAPPI+LC, Zoetis), brinda protección efectiva contra la enfermedad, la leucopenia y la eliminación del virus, luego de haber desafiado a cachorros de entre 8 y 9 semanas de edad con una cepa fuertemente virulenta de CPV-2c. Este trabajo

aplicó 2 dosis de dicha vacuna con una separación de 3 semanas, todos los animales vacunados mostraron fuerte protección y no manifestaron signos clínicos ni leucopenia luego del desafío con el virus. Sin embargo, el grupo de cachorros control manifestó la enfermedad luego del desafío.

Al margen de todas estas controversias en las investigaciones realizadas en todo el mundo en relación a la protección producida por las vacunas entre las cepas de Parvovirus canino existentes y las nuevas tecnologías aplicadas en vacunas contra CPV, todavía se observa muchos casos de Parvovirus clínica en caninos. Sin embargo, esto ocurre casi exclusivamente en animales jóvenes que son infectados en las primeras semanas de vida, cuando los anticuerpos maternos adquiridos pasivamente están disminuyendo y todavía no tienen un plan de vacunación apropiado. Igualmente como se mencionó, la detección de casos de parvovirus en animales vacunados, demuestran que existirían fallas en la vacunación que deberían ser estudiadas con mayor profundidad (Puentes, 2012b). Los factores inherentes a la vacuna que pueden afectar la respuesta inmune posvacunación contra CPV son el título del virus vaccinal, el grado de atenuación del virus, las propiedades antigénicas de la cepa vaccinal y la vía de administración (Martella y col., 2005a). En este sentido, varios autores sugieren que las vacunas actuales deberían ser diseñadas con las nuevas variantes virales de CPV, con el fin de obtener mayor protección de los animales inmunizados (Truyen, 2006). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, estas diferencias antigénicas parecen ser más notorias en ensayos *in vitro* y no tanto en la protección real a campo de animales inmunizados y desafiados posteriormente.

Y por último, otras de las causas que deben ser tenidas en cuenta al hablar de eficacia de vacunas, es la calidad y el título de los antígenos presentes y la inocuidad de las mismas (Decaro y col., 2006a). En Uruguay todas las vacunas comercializadas son de marcas reconocidas (nacionales y extranjeras), lo que podría suponer que son de buena calidad. En este sentido, en cuanto a la posibilidad de que las vacunas contra CPV causen enfermedad, cabe señalar que la reversión de la virulencia del virus vivo modificado (MLV) en vacunas contra CPV ha sido postulado muchas veces, pero nunca fue demostrado. Sin embargo, la atenuación de la virulencia ha sido probada ser muy estable (Bass y col., 1982). En un trabajo realizado por Decaro y col. (2007) donde se analizaron muestras fecales de animales que desarrollaron gastroenteritis poco después de la vacunación contra CPV, se demostró que la diarrea observada se relacionaba a la infección por cepas de campo de CPV-2. Fueron detectadas cepas vaccinales en algunos animales, pero generalmente estaban asociados a cepas de campo de CPV-2 o con otros patógenos asociados comúnmente a enteritis en perros (Decaro y col., 2007a) (Tabla 3). Y en cuanto a la calidad de los antígenos presentes en las vacunas, investigaciones hechas en Uruguay han evaluado la capacidad infectante *in vitro* de las vacunas a virus atenuado que se comercializan en el Uruguay (obtenidas de refrigeradores de clínicas veterinarias), encontrando que 8 de 10 vacunas analizadas tenían al menos el virus viable capaz de replicarse en cultivos celulares. Esto no quiere decir que las vacunas en Uruguay funcionen, pero significa que en un principio el virus se encuentra en condiciones de replicarse en células y potencialmente inducir una respuesta inmune cuando inoculadas en los animales (Franco y Puentes, 2011).

Tabla 3: Imagen extraída de Decaro y col., 2007a donde se puede observar los patógenos detectados en caninos con diarrea que tenían historia reciente de vacunación contra CPV. En la mayoría de los casos que se detectaron virus vaccinal como posible causante del cuadro clínico, también se detectaron otros patógenos.

Results of the diagnostic tests carried out on faecal samples of dogs displaying diarrhoea after CPV vaccination

Protocol no.	Origin	Vaccine	Company	D.p.v.	CPV vaccine strain	CPV field strain	Other pathogens
120/04	Hungary	Vanguard 7 ^a	Pfizer	3	ND	2a	ND
306/04	Italy, Apulia	Vanguard 7 ^a	Pfizer	2	ND	2a	ND
326/04	Italy, Apulia	?	?	4	2	2a	ND
11/05	Italy, Marche	Duramune DAPPI + LC ^b	Fort Dodge	3	2b SAH	ND	CCoV I, II
49/05-C	Italy, Piemonte	Nobivac PUPPY CP ^a	Intervet	5	ND	2a	ND
112/05	Italy, Lazio	Tetradog-CHPL ^a	Merial	7	ND	2c	ND
121/05-A	Poland	Duramune DA2LP + Pv ^a	Fort Dodge	2	ND	2a	CCoV I, II
121/05-B	Poland	Duramune DA2LP + Pv ^a	Fort Dodge	2	ND	2a	CCoV I, II
121/05-C	Poland	Duramune DA2LP + Pv ^a	Fort Dodge	2	ND	2a	CCoV I, II
128/05	Hungary	Nobivac PUPPY CP ^a	Intervet	2	ND	2a	MRV
159/05-C	Italy, E. Romagna	Nobivac PUPPY CP ^a	Intervet	7	ND	2a	ND
160/05	Italy, Apulia	Canigen CEPPi/L ^a	Virbac	4	2	ND	CCoV I, II
176/05-A	Italy, Piemonte	Nobivac PUPPY CP ^a	Intervet	4	2	ND	CCoV I
202/05	Italy, Lombardia	Primodog ^a	Merial	3	2	2a	ND
206/05	Italy, Apulia	?	?	3	ND	2a	CDV, MRV
220/05	Italy, Veneto	Nobivac CEPPi ^a	Intervet	3	2	ND	CCoV I, II
280/05	Italy, Apulia	Duramune DAPPI + LC ^b	Fort Dodge	3	ND	2a	CCoV II
327/05	Italy, Campania	Vanguard 7 ^a	Pfizer	2	ND	2c	ND
338/05-2	Italy, Lombardia	Duramune DAPPI + LC ^b	Fort Dodge	6	2b SAH	ND	ND
338/05-4	Italy, Lombardia	Duramune DAPPI + LC ^b	Fort Dodge	7	2b SAH	ND	ND
343/05-1	Italy, Piemonte	Nobivac PARVO-c ^a	Intervet	4	ND	2a	ND
343/05-8	Italy, Piemonte	Nobivac PARVO-c ^a	Intervet	7	2	ND	ND
343/05-9	Italy, Piemonte	Nobivac PARVO-c ^a	Intervet	4	ND	2a	ND
97/06-3	United Kingdom	?	?	?	2	ND	CCoV I
174/06	Hungary	Nobivac [®] PUPPY CP ^a	Intervet	6	2	ND	CCoV II
254/06-11	Italy, Apulia	Primodog ^a	Merial	7	2	ND	<i>Isospora canis</i>
254/06-12	Italy, Apulia	Primodog ^a	Merial	7	2	ND	<i>Isospora canis</i>
269/06	Italy, Apulia	Tetradog-CHPL ^a	Merial	3	ND	2c	CCoV II
291/06	Italy, Piemonte	Nobivac PUPPY CP ^a	Intervet	3	2	2a	ND

D.p.v., days after vaccination in which the onset of diarrhoea was observed; ND, not detected; ?, unknown.

^a Type 2-based vaccines.

^b Type 2b-based vaccines.

12. Conclusiones

- El origen del CPV aun es incierto, se cree que deriva de una variante del virus de la Panleucopenia felina (FPV) o de los FPV – like de carnívoros salvajes.
- La rápida generación de nuevas variantes del CPV son causa de una alta tasa de mutaciones en las proteínas de la cápside, que han ocurrido desde su origen.
- Estas nuevas variantes han sustituido por completo al CPV-2 original y alcanzaron una rápida distribución a nivel mundial.
- En Uruguay y la región el virus está presente hace ya varias décadas, siendo la variante CPV-2c predominante sobre las otras.
- Desde el año 2010, en Uruguay, la cepa CPV-2a está reemplazando la CPV-2c, como consecuencia de la invasión de una cepa extranjera.
- CPV produce una severa enfermedad en perros con signos clínicos caracterizados principalmente por una enteritis hemorrágica aguda y marcada leucopenia. Se ha comprobado que las nuevas variantes producen una enfermedad más severa en comparación con la variante original CPV-2.
- Como método diagnóstico, la Inmunocromatografía es lo más utilizado en la práctica de las clínicas veterinarias, aunque posee una sensibilidad relativamente baja. Lo mismo sucede con el aislamiento viral, hemoaglutinación y ELISA, pero además, estos últimos necesitan laboratorios especializados para su implementación.
- Actualmente las técnicas moleculares son de elección para la detección del virus, como ser PCR y qPCR, ambas con altas sensibilidad y especificidad.
- En los últimos años se está implementando la secuenciación genética como método de caracterización del virus, esto es muy útil desde el punto de vista epidemiológico para diferenciar entre variantes o para diferenciar cepas vacunales de cepas de campo.
- Sobre la respuesta inmune, en cachorros, los anticuerpos derivados de la madre, representan la mayor protección contra la infección por CPV, pero al mismo tiempo estos anticuerpos interfieren con la vacunación contra el virus, dejando una ventana de susceptibilidad a la infección entre la 4^o y 12^o semana de vida del cachorro.
- Aunque algunos autores afirman que a pesar de que exista interferencia, la mayoría de los animales seroconvierten adecuadamente, generando títulos capaces de protegerlos frente a la exposición del patógeno.
- Las vacunas utilizadas actualmente para prevenir la infección, son elaboradas con CPV vivo atenuado, la mayoría producidas con cepa CPV-2 original y algunas con la cepa CPV-2b. Ambas proporcionan una excelente protección y una larga duración de la inmunidad.
- Con respecto a la inmunidad cruzada, en ensayos *in vitro* se han encontrado diferencias significativas en los títulos de anticuerpos entre virus homólogos y heterólogos. Sin embargo, los títulos alcanzados por virus heterólogos serían suficientes para proteger contra CPV. En ensayos *in vivo* se ha observado que la vacunación con cepas heterólogas brinda buena protección a los animales.
- Los factores que juegan un rol clave en la correcta inmunización de los cachorros están relacionados con la interferencia de la inmunidad pasiva, el estado de salud de

los animales, la cantidad de dosis de vacunas administradas y el tiempo entre la inmunización y la exposición al virus.

13. Bibliografía:

1. Appel, M. J. G.; Parrish, C. R. (1987) Canine parvovirus type 2. En: Appel, M. J (Ed), *Virus Infections of Carnivores*, Elsevier, New York. V. 1, p. 69 – 62.
2. Bass, E. P.; Gill, M. A.; Beckenhauer, W. H. (1982) Development of a modified live, canine origin parvovirus vaccine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181: 909-913.
3. Binn, L. N.; Lazar, E. C.; Hedi, G. A.; Kajima, M. (1970) Recovery and characterization of a Minute Virus of Canines. *Infect. Immun.* 1: 503-508.
4. Buonavoglia, C.; Cavalli, A.; Gravino, E.; Voigt, V.; Buonavoglia, D.; DeCaprariis, D. (1994) Intranasal vaccination of pups with maternally derived antibodies with a modified live canine parvovirus. *J. Vet. Med. B.* 41: 3-8.
5. Buonavoglia, C.; Martella, V.; Pratelli, A.; Tempesta, M.; Cavalli, A.; Buonavoglia, D.; Bozzo, G.; Elia, G.; Decaro, N.; Carmichael, L. (2001) Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *J. Gen. Virol.* 82: 3021-3025.
6. Burtonboy, S.; Charlier, P.; Hertoghs, J.; Lobmann, M.; Wiswman, A.; woods, S. (1991) Performance of high-titre attenuated canine parvovirus vaccine in pups with maternally derived antibody. *Vet. Rec.* 128: 377-381.
7. Caillet-Fauquet, P.; Perros, M.; Brandenburger, A.; Spegelaere, P.; Rommelaere, J. (1990) Programmed Killing of human cells by means of an inducible clone of parvoviral genes encoding non-structural proteins. *Embo. J.* 9: 2989-2995.
8. Calderón, M. G.; Mattion, N.; Bucafusco, D.; Fogel, F.; Remorini, P.; La Torre, J. (2009) Molecular characterization of canine parvovirus strains in Argentina: Detection of the pathogenic variant CPV2c in vaccinated dogs. *J. Virol. Methods.* 159: 141-145.
9. Calderón, M. G.; 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 Res.* 157: 106-110.
10. Calderón, M. G.; 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 Gen.* 44: 32-39.
11. Carmichael, L. E. (1994) Canine parvovirus type-2. An evolving pathogen of dogs. *Ann. Med. Vet.* 138: 459-464.
12. Castro, T. X.; Costa, E. M.; Leite, J. P. G.; Labarthe, N. V.; Cubel Garcia, R. C. N. (2010) Partial VP2 sequencing of canine parvovirus (CPV) strains circulating in the state of Rio de Janeiro, Brazil: Detection of the new variant CPV-2c. *Braz. J. Microbiol.* 41: 1093-1098.
13. Castro, T. X.; Costa, E. M.; Leite, J. P.; Labarthe, N. V.; Cubel Garcia, R. C. (2011) Monitoring of canine parvovirus (CPV) strains detected in vaccinated puppies in Brazil. *Res. Vet. Sci.* 90(2): 336-40.
14. Cavalli, A.; Martella, V.; Desario, C.; Camero, M.; Bellacicco, A.; De Palo, P.; Decaro, N.; Elia, G.; Buonavoglia, C. (2008) Evaluation of the antigenic relationships among canine parvovirus type 2 variants. *Clin. Vacc. Immunol.* 15(3): 534-539.
15. Chalmers, W. S. K., Truyen, U., Greenwood, N. M., Baxendale, W. (1999) Efficacy of feline panleukopenia vaccine to prevent infection with an isolate of CPV2b obtained from a cat. *Vet. Microbiol.* 69: 41-45.
16. Chappuis, G. (1998) Neonatal immunity and immunization in early stage: lessons from veterinary medicine. *Vaccine* 16: 1468-1472.

17. Cotmore, S. F.; Tattersall, P. (1987) The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv. Virus Res.* 33: 91-174.
18. De Cramer, K. G. M.; Stylianides, E.; Van Vuuren, M. (2011) Efficacy of vaccination at 4 and 6 weeks in the control of canine parvovirus. *Vet. Microbiol.* 149: 126-132.
19. Decaro, N.; Desario, C.; Campolo, M.; Cavalli, A.; Ricci, D.; Martella, V.; y col. (2004) Lactogenic immunity to canine parvovirus in pups. *New Microbiol.* 27: 375-379.
20. Decaro, N.; Campolo, M.; Desario, C.; Elia, G.; Martella, V.; Lorusso, E.; Buonavoglia, C. (2005a) Maternal-derived antibodies in pups and protection from canine parvovirus infection. *Biologicals* 33: 259-265.
21. Decaro, N.; Desario, C.; Campolo, M.; Elia, G.; Martella, V.; Ricci, D.; Lorusso, E.; Buonavoglia, C. (2005b) Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17: 133-138.
22. Decaro, N.; Elia, G.; Martella, V.; Desario, C.; Campolo, M.; Trani, L. D.; Tarsitano, E.; Tempesta, M.; Buonavoglia, C. (2005c) A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. *Vet. Microbiol.* 105: 19-28.
23. Decaro, N.; Desario, C.; Elia, G.; Campolo, M.; Lorusso, A.; Mari, V.; Martella, V.; Buonavoglia, C. (2006a) Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: A clinical and laboratory diagnostic dilemma. *Vaccine* 25: 1161-1166.
24. Decaro, N.; Martella, V.; Desario, C.; Bellacicco, A. L.; Camero, M.; Manna, L.; d'Aloja, D.; Buonavoglia, C. (2006b) First detection of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* 53: 468-472.
25. Decaro, N.; Desario, C.; Elia, G.; Campolo, M.; Lorusso, A.; Mari, V.; Martella, V.; Buonavoglia, C. (2007a) Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: A clinical and laboratory diagnostic dilemma. *Vaccine* 25: 1161-1166.
26. Decaro, N.; Martella, V.; Elia, G.; Desario, C.; Campolo, M.; Lorusso, E.; Colaianni, M. L.; Lorusso, A.; Buonavoglia, C. (2007b) Tissue distribution of the antigenic variants of canine parvovirus type 2 in dogs. *Vet. Microbiol.* 121: 39-44.
27. Desario, C.; Decaro, N.; Campolo, M.; Cavalli, A.; Cirone, F.; Elia, G.; Martella, V.; Lorusso, E.; Camero, M.; Buonavoglia, C. (2005) Canine parvovirus infection: Which diagnostic test for virus? *J. Virol. Methods.* 126:179-185
28. Eliopoulos, N.; Finger, P.; Nunes, C.; Castro, C.; Moreno, J.; Hubner, S.; Puentes, R. (2010) Immune response to canine parvovirus (CPV): Comparison of antibodies to CPV-2 and CPV-2c in unvaccinated dogs. XX Encontro Nacional de Virologia, V Encontro de Virologia do Mercosul. Gramado, RS, Brasil.
29. Esfandiari, J., Klingeborn, B. (2000) A comparative study of a new rapid and one-step test for the detection of parvovirus in faeces from dogs, cats and mink. *J. Vet. Med. B.* 47: 145-153.
30. Flint, S. J.; Enquist, L. W.; Racaniello, V. R.; Skalka, A. M. (2003) Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses. 2a ed., ASM, Press.

31. Franco G, Puentes R. (2011) Detección y aislamiento de Parvovirus canino a partir de vacunas comerciales. 7mas Jornadas Técnicas de la Facultad de Veterinaria. Montevideo – Uruguay. p. 63.
32. Gooding, G. E.; Robinson, W. F. (1982) Maternal antibody, vaccination and reproductive failure in dogs with parvovirus infection. *Aust. Vet. J.* 59: 170-174.
33. Greene, C. E.; Decaro, N. (2011) Canine viral enteritis. En: Greene, C.E. (Ed), *Infectious diseases of the dog and cat*, 4a ed. WB Saunders, Philadelphia, PA.
34. Greenwood, N. M., Chalmers, W. S. K., Baxendale, W., Thompson, H. (1995) Comparison of isolates of canine parvovirus by restriction enzyme analysis and vaccine efficacy against field strains. *Vet. Rec.* 136: 63-67.
35. Hoare, C. M.; DeBouck, P.; Wiseman, A. (1997) Immunogenicity of a low-passage, high-titre modified live canine parvovirus vaccine in pups with maternally derived antibodies. *Vaccine* 15: 273-275.
36. Hoelzer, K.; Shackelton, L. A.; Parrish, C. R.; Holmes, E. C. (2008) Phylogenetic analysis reveals the emergence, evolution and dispersal of carnivore parvoviruses. *J. Gen. Virol.* 89: 2280-2289.
37. Hoelzer, K.; Parrish, C. (2010) The emergence of parvoviruses of carnivores. *Vet. Res.* 41(6):39.
38. Hong, C.; Decaro, N.; Desario, C.; Tanner, P.; Pardo, M. C.; Sanchez, S.; Buonavoglia, C.; Saliki, J. T. (2007) Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19: 535-539.
39. Hueffer, K.; Parrish, C. R. (2003a) Parvovirus host range, cell tropism and evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 392-398.
40. Hueffer, K.; Parker, J. S.; Weichert. W. S.; Geisel, R. E.; Sgro, J. Y.; Parrish, C. R. (2003b) The natural host range shift and subsequent evolution of canine parvovirus resulted from virus – specific binding to the canine transferrin receptor. *J. Virol.* 77: 1718-1726.
41. Kaelber, J.T.; Demogines, A.; Harbison, C.E.; Allison, A.B.; Goodman, L.B.; Ortega, A.N.; Sawyer, S.L.; Parrish, C.R. (2012) Evolutionary reconstruction of the transferring receptor of caniforms supports canine parvovirus being a reemerged and not a novel pathogen in dogs. *Plos Pathogens*, disponible en: www.plospathogens.org. Fecha de consulta: May 2012. 8 (5): e1002666.
42. Kumar, M.; Nandi, S. (2010) Development of a SYBR Green based real-time PCR assay for detection and quantitation of canine parvovirus in faecal samples. *J Virol. Meth.* 169: 198-201.
43. Li, X.; Rhode III, S. L. (1990) Mutation of Lysine 405 to Serine in the Parvovirus H-1 NS1 abolish its function for viral DNA replication, late promoter trans activation and cytotoxicity. *J. Virol.* 64: 4654-4660.
44. Lida, H.; Fukuda, S.; Kawashima, N.; Yamazaki, T.; Aoki, J.; Tokita, K.; Morioka, K.; Takarada, N.; Soeda, T. (1990) Effect of maternally derived antibody levels on antibody responses to canine parvovirus, canine distemper virus and infectious canine hepatitis virus after vaccinations in beagle puppies. *Jikken Dobutsu.* 39: 9-19.
45. Macartney, L.; Parrish, C. R.; Binn, L. N.; Carmichael, L. E. (1988a) Characterization of minute virus of canines (MVC) and its pathogenicity for pups. *Cornell Vet.* 78: 131-145.

46. Macartney, L.; Thompson, H.; McCandlish, I. A.; Cornwell, H. J. (1988b) Canine parvovirus: interaction between passive immunity and virulent challenge. *Vet. Rec.* 122: 573-576.
47. Martella, V.; Cavalli, A.; Decaro, N.; Elia, G.; Desario, C.; Campolo, M.; Bozzo, G.; Tarsitano, E.; Buonavoglia, C. (2005a) Immunogenicity of an intranasally administered modified live canine parvovirus type 2b vaccine in pups with maternally derived antibodies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12: 1243-1245.
48. Martella, V.; Decaro, N.; Elia, G.; Buonavoglia, C. (2005b) Surveillance activity for canine parvovirus in Italy. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* 52: 312-315.
49. Marulappa, S.; Kapil, S. (2009) Simple tests for rapid detection of canine parvovirus antigen and canine parvovirus-specific antibodies. *Clin. Vac. Immunol.* 16(1): 127-131.
50. Maya, L.; Calleros, L.; Francia, L.; Hernández, M.; Iraola, G.; Panzera, Y.; Sosa, K.; Pérez, R. (2013) Phylodynamics analysis of canine parvovirus in Uruguay: evidence of two successive invasions by different variants. *Arch. Virol.* 158: 1133-1141.
51. McKenna, R.; Olson, N. H.; Chipman, P. R.; Baker, T. S.; Booth, T. F.; Christensen, J.; Aasted, B.; Fox, J. M.; Bloom, M. E.; Wolfenbarger, J.B.; Agbandje-Mckenna, M. (1999) Three-dimensional structure of aleutian mink disease parvovirus: implications for disease pathogenicity. *J. Virol.* 73: 6882-6891.
52. Moon, H. S.; Lee, S. A.; Lee, S. G.; Choi, R.; Jeoung, S. Y.; Kim, D.; Hyun, C. (2008) Comparison of the pathogenicity in three different Korean canine parvovirus 2 (CPV-2) isolates. *Vet. Microbiol.* 131: 47-56.
53. Murphy, F. A.; Fauquet, C. M.; Mayo, M. A.; Jarvis, S. A.; Ghabrial, S. A.; Summers, M. D.; y col. (1995) International Committee on Taxonomy of Viruses, International Union of Microbiological Societies. Virology Division Virus Taxonomy/G: classification and nomenclature of viruses: Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol. (Suppl.)* 586p.
54. Naeger, L.K.; Salome, N.; Pintel, D.J. (1993) NS2 is required for efficient translation of viral mRNA in minute virus of mice-infected murine cell. *J. Virol.* 67: 1034-1043.
55. Nakamura, M.; Tohya, Y.; Miyazawa, T.; Mochizuki, M.; Phung, H. T.; Nguyen, N. H.; Huynh, L. M.; Nguyen, L. T.; Nguyen, P. N.; Nguyen, P. V.; Nguyen, N. P.; Akashi, H. (2004) A novel antigenic variant of Canine parvovirus from a Vietnamese dog. *Arch. Virol.* 149: 2261-2269.
56. Ohshima, T.; Hisaka, M.; Kawakami, K.; Kishi, M.; Tohya, Y.; Mochizuki, M.; (2008) Chronological analysis of canine parvovirus type 2 isolates in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 70(8): 769-775.
57. Op De Beeck, A.; Anouja, F.; Mousset, S.; Rommelaere, J.; Caillet-Fauquet, P. (1995) The nonstructural proteins of the autonomous parvovirus minute virus of mice interfere with the cell cycle, inducing accumulation in G2. *Cell Growth Diff.* 6:781-787.
58. Parrish, C. R. (1991a) Mapping specific functions in the capsid structure of canine parvovirus and feline panleukopenia virus using infectious plasmid clones. *Virology* 183: 195-205.

59. Parrish, C. R.; Aquadro, C. F.; Strassheim, M. L.; Evermann, J. F.; Sgro, J. Y.; Mohammed, H. O. (1991b) Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *J. Virol.* 65: 6544-6552.
60. Parrish, C. R. (1994) The emergence and evolution of canine parvovirus – an example of recent host range mutation. *Semin. Virol.* 5: 121-132.
61. Parrish, C. R. (1995) Pathogenesis of feline panleukopenia virus and canine parvovirus. *Baillieres Clin. Haematol.* 8: 57-71.
62. Parrish, C. R. (1999) Host range relationships and the evolution of canine parvovirus. *Vet. Microbiol.* 69: 29-40.
63. Pereira, C. A. D.; Leal, E. S.; Durigon, E. L. (2007) Selective regimen shift and demographic growth increase associated with the emergence of high fitness variants of canine parvovirus. *Infect. Genet. Evol.* 3: 399-409.
64. Pereira, N. A.; Monezi, T. A.; Pereira, C. A. D.; Richtzenhain, L. J.; Durigon, E. L. (2008) Antigenic characterization of canine parvovirus isolates from Brazil using specific monoclonal antibodies. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 45(5): 385-389.
65. Pérez, R.; Francia, L.; Romero, V.; Maya, L.; López, I.; Hernández, M. (2007) First detection of canine parvovirus type 2c in South America. *Vet. Microbiol.* 124: 147-152.
66. Pérez, R.; Bianchi, P.; Calleros, L.; Francia, L.; Hernandez, 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. *Vet. Microbiol.* 155: 214-219.
67. Phromnoi, S.; Sirinarumitr, K.; Sirinarumitr, T. (2010) Sequence analysis of VP2 gene of canine parvovirus isolates in Thailand. *Virus Genes* 41: 23-29.
68. Pinto, L. D.; Streck, A. F.; Goncalves, K. R.; Souza, C. K.; Corbellini, A. O.; Corbellini, L. G.; Canal, C. W. (2012) Typing of canine parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010. *Virus Res.* 165: 29-33.
69. Pollock, R. V. (1982a) Experimental canine parvovirus infection in dogs. *Cornell. Vet.* 72: 103-119.
70. Pollock, R. V.; Carmichael, L. E. (1982b) Maternally derived immunity to canine parvovirus infection: transfer, decline and interference with vaccination. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 180: 37-42.
71. Pratelli, A.; Cavalli, A.; Martella, V.; Tempesta, M.; Decaro, N.; Carmichael, L.E.; Buonavoglia, C. (2001) Canine parvovirus vaccination: comparison of neutralising antibody responses in pups after inoculation with CPV2 or CPV2b modified live virus vaccines. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 8: 612-615.
72. Puentes, R.; Eliopulos, N.; Finger, P.; Castro, C.; Nunes, C.; Furtado, A.; Franco, G.; Hubner, S. (2010) Detección viral en cachorros con diagnóstico presuntivo de Parvovirus canino (CPV). *Veterinaria (Montevideo)*. 46(177-180): 47-49.
73. Puentes, R.; Eliopulos, N.; Pérez, R.; Franco, G.; Sosa, K.; Bianchi, P.; Furtado, A.; Hubner, S.; Esteves, P. (2012a) Isolation and characterization of canine parvovirus type 2c (CPV-2c) from symptomatic puppies. *Braz. J. Microbiol.* 43(3):1005-9.
74. Puentes, R. (2012b) Parvovirosis canina: situación actual y protección de las vacunas contra las nuevas variantes virales circulantes en la región. *Vet. (Montevideo)* 48 (185): 5-10.

75. Puentes, R. (2012c) Situación actual y eficacia de las vacunas contra las nuevas variantes de Parvovirus canino. Disertación en las 1as Jornadas de Sanidad Animal realizadas en la Facultad de Veterinaria – Universidad de la República Oriental del Uruguay. (Poster).
76. Reed, A. P.; Jones, E. V.; Miller, T. J. (1988) Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. *J. Virol.* 62: 266-276.
77. Shackelton, L. A.; Parrish, C. C.; Truyen, U.; Holmes, E. C. (2005) High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:379:384.
78. Spibey, N.; Greenwood, N. M.; Sutton, D.; Chalmers, W. S.; Tarpey, I. (2008) Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. *Vet. Microbiol.* 128(1-2):48-55.
79. Steinel, A.; Parrish, C. R.; Bloom, M. E.; Truyen, U. (2001) Parvovirus infection in wild carnivores. *J. Wildl. Dis.* 37: 594-607.
80. Strassheim, M. L.; Grumberg, A.; Veijalainen, P.; Sgro, J-Y.; Parrish, C. R. (1994) Two dominant neutralizing antigen determinants of canine parvovirus are found on the threshold of the three fold spike of the virus capsid. *Virology* 198: 175-184.
81. Steck, A. F.; Souza, C. K.; Zang, L.; Pinto, L. D.; Canal, C. W. (2009) First detection of canine parvovirus type 2c in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 40: 465-469.
82. Streck, A.F.; Rüster, D.; Truyen, U.; Homeier, T. (2013) An updated TaqMan real-time PCR for canine and feline parvovirus. *J. Virol. Met.* 193: 6-8.
83. Truyen, U.; Parrish, C. R. (1992) Canine and feline host ranges of canine parvovirus and feline panleukopenia virus: distinct host cell tropism of each virus in vitro and in vivo. *J. Virol.* 66: 5399-5408.
84. Truyen, U.; Platzer, G.; Parrish, C. R.; Hanichen, T.; Hermanns, W.; Kaaden, O. R. (1994) Detection of canine parvovirus DNA in paraffin – embedded tissues by polymerase chain reaction. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 41: 148-152.
85. Truyen, U.; Gruenberg, A.; Chang, S. F.; Obermaier, B.; Veijalainen, P.; Parrish, C. R. (1995) Evolution of feline – subgroup parvoviruses and the control of canine host range in vivo. *J. Virol.* 69: 4702-4710.
86. Truyen, U.; Evermann, J. F.; Vieler, E.; Parrish, C. R. (1996) Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range. *Virology* 215: 186-189.
87. Truyen, U.; Geissler, K.; Parrish, C. R.; Hermanns, W.; Siegl, G. (1998a) No evidence for a role of modified live virus vaccines in the emergence of canine parvovirus. *J. Gen. Virol.* 79(5): 1153-1158.
88. Truyen, U.; Muller, T.; Heidrich, R.; Tackmann, K.; Carmichael, L. E. (1998b) Survey on viral pathogens in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) in Germany with emphasis on parvoviruses and analysis of DNA sequence from a red fox parvovirus. *Epidemiol. Infect.* 121: 433-440.
89. Truyen, U. (1999) Emergence and recent evolution of canine parvovirus. *Vet. Microbiol.* 69: 47-50.
90. Truyen, U. (2006) Evolution of canine parvovirus – A need for a new vaccines? *Vet. Microbiol.* 117: 9-13.
91. Vanacker, J. M.; Laudet, V.; Adelmant, G.; Stehelin, D.; Rommelaere, J. (1993) Interconnection between thyroid hormone signaling pathways and parvovirus cytotoxic functions. *J. Virol.* 67: 7668-7672.

92. Wilson, S.; Stirling, C.; Borowski, S.; Thomas, A.; King, V.; Salt, J. (2013) Vaccination of dogs with Duramune DAPPi+LC protects against pathogenic canine parvovirus type 2c challenge. *Vet. Rec.* 172(25): 662.
93. 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: 397-402.