



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS

UDELAR | fcien.edu.uy

Análisis diagnóstico y filogenético de parvovirus canino en Uruguay

TESINA DE GRADO PARA LA LICENCIATURA
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Emma Condon

Sección Genética Evolutiva,

Facultad de Ciencias,

Universidad de la República.

Orientadora: Lic. Sofía Grecco

Co-orientador: Lic. Eddie Fuques

2020

Índice

1. Resumen.....	4
2. Abreviaturas	5
3. Introducción	6
3.1. La familia <i>Parvoviridae</i>	6
3.2. Características generales del parvovirus canino	7
3.2.1. Genoma viral	7
3.2.2. Proteínas virales	8
3.2.3. Estructura del virión	9
3.2.4. Ciclo viral y replicación del genoma	10
3.3. Parvovirus canina.....	12
3.3.1. Aspectos clínicos	12
3.3.2. Diagnóstico y tratamiento.....	13
3.3.3. Prevención mediante vacunación	14
3.4. Aspectos evolutivos.....	15
3.4.1. Origen y evolución.....	15
3.4.2. Parvovirus canino en Uruguay	16
4. Objetivos	17
4.1. Objetivo general.....	17
4.2. Objetivos específicos.....	17
5. Materiales y métodos	18
5.1. Muestras.....	18
5.2. Datos de las muestras analizadas.....	18
5.3. Obtención de ADN y diagnóstico molecular	20
5.4. Caracterización genética mediante la secuenciación parcial del gen vp2	21
5.5. Obtención de la secuencia completa del gen vp2.....	22
5.6. Análisis bioinformático.....	22
5.6.1. Obtención de secuencias consenso y generación del conjunto de datos.....	22
5.6.2. Análisis filogenético.....	23
6. Resultados	24
6.1. Diagnóstico y caracterización mediante secuenciación parcial del gen VP2	24
6.3. Análisis comparativo de secuencias.....	26

6.4. Análisis filogenético.....	29
7. Discusión	32
8. Conclusiones.....	37
9. Perspectivas	38
10. Anexos	39
10.1. Anexo 1.....	39
10.2. Anexo 2.....	40
10.3. Anexo 3.....	55
10.4. Anexo 4.....	58
10.4. Anexo 5.....	58
11. Referencias bibliográficas	59
12. Agradecimientos	66

1. Resumen

El parvovirus canino (CPV por sus siglas en inglés) es un virus pequeño, de cápside icosaédrica cuyo tamaño varía entre 18 y 26 nm. Su genoma está compuesto por una molécula de ADN simple hebra de polaridad negativa de 5,2 kilobases de longitud. CPV es el agente etiológico de una de las enfermedades virales más frecuentes en perros, la parvovirus canina. El virus afecta principalmente a los cachorros entre las 6 semanas y los 4 meses de edad, pudiendo infectar además a diversos miembros de la familia *Canidae*, y a otros mamíferos como mapaches, comadreas, zarigüeyas y coatíes. Esta enfermedad se caracteriza por presentar gastroenteritis hemorrágica en cachorros y adultos, y miocarditis aguda en cachorros menores a dos meses. Debido a la alta tasa de mortalidad y a la facilidad de contagio, resulta de gran importancia su atención clínica y vacunación preventiva.

El virus se identificó por primera vez en Estados Unidos en 1978, y la primera variante encontrada se nombró CPV-2. En 1979, un año después de la aparición de CPV-2, se identificó una nueva variante denominada CPV-2a, que reemplazó completamente a la variante original CPV-2 a nivel mundial. CPV-2a constituye un linaje monofilético que evolucionó y originó el resto de las variantes que circulan hoy en día. Actualmente se reconocen tres variantes antigénicas, 2a, 2b y 2c, las cuales pueden diferenciarse en base al aminoácido 426 de la proteína VP2, que implica un cambio del epítipo contra el que se realizan los anticuerpos neutralizantes. En Uruguay, nuestro grupo de trabajo reportó en el año 2007 la circulación de una variante CPV-2c, primera aparición de esta variante en Sudamérica. CPV-2c fue la única circulando en el país hasta el año 2010, cuando se reportó la presencia de la variante CPV-2a, la cual rápidamente pasó a ser predominante en el territorio. Ambas variantes surgen en el territorio como consecuencia de invasiones intercontinentales de Europa y Asia.

La gran variabilidad genética que presenta este virus, en conjunto con la particular dinámica que pueden presentar los virus que infectan animales de compañía (sujeta a la movilidad del ser humano), hacen que sea de gran importancia el constante relevamiento de las cepas circulantes en nuestro país y en la región.

En el presente trabajo se realizó el relevamiento mediante el diagnóstico de 26 muestras colectadas en Uruguay entre los años 2017 y 2020. Se secuenciaron para su análisis y caracterización 14 de las 20 muestras positivas, las cuales pertenecen en su totalidad a la variante antigénica CPV-2a. Análisis filogenéticos revelaron que estas secuencias agrupan dentro de un clado junto con secuencias pertenecientes al clado Asia I, lo que confirma que pertenecen a este clado de origen asiático que circula en nuestro país desde el año 2010. Esta información es relevante tanto para la clínica veterinaria como para estudios epidemiológicos y futura evaluación de vacunas actualmente utilizadas en el territorio. Asimismo, su estudio en Uruguay aporta información sobre la variabilidad del virus y contribuye al conocimiento de este importante patógeno.

2. Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATP: Adenosín trifosfato

CPV: Parvovirus canino

CPV-1: Parvovirus canino tipo 1

CPV-2: Parvovirus canino tipo 2

CPV-2a: Parvovirus canino tipo 2a

CPV-2b: Parvovirus canino tipo 2b

CPV-2c: Parvovirus canino tipo 2c

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato

FPV: Virus de la panleukopenia felina

HA: Ensayo de hemaglutinación

IC: Inmunicromatografía

ICTV: Comité internacional de Taxonomía de Virus

NLS: Señal de localización nuclear

NS: Proteína no estructural

ORF: Marco abierto de lectura

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PLA2: Fosfolipasa A2

T: Número de triangulación

TfR: Receptor de la transferrina

UFBoot: Ultrafast bootstrap

UV: Ultra violeta

VP: Proteínas de la partícula viral

WSAVA: Asociación veterinaria mundial de pequeños animales

Unidades

µg/µL: Microgramos por microlitro

µL: Microlitro

µM: Micromolar

g: Gramo

kb: Kilobases

mL: Mililitro

mM: Milimolar

nt: Nucleótidos

°C: Grados centígrados

pb: Pares de bases

rpm: Revoluciones por minuto

U/µL: Unidades por microlitro

Aminoácidos

Ala: Alanina

Arg: Arginina

Asn: Asparagina

Asp: Acido aspártico

Glu: Glutamina

Gly: Glicina

Ile: Isoleucina

Leu: Leucina

Lys: Lisina

Met: Metionina

Phe: Fenilalanina

Ser: Serina

Thr: Treonina

Tyr: Tirosina

3. Introducción

3.1. La familia *Parvoviridae*

El parvovirus canino (CPV) pertenece a la familia *Parvoviridae*, la cual está integrada por virus pequeños (como indica su nombre, proveniente del latín “parvus” pequeño) cuyo tamaño ronda los 25 nm. Poseen un genoma compuesto por ADN simple hebra, generalmente de polaridad negativa, con una longitud de aproximadamente 5 kilobases (kb) (Reed et al., 1988).

Según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés), esta familia se divide en dos subfamilias debido al rango de hospederos, *Densovirinae* que infecta a artrópodos y *Parvovirinae* que infecta a vertebrados. *Densovirinae* contiene cinco géneros: *Ambidensovirus*, *Brevidensovirus*, *Hepadensovirus*, *Iteradensovirus* y *Penstydensovirus* (ICTV, 2019). En el género *Ambidensovirus* se encuentran virus que poseen genoma *ambisense*, pueden ser leídos en ambos sentidos (Cotmore et al., 2014).

Por su parte, la subfamilia *Parvovirinae* está compuesta por ocho géneros: *Amdoparvovirus*, *Bocaparvovirus*, *Averparvovirus*, *Copiparvovirus*, *Dependoparvovirus*, *Erythroparvovirus*, *Protoparvovirus* y *Tetraparvovirus* (ICTV, 2019) (Figura 1). Los virus del género *Dependovirus* generalmente necesitan coinfectar con un virus *helper* adenovirus o herpesvirus para poder replicarse, y se insertan en el genoma del huésped hasta que ocurra esta coinfección. Esto se debe a que para poder completar su ciclo replicativo requieren proteínas codificadas por el virus *helper*, y varios componentes del complejo de replicación celular. Es necesario que el virus *helper* induzca el ingreso de la célula huésped en fase S para posibilitar la replicación exitosa del *Dependovirus* (Strauss, 2008). El resto de los parvovirus, aunque pueden replicarse de forma autónoma, requieren también componentes de la célula en fase S, por lo que infectan preferentemente animales en etapas de gestación o desarrollo, o tejidos de alta proliferación en individuos adultos (López-Bueno et al., 2006).

Los virus pertenecientes al género *Protoparvovirus* infectan a variedad de mamíferos, como roedores, cerdos y miembros del orden Carnívora (Holezer et al., 2010). Parvovirus canino pertenece a este género y es una variante de la especie *Carnivore protoparvovirus 1*, en la cual se incluye al virus de la panleukopenia felina, virus de la enteritis del visón y al parvovirus del mapache (Cotmore et al., 2014).

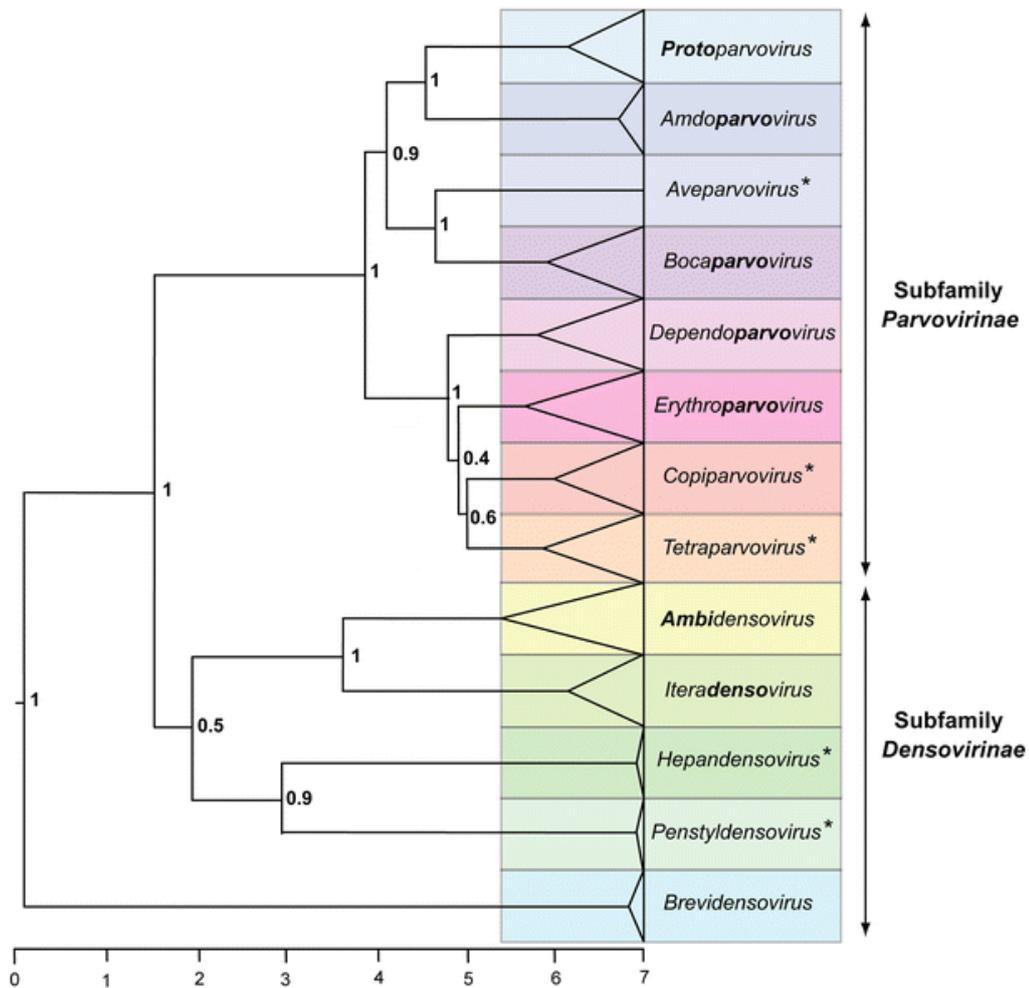


Figura 1. Árbol filogenético de los géneros de la familia *Parvoviridae*. Tomado de Cotmore et al., 2014.

3.2. Características generales del parvovirus canino

3.2.1. Genoma viral

El genoma de CPV está compuesto por una molécula de ADN simple hebra de polaridad negativa y de aproximadamente 5,2 kb de longitud. Posee dos marcos abiertos de lectura (ORFs, por sus siglas en inglés) denominados ORF1 y ORF2 que codifican para proteínas no estructurales (NSs) y de la partícula viral (VPs) (Reed et al., 1988) (Figura 2). Además, cuenta con repetidos invertidos en ambos extremos del genoma que se aparean formando estructuras en horquilla. Éstas son utilizadas como cebadores para la replicación y preservación de la integridad de las secuencias terminales, presentes en todos los parvovirus autónomos (Berns, 1990; Cotmore et al., 2018). Cercanos al extremo 5' se ubican dos grupos de repetidos directos, ambos compuestos por monómeros de aproximadamente 60 nucleótidos. El primer motivo se repite dos veces y el segundo tres, en ambos casos existen cambios en la secuencia nucleotídica de los repetidos (Reed et al., 1990)

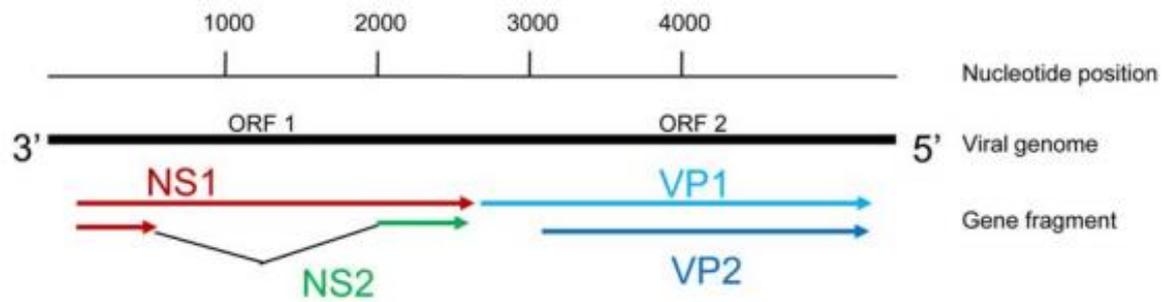


Figura 2. Esquema del genoma de CPV y transcritos de los genes. El genoma se representa en dirección 3'-5' por ser de polaridad negativa. Tomado de Hoeltzer et al., 2008.

3.2.2. Proteínas virales

El ORF1, ubicado hacia el extremo 3', codifica para las proteínas no estructurales NS1 y NS2, cuyo transcrito se diferencia por la eliminación de un intrón en la maduración del ARNm de NS2, mediante la utilización de un mecanismo de corte y empalme. Por esta razón, el extremo N-terminal de las proteínas resultantes es idéntico y se diferencian en el extremo C-terminal, ya que la eliminación del intrón resulta en un corrimiento del marco abierto de lectura (Hoelzer et al., 2008).

Las proteínas no estructurales cumplen diversas funciones a lo largo del ciclo viral. La proteína NS1 es una fosfoproteína multifuncional dependiente de ATP, necesaria para el inicio de la replicación del virus debido a sus funciones de endonucleasa y helicasa (Niskanen et al., 2010). Actúa como factor en trans, activando el promotor P38 que regula la expresión de las proteínas VP (Christensen et al., 1995), y regula su propia expresión mediante la unión al promotor P4 (Hanson et al., 1991). Además, NS1 estaría relacionada con el efecto citopático del virus, el empaquetamiento del genoma viral, y la apoptosis celular post-infección (Parrish et al., 2005; Cotmore et al., 1996). Las funciones de NS2 no son tan comprendidas como las de NS1, pero se sabe que está relacionada al tráfico nuclear y ensamblaje de las partículas virales de forma específica al huésped infectado (Miller et al., 2002). Aun así, no parece tener un rol importante en la infección de CPV, ya sea en cultivos celulares o en animales (Wang et al., 1998).

El ORF2, ubicado hacia el extremo 5', codifica para las proteínas estructurales VP1 (de 727 aminoácidos) y VP2 (de 584 aminoácidos), que conforman la cápside del virión (Hoelzer et al., 2008). Sus transcritos se diferencian mediante un mecanismo de corte y empalme alternativo, el cual permite el uso de diferentes codones de inicio. Hay dos sitios donadores de empalme para cada transcrito, pero un solo sitio aceptor común de empalme. En el caso de VP1, utiliza el segundo donador de empalme y el aceptor común, eliminándose el intrón en medio de ambas secuencias. De esta forma se genera un codón de inicio entre la unión de ambos extremos del empalme, y el ARNm resultante genera una proteína con un extremo N-terminal de 143 aminoácidos denominado secuencia única de VP1. VP1 posee en la secuencia única un dominio fosfolipasa A2 (PLA2) que interviene en el escape del virus desde el endosoma hacia el citoplasma celular, y una señal de localización nuclear responsable del transporte viral hacia el núcleo celular (Vihinen-Ranta et al., 1997; Vihinen-Ranta et al., 2002). Para la expresión de VP2 se utiliza el primer sitio donador de empalme y el aceptor de empalme común, eliminándose el intrón entre ambos y utilizando un codón de inicio diferente a VP1 ubicado aproximadamente a 400 nucleótidos corriente arriba, resultando en una

proteína más corta (Cotmore et al., 2007). Las proteínas VP1 y VP2 se producen con una relación de 1:5 (Cotmore et al., 2007). Existe una tercera proteína estructural VP3, que se origina por clivaje post traduccional de aproximadamente 20 aminoácidos de VP2, lo cual ocurre una vez que la cápside se ensambla y se empaqueta el ADN (Tsao et al., 1991).

La proteína VP2 interacciona con el receptor celular de la transferrina tipo 1 en la célula huésped (Parker et al., 2001; Hueffer et al., 2003) a través de los residuos aminoácidos ubicados en las posiciones 93, 299 ó 300 y 323 (Callaway et al., 2017). Debido a esto, cambios en su secuencia pueden alterar la infectividad del virus y su rango de huésped. Posee sitios antigénicos importantes, y es contra esta proteína que se generan los anticuerpos neutralizantes del sistema inmune del hospedero (Parrish et al., 2005; López de Turiso et al., 1992). Además, una propiedad interesante de VP2 es que puede auto ensamblarse formando *virus-like particles (VLP)* (López de Turiso et al., 1992).

3.2.3. Estructura del virión

CPV es un virus desnudo cuya cápside presenta simetría icosaédrica. En el virión infectivo, la cápside está formada por 60 unidades de las proteínas VP, lo cual significa que tiene un número de triangulación 1 ($T=1$). Las proporciones de las proteínas en la misma corresponden a un 10% de VP1 y un de 90% VP2 y VP3 (Weichert et al., 1998). De acuerdo con la simetría icosaédrica, posee tres ejes de simetría: segundo, tercero y quinto. Estos ejes poseen diferentes estructuras: en el segundo eje una depresión, en el tercer eje una espícula y en el quinto eje una estructura en forma de cañón y un poro que atraviesa la estructura (Figura 3) (Tsao et al., 1991).

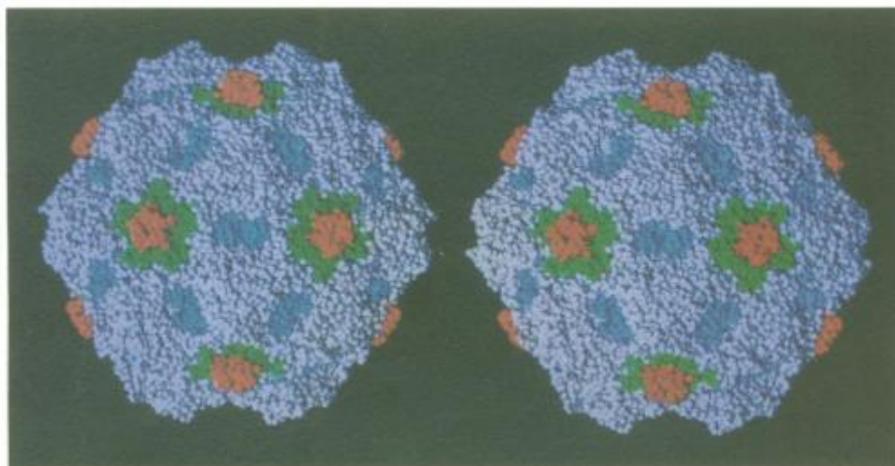


Figura 3. Vista externa del virión de CPV. Cada región está representada por un color: en verde las regiones de barriles β ; en celeste las regiones que forman las espículas del tercer eje de simetría; en rojo las estructuras cilíndricas del quinto eje de simetría; en azul las depresiones del segundo eje de simetría. Imagen tomada de Tsao et al., 1991.

Cada una de las subunidades proteicas que forman la cápside consisten en una estructura que es común en virus con este tipo de simetría, la cual se compone de un barril β de ocho láminas anti paralelas, unidas por lazos que conforman la superficie de la cápside (Figura 4). La variación en estos lazos genera diferentes propiedades biológicas. La estructura de barril β ocupa aproximadamente un tercio de la secuencia de las proteínas, mientras que los otros dos tercios corresponden a los lazos entre las láminas β (Agbandje et al., 1995). Las láminas β se

nombran alfabéticamente a partir del extremo N-terminal, y se agrupan de a 4 formando dos hojas: B-I-D-G y C-H-E-F. Estas se enfrentan formándose entre ellas puentes de hidrógeno, para formar el barril β .

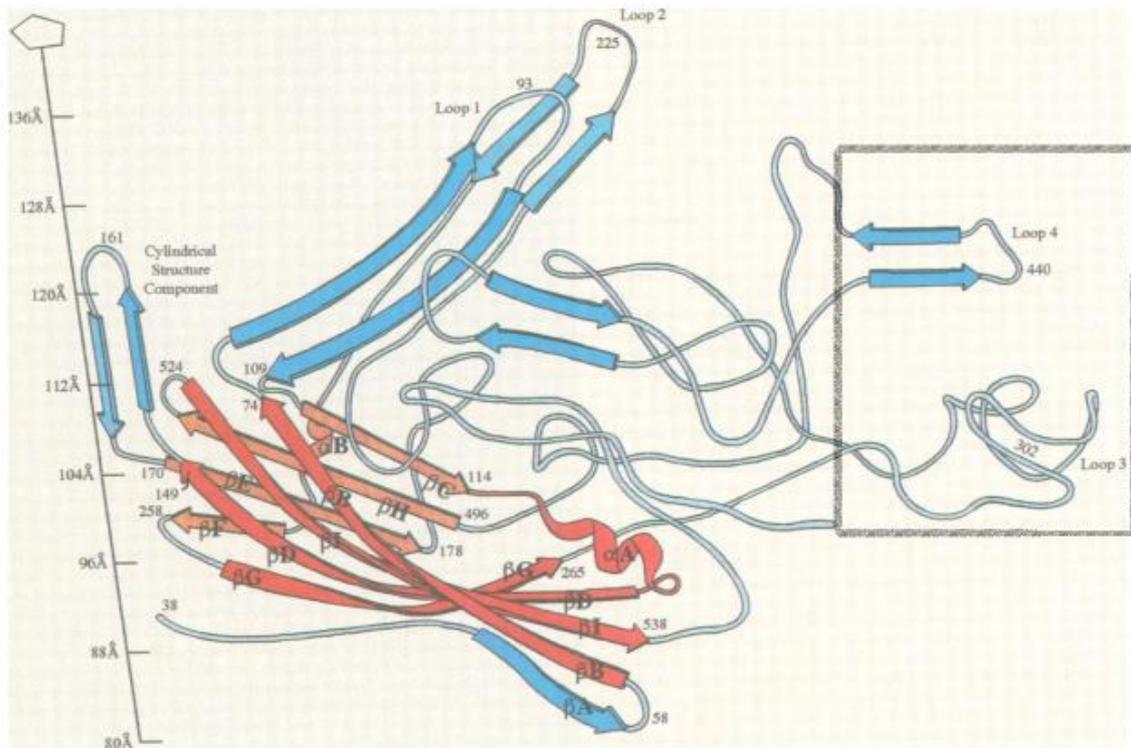


Figura 4. Estructura de la proteína VP2. En rojo se muestran las láminas β que conforman el barril β , señaladas por β y su correspondiente letra. Las inserciones entre las hojas β se muestran en azul. Los cuatro lazos, que en conjunto con estructuras equivalentes adyacentes forman la espícula del tercer eje de simetría se señalan como “Loop 1, 2, 3 y 4”. Se señala con un recuadro los lazos 3 y 4, pertenecientes al lazo GH. Imagen de Tsao et al., 1991.

Los lazos entre las hojas se denominan de acuerdo con las láminas β que unen. El lazo GH, incluye a los lazos 3 y 4, es particularmente grande, con 232 residuos (entre los residuos 267 y 498), y se visualiza como una espícula en el eje de simetría 3 de la cápside (Tsao et al., 1991). Desde un punto de vista antigénico, dos sitios de neutralización importantes se encuentran en el lazo GH, los cuales incluyen a los residuos 299, 300, 302 y 426, siendo el residuo 300 el más variable de CPV (Hurtado et al., 1996). Mientras tanto, los residuos 299, 300, 301 y 323 se relacionan directamente con el rango de hospedero del virus (Agbandje et al., 1995). Los residuos aminoacídicos que interactúan con el receptor celular son 93, 299, 300 y 323 (Callaway et al., 2017), el residuo 93 se encuentra en el lazo 1 mientras que el resto se encuentra en el lazo GH (Agbandje et al., 1995). Sin embargo, en la estructura de la cápside, los lazos 1, 3 y 4 de tres diferentes moléculas de VP2 se encuentran muy próximos (Hurtado et al., 1996), pudiendo interactuar estos residuos en conjunto con el receptor celular.

3.2.4. Ciclo viral y replicación del genoma

CPV se une a la célula huésped por medio de su interacción con el receptor celular de la transferrina (TfR) e infecta de manera primaria células pertenecientes a órganos linfáticos y luego a sus células blanco en el intestino delgado (Hueffler et al., 2003). El virus es endocitado

junto con el receptor por vesículas recubiertas de clatrina (Vihinen-Ranta, 2004). Desde éstas se transporta a endosomas tempranos y luego a vesículas endosomales perinucleares. No está claro cómo sucede su escape de las vesículas, pero se presume que está relacionado con el dominio PLA2 presente en VP1 (Suikkanen et al., 2003) (Figura 5).

Una vez en el citoplasma el virus se dirige al núcleo, transportado por dineína a través de los microtúbulos (Suikkanen et al., 2003). Se cree que esto está relacionado con la presencia de una señal de localización nuclear (NLS) en VP1. Esta NLS es expuesta debido a la modificación de la cápside por el proteosoma celular cuando se encuentra en el citoplasma. CPV ingresa al núcleo a través del poro nuclear por medio de un proceso activo, que requiere ATP e interacción con factores solubles celulares (Vihinen-Ranta et al., 2004) (Figura 5).

En el núcleo celular es en donde se realiza la replicación y transcripción, utilizando factores proteicos y polimerasas celulares (Vihinen-Ranta et al., 2004). También es en el núcleo donde tiene lugar el ensamblado de los viriones (Berns, 1990).

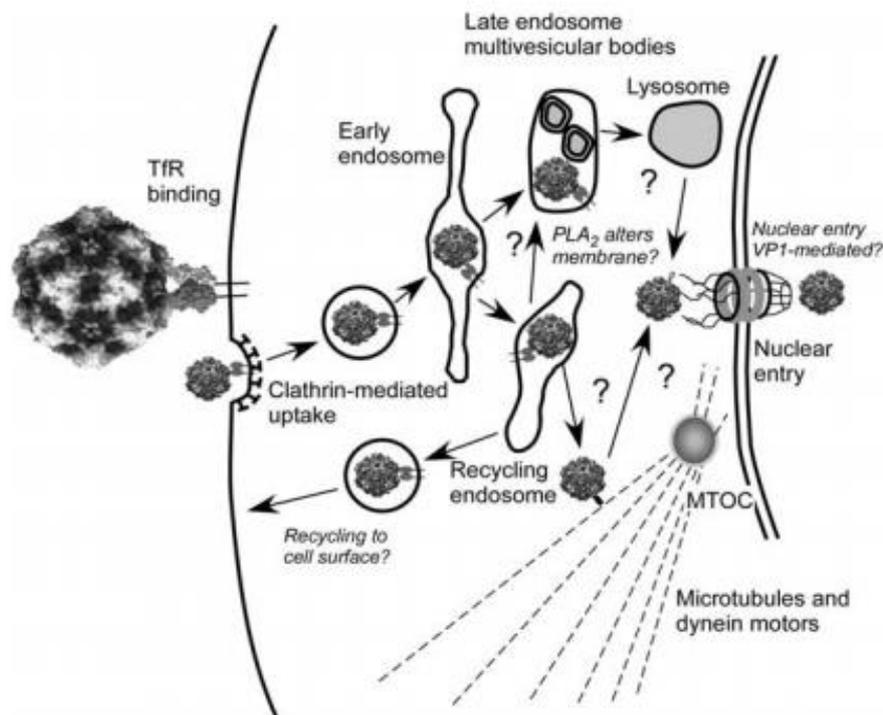


Figura 5. La adsorción, penetración y ruta probable a través de la célula durante una infección de parvovirus canino. Tomado de Vihinen-Ranta et al., 2006.

La replicación del genoma viral se da por un mecanismo similar al de círculo rodante, denominado de horquilla rodante. En éste, se usa la complementariedad de la estructura en horquilla del extremo 3' como cebador para iniciar la síntesis de la hebra complementaria positiva. Este intermediario se utilizará como molde para los ARNm de las proteínas NS. Al llegar la síntesis al extremo 5', que también forma una estructura en horquilla al plegarse sobre sí mismo, se cree que se liga a la nueva hebra formando una estructura covalentemente cerrada. Seguidamente, la proteína NS1 realiza un corte de una sola hebra a aproximadamente 20 nucleótidos del extremo 5' de la hebra parental que fue ligado recientemente, uniéndose de forma covalente al extremo 5' resultante y dejando un extremo 3'OH libre para que continúe la replicación hasta el final de la hebra molde. Luego de esto, la hebra que se está

sintetizando forma una estructura plegada sobre sí misma a la altura del extremo 3'OH denominada "orejas de conejo", la cual aporta un nuevo cebador, y como molde queda disponible el ADN sintetizado hasta ese momento. De esta forma, cuando termina de sintetizarse la hebra complementaria, tenemos un intermediario de doble hebra. De éste se escinden los genomas individuales, empaquetándose el genoma de sentido negativo, mientras que las secuencias de sentido positivo vuelven a replicarse (Cotmore et al., 1996; Berns, 1990) (Figura 6).

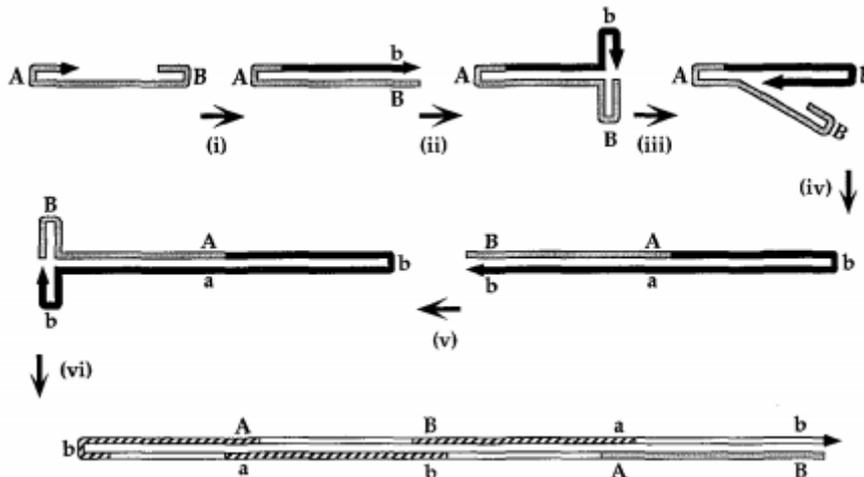


Figura 6. Esquema de la replicación de horquilla rodante para el virus diminuto del ratón (MVM). En gris se señala el genoma parental, en los pasos i a v se muestra el genoma recientemente sintetizado de color negro. En el paso vi se produce un intermediario doble hebra que repeticiones del genoma que serán escindidas para encapsidarse o continuar la replicación. Tomado de Cotmore et al., 1996.

Las proteínas NS se sintetizan antes que las VP, y desempeñan una función reguladora sobre la expresión de éstas. Luego de sintetizadas, las proteínas virales migran al núcleo, ya sea para cumplir funciones en la replicación, regulatorias de la expresión o ensamblarse en las partículas virales (Berns et al., 1990). Finalmente, la progenie del virus emerge mediante lisis celular.

3.3. Parvovirus canina

3.3.1. Aspectos clínicos

La parvovirus canina, enfermedad cuyo agente etiológico es CPV, afecta principalmente a los cachorros entre las 6 semanas y los 4 meses de edad. El virus también puede infectar además a diversos miembros de la familia *Canidae* (Nandi et al., 2010), y a otros mamíferos como gatos domésticos, mapaches, comadreja, zarigüeyas y coatíes (Truyen et al., 1996; Orozco et al., 2014, Bucafusco et al., 2019).

Esta enfermedad se caracteriza por presentar gastroenteritis hemorrágica en cachorros y adultos (Appel et al., 1979, Robinson et al., 1980), y miocarditis aguda en cachorros menores a dos meses (Robinson et al., 1979). También puede presentar otros síntomas como depresión, decaimiento, pérdida de apetito, vómitos, deshidratación y fiebre alta, pudiendo causar la

muerte. La gravedad del cuadro depende de diversos factores, como la edad del animal, estado previo de salud y plan de vacunación (Truyen 2000), o de la carga viral (Fletcher et al., 1979). Se ha observado contagio de la enfermedad en ambientes en los cuales los perros se encuentran juntos, ya sea parques, exhibiciones caninas, refugios caninos o veterinarias (Nandi et al., 2010). El contagio se da por vía fecal oral, generalmente de ocho a doce días post infección (Desario et al., 2005), por acicalarse luego de haber estado en contacto con perros infectados o ingerir alimentos del suelo donde permanece el virus.

Luego de entrar al hospedero, CPV hace una primera replicación en células de la nasofaringe, orofaringe y de nódulos linfáticos próximos. A continuación, hay una fase de viremia luego de la cual el virus se recupera de las amígdalas, los nódulos linfáticos retrofaríngeos, el timo y los nódulos linfáticos mesentéricos, todo esto aproximadamente en los primeros tres días de infección (Truyen et al., 2000; Prittie et al., 2004). Luego de los primeros tres a cinco días de infección, el virus puede encontrarse en tejidos de alta proliferación, como la médula ósea y el tracto gastrointestinal. En la médula ósea, el virus impide la formación de células jóvenes del sistema inmune, disminuyendo las defensas principales del individuo. En el tracto gastrointestinal, infecta a células de la base de las vellosidades en el íleon y el yeyuno, llamadas células de la cripta de Lieberkuhn (Parrish, 1995; Nandi et al., 2010). Al no poder regenerarse estas células, la absorción intestinal se ve comprometida y se rompe la barrera entre la luz del intestino y el interior del organismo, lo cual permite la entrada de patógenos oportunistas y causa la característica diarrea sanguinolenta (Nandi et al., 2010).

3.3.2. Diagnóstico y tratamiento

Debido a la alta tasa de mortalidad y a la facilidad de contagio de la parvovirus, es de gran importancia su atención clínica y vacunación preventiva. El diagnóstico muchas veces se dificulta debido a que los síntomas de la enfermedad son compartidos con otras afecciones caninas. Para confirmar el diagnóstico de la enfermedad se pueden usar diversas técnicas, siendo algunas de las más empleadas en laboratorios la hemaglutinación (HA), el ensayo de inmunocromatografía (IC) debido a su rapidez y facilidad de uso (usada también por veterinarios y dueños), aunque su sensibilidad no es muy alta, y las técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR en tiempo real (Desario et al., 2005). En el caso de la HA, esta puede llevar a falsos negativos ya que existen cepas del virus que no hemaglutinan (Parrish et al., 1988). Las técnicas de PCR son más efectivas y presentan mayor sensibilidad a la hora de detectar el virus, aunque pueden ser costosas y necesitan de personal entrenado (Truyen et al., 2000; Desario et al., 2005). Los abordajes moleculares permiten además la caracterización de las variantes genéticas. Una de las regiones genómicas más usadas para el diagnóstico de CPV mediante la amplificación, es un fragmento del gen vp2 que es informativo para la caracterización de la variante. Se utiliza un fragmento que incluye al codón que codifica para el aminoácido 426, el cual permite clasificar a las variantes en CPV2a, 2b y 2c y además es una región muy variable del genoma que es informativa filogenéticamente (Pérez et al., 2012; Buonavoglia et al., 2001).

El tratamiento de la enfermedad se basa en la recuperación del balance de electrolitos y el balance hídrico (Woods et al., 1980). De todas formas, para perros con casos intermedios a leves se recomienda la suspensión de alimentos por un período no mayor a 24 horas para permitir al intestino inflamado descansar, y la suspensión también de agua en el caso de no

tolerarla. Luego, una reintroducción paulatina del agua y alimentos blandos. En casos agudos, se recomienda terapia de fluidos intravenosa (Prittie et al., 2004). En algunos casos graves, es necesaria la administración de un espectro de antibióticos, ya que la rotura de la barrera intestinal puede dar lugar a infecciones bacterianas (Prittie et al., 2004).

3.3.3. Prevención mediante vacunación

A pesar de la intensiva vacunación para parvovirus canina, ésta sigue siendo una de las causas más importantes de gastroenteritis y mortalidad en canes (Voorhees et al., 2020). La prevención de la enfermedad se realiza principalmente mediante la vacunación, y las vacunas más utilizadas son a virus atenuado, las cuales inducen protección inmune duradera (Day et al., 2016). Se utilizan generalmente vacunas multivalentes que incluyen otros patógenos comunes, pero también existen vacunas monovalentes para CPV y son ampliamente recomendadas.

La inmunidad en cachorros está dada mayormente por anticuerpos maternos adquiridos a través de los primeros días de lactancia. Los anticuerpos maternos son capaces de proteger contra la infección de CPV con títulos mayores e iguales a 1:80, e interfieren con la vacunación hasta que su título es menor a 1:20. De esta manera, existe un período en el cual el título de anticuerpos maternos es capaz de neutralizar la vacunación, pero no protege contra la infección viral, en el cual los cachorros pueden contraer parvovirus (Pollock et al., 1982).

La Asociación Veterinaria Mundial de Pequeños Animales (WSAVA) considera indispensable la vacunación temprana contra CPV en perros de todo el mundo, y recomienda iniciar la vacunación en cachorros de seis a ocho semanas de edad, y continuar administrándola cada dos a cuatro semanas hasta las dieciséis semanas de edad o más, edad en la cual no deberían tener anticuerpos maternos que interfieran con la vacunación. Además, se recomienda vacunar al año y posteriormente a los tres años (Day et al., 2016). En ambientes en los cuales la prevalencia del virus es importante, como es el caso de refugios caninos, se recomienda un plan de vacunación más intensivo (Day et al., 2016). En Uruguay se encuentran disponibles vacunas de varios laboratorios, los cuales ofrecen cada uno varias vacunas (ya sea monovalentes o multivalentes) que incluyen protección contra CPV, siendo los más destacados Intervet, Merial, Tecnovax, Virbac y Zoetis (Tesis Franco, 2016).

De todas maneras, no siempre se desarrolla una inmunidad activa contra CPV mediante la vacunación, existiendo fallos en la prevención de la enfermedad (Decaro et al., 2012). Se piensa que estos fallos son la razón principal por la cual CPV continúa circulando a nivel mundial, y pueden deberse a diferentes razones como la persistencia de inmunidad materna en el momento de la vacunación, la vacunación a perros que no responden a ésta o la circulación de diferentes variantes antigénicas del virus (Decaro et al., 2020). También pueden estar relacionados con la incorrecta administración de la vacuna o su almacenamiento, aunque se piensa que esto es poco probable debido a su resistencia en el ambiente (van de Bildt et al., 2002).

Se conocen diferentes variantes antigénicas de CPV que difieren de la primera cepa descrita (CPV-2), la cual es la mayormente utilizada para la elaboración de vacunas. Existe controversia sobre la capacidad de las vacunas elaboradas con la cepa CPV-2 de proteger contra las demás variantes, o si su eficiencia disminuye (Pratelli et al., 2001). Estudios *in vitro* y en animales han demostrado que la protección cruzada generada por las vacunas es menor (Pratelli et al., 2001;

Cavalli et al., 2008; Kang et al., 2008), de todas formas, hay evidencia de que las vacunas actuales brindan protección contra la infección por las diferentes variantes antigénicas (Hernández-Blanco et al., 2015; Decaro et al., 2020). No se ha encontrado correlación entre la variante utilizada para la formulación de vacunas y los fallos de vacunación (Altman et al., 2017).

3.4. Aspectos evolutivos

3.4.1. Origen y evolución

El virus se identificó por primera vez en Estados Unidos en 1978 (Appel et al., 1978); sin embargo, estudios posteriores indicaron que ya estaba presente en Europa en 1976 (Hoelzer et al., 2010). La primera variante encontrada se nombró CPV-2, para diferenciarla de un virus anterior, CPV-1, el cual presenta un cuadro clínico similar pero no está relacionado evolutivamente (Truyen, 2000). Estudios filogenéticos han revelado que los aislamientos de CPV-2 se originaron a partir de un ancestro común muy relacionado al virus de la panleukopenia felina (FPV), con el cual CPV-2 guarda una gran similitud de epítopes y un 99.5% de identidad en sus secuencias de ADN genómico (Hueffer et al., 2003; Carmichael, 2005). CPV-2 perdió la capacidad de infectar gatos (a diferencia de FPV), pero adquirió la habilidad de infectar perros por lo que se extendió rápidamente a nivel mundial causando una pandemia con una gran mortalidad. CPV-2 difiere de FPV principalmente en cinco aminoácidos de la proteína VP2: Lys-80-Arg, Lys-93-Asn, Asp-323-Asn, Asn-564-Ser y Ala-568-Gly, a los cuales se los vincula con el cambio en el rango de hospedero (Hueffer et al., 2003).

En 1979, un año después de la aparición de CPV-2, se identificó una nueva variante denominada CPV-2a, que reemplazó completamente a la variante original CPV-2 a nivel mundial (Hoelzer et al., 2010). La variante CPV-2a recuperó la capacidad de infectar gatos y presenta cinco cambios aminoacídicos en la proteína VP2 de la cápside, los cuales generan la pérdida de un epítope, pero la ganancia de otro específico (Parrish et al., 1991). De estas mutaciones, a las que se atribuye la recuperación de la capacidad de infectar gatos son: Met-87-Leu, Ala-300-Gly, Asp-305-Tyr (Hueffer et al., 2003). Esta nueva variante antigénica se clasificó en base al aminoácido 426 de la proteína VP2, implicado en el cambio de epítope en los anticuerpos neutralizantes (Nakamura et al., 2004). CPV-2a, así como CPV-2, presenta una asparagina en la posición 426. En 1984 se descubrió una nueva variante antigénica nombrada CPV-2b, en la cual el aminoácido 426 de VP2 cambia a aspartato (Parrish et al., 1985). Más adelante, en el año 2000, se identificó en Italia otra variante antigénica denominada CPV-2c, que posee glutamato en la posición 426 de la proteína VP2 (Buonavoglia et al., 2001). De acuerdo con análisis filogenéticos, el linaje de CPV-2 ancestral da lugar a un nuevo linaje, CPV-2a, que ha seguido evolucionando, dando lugar a las nuevas variantes que circulan hoy en día (2a, 2b y 2c) (Hoelzer et al., 2010). Actualmente las tres variantes antigénicas circulan a nivel mundial en distinta proporción y con diferentes niveles de variabilidad, no existiendo una explicación clara de los mecanismos que generan y mantienen la variabilidad en las distintas poblaciones caninas.

Estudios evolutivos recientes evidenciaron que la clasificación antigénica de cepas de CPV-2 en base a un único aminoácido (426) no posee relevancia filogenética, y se ha originado *de novo*

en diferentes ocasiones, como es el caso del surgimiento del residuo 426-Glu (característico de CPV-2c) en cepas ecuatorianas (Grecco et al., 2018). Resulta fundamental entonces realizar la caracterización de las cepas mediante secuenciación de regiones parciales o genomas completos para poder estudiar la dinámica evolutiva de CPV.

3.4.2. Parvovirus canino en Uruguay

Los primeros casos de parvovirus en Uruguay se observaron aproximadamente en 1980, de acuerdo con los médicos veterinarios con experiencia en clínica e histopatología de pequeños animales de la Facultad de Veterinaria y centros veterinarios de la capital y el interior (Tesis Maya, 2011). En el año 2006, el grupo de investigación Genética de Microorganismos de la Facultad de Ciencias comenzó a trabajar en el relevamiento de la variabilidad genética de parvovirus canino en el país, mediante el empleo y desarrollo metodologías de diagnóstico y caracterización genética del virus.

Durante el 2006, se detectó la circulación de una variante CPV-2a. En el año 2007 nuestro grupo de trabajo reportó la primera aparición de la variante CPV-2c en el país y en Sudamérica (Pérez et al., 2007). Esta variante tuvo una prevalencia del 100% hasta el año 2010. En dicho año se reportó la presencia de una nueva variante, CPV-2a, la cual rápidamente pasó a ser la predominante en el territorio (Maya et al., 2013, Pérez et al., 2012). Este fue el primer caso reportado en el cual una cepa CPV-2a desplazara completamente a una cepa CPV-2c, dándose generalmente el proceso inverso (Maya et al., 2013).

Mediante análisis filogeográficos de secuencias de genomas completos de cepas provenientes de diversas partes del mundo, se determinó que Uruguay sufrió dos invasiones intercontinentales. La variante CPV-2c pertenece a un clado de origen europeo, mientras que la CPV-2a a un clado de origen asiático. Estos estudios revelaron que las variantes antigénicas CPV-2a, 2b y 2c presentan un origen polifilético (Grecco et al., 2018).

La gran variabilidad genética que presenta este virus, con una tasa de sustitución media de $1,7 \times 10^{-4}$ que se asemeja más a las de virus ARN que ADN (Shackelton et al., 2005), en conjunto con la particular dinámica que pueden presentar los virus que infectan animales de compañía (sujeta a la movilidad del ser humano) y la dinámica de desplazamiento de variantes que ha ocurrido anteriormente en Uruguay, hacen que sea de gran importancia el constante relevamiento de las cepas circulantes en nuestro país y en la región.

En este trabajo se propone continuar con el relevamiento mediante la realización del diagnóstico y la caracterización de cepas circulantes en Uruguay, siendo esta información relevante tanto para los estudios epidemiológicos como para la futura evaluación de las vacunas utilizadas en el territorio. Además, CPV es un modelo de evolución y salto de hospedero en virus animales, su estudio en Uruguay aportará información sobre la variabilidad del virus y contribuirá a avanzar en el conocimiento de este importante patógeno.

En función de los reportes anteriores, se espera encontrar cepas de parvovirus canino caracterizadas como pertenecientes a la variante CPV-2a. Además, se espera que estas cepas sean parte del clado Asia I descrito por Grecco et al., 2018, que ingresó a nuestro país en el año 2010, y se presume que es el único circulante desde 2014.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

- Analizar cepas de CPV circulantes en Uruguay entre febrero 2017 y febrero de 2020.

4.2. Objetivos específicos

- Diagnosticar parvovirus canino mediante técnicas moleculares.
- Caracterizar genéticamente las cepas mediante el análisis del gen vp2.
- Establecer la variación temporal de las cepas en Uruguay.
- Realizar un estudio comparativo de las cepas uruguayas con las circulantes en la región y el mundo.

5. Materiales y métodos

5.1. Muestras

Se analizaron 26 muestras de materia fecal de canes con síntomas de parvovirus pertenecientes al banco de muestras del laboratorio de Genética de Microorganismos. Estas muestras fueron colectadas en Uruguay a partir de 2017 por parte de médicos veterinarios que colaboran con nuestro laboratorio y fueron almacenadas a -80 °C hasta el momento de su procesamiento.

5.2. Datos de las muestras analizadas

De las 26 muestras analizadas, 12 fueron colectadas en el departamento de Montevideo, 5 en Canelones, 4 en Colonia y el resto en los departamentos de Rivera, Salto y San José (Tabla 1).

En cuanto a las edades de los perros de los que se obtuvieron las muestras, 17 son menores a un año, 2 tienen 2 años y de 7 no se conoce la edad. Con respecto a la vacunación, 3 de los perros tienen el calendario de vacunación completo (el cual varía según la veterinaria, establecido entre 4 y 5 dosis en cachorros), 9 recibieron 3 dosis, 2 recibieron 2 dosis, 7 no fueron vacunados y de 5 no se tienen datos. Atendiendo a la sintomatología, 14 de los perros presentaron diarrea, en 12 de los casos fue hemorrágica. Aparte de éste, los síntomas más frecuentes fueron vómitos, fiebre, depresión o decaimiento, gastroenteritis y anorexia (Tabla 1). Otros síntomas reportados fueron deshidratación y falta de sed y apetito. No se tienen datos de la sintomatología de 10 de los perros. De los canes cuyas muestras fueron analizadas, 7 de ellos murieron.

Tabla 1. Información acerca de las muestras analizadas. Se indica lugar y año de colección de la muestra, número de muestra, edad del perro del que fue colectada, su vacunación y sintomatología. Se indica con un guion la falta de datos.

Lugar de colecta	Año de colecta	Número de muestra	Edad del perro	Vacunación	Sintomatología
Montevideo	2017	617	4 meses	3 dosis	diarrea hemorrágica, vómitos, depresión /decaimiento
San José	2017	618	2 meses	sin vacunas	diarrea hemorrágica, vómitos, fiebre, gastroenteritis, depresión/decaimiento
Canelones	2017	619	2 años	completa	diarrea hemorrágica, vómitos, fiebre, gastroenteritis, anorexia, depresión/decaimiento
Canelones	2017	620	5 meses	3 dosis	diarrea hemorrágica, vómitos, fiebre, gastroenteritis, anorexia,

					depresión/decaimiento
Salto	2017	621	-	-	-
Montevideo	2017	622	-	-	-
Montevideo	2018	623	11 meses	3 dosis	diarrea hemorrágica, vómitos, fiebre, gastroenteritis, anorexia, depresión/decaimiento
Montevideo	2018	624	3 meses	2 dosis	diarrea hemorrágica, vómitos, fiebre, gastroenteritis, anorexia
Rivera	2019	625	2 años	3 dosis	diarrea hemorrágica, vómitos, fiebre, gastroenteritis, anorexia, depresión/decaimiento
Canelones	2019	626	3 meses	3 dosis	diarrea hemorrágica, fiebre, gastroenteritis, anorexia, depresión/decaimiento
Rivera	2019	627	1 año	completa	diarrea hemorrágica, fiebre, depresión/decaimiento
Rivera	2019	628	5 meses	3 dosis	diarrea hemorrágica, fiebre, depresión/decaimiento
Montevideo	2019	629	-	-	-
Montevideo	2019	630	3 meses	2 dosis	diarrea hemorrágica, vómitos
Montevideo	2019	631	-	-	-
Colonia	2019	632	-	-	-
Montevideo	2019	633	10 meses	3 dosis	diarrea, fiebre, vómitos, anorexia, gastroenteritis, depresión/decaimiento
Canelones	2019	634	6 meses	completa	-
Montevideo	2019	635	4 meses	3 dosis	-
Canelones	2019	636	8 meses	3 dosis	diarrea hemorrágica, fiebre, vómitos, gastroenteritis, anorexia
Montevideo	2020	637	3 meses	sin vacunas	diarrea, vómitos
Montevideo	2020	638	-	sin vacunas	diarrea, vómitos
Montevideo	2020	639	3 meses	sin vacunas	diarrea, vómitos, depresión/decaimiento
Colonia	2020	640	3 meses	sin vacunas	-
Colonia	2020	641	40 días	sin vacunas	-

5.3. Obtención de ADN y diagnóstico molecular

Para obtener el genoma viral, se extrajo el ADN presente en cada muestra por medio de una modificación del método de “*fast boiling*” (Schunk et al., 1995). En la misma se hierve a 101 °C un homogeneizado de 0,1 g de la muestra de materia fecal en 1 mL de buffer fosfato salino (1X PBS) durante 10 minutos, con el fin de liberar componentes celulares y virales. Luego se incubó en hielo 5 minutos para inhibir reacciones enzimáticas y se centrifugó durante 20 minutos a 3000 rpm para precipitar remanentes celulares. Finalmente se recupera el sobrenadante del centrifugado, el cual contiene el ADN viral, y se almacena a -20 °C.

Para el diagnóstico se amplificó por PCR un fragmento de 1316 pb del gen vp2, utilizando cebadores diseñados por Ikeda et al., 2000 (Tabla 2). El fragmento incluye al lazo GH, el cual va desde el residuo aminoacídico 267 al 498, ocupando 232 residuos, y codificado por 696 nucleótidos, entre las posiciones 3585 y 4280 del genoma de CPV. Este lazo es la zona más variable del genoma, e incluye al aminoácido 426, mediante el cual se caracterizan las variantes antigénicas de CPV.

Tabla 2. Cebadores utilizados para la amplificación de CPV, según Ikeda et al., 2000. Se incluye el nombre, sentido, secuencia y posición en el genoma de ambos cebadores. (*) En referencia a la cepa de número de acceso GenBank M38245.1.

Cebador	Sentido	Secuencia	Posición en el genoma* (nt)
F1	Forward	AGATAGTAATAATACTATGCCATTT	3316-3340
R3	Reverse	CCTATATCAAATACAAGTACAATA	4609-4632

La PCR se realizó con un volumen final de 25 µL, haciéndose una mezcla de reacción que se detalla en la Tabla 3. Se utilizó como molde el sobrenadante de las extracciones en dos diluciones: 1:10 y 1:5. Como control positivo, se utilizó un plásmido que contiene un inserto del genoma completo de CPV. La PCR se realizó en un termociclador Applied Biosystems 2720, siguiendo el programa de ciclado que se detalla en la Tabla 4.

Tabla 3. Detalle de los reactivos utilizados para la amplificación por PCR de un fragmento del gen VP2 de CPV, con sus respectivas concentraciones y volúmenes.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer (Bioron)	10X	1X	2,5
dNTPs	10 mM	0,2 mM	2
Cebador F1	10 µM	0,5 mM	1,3
Cebador R3	10 µM	0,5 mM	1,3
Taq polimerasa (High taq DNA	5 U/µL	0,06 U/µL	0,3

Polimerase, Bioron)			
Agua	-	-	15,6
ADN molde	-	-	2

Tabla 4. Ciclado utilizado para la amplificación por PCR incluyendo las etapas, su temperatura y duración.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	10 minutos	1 ciclo
Desnaturalización	94	30 segundos	
Hibridación	42	1 minuto	30 ciclos
Extensión	72	1 minuto	
Extensión final	72	10 minutos	1 ciclo

Los productos de PCR se visualizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% utilizando buffer Tris Acetato-EDTA (1XTAE). Se corrieron 5 µL de producto de PCR y se tiñó el gel con el intercalante bromuro de etidio a una concentración final de 0,6 µg/µL. Se visualizó utilizando un transiluminador de luz UV, y se fotografió para su análisis.

5.4. Caracterización genética mediante la secuenciación parcial del gen vp2

Las muestras positivas fueron secuenciadas y previamente se realizó la purificación de los productos de PCR utilizando el sistema AMPure XP de “beads” magnéticas (Agencourt, Beckmann-Coulter, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Los productos purificados fueron enviados a secuenciar a MacroGen Inc. (Seoul, Corea), y se utilizaron los cebadores F1 y R3 (Tabla 2). La edición y obtención de secuencias consenso a partir de la secuenciación de las muestras se realizó con el programa SeqMan del paquete Lasergene 7.1 (DNASTar, Madison, WI).

La caracterización de las cepas se realizó en base al codón que codifica para el aminoácido 426 de VP2, el cual determina la variante antigénica (Tabla 5) y se encuentra en el fragmento de 1316 pb amplificado.

Tabla 5. Caracterización de CPV según el aminoácido 426 de VP2.

Aminoácido	Codón	Caracterización
Asn	AAT	CPV-2a
Asp	GAT	CPV-2b
Glu	GAA	CPV-2c

5.5. Obtención de la secuencia completa del gen vp2

De las muestras caracterizadas, se seleccionaron algunas para realizar una nueva amplificación por PCR y secuenciación y así obtener la secuencia completa del gen vp2. Esto se realizó mediante la amplificación del gen vp2 utilizando cebadores 2162F y 4823R descritos por Pérez et al., 2012 (Tabla 6), con condiciones y ciclado descritas en las Tablas 3 y 7. Para su posterior secuenciación se utilizaron los cebadores *forward* F1 y 2162F, y dos cebadores *reverse* descritos por Ikeda et al., 2000 (Tabla 6).

Tabla 6. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación del gen vp2. Los primeros dos cebadores se utilizaron en la reacción de PCR. Para la secuenciación se utilizaron 2162F, F1, R1 y R2. Los cebadores 2162F y 4823R fueron descritos por Pérez et al., 2012; F1, R1 y R2 por Ikeda et al., 2000. (*) En referencia a la cepa de número de acceso GenBank M38245.1.

Cebador	Sentido	Secuencia	Posición en el genoma* (nt)
2162F	Forward	TTGGCGTACTCACAAAGACGTGC	2162-2184
4823R	Reverse	ACCAACCACCC ACACCATAACAAC	4800-4823
F1	Forward	AGATAGTAATAATACTATGCCATTT	3316-3340
R1	Reverse	TGGTTGGTTTCCATGGATAAAAACC	3371-3395
R2	Reverse	TTTTGAATCCAATCTCCTTCTGGAT	4011-4035

Tabla 7. Ciclado de la PCR utilizada para amplificar el gen vp2, incluyendo las etapas, su temperatura y duración.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 minutos	1 ciclo
Desnaturalización	95	30 segundos	
Hibridación	50	1 minuto	30 ciclos
Extensión	72	1 minuto	
Extensión final	72	5 minutos	1 ciclo

5.6. Análisis bioinformático

5.6.1. Obtención de secuencias consenso y generación del conjunto de datos

La edición y obtención de secuencias consenso a partir de la secuenciación de las muestras se realizó con el programa SeqMan del paquete Lasergene (DNASTar, Madison, WI). Se obtuvo la secuencia completa del gen vp2, que va desde la posición 2787 a 4541 en el genoma de CPV, abarcando 1755 pb.

Se generaron dos *sets* de datos: uno que incluye las secuencias obtenidas en este trabajo y secuencias uruguayas obtenidas anteriormente en nuestro laboratorio entre los años 2006 y 2016 (Tabla 12, Anexo 1); y otro que además de las obtenidas en este trabajo, incluye secuencias de varias partes del mundo disponibles en la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Este último set de datos comprendió 701

secuencias provenientes de 19 países (Tabla 13, Anexo 2). El mismo se redujo manteniendo secuencias representativas de la variabilidad del *set* de datos con un umbral de 99,5% de identidad nucleotídica, utilizando la herramienta CH-HIT-EST (<http://weizhong-lab.ucsd.edu/cdhit-web-server/cgi-bin/index.cgi?cmd=cd-hit-est>) en el servidor CH-HIT (Li et al., 2006; Huang et al., 2010). El *set* de datos resultante contiene 114 secuencias, que incluye las secuencias del gen *vp2* completo obtenidas en este trabajo, 4 secuencias uruguayas CPV-2a obtenidas por nuestro grupo de trabajo anteriormente colectadas entre los años 2013 y 2016, 4 secuencias uruguayas tomadas de Grecco et al., 2018 (KM457132, KM457134, KM457135, KM457136) pertenecientes al clado Asia I colectadas en 2010 y 2011 (Tabla 14, Anexo 3) y 95 secuencias obtenidas de GenBank provenientes de 9 países diferentes. Este conjunto de datos se utilizó para el análisis filogenético y comparativo de las secuencias. Se realizó el alineamiento de las secuencias obtenidas con el programa MEGAX (Kumar et al., 2018).

5.6.2. Análisis filogenético

Se determinó el modelo que mejor describe las relaciones evolutivas de las secuencias mediante ModelFinder + tree reconstruction (Subha et al., 2017) perteneciente al paquete IQTREE (Trifinopoulos et al., 2016) (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>), siendo este modelo el TVM+F+I+G4 según el criterio Bayesiano. Esta información se utilizó para inferir filogenias de máxima verosimilitud mediante el servidor web IQTREE (Nguyen et al., 2015). Para calcular el soporte de los nodos, se utilizaron 1000 réplicas de *ultra fast bootstrap* (UFBoot) (Quan Minh et al., 2013). Los árboles obtenidos fueron visualizados y editados utilizando el programa FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Se utilizó el servidor DIVEIN (<https://indra.mullins.microbiol.washington.edu/DIVEIN/>) (Wenjie et al., 2010) para analizar los sitios informativos en el alineamiento de las secuencias proteicas del *set* de datos mundial reducido.

Se halló la matriz de *p-distance* entre las secuencias uruguayas pertenecientes a la variante CPV-2a, y también entre las secuencias obtenidas en este trabajo y secuencias brasileras (número de acceso: MK344442, MK344444, MK344445 y MK344449) (Figura 12, Anexo 5) empleando la aplicación *p-distance* (Nucleotide) del software MEGA X. Esta distancia corresponde a la proporción de nucleótidos diferentes entre las secuencias (Nei et al., 2000).

6. Resultados

6.1. Diagnóstico y caracterización mediante secuenciación parcial del gen VP2

Mediante PCR se amplificó un fragmento de 1316 pb del gen vp2 de CPV en 20 de las 26 muestras analizadas (Tabla 8), en la Figura 7 se muestra una foto de la electroforesis en gel de agarosa con los resultados de la PCR. Existen muestras positivas en todos los años analizados: 20% pertenecen al 2017, 10% al 2018, 45% al 2019 y 25% al 2020.

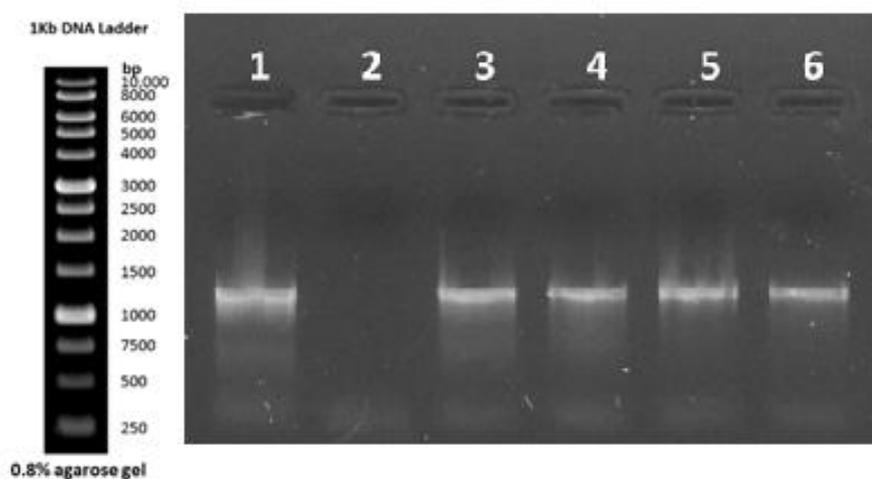


Figura 7. Imagen del resultado de una electroforesis en gel de agarosa 0,8% con buffer 1×TAE de la PCR para diagnóstico de CPV. En el carril 1 se ve el control positivo, en el carril 2 el blanco, en los carriles 3 y 4 está la muestra 633 con diluciones 1:10 y 1:5 respectivamente, en los carriles 5 y 6 se ve la muestra 634 con diluciones 1:10 y 1:5 respectivamente. Se observan bandas a la altura del tamaño esperado en ambas muestras en todas las diluciones. Se añadió el marcador de peso molecular (DNALand Scientific) para ilustrar el tamaño de la banda de 1316 pb.

Se seleccionaron para caracterizar y se enviaron a secuenciar los amplicones obtenidos de 14 de las 20 muestras positivas. Luego de la edición de los cromatogramas obtenidos, se generaron las secuencias consenso y se caracterizaron las muestras según el aminoácido 426 de la proteína VP2. Todas las muestras analizadas (años: 2017, 2018 y 2019) fueron caracterizadas como CPV-2a (Tabla 8). De las 14 muestras caracterizadas a través de secuenciación parcial de vp2, se amplificó y secuenció el gen vp2 completo en 11 de ellas (Tabla 8). De las 20 muestras diagnosticadas como positivas, 1 pertenece a un cachorro con la vacunación completa, 7 corresponden a cachorros con 3 dosis y 2 poseen 2 dosis, 6 no fueron vacunados, y de 5 no se poseen datos.

Tabla 8. Se indica el número para cada una de las muestras analizadas en este trabajo, se especifican el año de colecta y el diagnóstico positivo (+) o negativo (-), y la secuencia obtenida.

Número de muestra	Año de colecta	Diagnóstico	Caracterización	Secuencia de vp2
617	2017	+	2a	completa
618	2017	+	2a	completa
619	2017	-	-	-
620	2017	+	2a	completa
621	2017	+	2a	completa
622	2017	-	-	-
623	2018	+	2a	completa
624	2018	+	2a	completa
625	2019	-	-	-
626	2019	+	2a	completa
627	2019	-	-	-
628	2019	-	-	-
629	2019	+	2a	completa
630	2019	+	2a	completa
631	2019	+	2a	completa
632	2019	+	2a	completa
633	2019	+	-	parcial
634	2019	+	-	parcial
635	2019	+	-	parcial
636	2019	+	-	-
637	2020	+	-	-
638	2020	+	-	-
639	2020	+	-	-
640	2020	+	-	-

641	2020	+	-	-
-----	------	---	---	---

6.3. Análisis comparativo de secuencias

Se compararon las 11 secuencias del gen vp2 obtenidas utilizando el software MEGA X (Kumar et al., 2018). Se encontraron 7 cambios entre las secuencias, todos sinónimos y sin sitios informativos (mutaciones compartidas entre al menos dos secuencias). Las diferencias entre las secuencias se dan en las posiciones 3176, 3377, 3878, 4295, 4404, 4451 y 4490 del genoma (Tabla 9).

Además, se realizó una comparación de la secuencia del lazo GH para incluir las muestras 633, 634 y 635, de las cuales se posee un fragmento parcial de vp2 (Tabla 8). La secuencia del lazo GH (obtenida con los cebadores F1 y R3), comprende 696 pb de vp2 entre las posiciones 3585 y 4280 del genoma, lo que corresponde a 232 residuos entre las posiciones 267 y 498 de la proteína. No se encontraron diferencias nucleotídicas entre las 3 secuencias incluidas en este análisis.

Tabla 9. Cambios nucleotídicos entre las secuencias obtenidas. Se detalla el número de muestra, la posición en la secuencia genómica, la posición en el codón, el codón que sufre el cambio y el aminoácido correspondiente. (*) En referencia a la cepa de número de acceso GenBank M38245.1.

Número de muestra	Posición en el genoma* (nt)	Sustitución	Posición en el codón	Codón	Aminoácido
623	3176	T por C	3º	GTT	Val
617	3377	T por C	1º	TTT	Phe
621	3878	G por A	3º	GCG	Ala
630	4295	G por A	3º	GCG	Ala
617	4404	A por C	1º	AGA	Leu
621	4451	A por T	3º	GTA	Val
632	4490	C por T	3º	GGT	Gly

Se analizaron todas las secuencias uruguayas obtenidas por nuestro grupo de trabajo colectadas desde el año 2006 hasta el 2016 (n=76), a nivel de vp2 completo y del lazo GH. De éstas, 44 pertenecen a la variante CPV-2a y 43 a la variante CPV-2c (Tabla 11).

Tabla 10. Secuencias uruguayas obtenidas por nuestro grupo de trabajo. Se indica en que año fueron colectadas, cuantas secuencias pertenecientes a cada año, y a que variante antigénica corresponden.

Año de colecta	Secuencias totales	Caracterizadas como CPV-2a	Caracterizadas como CPV-2c
2006	6	1	5
2007	4	-	4
2008	4	-	4
2009	6	-	6
2010	11	4	7
2011	16	7	9
2012	11	4	7
2013	7	6	1
2014	4	4	-
2015	3	3	-
2016	4	4	-

En este set de datos, se encontraron 37 cambios informativos. De éstos, 7 son cambios no sinónimos (Tabla 11). Los cambios sinónimos presentes en la mayoría de las secuencias CPV-2a (42/44) son: T3089C, T3518C, T3617C y T4538C. Por su parte un cambio sinónimo compartido por la totalidad de muestras CPV-2c corresponde a la sustitución T2846A en la tercera posición del codón.

Entre los cambios no sinónimos, tres son compartidos por la mayoría (42/44) de las secuencias pertenecientes a variantes del tipo 2a (267-Tyr, 324-Ile y 440-Ala), exceptuando la muestra 6 del año 2006 y la 580 del 2016. La sustitución en la posición 440, además de ser prevalente en las secuencias 2a, se encuentra en 4 secuencias 2c, 2 pertenecientes al año 2009 (181 y 196), una al 2010 (269) y otra al 2012 (426). Con respecto al análisis del lazo GH, las secuencias de las muestras 633, 634 y 635 comparten los cambios ya vistos en las secuencias uruguayas 2a. Existe una identidad de hasta 100% entre las secuencias obtenidas y las cepas pertenecientes a la variante CPV-2a uruguayas previamente secuenciadas por nuestro grupo de trabajo (Figura 8).

Tabla 11. Cambios no sinónimos en la proteína VP2 presentes en el set de datos de secuencias uruguayas obtenidas en este trabajo y anteriormente por nuestro grupo de trabajo. Se indica la posición nucleotídica en el genoma y aminoacídica en la proteína VP2, el aminoácido que resulta del cambio, el número de muestras que lo comparten y a qué variante antigénica pertenecen. (*) En referencia a la cepa de número de acceso GenBank M38245.1.

Posición en el genoma* (nt)	Posición aminoacídica	Aminoácido	Número de muestras	Variante antigénica
2823	13	Ser	6	2c
2826	14	Thr	2	2c
3201	139	Ile	2	2c
3586	267	Tyr	42	2a
3756 - 3757	324	Ile	42	2a

4062 - 4064	426	Asn	44	2a
4062 - 4064	426	Glu	42	2c
4104	440	Ala	46	2a - 2c

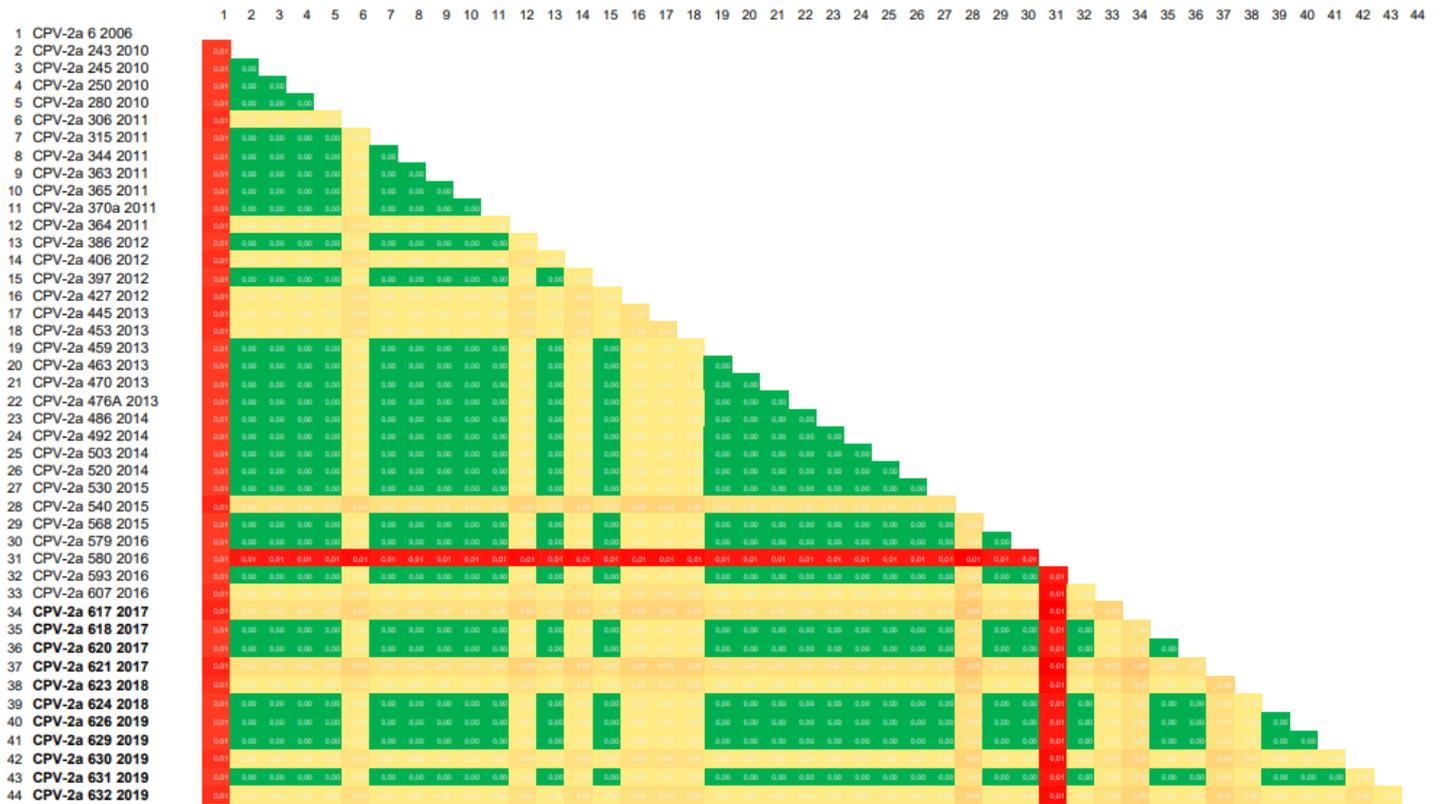


Figura 8. Matriz de *p-distance* de divergencia nucleotídica entre secuencias CPV-2a uruguayas, obtenida con Mega X. Se muestra en rojo el rango de distancias entre 0,0119 y 0,0091, en amarillo entre 0,0022 y 0,0005, y en verde 0. Las secuencias obtenidas en este trabajo se resaltan en negra.

6.4. Análisis filogenético

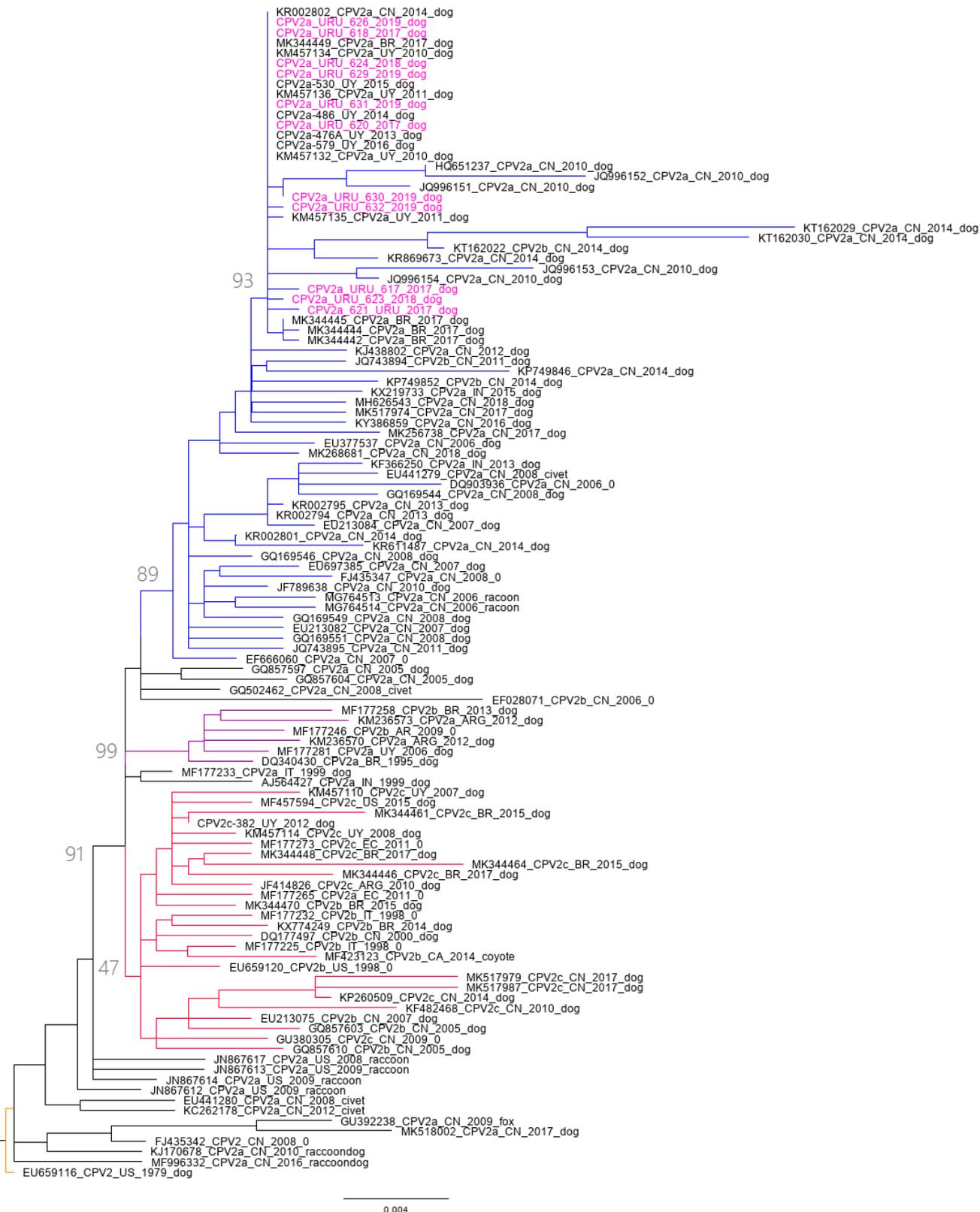


Figura 9. Árbol filogenético de máxima verosimilitud obtenido. Se infirió con el modelo TVM+F+I+G4, utilizando el servidor IQTREE. Se utilizó el set de datos de secuencias completas del gen vp2 (1755 nt), que incluye secuencias de todo el mundo y las secuencias obtenidas en este trabajo. Se distinguen tres clados: en azul clado I, en violeta el clado II, y en rojo el clado III. La secuencia utilizada como grupo externo (US 1979) se marcó en naranja. Las secuencias obtenidas en la tesina se ven en rosado.

Se obtuvo un árbol filogenético a partir del set de datos con secuencias mundiales del gen vp2 (Tabla 14, Anexo 3), usando el servidor IQTREE (Nguyen et al., 2015). Se utilizó como grupo externo una secuencia clasificada como CPV-2 colectada en Estados Unidos en el año 1979 (número de acceso GenBank: EU659116), la cual no pertenece al linaje CPV-2a (Grecco et al., 2018). Se observan tres clados diferentes, nombrados clado I, clado II y clado III (Figura 9). Se analizaron los sitios informativos del set de datos: no se encontraron sitios exclusivos para los grupos establecidos.

Las secuencias obtenidas en este trabajo agrupan en el clado I, el cual posee un apoyo de UFBoot de 89%. Está compuesto mayormente por secuencias asiáticas (China e India) e incluye secuencias sudamericanas (Uruguay y Brasil). En su mayoría las secuencias pertenecen a China (n= 39/65) colectadas entre 2006 y 2018, y se encuentran 2 secuencias colectadas en India, de 2013 y 2015. Además, el grupo está compuesto mayormente por secuencias CPV-2a, aunque también agrupa 3 secuencias pertenecientes a CPV-2b.

El sub-clado (Figura 11) que agrupa a las secuencias uruguayas obtenidas en este trabajo posee un apoyo de UFBoot de 93%. En éste también se encuentran las secuencias uruguayas CPV-2a colectadas entre 2010 y 2011 (Grecco et al., 2018), las cepas CPV-2a previamente secuenciadas por nuestro grupo de trabajo colectadas entre 2013 y 2016, y 4 secuencias brasileras del año 2017. Además, se puede observar en este sub-clado la presencia de tres ramas que poseen una distancia evolutiva mayor al resto. Una agrupa a las secuencias KT162022, KT162029 y KT162030, colectadas en China en 2014; otra a JQ996153 y JQ996154, colectadas en China en 2010, y por último otra a las secuencias JQ996151, JQ996152 y HQ651237, también colectadas en China en 2010.

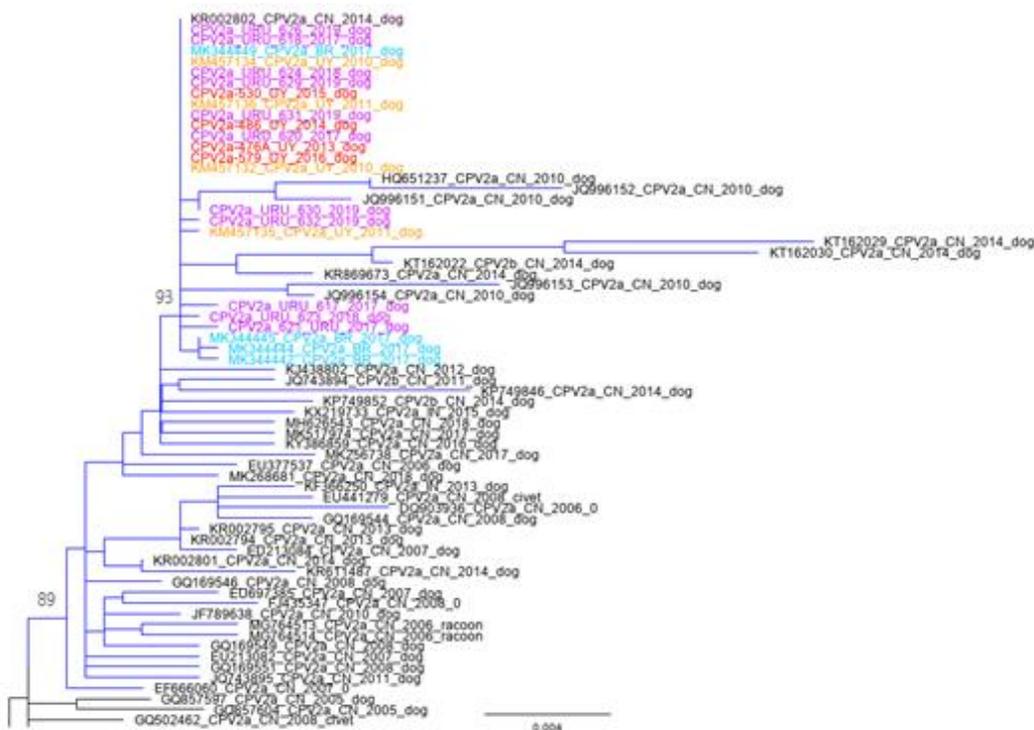


Figura 10. Clado I del árbol filogenético obtenido con el servidor IQTREE, utilizando el set de datos que incluye secuencias de todo el mundo. Se muestran las secuencias obtenidas en este trabajo (rosado), secuencias uruguayas CPV-2a colectadas en 2010 y 2011 tomadas del clado Asia I de Grecco et al., 2018 (naranja), secuencias uruguayas CPV-2a colectadas entre 2013 y 2016 obtenidas por nuestro grupo de trabajo (rojo), secuencias brasileras colectadas en 2017 (celeste).

El clado II es el más pequeño en número de secuencias, agrupando cepas pertenecientes a las variantes CPV-2a y CPV-2b provenientes de Argentina (3), Uruguay (1) y Brasil (2), y tiene un apoyo de UFBoot de 99%. La secuencia uruguaya que se encuentra en éste fue colectada en el año 2006 y pertenece a la variante CPV-2a.

El clado III posee un apoyo de UFBoot de 47% y agrupa secuencias de orígenes geográficos variados mayormente pertenecientes a las variantes antigénicas CPV-2c (n=15/26) y CPV-2b (n=10/26), y a una secuencia de la variante CPV-2a. Se pueden observar secuencias sudamericanas (Uruguay, Argentina, Brasil, Ecuador), norteamericanas (Estados Unidos, Canadá), europeas (Italia) y asiáticas (China). Este clado incluye las secuencias uruguayas pertenecientes a la variante CPV-2c.

7. Discusión

CPV es el agente causante de la parvovirus canina, una de las enfermedades más comunes en cachorros de hasta 12 semanas de edad. La parvovirus canina posee altas tasas de mortalidad y morbilidad, por lo cual es de gran importancia su atención clínica y vacunación preventiva. Esto hace que el relevamiento mediante el diagnóstico y caracterización de las cepas sea tan valioso, ya que es de utilidad para la clínica veterinaria, estudios epidemiológicos y futura evaluación de vacunas en el territorio. Además, tomando en cuenta que CPV es un modelo de evolución y salto de hospedero en animales, los estudios de este virus aportan al conocimiento general de este patógeno y los mecanismos asociados a la transferencia entre las especies.

La metodología utilizada en esta tesina para diagnóstico y caracterización se diferencia de trabajos anteriores realizados en nuestro grupo de trabajo, en los cuales el diagnóstico y caracterización de las muestras se llevó a cabo principalmente por medio de PCR seguido de la clasificación de los amplicones mediante el polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción (RFLP). La técnica de RFLP se realiza utilizando la enzima de restricción *MbolI*, y es útil para caracterizar las variantes de CPV de manera rápida ya que el amplicón utilizado incluye el codón que codifica para el aminoácido 426 y permite distinguir entre CPV-2c y no 2c (2a/2b), y distinguir cepas vacunales de tipo CPV-2, con el beneficio de que es menos costosa que la secuenciación de todas las muestras positivas. Esto es así debido a que reconoce una secuencia diana que está presente una vez en los fragmentos de las muestras CPV-2 y CPV-2a/2b, y 2 veces en las muestras CPV-2c. En las cepas vacunales de CPV-2 genera un fragmento mayor que se debe a la presencia de una secuencia repetida en el extremo izquierdo del genoma (Tesis Grecco 2014). En el presente trabajo se utilizó la técnica de PCR a tiempo final como método de diagnóstico para CPV y la secuenciación como método de caracterización. Esta técnica es efectiva para la detección de ácidos nucleicos pertenecientes a este patógeno debido a su alta sensibilidad. Además, tiene la ventaja de que permite la posterior secuenciación de los amplicones obtenidos (Desario et al., 2005), haciendo posible un mejor análisis de la secuencia del genoma del virus. Esto resulta más informativo que otras técnicas a la hora de analizar la cepa viral, teniendo en cuenta que la caracterización en base al aminoácido 426 no es relevante desde un punto de vista filogenético (Grecco et al., 2018), por lo cual es necesario conocer la secuencia para hacer inferencias sobre su origen y evolución. Dicho esto, el fragmento amplificado con el propósito de caracterizar la cepa incluye al lazo GH, el cual es el fragmento más variable del virus y se considera filogenéticamente informativo (Pérez et al., 2012).

Se diagnosticaron 26 muestras presuntivas para parvovirus provenientes de perros con gastroenteritis, colectadas a partir de febrero de 2017 hasta febrero de 2020. La muestra es relativamente baja para ser analizada mediante una aproximación estadística, o para ser considerada representativa de lo que sucede en el país. El promedio de muestras recibido por el laboratorio desde 2006 a 2016 fue de 41 muestras anuales, mientras que a partir del 2017 bajó drásticamente a 9 muestras anuales (Figura 11, Anexo 4). No está claro cuál es la razón de este descenso en el número de muestras recibido: si se debe a causas independientes de la ocurrencia de la enfermedad (*delivery* de muestras interrumpido), a que la prevalencia de la parvovirus disminuyó o a una combinación de ambas.

Con respecto a la vacunación, la WSAVA recomienda entre 2 a 5 dosis en cachorros entre las 6 y 16 semanas de edad, administrando luego una dosis *booster* al año y a los tres años. Sin embargo, en Uruguay se utilizan diferentes protocolos que incluyen de 3 a 5 dosis en cachorros a partir de los 30 días, revacunando de forma anual (Tesis Franco, 2016). De las 20 muestras diagnosticadas como positivas, 1 pertenece a un cachorro con la vacunación completa. Algunos cachorros infectados tenían la vacunación incompleta: 7 corresponden a cachorros con 3 dosis y 2 poseen 2 dosis, 6 no fueron vacunados, y de 5 no se poseen datos. La existencia de un perro infectado con la vacunación completa en una muestra de 20 perros positivos para CPV denota una posible prevalencia de las fallas vacunales, aunque también puede deberse a un sesgo de muestreo debido al tamaño pequeño de la muestra. Esta falla en la protección vacunal puede estar causada por la interferencia de los anticuerpos maternos adquiridos a través de la lactancia. Dicha interferencia sucede en una ventana de tiempo en la cual el título de anticuerpos materno no es efectivo para proteger contra la infección de CPV, pero es neutralizante frente a las cepas vacunales (Pollock et al., 1982). También existe controversia sobre si las vacunas que se utilizan, las cuales son en su mayoría vacunas atenuadas de CPV-2, son efectivas o no contra las variantes antigénicas circulantes (2a, 2b y 2c). Algunos autores ponen en duda la protección contra las demás variantes antigénicas del virus, aunque no existe evidencia de que no sean efectivas (Cavalli et al., 2008; Altman et al., 2017). De todas maneras, no puede descartarse que el caso del perro con CPV y vacunación completa se trate de un perro que no responde a la vacunación (Day et al., 2016), o que el fallo se deba a incorrecta administración vacunal. Existen un número de reportes sobre fallas de inmunización contra CPV, lo cual representa un problema para la prevención efectiva y erradicación del virus a pesar de la amplia vacunación que se realiza a nivel mundial (Decaro et al., 2020). Para el caso del muestreo analizado en esta tesina, no se tienen datos suficientes para realizar análisis estadísticos sobre la relación del plan de vacunación y la gravedad del cuadro clínico, ya que es necesario un muestreo más extensivo y mejor documentación de la enfermedad (síntomas y mortalidad) y la vacunación (cantidad de dosis y vacuna administrada).

Hay muestras analizadas que provienen de cachorros de 4 meses o mayores con la vacunación incompleta, en los cuales debería haber finalizado la vacunación. En perros mayores a 20 semanas, se correlaciona la presencia de anticuerpos, sin importar el título con la protección a infecciones del virus (Decaro et al., 2020), por lo tanto podría existir algún grado de inmunidad parcial. Sin embargo, no se tienen datos suficientes para realizar análisis estadísticos sobre la relación del grado de vacunación y la gravedad del cuadro clínico, es necesario un muestreo más extensivo y mejor documentación de la enfermedad y vacunación.

En Uruguay, las variantes circulantes han cambiado a lo largo de los años. En el año 2006 se registró una sola muestra perteneciente a la variante CPV-2a, mientras que el resto de las muestras caracterizadas ese año pertenecen a la variante CPV-2c. En 2007, CPV-2c pasó a ser la única variante descrita en el territorio, lo cual continuó así hasta 2009. De acuerdo con estudios filogeográficos, estas cepas 2c pertenecen a un clado que posee como origen más probable el sur de Europa, y su ancestro común más reciente ocurrió aproximadamente en el año 1984 (Grecco et al., 2018). Se cree que la cepa CPV-2a colectada en 2006 es un vestigio de lo que circulaba en el país antes de la invasión de CPV-2c, que por extrapolación basada en datos de los países vecinos, fue una confluencia de CPV-2a y 2b (Maya et al., 2013). Según los análisis de Grecco et al., 2018, esta única cepa 2a del 2006 tiene origen sudamericano y su ancestro común más reciente ronda el año 1995. En el año 2010 se reportó la emergencia de una nueva variante CPV-2a en Uruguay (Pérez et al., 2012), la cual co-circuló con CPV-2c hasta

2013, para al año siguiente convertirse en la única variante circulante reportada. De acuerdo con los análisis filogeográficos, esta variante es completamente diferente y posee como origen geográfico más probable al continente asiático (Grecco et al., 2018).

Las 14 muestras secuenciadas en este trabajo pertenecen a la variante CPV-2a, lo cual sugiere que esta variante continúa siendo la única circulante en Uruguay. De éstas, 6 (9 incluyendo las secuencias parciales de vp2) poseen un 100% de identidad nucleotídica y 5 poseen cambios sinónimos, aunque ninguno es compartido entre ellas (Figura 8). Estas secuencias provienen de muestras tomadas a lo largo de 3 años en diferentes puntos del país, a pesar de lo cual muestran gran similitud entre ellas. Esta homogeneidad presentada por cepas CPV-2a uruguayas ya ha sido reportada anteriormente (Maya et al., 2013, Grecco et al., 2018), y se presume que se debe a que éstas se originan a partir de una invasión reciente y puntual en el territorio, seguida de una rápida expansión. Sin embargo, la invasión al territorio uruguayo se describió en el año 2010, y las cepas relevadas en este trabajo fueron colectadas luego de un lapso de entre 7 y 9 años desde ésta. A pesar de que la tasa de sustitución de CPV es elevada para ser un virus ADN, existe una limitada acumulación de mutaciones observada en sus 40 años de evolución (Voorhees et al., 2020). Además, el tener una estructura tan pequeña en la cual los principales sitios antigénicos se superponen con sitios de reconocimiento del receptor, en conjunto con el pequeño tamaño de su genoma, puede ocasionar que haya pocos sitios que varíen libremente sin afectar negativamente la eficacia biológica del virus (Voorhees et al., 2020).

Se compararon las secuencias de las muestras obtenidas en esta tesina con secuencias uruguayas obtenidas por nuestro grupo de trabajo, revelando hasta un 100% de identidad nucleotídica con las cepas de CPV-2a previamente circulantes. Este resultado indica que pertenecen al mismo clado evolutivo. Los cambios aminoacídicos prevalentes en las cepas 2a concuerdan con los reportados por Pérez et al., 2012 y Zoller 2016 (Tesina de grado): 267- Tyr, 324-Ile, 426-Asn y 440-Ala. Los cambios 267-Tyr, 324-Ile y 440-Ala fueron descritos recientemente en Brasil (De Oliveira et al., 2019), y en Colombia en cepas de tipo CPV-2b (Giraldo-Ramirez et al., 2020). Se ha observado que estos tres cambios, de manera independiente, han aumentado su frecuencia en los últimos años hasta volverse predominantes en aislamientos de CPV de todo el mundo (Zhou et al., 2017). Estudios recientes proponen que la deriva antigénica es el motor de su aparición. Aunque el sitio 267 no se encuentra expuesto en la cápside, los otros dos se encuentran en lazos expuestos de la proteína, y el sitio 440 se encuentra en la protrusión superior de uno de estos lazos (Zhou et al., 2017), lo cual refuerza esta suposición.

En el árbol filogenético inferido podemos ver claramente 3 clados que agrupan cepas de diferentes orígenes geográficos: uno en el que agrupan principalmente secuencias chinas (en el que se encuentran las secuencias obtenidas en este trabajo), otro exclusivamente con secuencias sudamericanas y un tercero que posee secuencias de orígenes geográficos variados.

El clado I agrupa cepas chinas pertenecientes a la variante CPV-2a, cepas de India (CPV-2a), de Brasil (CPV-2a), las secuencias obtenidas en este trabajo y secuencias uruguayas pertenecientes a la variante CPV-2a colectadas entre 2010 y 2016. Entre estas secuencias se encuentran 4 utilizadas por Grecco et al., 2018, las cuales pertenecen al clado de origen asiático circulante en Uruguay (clado Asia I) (Figura 11). Este resultado confirma que las cepas analizadas en esta tesina pertenecen al mismo clado circulante en nuestro país desde 2010. Junto con las secuencias uruguayas agrupan secuencias brasileñas colectadas en el año 2017

(números de acceso de Genbank: MK344442, MK344444, MK344445 y MK344449) (Figura 11). Éstas presentan hasta un 100% de identidad nucleotídica con las secuencias obtenidas (Figura 12, Anexo 5), pertenecen a la variante CPV-2a y comparten los cambios 267-Tyr, 324-Ile, y 440-Ala. Esto puede ser indicador de que esta variante se extendió a Brasil, tomando en cuenta que las muestras fueron tomadas en el estado de Río Grande do Sul (De Oliveira et al., 2019), el cual limita con Uruguay. Esto está respaldado por el hecho de que no se han descrito cepas CPV-2a que posean los marcadores de este clado en el país vecino (Fontana et al., 2013; Monteiro et al., 2016; Silva et al., 2017, Vieira et al., 2017). De todas formas, existe la posibilidad de que la variante originalmente haya entrado a Uruguay desde Brasil, pero que no hayan sido reportada su presencia en este último. Es pertinente agregar que hasta la fecha no se han reportado cepas relacionadas con este clado en Argentina (Calderón et al., 2009; Calderón et al., 2011; Calderón et al., 2011; Calderón et al., 2015). En ambos países, se ha descrito la circulación de las tres variantes antigénicas de CPV, siendo la variante CPV-2c predominante desde que fue reportada en éstos, en el año 2003 en Argentina (siendo la única variante descrita en el país hasta el año 2008) y en 2008 en Brasil (Pinto et al., 2012; Calderón et al., 2011; Calderón et al., 2015; Vieira et al., 2017; De Oliveira et al., 2018). Con respecto al resto de Sudamérica, recientemente se reportó por primera vez la presencia de las variantes antigénicas CPV-2c y CPV-2a en Chile (Castillo et al., 2020), mientras que en Ecuador se ha descrito la ocurrencia de las tres variantes (Aldaz et al., 2013; De la Torre et al., 2018). Sin embargo, las cepas descritas no son similares a las detectadas en Uruguay, a diferencia de las ya mencionadas que comparten los marcadores del clado asiático descritas en Brasil y Colombia (Giraldo-Ramirez et al., 2020; De Oliveira et al., 2018).

En el sub clado que agrupa a las secuencias obtenidas se observan tres ramas que poseen una distancia evolutiva mayor al resto, lo cual puede significar que la tasa evolutiva aumentó de forma puntual. Una de las ramas agrupa a las secuencias JQ996153 y JQ996154 colectadas en China en 2010, las cuales acumulan 8 y 5 cambios no sinónimos en una región de aproximadamente 200 pb del gen vp2. Otra agrupa a las secuencias JQ996151, JQ996152 y HQ651237, también colectadas en China en 2010, las cuales acumulan entre 4 y 5 cambios no sinónimos en una región de aproximadamente 140 pb del gen. La última rama contiene a las secuencias KT162022, KT162029 y KT162030 colectadas en China en 2014, las cuales acumulan entre 6 y 12 cambios no sinónimos en una región de aproximadamente 280 pb. Es necesario estudiar más en profundidad estas secuencias para determinar si esto se debe a recombinación, presiones selectivas puntuales (relacionadas al contexto de tales infecciones), artefactos de secuenciación u otra razón. También es posible que el *pool* utilizado de muestras chinas no sea representativo de la población de virus de ese país, dando lugar a ramas con diferentes distancias evolutivas.

El clado I podría considerarse homólogo al clado Asia I encontrado por Grecco et al., 2018 para el que se utilizaron secuencias de genomas completos y en el cual agrupan secuencias uruguayas CPV-2a colectadas desde 2010 a 2011, y secuencias pertenecientes a China e India. En este estudio se utilizaron secuencias utilizadas por Grecco., et al 2018 provenientes de China (KR002801, KR002802, KR002794 y KR002795), y de India (KF366250), además de secuencias uruguayas utilizadas en tal estudio y secuencias presuntamente pertenecientes al mismo clado circulantes en el país entre 2013 y 2016. Sin embargo, a pesar de encontrar mayormente secuencias asiáticas, en el clado I también encontramos secuencias colectadas en Brasil. Además, las secuencias del clado I no poseen exclusivamente los marcadores reportados para Asia I (267-Tyr, 297-Ala, 324-Ile y 426-Asn), aunque están presentes en la mayoría de ellas.

El clado II posee un apoyo de UFBoot de 99%, e incluye a la cepa CPV-2a uruguaya colectada en 2006, la cual agrupa separada de otras cepas uruguayas, junto con secuencias argentinas y brasileras pertenecientes a las variantes CPV-2a/2b. Se presume que esta cepa uruguaya es representativa de lo que circulaba antes de la invasión de la variante CPV-2c europea al territorio uruguayo, siendo similar a secuencias colectadas en los países vecinos, lo cual se observa al agrupar en este clado con secuencias de Argentina y Brasil. El clado II se asemeja al clado Sudamérica I (Grecco et al., 2018), el cual también incluye a la cepa uruguaya colectada en 2006, dos secuencias de Argentina y Brasil utilizadas en este estudio (MF177246, MF177258) y es exclusivamente sudamericano. Para Sudamérica I se describieron los cambios aminoacídicos 267-Phe, 297-Asn, 324-Tyr, 426-Asn/Asp. El clado II comparte algunos de estos marcadores aminoacídicos descritos: el primer cambio (267-Phe) es compartido por la totalidad de las secuencias, como también la posición 426-Asn/Asp, mientras que los otros están presentes en el grupo, pero no de forma absoluta.

El clado III posee un apoyo de UFBoot de 47%, el cual no es confiable, lo que puede deberse a la heterogeneidad de secuencias que agrupa y al hecho de que son secuencias parciales del genoma. Incluye secuencias de orígenes muy diversos (americanas, asiáticas y europeas), mayormente pertenecientes a las variantes antigénicas CPV-2c y 2b. En éste agrupan las secuencias uruguayas pertenecientes a la variante CPV-2c colectadas entre 2007 y 2012, las cuales pertenecen a un clado de origen europeo (Grecco et al., 2018). Estas secuencias, según Grecco et al., 2018 agrupan en el clado reportado como Europa I, sin embargo, las secuencias del clado III guardan mayor similitud en los sitios aminoacídicos reportados como relevantes del clado Europa II (267-Phe, 297-Ala, 324-Tyr y 426-Asn/Asp/Glu). Esto puede deberse a que esta inferencia filogenética fue realizada con secuencias parciales en lugar de genomas completos, además de que el set de datos empleado es diferente.

En este árbol se emplearon, además de cepas aisladas en perros, otras cepas aisladas de carnívoros salvajes. En el clado I podemos encontrar dos secuencias tomadas de mapaches, y en el clado III hay una secuencia cuyo hospedero fue un coyote. No obstante, la mayoría de las secuencias pertenecientes a animales silvestres (colectadas de mapache, civeta y zorro) agrupan cercanas a la base del árbol, sin formar un clado específico. Se ha reportado que CPV es capaz de infectar a variedad de animales pertenecientes al orden *Carnivora* (Truyen et al., 1996; Orozco et al., 2014, Bucafusco et al., 2019, Calatayud et al., 2020). Existen infecciones que tienen un claro origen a partir de perros domésticos debido a su alta identidad de secuencia con cepas colectadas de éstos, como es el caso de las secuencias obtenidas de coatíes (Bucafusco et al., 2019), o la reciente descripción de un evento de infección en guiña por una cepa 2c (Ortega et al., 2020). De todas formas, podemos presumir que una parte importante del ciclo de este virus ocurre en la vida silvestre, aunque no es sabido si CPV causa síntomas en todos los animales en los que se han reportado infecciones. La fauna silvestre es difícil de monitorear, por lo que probablemente se desconoce mucho de los procesos que gobiernan la evolución de CPV.

Los estudios realizados en este trabajo aportan información sobre las cepas circulantes en Uruguay entre los años 2017 y 2019, estando disponibles para estudios futuros y contribuyendo a un mejor entendimiento de la evolución de parvovirus canino.

8. Conclusiones

Se detectó CPV en 20 de las 26 muestras analizadas, comprobándose que la PCR a tiempo final seguida de secuenciación y análisis filogenéticos basados en el gen vp2 es un método rápido y efectivo de diagnóstico y caracterización para este virus.

Todas las muestras positivas caracterizadas pertenecientes a los años 2017, 2018 y 2019 fueron caracterizadas como CPV-2a, lo que sugiere que esta variante es la única circulando en la población canina uruguaya. Las cepas uruguayas 2a pertenecen a un clado de origen asiático que invadió y se expandió en el país desde el año 2010. Este clado ha demostrado gran homogeneidad de secuencias en Uruguay, ya que posee 100% de identidad nucleotídica en secuencias de muestras pertenecientes a un periodo de 10 años.

Es de gran importancia continuar con el relevamiento de la situación epidemiológica de parvovirus canino en Uruguay para monitorear su evolución y la relación de las cepas actuales con futuras invasiones.

9. Perspectivas

Se seguirá monitoreando la evolución de CPV en Uruguay por medio de diagnóstico y secuenciación. Esto es de importancia tanto para el seguimiento de este patógeno como para la eventual realización de estudios epidemiológicos, para los cuales se necesita un relevamiento extenso y constante. Asimismo, nos proponemos entender la razón por la cual el número de muestras recibido por el laboratorio disminuyó, para poder dirigir esfuerzos en aumentar la detección de muestras presuntivas.

Es importante obtener muestras de diferentes procedencias geográficas, teniendo en cuenta que las que se analizaron en esta tesina provinieron de 6 de los 19 departamentos del país. De esta manera, podemos tener una mejor representación de las cepas circulantes. También nos proponemos relevar fauna silvestre presente en el territorio, para lo cual no hay registros hasta la fecha en Uruguay. Así podremos comprender mejor el ciclo silvestre del virus y recabar información valiosa sobre sus hospederos salvajes.

Además, pretendemos obtener la secuencia de genomas completos de cepas de parvovirus canino de muestras colectadas en Uruguay y en países de la región, lo cual será más informativo desde un punto de vista filogenético y permitirá comprender mejor las relaciones evolutivas. Especialmente se estudiarán los países limítrofes Brasil y Argentina, con lo cual ayudará a esclarecer la relación de las cepas brasileras CPV-2a analizadas con las cepas uruguayas, y comprender si algo similar sucede en Argentina, al ser el otro país limítrofe con Uruguay. Esto permitirá un estudio más completo del camino evolutivo que toma CPV en el contexto Latinoamericano.

10. Anexos

10.1. Anexo 1

Tabla 12. Secuencias utilizadas en el set de datos de cepas uruguayas. Todas fueron secuenciadas por nuestro grupo de trabajo y colectadas a partir de heces caninas. Se detalla variante antigénica, número de muestra y año de colecta.

Nº de muestra	Variante	Año	Nº de muestra	Variante	Año
6	CPV2a	2006	370	CPV2c	2011
12	CPV2c	2006	364	CPV2a	2011
21	CPV2c	2006	375	CPV2c	2011
47	CPV2c	2006	386	CPV2a	2012
52	CPV2c	2006	406	CPV2a	2012
55	CPV2c	2006	397	CPV2a	2012
72	CPV2c	2007	427	CPV2a	2012
82	CPV2c	2007	391	CPV2c	2012
95	CPV2c	2007	408	CPV2c	2012
101	CPV2c	2007	423	CPV2c	2012
120	CPV2c	2008	426	CPV2c	2012
135	CPV2c	2008	430	CPV2c	2012
152	CPV2c	2008	410	CPV2c	2012
169	CPV2c	2008	382	CPV2c	2012
173	CPV2c	2009	445	CPV2a	2013
196	CPV2c	2009	453	CPV2a	2013
181	CPV2c	2009	459	CPV2a	2013
185	CPV2c	2009	463	CPV2a	2013
187	CPV2c	2009	467	CPV2c	2013
190	CPV2c	2009	470	CPV2a	2013
243	CPV2a	2010	476	CPV2a	2013
235	CPV2c	2010	486	CPV2a	2014
242	CPV2c	2010	492	CPV2a	2014
247	CPV2c	2010	503	CPV2a	2014
258	CPV2c	2010	520	CPV2a	2014
261	CPV2c	2010	530	CPV2a	2015
318	CPV2c	2010	540	CPV2a	2015
245	CPV2a	2010	568	CPV2a	2015
250	CPV2a	2010	579	CPV2a	2016
280	CPV2a	2010	580	CPV2a	2016
269	CPV2c	2010	593	CPV2a	2016
307	CPV2c	2011	607	CPV2a	2016
317	CPV2c	2011	632	CPV2a	2019
326	CPV2c	2011	631	CPV2a	2019

346	CPV2c	2011	630	CPV2a	2019
349	CPV2c	2011	629	CPV2a	2019
354	CPV2c	2011	626	CPV2a	2019
368	CPV2c	2011	624	CPV2a	2018
306	CPV2a	2011	623	CPV2a	2018
315	CPV2a	2011	621	CPV2a	2017
344	CPV2a	2011	620	CPV2a	2017
363	CPV2a	2011	618	CPV2a	2017
365	CPV2a	2011	617	CPV2a	2017
370	CPV2a	2011	-	-	-

10.2. Anexo 2

Tabla 13. Secuencias utilizadas en el set de datos de 701 secuencias mundiales. Se detalla Número de Acceso Gen Bank/Número de muestra, variante antigénica, país de origen, año de colecta y hospedero.

Número de acceso GenBank	Variante	País	Año	Hospedero
MF177229	CPV2c	Albania	2012	-
MF177246	CPV2b	Argentina	2009	-
MF177242	CPV2c	Argentina	2008	-
MF177243	CPV2c	Argentina	2008	-
MF177244	CPV2c	Argentina	2008	-
MF177247	CPV2c	Argentina	2010	-
MF177249	CPV2c	Argentina	2010	-
JF346754	CPV2a	Argentina	2003	perro
JF414817	CPV2b	Argentina	2003	perro
JF414818	CPV2c	Argentina	2003	perro
JF414819	CPV2c	Argentina	2003	perro
JF414820	CPV2c	Argentina	2009	perro
JF414821	CPV2c	Argentina	2009	perro
JF414823	CPV2c	Argentina	2010	perro
JF414824	CPV2c	Argentina	2010	perro
JF414825	CPV2c	Argentina	2010	perro
JF414826	CPV2c	Argentina	2010	perro
KM236568	CPV	Argentina	2012	perro
KM236569	CPV2c	Argentina	2013	perro
KM236570	CPV2a	Argentina	2012	perro
KM236571	CPV2a	Argentina	2012	perro
KM236572	CPV2a	Argentina	2012	perro
KM236573	CPV2a	Argentina	2012	perro
KU508692	CPV2c	Australia	2015	perro
KU508693	CPV2c	Australia	2015	perro
KX774249	CPV2b	Brasil	2014	perro

KX774251	CPV2b	Brasil	2015	perro
KX774250	CPV2b	Brasil	2016	perro
MF177251	CPV2b	Brasil	2013	perro
MF177258	CPV2b	Brasil	2013	perro
MF177256	CPV2b	Brasil	2013	perro
MF177250	CPV2c	Brasil	2010	perro
MF177260	CPV2c	Brasil	2012	perro
MF177255	CPV2c	Brasil	2014	perro
MF177252	CPV2c	Brasil	2010	perro
MF177257	CPV2c	Brasil	2014	perro
MF177253	CPV2c	Brasil	2010	perro
MF177254	CPV2c	Brasil	2010	perro
MF177261	CPV2c	Brasil	2013	perro
KY073269	CPV2c	Brasil	2015	perro
DQ340404	CPV2a	Brasil	1980	perro
DQ340407	CPV2a	Brasil	1980	perro
DQ340409	CPV2b	Brasil	1985	perro
DQ340410	CPV2a	Brasil	1986	perro
DQ340411	CPV2a	Brasil	1990	perro
DQ340412	CPV2a	Brasil	1990	perro
DQ340413	CPV2a	Brasil	1990	perro
DQ340414	CPV2a	Brasil	1990	perro
DQ340415	CPV2a	Brasil	1991	perro
DQ340418	CPV2a	Brasil	1992	perro
DQ340419	CPV2a	Brasil	1992	perro
DQ340421	CPV2a	Brasil	1992	perro
DQ340422	CPV2a	Brasil	1993	perro
DQ340423	CPV2a	Brasil	1993	perro
DQ340424	CPV2a	Brasil	1993	perro
DQ340426	CPV2a	Brasil	1994	perro
DQ340427	CPV2a	Brasil	1994	perro
DQ340428	CPV2a	Brasil	1994	perro
DQ340429	CPV2a	Brasil	1994	perro
DQ340430	CPV2a	Brasil	1995	perro
DQ340431	CPV2a	Brasil	1995	perro
DQ340432	CPV2a	Brasil	1995	perro
DQ340433	CPV2a	Brasil	2000	perro
DQ340434	CPV2a	Brasil	2000	perro
MK344433	CPV2a	Brasil	2017	perro
MK344435	CPV2a	Brasil	2016	perro
MK344436	CPV2c	Brasil	2016	perro
MK344437	CPV2a	Brasil	2018	perro
MK344438	CPV2c	Brasil	2016	perro
MK344439	CPV2b	Brasil	2016	perro
MK344440	CPV2b	Brasil	2016	perro
MK344441	CPV2b	Brasil	2016	perro

MK344442	CPV2a	Brasil	2017	perro
MK344443	CPV2a	Brasil	2017	perro
MK344444	CPV2a	Brasil	2017	perro
MK344445	CPV2a	Brasil	2017	perro
MK344446	CPV2c	Brasil	2017	perro
MK344447	CPV2a	Brasil	2017	perro
MK344448	CPV2c	Brasil	2017	perro
MK344449	CPV2a	Brasil	2017	perro
MK344451	CPV2a	Brasil	2016	perro
MK344452	CPV2c	Brasil	2016	perro
MK344454	CPV2c	Brasil	2015	perro
MK344456	CPV2c	Brasil	2015	perro
MK344457	CPV2c	Brasil	2015	perro
MK344458	CPV2c	Brasil	2015	perro
MK344459	CPV2c	Brasil	2017	perro
MK344460	CPV2c	Brasil	2015	perro
MK344461	CPV2c	Brasil	2015	perro
MK344463	CPV2c	Brasil	2015	perro
MK344464	CPV2c	Brasil	2015	perro
MK344465	CPV2b	Brasil	2015	perro
MK344466	CPV2c	Brasil	2015	perro
MK344467	CPV2c	Brasil	2015	perro
MK344468	CPV2a	Brasil	2015	perro
MK344469	CPV2	Brasil	2015	perro
MK344470	CPV2b	Brasil	2015	perro
MF423125	CPV2a	Canadá	2014	coyote
MF069442	CPV2a	Canadá	2010	mapache
MF069443	CPV2a	Canadá	2016	mapache
MF423123	CPV2b	Canadá	2014	coyote
KR002794	CPV2a	Chile	2013	-
KR002795	CPV2a	Chile	2013	-
KR002798	CPV2a	Chile	2013	-
KR002800	CPV2a	Chile	2014	-
KR002804	CPV2a	Chile	2014	-
KR002801	CPV2a	Chile	2014	-
MH476580	CPV2a	China	2017	perro
MH476582	CPV2a	China	2017	perro
MH476586	CPV2a	China	2017	perro
MH476589	CPV2a	China	2017	perro
MH476593	CPV2a	China	2017	perro
MF134808	CPV2a	China	2017	perro
MH106698	CPV2a	China	2015	perro
MG763189	CPV2a	China	2014	perro
JQ268283	CPV2a	China	2011	perro
KF638400	CPV2a	China	2010	perro
JX660690	CPV2a	China	2011	perro

DQ177497	CPV2b	China	2000	perro
DQ354068	CPV2a	China	2004	panda rojo
DQ903936	CPV2a	China	2006	-
EF011664	CPV2a	China	2004	perro
EF028071	CPV2b	China	2006	-
EF666059	CPV2a	China	2007	-
EF666060	CPV2a	China	2007	-
EF666061	CPV2a	China	2007	-
EF666062	CPV2a	China	2007	-
EF666063	CPV2a	China	2007	-
EF666064	CPV2a	China	2007	-
EF666065	CPV2a	China	2006	-
EF666066	CPV2a	China	2007	-
EF666069	CPV2a	China	2007	-
EU095252	CPV2a	China	2004	perro
EU145953	CPV2a	China	2007	perro
EU145954	CPV2b	China	2007	perro
EU145955	CPV2a	China	2007	perro
EU145956	CPV2a	China	2007	perro
EU145957	CPV2a	China	2007	perro
EU145958	CPV2a	China	2007	perro
EU145961	CPV2a	China	2007	perro
EU170352	CPV2a	China	2007	perro
EU213073	CPV2a	China	2007	perro
EU213074	CPV2a	China	2007	perro
EU213075	CPV2b	China	2007	perro
EU213076	CPV2a	China	2007	perro
EU213077	CPV2a	China	2007	perro
EU213078	CPV2b	China	2007	perro
EU213081	CPV2a	China	2007	perro
EU213082	CPV2a	China	2007	perro
EU213083	CPV2a	China	2007	perro
EU213084	CPV2a	China	2007	perro
EU213085	CPV2a	China	2007	perro
EU377537	CPV2a	China	2006	perro
EU441279	CPV2a	China	2008	civeta
EU441280	CPV2a	China	2008	civeta
EU483509	CPV2a	China	2008	perro
EU483510	CPV2b	China	2008	perro
EU483511	CPV2a	China	2008	perro
EU483512	CPV2b	China	2008	perro
EU483513	CPV2a	China	2008	perro
EU483514	CPV2a	China	2008	perro
EU483515	CPV2b	China	2008	perro
EU483516	CPV2a	China	2008	perro
EU483517	CPV2b	China	2008	perro

EU697385	CPV2a	China	2007	perro
FJ432717	CPV2a	China	2008	perro
FJ432718	CPV2a	China	2008	vacunal
FJ435342	CPV2	China	2008	-
FJ435343	CPV2a	China	2008	-
FJ435344	CPV2	China	2008	-
FJ435345	CPV2a	China	2008	-
FJ435346	CPV2a	China	2008	-
FJ435347	CPV2a	China	2008	-
FJ435348	CPV2	China	2008	-
GQ169537	CPV2a	China	2008	perro
GQ169539	CPV2a	China	2008	perro
GQ169540	CPV2a	China	2008	perro
GQ169541	CPV2a	China	2008	perro
GQ169542	CPV2a	China	2008	perro
GQ169544	CPV2a	China	2008	perro
GQ169545	CPV2a	China	2008	perro
GQ169546	CPV2a	China	2008	perro
GQ169548	CPV2a	China	2008	perro
GQ169549	CPV2a	China	2008	perro
GQ169551	CPV2a	China	2008	perro
GQ169553	CPV	China	2007	perro
GQ502462	CPV2a	China	2008	civeta
GQ857596	CPV2a	China	2005	perro
GQ857597	CPV2a	China	2005	perro
GQ857599	CPV2b	China	2005	perro
GQ857600	CPV2a	China	2005	perro
GQ857601	CPV2b	China	2005	perro
GQ857603	CPV2b	China	2005	perro
GQ857604	CPV2a	China	2005	perro
GQ857605	CPV2b	China	2005	perro
GQ857606	CPV2a	China	2005	perro
GQ857607	CPV2a	China	2005	perro
GQ857609	CPV2b	China	2005	perro
GQ857610	CPV2b	China	2005	perro
GQ857612	CPV2a	China	2005	perro
GQ857614	CPV2a	China	2007	perro mapache
GU380299	CPV2b	China	2009	-
GU380300	CPV2b	China	2009	-
GU380301	CPV2a	China	2009	-
GU380303	CPV2c	China	2009	-
GU380304	CPV2a	China	2009	-
GU380305	CPV2c	China	2009	-
GU392236	CPV2a	China	2009	zorro
GU392237	CPV2a	China	2009	zorro
GU392238	CPV2a	China	2009	zorro

GU392239	CPV2a	China	2009	perro mapache
GU392240	CPV2	China	2009	perro mapache
GU392241	CPV2a	China	2009	perro mapache
GU392242	CPV2a	China	2009	perro mapache
GU392244	CPV2a	China	2009	perro mapache
GU452715	CPV2a	China	2009	perro
GU569936	CPV2a	China	2008	perro
GU569937	CPV2b	China	2002	perro
GU569938	CPV2b	China	2002	perro
GU569939	CPV2a	China	2002	perro
GU569940	CPV2b	China	2002	perro
GU569941	CPV2a	China	2002	perro
GU569942	CPV2a	China	2002	perro
GU569943	CPV2	China	2002	perro
GU569944	CPV2b	China	2002	perro
GU569946	CPV2a	China	2002	perro
GU569948	CPV2a	China	2002	perro
HQ651237	CPV2a	China	2010	perro
HQ883267	CPV2a	China	2010	perro
HQ883271	CPV2a	China	2010	perro
HQ883273	CPV2a	China	2010	perro
JF767494	CPV2a	China	2009	perro
JF789638	CPV2a	China	2010	perro
JF795452	CPV2a	China	2009	perro
JF795453	CPV2a	China	2009	perro
JF795454	CPV2a	China	2009	perro
JF795455	CPV2a	China	2009	perro
JN403045	CPV2a	China	2011	perro
JQ268284	CPV2b	China	2011	perro
JQ686671	CPV2a	China	2011	perro
JQ743890	CPV2b	China	2010	perro
JQ743891	CPV2b	China	2010	perro
JQ743892	CPV2b	China	2011	perro
JQ743894	CPV2b	China	2011	perro
JQ743895	CPV2a	China	2011	perro
JQ743896	CPV2a	China	2011	perro
JQ743897	CPV2a	China	2011	perro
JQ743898	CPV2a	China	2011	perro
JQ743900	CPV2a	China	2011	perro
JQ743902	CPV2a	China	2010	perro
JQ743903	CPV2a	China	2010	perro
JQ743905	CPV2a	China	2010	perro
JQ743906	CPV2a	China	2010	perro
JQ996151	CPV2a	China	2010	perro
JQ996152	CPV2a	China	2010	perro
JQ996153	CPV2a	China	2010	perro

JQ996154	CPV2a	China	2010	perro
JX120178	CPV2a	China	2010	perro
JX121627	CPV2a	China	2011	perro
KC262178	CPV2a	China	2012	civeta
KC881278	CPV2b	China	2010	perro
KF482468	CPV2c	China	2010	perro
KF482471	CPV2c	China	2009	perro
KF482472	CPV2a	China	2009	perro
KF482476	CPV2a	China	2009	perro
KF482477	CPV2a	China	2009	perro
KF482478	CPV2b	China	2009	perro
KF676668	CPV2a	China	2013	perro
KF803640	CPV2a	China	2013	perro
KF803641	CPV2a	China	2013	perro
KF803643	CPV2a	China	2013	perro
KJ170678	CPV2a	China	2010	perro mapache
KJ170679	CPV2a	China	2010	perro mapache
KJ170680	CPV2a	China	2011	perro mapache
KJ170681	CPV2a	China	2010	civetas
KJ186139	CPV	China	2008	zorro
KJ186140	CPV	China	2008	zorro
KJ186141	CPV2a	China	2008	perro
KJ186142	CPV2a	China	2008	perro
KJ438798	CPV2a	China	2011	perro
KJ438799	CPV2a	China	2011	perro
KJ438801	CPV2a	China	2012	perro
KJ438802	CPV2a	China	2012	perro
KJ438804	CPV2a	China	2012	perro
KJ438805	CPV2a	China	2013	perro
KJ674808	CPV2a	China	2013	perro
KJ674813	CPV2a	China	2013	perro
KJ674814	CPV2a	China	2013	perro
KJ674819	CPV2a	China	2013	perro
KM014812	CPV2a	China	2014	perro
KM386821	CPV2a	China	2014	perro
KM924289	CPV2a	China	2013	perro
KP260509	CPV2c	China	2014	perro
KP686093	CPV2a	China	2014	perro
KP749837	CPV2a	China	2014	perro
KP749838	CPV2a	China	2014	perro
KP749839	CPV2a	China	2014	perro
KP749840	CPV2b	China	2014	perro
KP749841	CPV2a	China	2014	perro
KP749842	CPV2a	China	2014	perro
KP749843	CPV2a	China	2014	perro
KP749844	CPV2a	China	2014	perro

KP749845	CPV2a	China	2014	perro
KP749846	CPV2a	China	2014	perro
KP749847	CPV2b	China	2014	perro
KP749848	CPV2a	China	2014	perro
KP749849	CPV2a	China	2014	perro
KP749850	CPV2a	China	2014	perro
KP749851	CPV2c	China	2014	perro
KP749852	CPV2b	China	2014	perro
KP749853	CPV2a	China	2014	perro
KP749854	CPV2c	China	2014	perro
KP749855	CPV2b	China	2014	perro
KR002792	CPV2a	China	2013	perro
KR002793	CPV2b	China	2013	perro
KR002796	CPV2b	China	2013	perro
KR002803	CPV2a	China	2014	perro
KR058183	CPV2b	China	2013	perro
KR611459	CPV2b	China	2014	perro
KR611460	CPV2b	China	2014	perro
KR611466	CPV2b	China	2014	perro
KR611467	CPV2b	China	2014	perro
KR611470	CPV2a	China	2014	perro
KR611471	CPV2b	China	2014	perro
KR611477	CPV2b	China	2014	perro
KR611479	CPV2a	China	2014	perro
KR611480	CPV2a	China	2014	perro
KR611481	CPV2a	China	2014	perro
KR611483	CPV2a	China	2014	perro
KR611484	CPV2a	China	2014	perro
KR611487	CPV2a	China	2014	perro
KR611490	CPV2b	China	2014	perro
KR611494	CPV2a	China	2014	perro
KR611498	CPV2a	China	2014	perro
KR611502	CPV2b	China	2014	perro
KR611504	CPV2b	China	2014	perro
KR611506	CPV2a	China	2014	perro
KR611510	CPV2b	China	2014	perro
KR611513	CPV2a	China	2014	perro
KR611515	CPV2a	China	2014	perro
KR611517	CPV2a	China	2014	perro
KR611520	CPV2b	China	2014	perro
KR611522	CPV2c	China	2014	perro
KR869652	CPV2a	China	2014	perro
KR869653	CPV2a	China	2014	perro
KR869654	CPV2a	China	2014	perro
KR869656	CPV2a	China	2014	perro
KR869658	CPV2a	China	2014	perro

KR869659	CPV2a	China	2014	perro
KR869660	CPV2a	China	2014	perro
KR869661	CPV2a	China	2014	perro
KR869662	CPV2a	China	2014	perro
KR869663	CPV2a	China	2014	perro
KR869664	CPV2a	China	2014	perro
KR869665	CPV2a	China	2014	perro
KR869666	CPV2a	China	2014	perro
KR869667	CPV2a	China	2014	perro
KR869669	CPV2a	China	2014	perro
KR869670	CPV2a	China	2014	perro
KR869671	CPV2a	China	2014	perro
KR869672	CPV2a	China	2014	perro
KR869673	CPV2a	China	2014	perro
KR869674	CPV2a	China	2014	perro
KR869675	CPV2a	China	2014	perro
KR869678	CPV2a	China	2014	perro
KT156825	CPV2a	China	2014	perro
KT156826	CPV2a	China	2014	perro
KT156828	CPV2a	China	2014	perro
KT156829	CPV2a	China	2014	perro
KT156830	CPV2a	China	2014	perro
KT156832	CPV2c	China	2014	perro
KT156834	CPV2a	China	2014	perro
KT156835	CPV2a	China	2014	perro
KT156836	CPV2a	China	2014	perro
KT156837	CPV2b	China	2014	perro
KT162014	CPV2c	China	2014	perro
KT162022	CPV2b	China	2014	perro
KT162023	CPV2b	China	2014	perro
KT162024	CPV2b	China	2014	perro
KT162029	CPV2a	China	2014	perro
KT162030	CPV2a	China	2014	perro
KT162032	CPV2a	China	2014	perro
KT162033	CPV2a	China	2014	perro
KT162038	CPV2a	China	2014	perro
KT162041	CPV2a	China	2015	perro
KT162043	CPV2a	China	2015	perro
KT162046	CPV2a	China	2015	perro
KT382542	CPV2a	China	2014	perro
KU983478	CPV2a	China	2016	perro
KU983481	CPV2a	China	2016	perro
KY386850	CPV2a	China	2015	perro
KY386851	CPV2a	China	2015	perro
KY386853	CPV2c	China	2015	perro
KY386854	CPV2a	China	2016	perro

KY386855	CPV2a	China	2016	perro
KY386856	CPV2c	China	2016	perro
KY386857	CPV2c	China	2016	perro
KY386858	CPV2a	China	2016	perro
KY386859	CPV2a	China	2016	perro
KY403998	CPV2a	China	2008	perro
KY922906	CPV2a	China	2016	perro
KY922907	CPV2c	China	2016	perro
KY922908	CPV2a	China	2016	perro
KY922910	CPV2c	China	2016	perro
KY937637	CPV2c	China	2016	perro
KY937639	CPV2a	China	2016	perro
KY937640	CPV2a	China	2016	perro
KY937641	CPV2c	China	2016	perro
KY937645	CPV2a	China	2016	perro
KY937646	CPV2a	China	2016	perro
KY937647	CPV2c	China	2016	perro
KY937648	CPV2c	China	2016	perro
KY937650	CPV2c	China	2016	perro
KY937651	CPV2c	China	2017	perro
KY937653	CPV2a	China	2017	perro
KY937654	CPV2a	China	2017	perro
KY937655	CPV2c	China	2017	perro
KY937656	CPV2b	China	2016	perro
KY937657	CPV2b	China	2016	perro
KY937658	CPV2c	China	2016	perro
KY937659	CPV2b	China	2017	perro
KY937660	CPV2a	China	2017	perro
KY937662	CPV2c	China	2016	perro
KY937665	CPV2a	China	2016	perro
KY937666	CPV2a	China	2017	perro
KY937669	CPV2a	China	2016	perro
KY937671	CPV2b	China	2016	perro
KY937673	CPV2a	China	2016	perro
KY937674	CPV2a	China	2016	perro
KY937675	CPV2a	China	2016	perro
MF001435	CPV2c	China	2016	perro
MF001436	CPV2c	China	2016	perro
MF001437	CPV2c	China	2016	perro
MF001438	CPV2a	China	2016	perro
MF001439	CPV2a	China	2016	perro
MF467225	CPV2c	China	2015	perro
MF467226	CPV2a	China	2015	perro
MF467227	CPV2a	China	2016	perro
MF467228	CPV2a	China	2016	perro
MF467229	CPV2c	China	2016	perro

MF467230	CPV2a	China	2016	perro
MF467231	CPV2a	China	2016	perro
MF467232	CPV2a	China	2016	perro
MF467234	CPV2a	China	2015	perro
MF467235	CPV2a	China	2015	perro
MF467236	CPV2a	China	2015	perro
MF467237	CPV2a	China	2015	perro
MF467238	CPV2b	China	2015	perro
MF467240	CPV2a	China	2015	perro
MF467241	CPV2a	China	2015	perro
MF541141	CPV2b	China	2016	gato
MF541142	CPV2a	China	2016	gato
MF918377	CPV2a	China	2017	perro
MF918379	CPV2c	China	2017	perro
MF918383	CPV2a	China	2017	perro
MF918386	CPV2a	China	2017	perro
MF918393	CPV2a	China	2017	perro
MF996332	CPV2a	China	2016	perro mapache
MF996333	CPV2a	China	2016	perro mapache
MF996334	CPV2a	China	2016	perro mapache
MG583676	CPV2a	China	2017	yak
MG764512	CPV2a	China	2006	mapache
MG764513	CPV2a	China	2006	mapache
MG764514	CPV2a	China	2006	mapache
MH155192	CPV2b	China	2017	perro
MH155193	CPV2c	China	2017	perro
MH177301	CPV2a	China	2017	perro
MH177302	CPV2a	China	2017	perro
MH177305	CPV2c	China	2017	perro
MH177308	CPV2c	China	2017	perro
MH177311	CPV2c	China	2017	perro
MH177314	CPV2c	China	2017	perro
MH329284	CPV2a	China	2016	gato
MH329285	CPV2a	China	2016	gato
MH329287	CPV2a	China	2016	gato
MH581179	CPV2a	China	2011	perro mapache
MH581183	CPV2a	China	2009	perro mapache
MH626541	CPV2a	China	2018	perro
MH626542	CPV2a	China	2018	perro
MH626543	CPV2a	China	2018	perro
MH626544	CPV2c	China	2018	perro
MH626545	CPV2c	China	2018	perro
MH626547	CPV2a	China	2018	perro
MH626548	CPV2a	China	2018	perro
MH626549	CPV2a	China	2014	perro
MH626550	CPV2a	China	2014	perro

MH626551	CPV2a	China	2014	perro
MH626552	CPV2a	China	2014	perro
MH626553	CPV2a	China	2014	perro
MH626556	CPV2a	China	2014	perro
MH660523	CPV2a	China	2018	perro
MH660524	CPV2b	China	2018	perro
MK208971	CPV2a	China	2016	perro mapache
MK208972	CPV2a	China	2017	perro mapache
MK256738	CPV2a	China	2017	perro
MK268681	CPV2a	China	2018	perro
MK268683	CPV2b	China	2018	perro
MK331997	CPV2c	China	2016	perro
MK331998	CPV2c	China	2016	perro
MK332000	CPV2c	China	2016	perro
MK332006	CPV2b	China	2016	perro
MK332007	CPV2c	China	2016	perro
MK517966	CPV2c	China	2016	perro
MK517967	CPV2c	China	2016	perro
MK517969	CPV2c	China	2016	perro
MK517970	CPV2c	China	2016	perro
MK517971	CPV2a	China	2016	perro
MK517972	CPV2c	China	2016	perro
MK517974	CPV2a	China	2017	perro
MK517975	CPV2a	China	2017	perro
MK517976	CPV2c	China	2017	perro
MK517977	CPV2a	China	2017	perro
MK517978	CPV2c	China	2017	perro
MK517979	CPV2c	China	2017	perro
MK517980	CPV2a	China	2017	perro
MK517981	CPV2c	China	2017	perro
MK517982	CPV2a	China	2017	perro
MK517983	CPV2b	China	2017	perro
MK517985	CPV2a	China	2017	perro
MK517986	CPV2c	China	2017	perro
MK517987	CPV2c	China	2017	perro
MK517988	CPV2c	China	2017	perro
MK517989	CPV2c	China	2016	perro
MK517990	CPV2c	China	2016	perro
MK517991	CPV2c	China	2016	perro
MK517992	CPV2c	China	2017	perro
MK517993	CPV2c	China	2017	perro
MK517994	CPV2c	China	2017	perro
MK517995	CPV2a	China	2017	perro
MK517996	CPV2c	China	2017	perro
MK517997	CPV2c	China	2017	perro
MK517998	CPV2c	China	2017	perro

MK517999	CPV2c	China	2017	perro
MK518000	CPV2a	China	2017	perro
MK518001	CPV2c	China	2017	perro
MK518002	CPV2a	China	2017	perro
MK518003	CPV2c	China	2017	perro
MK518004	CPV2c	China	2016	perro
MK518005	CPV2c	China	2016	perro
MK518006	CPV2c	China	2016	perro
MK518007	CPV2b	China	2016	perro
MK518008	CPV2c	China	2017	perro
MK518010	CPV2c	China	2017	perro
MK518011	CPV2b	China	2017	perro
MK518012	CPV2c	China	2017	perro
MK518013	CPV2a	China	2017	perro
MK518014	CPV2c	China	2016	perro
MK518015	CPV2c	China	2016	perro
MK518016	CPV2a	China	2016	perro
MK518017	CPV2a	China	2017	perro
MK518018	CPV2c	China	2017	perro
MK518019	CPV2c	China	2017	perro
MK518020	CPV2c	China	2017	perro
MK518021	CPV2c	China	2017	perro
KR002801	CPV2a	China	2014	perro
KR002802	CPV2a	China	2014	perro
KR002794	CPV2a	China	2013	perro
KR002795	CPV2a	China	2013	perro
MN114239	CPV2a	China	2019	perro
MF177265	CPV2a	Ecuador	2011	-
MF177276	CPV2a	Ecuador	2011	-
MF177269	CPV2b	Ecuador	2011	-
MF177280	CPV2b	Ecuador	2011	-
MF177263	CPV2c	Ecuador	2011	-
MF177264	CPV2c	Ecuador	2011	-
MF177266	CPV2c	Ecuador	2011	-
MF177270	CPV2c	Ecuador	2011	-
MF177271	CPV2c	Ecuador	2011	-
MF177272	CPV2c	Ecuador	2011	-
MF177273	CPV2c	Ecuador	2011	-
MF177274	CPV2c	Ecuador	2011	-
MF177278	CPV2c	Ecuador	2011	-
MF177227	CPV2c	Francia	2009	-
AY742935	CPV2a	Alemania	1995	-
AY742934	CPV2b	Alemania	1995	-
KF366250	CPV2a	India	2013	perro
AJ564427	CPV2a	India	1999	perro
MH545963	CPV2a	India	2018	perro

KX219732	CPV2a	India	2015	perro
KX219733	CPV2a	India	2015	perro
KX219736	CPV2a	India	2012	perro
KX219737	CPV2a	India	2015	perro
KX219741	CPV2a	India	2015	perro
KX425922	CPV2a	India	2015	perro
KX425924	CPV2a	India	2014	perro
KX469434	CPV2a	India	2016	perro
KX469435	CPV2a	India	2016	perro
KX878988	CPV2a	India	2016	perro
MH891835	CPV2a	India	2017	perro
MH891836	CPV2a	India	2017	perro
MH891837	CPV2a	India	2018	perro
MF177233	CPV2a	Italia	1999	perro
MF177231	CPV2a	Italia	2000	-
MF177224	CPV2a	Italia	1997	-
KX434454	CPV2a	Italia	2009	perro
KX434457	CPV2a	Italia	2010	perro
MG434742	CPV2a	Italia	2017	perro
MG434740	CPV2a	Italia	2017	perro
MG434738	CPV2a	Italia	2016	perro
MG434739	CPV2a	Italia	2016	perro
MG434741	CPV2a	Italia	2017	perro
MF177226	CPV2b	Italia	1999	-
MF177232	CPV2b	Italia	1998	-
MF177225	CPV2b	Italia	1998	-
MF177238	CPV2c	Italia	2005	-
MF177237	CPV2c	Italia	2007	-
MF177240	CPV2c	Italia	2002	-
MF177236	CPV2c	Italia	2004	-
MF177235	CPV2c	Italia	2006	-
MF177239	CPV2c	Italia	2001	-
MF177234	CPV2c	Italia	2003	-
MF177228	CPV2c	Italia	2009	-
MF177228	CPV2c	Italia	2010	-
KX434458	CPV2c	Italia	2011	perro
KX434455	CPV2c	Italia	2009	perro
KU508407	CPV2c	Italia	2009	perro
KX434459	CPV2c	Italia	2011	perro
KX434459	CPV2c	Italia	2016	perro
KX434456	CPV2c	Italia	2009	perro
KX434460	CPV2c	Italia	2012	perro
MF510157	CPV2c	Italia	2017	perro
MH491862	CPV2a	Italia	2010	-
MH491880	CPV2a	Italia	2014	-
MH491895	CPV2a	Italia	2015	-

MK806279	CPV2c	Italia	2018	perro
MK806280	CPV2c	Italia	2018	perro
MK806281	CPV2c	Italia	2018	perro
MK806284	CPV2c	Italia	2019	perro
MK806285	CPV2c	Italia	2019	perro
D26079	CPV2a	Japón	1982	perro
MK895483	CPV2a	Nigeria	2018	perro
MK895484	CPV2a	Nigeria	2018	perro
MK895486	CPV2c	Nigeria	2018	perro
MK895487	CPV2c	Nigeria	2018	perro
MK895488	CPV2c	Nigeria	2018	perro
MK895489	CPV2c	Nigeria	2018	perro
AY742933	CPV2a	Nueva Zelanda	1994	-
MF177262	CPV2c	Paraguay	2009	-
KX618915	CPV2a	Singapur	2014	palm civeta
EU659116	CPV2	Estados Unidos	1979	perro
EU659117	CPV2	Estados Unidos	1980	perro
EU659118	CPV2a	Estados Unidos	1981	-
M24003	CPV2a	Estados Unidos	1984	perro
M24000	CPV2a	Estados Unidos	1983	-
JN867617	CPV2a	Estados Unidos	2008	mapache
JN867613	CPV2a	Estados Unidos	2009	mapache
JN867615	CPV2a	Estados Unidos	2008	mapache
JN867616	CPV2a	Estados Unidos	2008	mapache
JN867611	CPV2a	Estados Unidos	2009	mapache
JN867612	CPV2a	Estados Unidos	2009	mapache
JN867610	CPV2a	Estados Unidos	2007	mapache
JN867614	CPV2a	Estados Unidos	2009	mapache
JN867618	CPV2a	Estados Unidos	2010	mapache
AY742932	CPV2b	Estados Unidos	1991	-
AY742936	CPV2b	Estados Unidos	1998	-
EU659119	CPV2b	Estados Unidos	2000	-
EU659120	CPV2b	Estados Unidos	1998	-
EU659121	CPV2b	Estados Unidos	1998	-
MF457594	CPV2c	Estados Unidos	2015	perro
M19296	CPV2	Estados Unidos	1978	-
MN451653	CPV2	Estados Unidos	1979	perro
MN451654	CPV2	Estados Unidos	1979	perro
MN451655	CPV2	Estados Unidos	1978	perro
KM457102	CPV2a	Uruguay	2010	perro
KM457135	CPV2a	Uruguay	2011	perro
KM457136	CPV2a	Uruguay	2011	perro
KM457139	CPV2a	Uruguay	2011	perro
MF177281	CPV2a	Uruguay	2006	perro
KM457110	CPV2c	Uruguay	2007	perro
KM457103	CPV2c	Uruguay	2006	perro

KM457111	CPV2c	Uruguay	2008	perro
KM457113	CPV2c	Uruguay	2008	perro
KM457114	CPV2c	Uruguay	2008	perro
KM457115	CPV2c	Uruguay	2009	perro
MF177283	CPV2c	Uruguay	2009	perro
KM457116	CPV2c	Uruguay	2009	perro
KM457117	CPV2c	Uruguay	2009	perro
KM457118	CPV2c	Uruguay	2009	perro
MF177284	CPV2c	Uruguay	2009	perro
MF177282	CPV2c	Uruguay	2006	perro
KM457119	CPV2c	Uruguay	2010	perro
KM457120	CPV2c	Uruguay	2010	perro
KM457121	CPV2c	Uruguay	2010	perro
KM457122	CPV2c	Uruguay	2010	perro
MF177285	CPV2c	Uruguay	2010	perro
KM457124	CPV2c	Uruguay	2011	perro
KM457125	CPV2c	Uruguay	2011	perro
KM457126	CPV2c	Uruguay	2010	perro
KM457127	CPV2c	Uruguay	2011	perro
KM457128	CPV2c	Uruguay	2011	perro
KM457129	CPV2c	Uruguay	2011	perro
KM457131	CPV2c	Uruguay	2011	perro
MF177286	CPV2c	Uruguay	2011	perro
KM457104	CPV2c	Uruguay	2006	perro
KM457105	CPV2c	Uruguay	2006	perro
KM457106	CPV2c	Uruguay	2006	perro
KM457107	CPV2c	Uruguay	2007	perro
KM457108	CPV2c	Uruguay	2007	perro
KM457109	CPV2c	Uruguay	2007	perro
LC214970	CPV2a	Vietnam	2013	perro
LC214969	CPV2c	Vietnam	2013	perro

10.3. Anexo 3

Tabla 14. Secuencias utilizadas en el set de datos usado para la inferencia del árbol filogenético. Se detalla número de acceso GenBank (número de muestra en el caso de las secuencias obtenidas en esta tesis y secuenciadas anteriormente por nuestro grupo de trabajo), variante antigénica, país de origen, año de colecta y hospedero.

Nº de acceso GenBank/ Nº de muestra	Variante	País	Año	Hospedero
MF177246	CPV2b	Argentina	2009	-
JF414826	CPV2c	Argentina	2010	perro
KM236570	CPV2a	Argentina	2012	perro
KM236573	CPV2a	Argentina	2012	perro
MK344470	CPV2b	Brasil	2015	perro

MK344461	CPV2c	Brasil	2015	perro
MK344446	CPV2c	Brasil	2017	perro
MK344448	CPV2c	Brasil	2017	perro
MK344464	CPV2c	Brasil	2015	perro
KX774249	CPV2b	Brasil	2014	perro
MF177258	CPV2b	Brasil	2013	perro
DQ340430	CPV2a	Brasil	1995	perro
MK344449	CPV2a	Brasil	2017	perro
MK344445	CPV2a	Brasil	2017	perro
MK344444	CPV2a	Brasil	2017	perro
MK344442	CPV2a	Brasil	2017	perro
MF423123	CPV2b	Canadá	2014	coyote
DQ177497	CPV2b	China	2000	perro
EF028071	CPV2b	China	2006	-
EU213075	CPV2b	China	2007	perro
KP260509	CPV2c	China	2014	perro
KF482468	CPV2c	China	2010	perro
MK517979	CPV2c	China	2017	perro
MK517987	CPV2c	China	2017	perro
GQ857603	CPV2b	China	2005	perro
GQ857610	CPV2b	China	2005	perro
DQ903936	CPV2a	China	2006	-
GQ169544	CPV2a	China	2008	perro
EU213084	CPV2a	China	2007	perro
GU380305	CPV2c	China	2009	-
EF666060	CPV2a	China	2007	-
EU377537	CPV2a	China	2006	perro
HQ651237	CPV2a	China	2010	perro
JQ996151	CPV2a	China	2010	perro
JQ996152	CPV2a	China	2010	perro
JQ996153	CPV2a	China	2010	perro
JQ996154	CPV2a	China	2010	perro
KT162022	CPV2b	China	2014	perro
KR869673	CPV2a	China	2014	perro
KT162029	CPV2a	China	2014	perro
KT162030	CPV2a	China	2014	perro
KJ438802	CPV2a	China	2012	perro
KY386859	CPV2a	China	2016	perro
MH626543	CPV2a	China	2018	perro
MK517974	CPV2a	China	2017	perro
JQ743894	CPV2b	China	2011	perro
KP749852	CPV2b	China	2014	perro
KP749846	CPV2a	China	2014	perro
MK256738	CPV2a	China	2017	perro
MK268681	CPV2a	China	2018	perro
GQ169546	CPV2a	China	2008	perro

EU697385	CPV2a	China	2007	perro
FJ435347	CPV2a	China	2008	-
JF789638	CPV2a	China	2010	perro
MG764513	CPV2a	China	2006	mapache
MG764514	CPV2a	China	2006	mapache
GQ169549	CPV2a	China	2008	perro
GQ169551	CPV2a	China	2008	perro
JQ743895	CPV2a	China	2011	perro
EU213082	CPV2a	China	2007	perro
GQ857604	CPV2a	China	2005	perro
GQ502462	CPV2a	China	2008	civeta
GQ857597	CPV2a	China	2005	perro
KR002801	CPV2a	China	2014	perro
KR002802	CPV2a	China	2014	perro
KR002794	CPV2a	China	2013	perro
KR002795	CPV2a	China	2013	perro
MF177265	CPV2a	Ecuador	2011	-
MF177273	CPV2c	Ecuador	2011	-
AJ564427	CPV2a	India	1999	perro
KF366250	CPV2a	India	2013	perro
KX219733	CPV2a	India	2015	perro
MF177232	CPV2b	Italia	1998	-
MF177225	CPV2b	Italia	1998	-
MF177233	CPV2a	Italia	1999	perro
476	CPV2a	Uruguay	2013	perro
486	CPV2a	Uruguay	2014	perro
530	CPV2a	Uruguay	2015	perro
579	CPV2a	Uruguay	2016	perro
632	CPV2a	Uruguay	2019	perro
631	CPV2a	Uruguay	2019	perro
630	CPV2a	Uruguay	2019	perro
618	CPV2a	Uruguay	2017	perro
617	CPV2a	Uruguay	2017	perro
626	CPV2a	Uruguay	2019	perro
624	CPV2a	Uruguay	2018	perro
623	CPV2a	Uruguay	2018	perro
620	CPV2a	Uruguay	2017	perro
629	CPV2a	Uruguay	2019	perro
621	CPV2a	Uruguay	2017	perro
KM457110	CPV2c	Uruguay	2007	perro
KM457114	CPV2c	Uruguay	2008	perro
MF177281	CPV2a	Uruguay	2006	perro
KM457132	CPV2a	Uruguay	2010	perro
KM457134	CPV2a	Uruguay	2010	perro
KM457135	CPV2a	Uruguay	2011	perro
KM457136	CPV2a	Uruguay	2011	perro

EU659116	CPV2	Estados Unidos	1979	perro
MF457594	CPV2c	Estados Unidos	2015	perro
EU659120	CPV2b	Estados Unidos	1998	-

10.4. Anexo 4

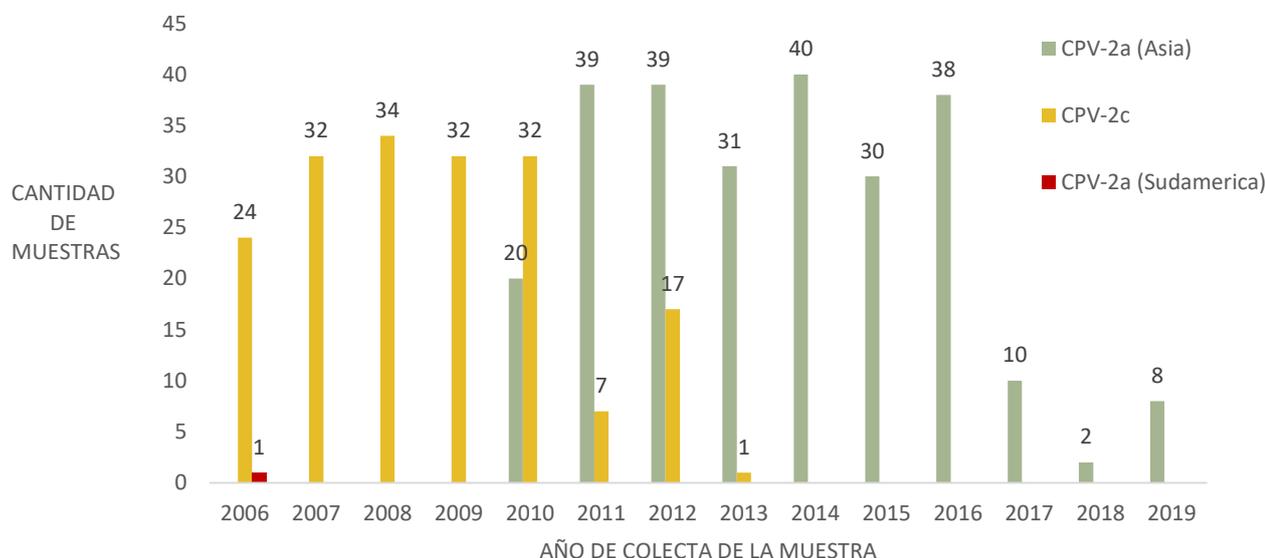


Figura 11. Frecuencia de las variantes detectadas para CPV en Uruguay por año reportadas por nuestro grupo de trabajo desde 2006. Son un total de 484 muestras, de las cuales 41 resultaron negativas para CPV. Se muestra en rojo la caracterizada como CPV-2a perteneciente al clado sudamericano, en amarillo el número de muestras caracterizadas como CPV-2c, y en verde las caracterizadas como CPV-2a pertenecientes al clado asiático.

10.4. Anexo 5

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 MK344449_CPV2a_BR_2017_dog															
2 MK344445_CPV2a_BR_2017_dog	0,00057														
3 MK344444_CPV2a_BR_2017_dog	0,00114	0,00057													
4 MK344442_CPV2a_BR_2017_dog	0,00114	0,00057	0,00114												
5 CPV2a-621_UY_2017_dog	0,00114	0,00171	0,00228	0,00228											
6 CPV2a_URU_632_2019_dog	0,00057	0,00114	0,00171	0,00171	0,00171										
7 CPV2a_URU_631_2019_dog	0,00000	0,00057	0,00114	0,00114	0,00114	0,00057									
8 CPV2a_URU_630_2019_dog	0,00057	0,00114	0,00171	0,00171	0,00171	0,00114	0,00057								
9 CPV2a_URU_629_2019_dog	0,00000	0,00057	0,00114	0,00114	0,00114	0,00057	0,00000	0,00057							
10 CPV2a_URU_626_2019_dog	0,00000	0,00057	0,00114	0,00114	0,00114	0,00057	0,00000	0,00057	0,00000						
11 CPV2a_URU_624_2018_dog	0,00000	0,00057	0,00114	0,00114	0,00114	0,00057	0,00000	0,00057	0,00000	0,00000					
12 CPV2a_URU_623_2018_dog	0,00057	0,00114	0,00171	0,00171	0,00171	0,00114	0,00057	0,00114	0,00057	0,00057	0,00057				
13 CPV2a_URU_620_2017_dog	0,00000	0,00057	0,00114	0,00114	0,00114	0,00057	0,00000	0,00057	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000			
14 CPV2a_URU_618_2017_dog	0,00000	0,00057	0,00114	0,00114	0,00114	0,00057	0,00000	0,00057	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00057		
15 CPV2a_URU_617_2017_dog	0,00114	0,00171	0,00228	0,00228	0,00228	0,00171	0,00114	0,00171	0,00114	0,00114	0,00114	0,00171	0,00114	0,00114	

Figura 12. Matriz de *p-distance* entre secuencias obtenidas en este trabajo y secuencias brasileras (MK344442, MK344444, MK344445 y MK344449), obtenida con el software Mega X.

11. Referencias bibliográficas

- Agbandje, M., Parrish, C. R., & Rossmann, M. G. (1995). The structure of parvoviruses. *Seminars in Virology*, 6(5), 299-309.
- Aldaz, J., J. García-Díaz, L. Calleros, K. Sosa, G. Iraola, A. Marandino, M. Hernández, Y. Panzera, & R. Pérez. (2013). High Local Genetic Diversity of Canine Parvovirus from Ecuador. *Veterinary Microbiology* 166(1-2): 214–19.
- Altman, K.D., Kelman, M. & Ward, M.P. (2017). Are vaccine strain, type or administration protocol risk factors for canine parvovirus vaccine failure? *Veterinary Microbiology*, 210, 8-16.
- Appel, M. J., Cooper, B. J., Greisen, H., Scott, F., & Carmichael, L. E. (1979). Canine viral enteritis. I. Status report on corona- and parvo-like viral enteritides. *The Cornell Veterinarian*, 69(3), 123-133.
- Berns, K. I. (1990). Parvovirus replication. *Microbiological Reviews*, 54(3), 316-329.
- Bucafusco, D., Argibay, H., Diaz, L., Vega, C., Minatel, L., Postma, G. C., Rinas, M., & Bratanich, A. (2019). First characterization of a canine parvovirus causing fatal disease in coatis (*Nasua nasua*). *Archives of Virology*, 164(12), 3073-3079.
- 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. *The Journal of General Virology*, 82(Pt 12), 3021-3025.
- Calatayud, O., Esperón, F., Velarde, R., Oleaga, A., Llana, L., Ribas, A., Negre, N., de la Torre, A., Rodríguez, A., & Millán, J. (2020). Genetic characterization of Carnivore Parvoviruses in Spanish wildlife reveals domestic dog and cat-related sequences. *Transboundary Emerging Diseases*, 67(2):626-634.
- 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. *Journal of Virological Methods*, 159(2), 141–145.
- Calderón, M., Wilda, M., Boado, L., Keller, L., Malirat, V., Iglesias, M., ... La Torre, J. (2011). 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.
- Calderón, M. G., Romanutti, C., Antuono, A. D., 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.
- Calderón, M., Romanutti, C., Wilda, M., D' Antuono, A., Keller, L., Giacomodonato, M. N., 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.
- Callaway, H. M., Feng, K. H., Lee, D. W., Allison, A. B., Pinard, M., McKenna, R., Agbandje-McKenna, M., Hafenstein, S., & Parrish, C. R. (2017). Parvovirus Capsid Structures Required for

- Infection: Mutations Controlling Receptor Recognition and Protease Cleavages. *Journal of Virology*, 91(2).
- Carmichael, L. E. (2005). An annotated historical account of canine parvovirus. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 52(7-8), 303-311.
- Castillo, C., Meira, V., Aníñir, P., Grecco, S., Pérez, R., Panzera, Y., Zegpi, N., Sandoval, A., Sandoval, D., Cpfre, S. & Ortega, R. (2020). First Molecular Identification of Canine Parvovirus Type 2 (CPV2) in Chile Reveals High Occurrence of CPV2c Antigenic Variant. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 194.
- Cavalli, A., Martella, V., Desario, C., Camero, M., Bellacicco, A. L., 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 : CVI*, 15(3), 534-539.
- Christensen, J., Cotmore, S. F., & Tattersall, P. (1995). Minute virus of mice transcriptional activator protein NS1 binds directly to the transactivation region of the viral P38 promoter in a strictly ATP-dependent manner. *Journal of Virology*, 69(9), 5422-5430.
- Cotmore, S. F., Agbandje-McKenna, M., Chiorini, J. A., Mukha, D. V., Pintel, D. J., Qiu, J., Soderlund-Venermo, M., Tattersall, P., Tijssen, P., Gatherer, D., & Davison, A. J. (2014). The family Parvoviridae. *Archives of Virology*, 159(5), 1239-1247.
- Cotmore, S. F., & Tattersall, P. (1996). 28 Parvovirus DNA Replication. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, 31(0), 799-813.
- Cotmore, S. F., & Tattersall, P. (2007). Parvoviral host range and cell entry mechanisms. *Advances in Virus Research*, 70, 183-232.
- Day, M.J., Horzinek, M.C., Schultz, R.D. & Squires, R.A. (2016). WSAVA Guidelines for the vaccination of dogs and cats. Vaccination Guidelines Group (VGG) of the World Small Animal Veterinary Association (WSAVA). *Journal of Small Animal Practice*, 57, 4-8.
- Decaro, N. & Buonavoglia, C. (2012). Canine parvovirus-A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Veterinary Microbiology*, 155, 1-12.
- Decaro, N., Buonavoglia, C., & Barrs, V. R. (2020). Canine parvovirus vaccination and immunisation failures: are we far from disease eradication? *Veterinary Microbiology*, 108760.
- De la Torre, D., Mafla, E., Puga, B., Erazo, L., Astolfi-Ferreira, C., & Ferreira, A. P. (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.
- de Oliveira, P. S. B., Cargnelutti, J. F., Masuda, E. K., Weiblen, R., & Flores, E. F. (2019). New variants of canine parvovirus in dogs in southern Brazil. *Archives of Virology*, 164(5), 1361-1369.
- Deng, W., Maust, B., Nickle*, D., Learn**, G., Liu, Y., Heath, L., Kosakovsky Pond, S., & Mullins, J. (2010). DIVEIN: A web server to analyze phylogenies, sequence divergence, diversity, and informative sites. *BioTechniques*, 48(5), 405-408.
- Deng, W., Maust, B. S., Nickle, D. C., Learn, G. H., Liu, Y., Heath, L., Kosakovsky Pond, S. L., & Mullins, J. I. (2010). DIVEIN: A web server to analyze phylogenies, sequence divergence, diversity, and informative sites. *BioTechniques*, 48(5), 405-408.

- 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? *Journal of Virological Methods*, *126*(1-2), 179-185.
- Fletcher, K. C., Eugster, A. K., Schmidt, R. E., & Hubbard, G. B. (1979). Parvovirus infection in maned wolves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *175*(9), 897-900.
- Fontana, D. S., Rocha, P. R. D., Cruz, R. A. S., Lopes, L. L., Melo, A. L. T., Silveira, M. M., Aguiar D. M. & Pescador C. A. (2013). A phylogenetic study of canine parvovirus type 2c in midwestern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, *33*(2), 214–218.
- Franco, V. (2016). Vacunas para caninos: duración de la inmunidad y recomendaciones para su utilización. (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, UdelaR. Montevideo, Uruguay.
- Gagnon, A. N., Crowe, S. P., Allen, D. G., & Downey, R. S. (1980). Myocarditis in Puppies: Clinical, Pathological and Virological Findings. *The Canadian Veterinary Journal*, *21*(7), 195-197.
- Giraldo-Ramirez, S., Rendon-Marin, S., & Ruiz-Saenz, J. (2020). Phylogenetic, Evolutionary and Structural Analysis of Canine Parvovirus (CPV-2) Antigenic Variants Circulating in Colombia. *Viruses*, *12*(5).
- Grecco, S. (2014). Diagnóstico y caracterización genética de parvovirus canino en Uruguay durante 2012 y 2013 (Tesis de grado). Facultad de Ciencias, UdelaR. Montevideo, Uruguay.
- Grecco, S., Iraola, G., Decaro, N., Alfieri, A., Alfieri, A., Gallo Calderón, M., da Silva, A. P., 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), vey011.
- Hanson, N. D., & Rhode, S. L. (1991). Parvovirus NS1 stimulates P4 expression by interaction with the terminal repeats and through DNA amplification. *Journal of Virology*, *65*(8), 4325-4333.
- Hernández-Blanco, B. ŞCatala-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*, 1-9.
- Hoelzer, K., & Parrish, C. R. (2010). The emergence of parvoviruses of carnivores. *Veterinary Research*, *41*(6).
- Hoelzer, K., Shackelton, L. A., Parrish, C. R., & Holmes, E. C. (2008). Phylogenetic analysis reveals the emergence, evolution and dispersal of carnivore parvoviruses. *The Journal of General Virology*, *89*(Pt 9), 2280-2289.
- Huang, Y., Niu, B., Gao, Y., Fu, L., & Li, W. (2010). CD-HIT Suite: A web server for clustering and comparing biological sequences. *Bioinformatics*, *26*(5), 680-682.
- Hueffer, K., Parker, J. S. L., Weichert, W. S., Geisel, R. E., Sgro, J.-Y., & Parrish, C. R. (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.

- Hurtado, A., Rueda, P., Nowicky, J., Sarraseca, J., & Casal, J. I. (1996). Identification of domains in canine parvovirus VP2 essential for the assembly of virus-like particles. *Journal of Virology*, 70(8), 5422-5429.
- Kang, B.K., Song, D.S., Lee, C.S., Jung, K.I., Park, S.J., Kim, E.M. & Park, B.K. (2008). Prevalence and genetic characterization of canine parvoviruses in Korea. *Virus Genes* 36, 127-133.
- Kosakovsky Pond, S. L., & Frost, S. D. W. (2005). Not So Different After All: A Comparison of Methods for Detecting Amino Acid Sites Under Selection. *Molecular Biology and Evolution*, 22(5), 1208-1222.
- Li, W., & Godzik, A. (2006). Cd-hit: A fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 22(13), 1658-1659.
- Liu, P., Chen, S., Wang, M., & Cheng, A. (2017). The role of nuclear localization signal in parvovirus life cycle. *Virology Journal*, 14.
- López de Turiso, J. A., 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.
- López-Bueno, A., Villarreal, L. P., & Almendral, J. M. (2006). Parvovirus variation for disease: A difference with RNA viruses? *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 299, 349-370.
- Maya, L. (2011). Estudio evolutivo del gen codificante de las proteínas estructurales VP1/VP2 de cepas de parvovirus canino de Uruguay. (Tesis de Maestría). Facultad de Ciencias, UdelaR. Montevideo, Uruguay.
- 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. *Archives of Virology*, 158(6), 1133-1141.
- Miller, C. L., & Pintel, D. J. (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.
- Minh, B. Q., Nguyen, M. A. T., & von Haeseler, A. (2013). Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), 1188-1195.
- Monteiro, K., Allendorf, K., Vicente, A., Appolinário, C. M., Peres, M. G., Cortez, A. & Heinemann M. B. (2016). Viral type characterization and clinical aspects of canine parvovirus in naturally infected dogs in São Paulo State, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 36(12), 1181-1185.
- Nandi, S., Kumar, M., Mohapatra, T. K., & Ravishankar, C. (2013). *Emergence of Canine Parvovirus—2 Variants and its Impact on Vaccination*. 23, 1366-1376.
- Nei, M. & Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Nguyen, L.T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268-274.

- Niskanen, E. A., Ihalainen, T. O., Kalliolinna, O., Häkkinen, M. M., & Vihinen-Ranta, M. (2010). Effect of ATP Binding and Hydrolysis on Dynamics of Canine Parvovirus NS1. *Journal of Virology*, *84*(10), 5391-5403.
- Orozco, M. M., Miccio, L., Enriquez, G. F., Iribarren, F. E., & Gürtler, R. E. (2014). Serologic evidence of canine parvovirus in domestic dogs, wild carnivores, and marsupials in the Argentinean Chaco. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine: Official Publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, *45*(3), 555-563.
- Ortega, R., Mena, J., Grecco, S., Pérez, R., Panzera, Y., Constanza Napolitano, C., Zegpi, N., Sandoval, A., Daniel Sandoval, D., González-Acuña, D., Cofré, S., Neira, V., & Castillo-Aliaga C. (2020). Domestic dog origin of Carnivore Protoparvovirus 1 infection in a rescued free-ranging 2 guiña (*Leopardus guigna*) in Chile. *Transboundary and Emerging Diseases*. TBED-RC-590-20.R2
- Parker, J. S., Murphy, W. J., Wang, D., O'Brien, S. J., & Parrish, C. R. (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.
- Parrish, C. R. (1995). Pathogenesis of feline panleukopenia virus and canine parvovirus. *Bailliere's Clinical Haematology*, *8*(1), 57-71.
- Parrish, C. R., Aquadro, C. F., Strassheim, M. L., Evermann, J. F., Sgro, J. Y., & Mohammed, H. O. (1991). Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *Journal of Virology*, *65*(12), 6544-6552.
- Parrish, C. R., Burtonboy, G., & Carmichael, L. E. (1988). Characterization of a nonhemagglutinating mutant of canine parvovirus. *Virology*, *163*(1), 230-232.
- Parrish, Colin. (2006). *Parvoviruses*. Hodder Arnold ; Distributed in the United States of America by Oxford University Press.
- Parrish, Colin R., & Kawaoka, Y. (2005). The origins of new pandemic viruses: The acquisition of new host ranges by canine parvovirus and influenza A viruses. *Annual Review of Microbiology*, *59*, 553-586.
- 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.
- 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.
- Pinto, L. D., A. F. Streck, K. R. Gonçalves, C. K. Souza, Â. O. Corbellini, L. G. Corbellini, & C. Wageck Canal. (2012). Typing of Canine Parvovirus Strains Circulating in Brazil between 2008 and 2010. *Virus Research* *165*(1), 29-33.
- Pratelli, A., Cavalli, A., Martella, V., Tempesta, M., Decaro, N., Carmichael, L.E. & Buonavoglia, C. (2001). Canine parvovirus (CPV) vaccination: comparison of neutralizing antibody responses in pups after inoculation with CPV2 or CPV2b modified live virus vaccine. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, *8*, 612-615.
- Prittie, J. (2004). Canine parvoviral enteritis: A review of diagnosis, management, and prevention. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, *14*(3), 167-176.

- Pollock, R.V & Carmichael, L.E. (1982). Maternally derived immunity to canine parvovirus infection: transfer, decline and interference with vaccination. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 180, 37-42.
- Reed, A. P., Jones, E. V., & Miller, T. J. (1988). Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. *Journal of Virology*, 62(1), 266-276.
- Schmidt, H., Trifinopoulos J., Bui, M. & Bui, M. (2020). Iqtree.org. Recuperado 2 de junio de 2020 de <http://www.iqtree.org/doc/Frequently-Asked-Questions#how-do-i-interpret-ultrafast-bootstrap-ufboot-support-values>
- Shackelton, L. A., Parrish, C. R., Truyen, U., & Holmes, E. C. (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.
- Silva, S. P., Silva, L. N., Rodrigues, E. D., Cardoso, J. F., Tavares, F. N., Souza, W. M., Santos, C. M. P., Martins, F. M., Jesus, I. S., Brito, T. C., Moura, T. P., Nunes, M. R., Casseb, L. M., Silva Filho, E. & Casseb, A. R. (2017). Full-length genomic and molecular characterization of Canine parvovirus in dogs from North of Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 16(3).
- Strauss, J. H., & Strauss, E. G. (2008). CHAPTER 7—DNA-Containing Viruses. En J. H. Strauss & E. G. Strauss (Eds.), *Viruses and Human Disease (Second Edition)* (pp. 261-323). Academic Press.
- Suikkanen, S., Aaltonen, T., Nevalainen, M., Vällilehto, O., Lindholm, L., Vuento, M., & Vihinen-Ranta, M. (2003). Exploitation of Microtubule Cytoskeleton and Dynein during Parvoviral Traffic toward the Nucleus. *Journal of Virology*, 77(19), 10270-10279.
- Suikkanen, S., Antila, M., Jaatinen, A., Vihinen-Ranta, M., & Vuento, M. (2003). Release of canine parvovirus from endocytic vesicles. *Virology*, 316(2), 267-280.
- Susan F. Cotmore, Mavis Agbandje-McKenna, Marta Canuti, John A. Chiorini, Anna-Maria Eis-Hubinger, Joseph Hughes, Mario Mietzsch, Sejal Modha, Mylène Ogliastro, Judit J. Péntzes, David J. Pintel, Jianming Qiu, Maria Soderlund-Venermo, Peter Tattersall, Peter Tijssen. (2018). ICTV Virus Taxonomy Profile: Parvoviridae. *Journal of General Virology*, 100, 367–368.
- Susan F. Cotmore, & Peter Tattersall. (1996). Parvovirus DNA Replication. En *DNA replication in eukaryotic cells* (pp. 799–813). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Trifinopoulos J., Nguyen L., von Haeseler A., & Minh B. Q. (2016). W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research*, 232–235.
- Truyen U. (2000). Canine parvovirus. In: Carmichael L. (Ed.), *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*. Ithaca: International Veterinary Information Service (www.ivis.org); Document No. A0106.01.
- 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(2), 186-189.
- Tsao, J., Chapman, M. S., Agbandje, M., Keller, W., Smith, K., Wu, H., Luo, M., Smith, T. J., Rossmann, M. G., & Compans, R. W. (1991). The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science (New York, N.Y.)*, 251(5000), 1456-1464.
- Vaccination Guidelines – WSAVA*. (s. f.). Recuperado 29 de abril de 2020, de <https://wsava.org/global-guidelines/vaccination-guidelines/>

- van de Bildt, M.W., Kuiken, T., Visee, A.M., Lema, S., Fitzjohn, T.R. & Osterhaus, A.D. (2002). Distemper outbreak and its effect on African wild dog conservation. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 211-213.
- Vieira, F. V., Hoffmann, D. J., Fabri, C. U. F., Bresciani, K. D. S., Gameiro, R., Flores, E. F., & Cardoso, T. C. (2017). Circulation of canine parvovirus among dogs living in human-wildlife interface in the Atlantic forest biome, Brazil. *Heliyon*, 3(12), e00491.
- 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), 389-394.
- Vihinen-Ranta, Maija, & Parrish, C.R. (2006). Cell infection processes of autonomous parvoviruses. En *Parvoviruses* (pp. 157-163).
- Vihinen-Ranta, Maija, Suikkanen, S., & Parrish, C. R. (2004). Pathways of Cell Infection by Parvoviruses and Adeno-Associated Viruses. *Journal of Virology*, 78(13), 6709-6714.
- Vihinen-Ranta, Maija, Wang, D., Weichert, W. S., & Parrish, C. R. (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.
- Voorhees I., Hyunwook, L., Allison, A., Lopez-Astacio, R., Goodman, L., Oyesola, O., Omobowale, O., Fagbohun, O., Dubovi, E., Hafenstein, S., Holmes, E., & Parrish, C. R. (2020). Limited Intrahost Diversity and Background Evolution Accompany 40 Years of Canine Parvovirus Host Adaptation and Spread. *Journal of virology*, 94(1), e01162-19.
- Wang, D., Yuan, W., Davis, I., & Parrish, C. R. (1998). Nonstructural protein-2 and the replication of canine parvovirus. *Virology*, 240(2), 273-281.
- Weichert, W. S., Parker, J. S., Wahid, A. T., Chang, S. F., Meier, E., & Parrish, C. R. (1998). Assaying for structural variation in the parvovirus capsid and its role in infection. *Virology*, 250(1), 106-117.
- Wenjie, D., Maust¹, B. S., Nickle¹, D. C., Learn, G. H., Liu, Y., Heath L., Kosakovsky S. L, & Mullins, J. I. (2010). DIVEIN: a web server to analyze phylogenies, sequence divergence, diversity, and informative sites. *BioTechniques* 48, 405-408
- Woods, C. B., Pollock, R. V. H., & Carmichael, L. E. (1980). Canine parvoviral enteritis. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 16(2), 171-179.
- Zhou, P., Zeng, W., Zhang, X., & Li, S. (2017). The genetic evolution of canine parvovirus – A new perspective. *PLoS ONE*, 12(3).
- Zoller, S. (2016). Análisis de variantes genéticas de Parvovirus Canino en Uruguay (Tesis de grado). Facultad de Ciencias, UdelaR. Montevideo, Uruguay.

12. Agradecimientos

A Ruben Pérez y Yanina Panzera, por la oportunidad integrar la Sección de Genética Evolutiva y trabajar en sus líneas de investigación. Gracias por su confianza y paciencia.

A Sofía y Eddie, que me guiaron durante la realización de esta tesina.

A los miembros de la Sección, por responderme mil dudas y hacerme sentir parte. Especialmente a Joaco, sin quien no habría encontrado este lugar.

A mi familia, por apoyarme siempre a lo largo de la carrera, y en todas las decisiones que me llevaron a elegirla.

A papá, que me inculcó sin saberlo el gusto por la biología.

A los amigos que hice durante mi pasaje por la Facultad de Ciencias, a la que tanto cariño le tengo.

A Tito, por bancarme durante la redacción de este trabajo.