



MAESTRÍA PEDECIBA – CIENCIAS BIOLÓGICAS, SUBAREA GENÉTICA

Evolución de parvovirus canino: análisis de los mecanismos de generación de variabilidad

Lic. Lucía Carrau

Orientadora: Dra. Yanina Panzera

Co-Orientador: Dr. Ruben Pérez

Octubre 2015

Agradecimientos

En primer lugar a la Sección Genética Evolutiva por abrirme sus puertas y permitirme realizar todos mis estudios de maestría, y a la querida Facultad de Ciencias que alberga a la mencionada sección.

A mi orientadora de tesis la Dra. Yanina Panzera y a mi co-orientador Dr. Rubén Pérez.

Al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA).

Al Dr. Marco Vignuzzi que me recibió en su laboratorio para la realización de una pasantía de investigación que supuso la culminación de los experimentos de este trabajo.

A los médicos veterinarios que gentilmente proveen las muestras biológicas sobre las que trabajamos.

Al Laboratorio de Virología Molecular del Centro de Investigaciones Nucleares que nos facilitaron sus instalaciones.

A todos mis compañeros de la Sección Genética Evolutiva que me recibieron de muy buena forma y me ayudaron constantemente, en especial al Msc. Gonzalo Tomás que colaboró en el diseño experimental.

A Jorge, mis amigas y mi familia, pero muy especialmente a mi mamá.

Índice

RESUMEN

1 - INTRODUCCIÓN	1
1.1 Familia <i>Parvoviridae</i>	1
1.2 Parvovirus canina	1
1.2.1 Aspectos clínicos.....	1
1.2.2 Diagnóstico.....	3
1.3 Parvovirus canino tipo 2 (CPV-2)	4
1.3.1 Genoma viral.....	4
1.3.2 Proteínas virales.....	5
1.3.3 Estructura del virión.....	7
1.3.4 Ciclo replicativo.....	9
1.3.4.1 Ingreso viral a la célula blanco.....	11
1.3.4.2 Replicación del genoma.....	11
1.3.4.3 Síntesis proteica y liberación.....	12
1.4 Evolución viral	13
1.4.1 Generalidades.....	13
1.4.1.1 Mutación, tasas de mutación y tasas de sustitución nucleotídica.....	13
1.4.1.2 Cuasiespecies.....	16
1.4.1.3 Co-infección.....	17
1.4.1.4 Recombinación.....	18
1.4.2 Origen e historia evolutiva de CPV-2.....	19
1.4.3 Evolución de CPV-2 en Uruguay.....	22
1.5 Hipótesis de trabajo	25
1.6 Objetivos	25
1.6.1 Objetivo general.....	25
1.6.2 Objetivos específicos.....	25

2 – MATERIALES Y MÉTODOS	26
2.1 Estrategia de investigación	26
2.2 Material biológico	26
2.3 Relevamiento por PCR con cebadores variante específicos (PCR-CVE)	29
2.3.1 Diseño de cebadores variante específicos (CVE) para CPV-2a y CPV-2c.....	29
2.3.2 Optimización y validación de la técnica.....	29
2.3.2.1 Optimización de la reacción de PCR-CVE que hibridan en el ORF VP (PCR-CVE-VP) y en el ORF NS (PCR-CVE-NS).....	29
2.3.2.2 Validación de la técnica mediante ensayo de RFLP sobre amplicones diferenciales obtenidos con PCR-CVE-VP.....	30
2.3.2.3 Validación de la técnica por secuenciación automática de amplicones diferenciales obtenidos por PCR-CVE-VP y PCR-CVE-NS.....	30
2.3.2.4 Determinación de la sensibilidad de la técnica.....	31
2.3.3 Relevamiento por PCR-CVE-VP y PCR-CVE-NS.....	31
2.3.4 Preparación de muestras para secuenciación profunda.....	32
2.3.4.1 Extracción de DNA con kit QIAmp DNA de QIAGEN.....	32
2.3.4.2 PCR para amplificar genomas completos.....	33
2.3.4.3 Purificación de los genomas completos obtenidos en fragmentos solapantes.....	35
2.3.4.4 Electroforesis.....	35
2.4 Secuenciación profunda	36
2.4.1 Cuantificación del DNA purificado.....	36
2.4.2 Fragmentación del DNA.....	36
2.4.3 Purificación del DNA fragmentado.....	37
2.4.4 Construcción de librerías.....	37
2.4.5 Secuenciación por síntesis.....	38
2.5 Análisis bioinformáticos	40
2.5.1 Control de calidad y alineamiento de los <i>reads</i>	40
2.5.2 Implementación del programa Viral Variance Analysis (ViVan).....	41

2.5.3	Identificación de variantes nucleotídicas.....	41
2.5.3.1	Identificación de co-infectantes y recombinantes CPV-2a y CPV-2c.....	42
2.5.4	Reconstrucción de las secuencias consenso y alineamiento.....	42
2.5.5	Análisis de recombinación.....	42
3	– RESULTADOS	44
3.1	Diseño, optimización y validación de la técnica	44
3.1.1	Obtención de cebadores variante específicos (CVE) para CPV-2a y CPV-2c.....	44
3.1.2	Optimización de la PCR-CVE en el ORF VP (PCR-CVE-VP) y en el ORF NS (PCR-CVE-NS).....	46
3.1.3	Validación de la técnica mediante ensayo de RFLP.....	47
3.1.4	Validación de la técnica mediante secuenciación automática.....	47
3.1.5	Determinación de la sensibilidad de la técnica.....	48
3.2	Relevamiento por PCR-CVE en muestras de campo	49
3.2.1	PCR-CVE sobre CPV 370.....	49
3.2.2	Relevamiento por PCR-CVE-VP	49
3.2.3	Relevamiento por PCR-CVE-NS.....	51
3.3	Secuenciación profunda (NGS)	54
3.3.1	Amplificación de los genomas completos de muestras presuntamente co-infectantes y/o recombinantes.....	54
3.3.2	Secuenciación profunda por tecnología MiSeq (Illumina) de las muestras seleccionadas.....	55
3.3.3	Análisis de las secuencias obtenidas.....	56
3.3.4	Caracterización de la composición genética de las muestras a partir de los datos obtenidos del programa ViVan.....	57
3.3.4.1	Análisis de la muestra biológica CPV 247	57
3.3.4.2	Análisis de la muestra biológica CPV 260.....	58
3.3.4.3	Análisis de la muestra biológica CPV 290.....	59
3.3.4.4	Análisis de la muestra biológica CPV 347.....	60

3.3.4.5	Análisis de la muestra biológica CPV 382.....	61
3.3.4.6	Análisis de la muestra biológica CPV 383.....	62
3.3.4.7	Análisis de la muestra biológica CPV 389.....	64
3.3.4.8	Análisis de la muestra biológica CPV 405.....	65
3.3.4.9	Análisis de la muestra biológica CPV 407.....	66
3.3.4.10	Análisis de la muestra biológica CPV 409.....	67
3.3.4.11	Análisis de la muestra biológica CPV 410.....	68
3.3.4.12	Análisis de la muestra biológica CPV 426.....	69
3.3.4.13	Análisis de la muestra biológica CPV 437.....	70
3.3.4.14	Análisis de la muestra biológica CPV 443.....	72
3.3.4.15	Análisis de la muestra biológica CPV 453.....	73
3.3.5	Reconstrucción de las secuencias consenso.....	74
3.3.6	Identificación de otras variantes nucleotídicas.....	74
3.3.7	Análisis de recombinación.....	75
4	– DISCUSIÓN.....	78
4.1	Co-infección entre CPV-2a y CPV-2c en Uruguay.....	82
4.2	Recombinación entre CPV-2a y CPV-2c en Uruguay.....	84
4.3	Variabilidad poblacional de CPV-2 en Uruguay.....	86
4.4	Variabilidad de CPV-2 intra-hospedero: presencia de variantes nucleotídicas en cepas de una misma muestra.....	87
5	– CONCLUSIONES.....	90
6	– PERSPECTIVAS.....	91
7	– BIBLIOGRAFÍA.....	92
	ANEXO I.....	103
	ANEXO II.....	104
	ANEXO III.....	105
	ANEXO IV.....	113

RESUMEN

El parvovirus canino tipo 2 (CPV-2) es el agente etiológico de la parvovirus canina, una de las enfermedades infecciosas más relevantes en canes. CPV-2 presenta un genoma de simple hebra DNA con dos marcos de lectura abiertos (ORFs): uno codifica para las proteínas no estructurales (NS1 y NS2) y otro para las proteínas estructurales (VP1, VP2 y VP3). A pesar de tratarse de un virus DNA, presenta altas tasas de sustitución nucleotídica y una elevada variabilidad genética. Esto se refleja claramente en su corta historia evolutiva: CPV-2 emergió en 1978 y se extendió rápidamente por todo el mundo causando una pandemia. Dos años después, fue totalmente reemplazado por la variante CPV-2a, y posteriormente se describieron dos variantes antigénicas, CPV-2b en 1984 y CPV-2c en el año 2000. En la actualidad las tres cepas (CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c) circulan en el mundo con diferente prevalencia y se clasifican en base al aminoácido presente en la posición 426 de la proteína VP2 de la cápside. El cambio en este aminoácido afecta un importante sitio antigénico del virus.

En 2006 nuestro grupo detectó por primera vez en Uruguay y en el continente americano, la circulación de la cepa CPV-2c, estableciendo que la misma tenía un probable origen europeo. En 2010 ingresaron a nuestro territorio cepas CPV-2a de origen asiático. La co-circulación de ambas cepas nos ha brindado la oportunidad de analizar su interacción y dinámica evolutiva.

La mutación puntual es el mecanismo fundamental de generación de variabilidad genética en CPV-2. Otros mecanismos de generación de variabilidad genética, como la co-infección y la recombinación han sido poco estudiados. En ese sentido, y dada la población heterogénea uruguaya, en este proyecto nos propusimos detectar y analizar posibles eventos de co-infección y recombinación para determinar el impacto de éstos sobre la generación de variabilidad y evolución de CPV-2.

Para ello se desarrolló y estandarizó una metodología basada en PCR a tiempo final con cebadores variante específicos (PCR-CVE) capaces de discriminar entre cepas CPV-2a y CPV-2c. Se obtuvieron 4 juegos de cebadores que amplifican diferencialmente una región del ORF NS y del ORF VP de cada cepa. La especificidad de los cebadores se confirmó mediante la caracterización de los amplicones por ensayo de polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción (RFLP) y por secuenciación Sanger. El relevamiento por PCR-CVE se realizó sobre 214 muestras colectadas durante los años 2010 y 2013, diagnosticadas como positivas para

CPV-2. Se detectó la presencia de 15 muestras con patrones de amplificación correspondientes a cepas co-infectantes y/o recombinantes. Se amplificaron los genomas completos de estas muestras y se analizaron mediante protocolos de secuenciación profunda, utilizando la tecnología de Illumina MiSeq. Se caracterizó la composición genética exacta de las muestras y se infirieron las secuencias nucleotídicas de cada una. Se confirmó la presencia de 4 muestras co-infectantes CPV-2a/CPV-2c y una muestra recombinante. Los perfiles de secuenciación profunda sugieren además, la existencia de variantes nucleotídicas que podrían ser consecuencia de eventos de co-infección múltiples o mutación intra-hospedero.

Este es el primer estudio que analiza la ocurrencia de eventos de co-infección y recombinación en una población natural establecida de CPV-2. Nuestros resultados evidencian que CPV-2 emplea ambos mecanismos para la generación de variabilidad genética durante su evolución.

1 - INTRODUCCIÓN

1.1 Familia *Parvoviridae*

El parvovirus canino tipo 2 (CPV-2) es el agente etiológico de la parvovirus canina, una de las enfermedades infecciosas más relevantes en canes. CPV-2 pertenece a la familia *Parvoviridae*, denominación que refleja el tamaño reducido de sus integrantes (“parvo” significa pequeño en latín). Los parvovirus miden entre 18 y 26 nanómetros (nm), y su peso molecular varía entre 5.5 y 6.2×10^6 Daltos (Da). Su genoma está compuesto por una simple hebra de DNA (shDNA) de aproximadamente 5 kilobases (kb), en general de polaridad negativa. Según el sistema de clasificación de Baltimore se ubican en el grupo II (Muzyczka & Berns, 2001).

La familia *Parvoviridae* se divide en dos subfamilias según el hospedero que infectan, *Densovirinae* (insectos) y *Parvovirinae* (vertebrados). La primera está compuesta por 5 géneros: *Ambidensovirus*, *Brevidensovirus*, *Hepandensovirus*, *Iteradensovirus* y *Penstyldensovirus*. La subfamilia *Parvovirinae* se divide en 8 géneros: *Amdoparvovirus*, *Aveparvovirus*, *Bocaparvovirus*, *Copiparvovirus*, *Dependoparvovirus*, *Erythroparvovirus*, *Protoparvovirus* y *Tetraparvovirus* (Comité Internacional de Taxonomía de Virus, 2014). Específicamente, CPV-2 se encuentra contenido en el género *protoparvovirus* como una variante de la especie *protoparvovirus* carnívoro tipo 1, junto con otros parvovirus relacionados, como el virus de la enteritis de visón (MEV) y el parvovirus de mapache (RaPV).

Los parvovirus no son capaces de promover una replicación efectiva por sí mismos ya que su pequeño genoma no codifica polimerasas. Los llamados parvovirus autónomos requieren que la célula hospedera se encuentre en fase S del ciclo celular para replicarse, por lo que muestran tropismo por tejidos con altos índices de proliferación (Tattersall, 1972).

1.2 Parvovirus canina

1.2.1 Aspectos clínicos

La parvovirus canina es una de las enfermedades virales más relevantes en canes (Desario et al., 2005), con elevadas tasas de mortalidad (Clegg et al., 2011; Goddard & Leisewitz, 2010). La misma provoca miocarditis aguda en cachorros de entre 3 y 8 semanas de edad (Robinson et al., 1980), y cuadros severos de gastroenteritis hemorrágica (Carmichael & Binn, 1981) en perros de todas las edades, si bien es mínima su prevalencia en adultos (Apple et al., 1979a; Godsall et al., 2010; Nandi & Kumar, 2010).

CPV-2 se transmite por ruta fecal-oral/nasal. Cuando los animales toman contacto con heces o superficies contaminadas, el virus puede ingresar al organismo y permanecer en él durante aproximadamente 2 semanas, siendo excretado en grandes cantidades a través de las heces hasta 8-12 días post-infección (Pollock, 1982). Por su alta resistencia al ambiente, el virus puede permanecer en la materia fecal o en superficies alrededor de 5 meses, facilitando su dispersión y capacidad de infección (Nandi & Kumar, 2010). Además, como el desarrollo de la enfermedad está altamente relacionado con la carga viral, en algunos animales es asintomática, lo cual representa un peligro para el control de la misma, ya que el animal aparentemente sano puede esparcir el virus a través de las heces, aumentando la posibilidad de contagio a otros animales (Truyen, 2000).

El virus se replica principalmente en tejidos linfoides y epiteliales, pero se lo ha detectado incluso en células neuronales (Decaro et al., 2007; Url et al., 2003). El sitio inicial de replicación se ubica en células linfoides de la nasofaringe y orofaringe, así como en amígdalas y otros tejidos linfoides. Posteriormente, el virus se disemina a nivel sistémico. Después de 1-3 días post-infección es posible encontrarlo en amígdalas, nódulos linfáticos retrofaríngeos, timo y nódulos linfáticos mesentéricos. A los 3 días post-infección el virus ya se replica en Placas de Peyer del tejido intestinal. A partir de este momento se disemina a los enterocitos, células epiteliales en constante división. Por último, el virus es excretado en las heces (Truyen, 2000).

La infección por CPV-2 produce una rápida necrosis de las células de la médula ósea, del epitelio de la cripta intestinal y de los tejidos linfoides. La sintomatología del cuadro de gastroenteritis hemorrágica está marcada por pérdida de apetito, depresión, fiebre alta, vómitos, diarrea y leucopenia o linfopenia, con deshidratación severa y pérdida de peso (Figura 1) (Decaro et al., 2007). En algunos casos severos, la infección puede ser aguda, conduciendo a la muerte del animal en 48-72 horas después de la primera manifestación clínica (Truyen, 2000).



Figura 1 – Cachorro recibiendo tratamiento por parvovirus. Es notoria la pérdida de peso sufrida y el decaimiento. Tomado de Nandi & Kumar, 2010.

Los signos clínicos de la miocarditis son arritmias ventriculares severas, que producen muerte súbita o tras un breve período de fatiga y disnea. La lesión primaria en este cuadro es la necrosis multifocal del miocardio con reacción inflamatoria de intensidad variable (Jezyk et al., 1979; Kelly & Atwell, 1979; Robinson et al., 1979).

1.2.2 Diagnóstico

El diagnóstico primario es realizado por el médico veterinario mediante la observación de los signos clínicos. Debido a que varios de los síntomas que caracterizan a la parvovirus pueden también ser causados por otros patógenos, son necesarios exámenes de laboratorio que confirmen la presencia del virus (Desario et al., 2005).

Algunos de los métodos diagnósticos utilizados incluyen microscopía electrónica (Burtonboy et al., 1979), aislamiento en cultivo celular (Apple et al., 1979b; Mochizuki et al., 1993), métodos serológicos y métodos moleculares. Dentro de los métodos serológicos se encuentran: test de hemaglutinación (Carmichael et al., 1980), ensayo de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (Mohan et al., 1993), test de aglutinación de látex (LAT) (Apple et al., 1978), test de anticuerpos fluorescentes (FAT), test de precipitación de agar en gel (Ramadass & Khadher, 1982) y virus neutralización. Dentro de los métodos moleculares encontramos: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mochizuki et al., 1993; Nandi et al., 2007; Uwatoko et al., 1995) y sus variantes, como PCR tiempo real (Decaro et al., 2005a) y amplificación tipo LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*) (Ho-Seong et al., 2006), hibridación de ácidos nucleicos o *dot blot*, hibridación *in situ* (Cho et al., 2004), etc. Todas ellas presentan grados variables de especificidad y sensibilidad (Nandi & Kumar, 2010), y en función de ello, y del tiempo, costos y destreza requeridos, se ha optado por utilizar principalmente los inmunoensayos comerciales y

aquellos que implican la amplificación de DNA por PCR tiempo final y PCR tiempo real (Desario et al., 2005).

La amplificación del genoma viral por PCR es una metodología rápida, sensible, de alta especificidad y demanda poco material de partida. Requiere un paso previo, pero muy sencillo, de extracción del DNA viral a partir del material fecal (Schunck et al., 1995). Éste se utiliza como molde en la reacción de PCR que emplea cebadores específicos para CPV-2 y los productos de PCR se visualizan por electroforesis. Además, a diferencia de varios de los métodos antes mencionados, en un paso posterior es posible realizar la caracterización molecular mediante digestión enzimática, secuenciación automática, u otros. Incluso, se ha utilizado directamente la propia reacción de PCR tiempo final para caracterizar molecularmente al virus utilizando cebadores específicos (Pereira et al., 2000). También se ha empleado la variante PCR anidada para aumentar la sensibilidad de la reacción (Hirasawa et al., 1994). Empleando metodologías por PCR tiempo real con química de sondas de hidrolisis *Taqman*, se ha detectado y cuantificado CPV-2 (Decaro et al., 2005b). Por último, con el uso de sondas MGB (*minor groove binding*), también se ha realizado el diagnóstico y la caracterización molecular de CPV-2 en una única reacción por PCR tiempo real (Decaro et al., 2006a). La principal desventaja de la técnica de PCR tiempo real, es que los costos de equipamiento y reactivos son más elevados en comparación a otras metodologías moleculares (Desario et al., 2005). Por tal motivo el diagnóstico por PCR tiempo final y la caracterización por secuenciación Sanger siguen siendo una de las alternativas más extendidas (Kumar et al., 2004).

1.3 Parvovirus canino tipo 2 (CPV-2)

1.3.1 Genoma viral

El genoma de CPV-2 consiste en una única molécula de DNA de polaridad negativa, de aproximadamente 5.3 kb y presenta dos marcos de lectura abiertos o ORFs (*Open Reading Frames*) (Figura 2). El primero, sobre el extremo 3' (izquierdo) del genoma, codifica para las proteínas no estructurales NS1 y NS2. Éstas son proteínas reguladoras y están implicadas en la replicación, expresión génica viral y encapsidación. El segundo, sobre el extremo 5' (derecho) del genoma, codifica para las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3 que conforman la cápside viral (Reed et al., 1988; Wang et al, 1998).

En los extremos 3' y 5' del genoma hay secuencias palindrómicas que forman estructuras secundarias tipo horquilla (*hairpin*), que actúan como cebadores durante la replicación (Figura

2). Además, encontramos dos promotores que inician la transcripción, p4 (NS) y p38 (VP), y sitios de poliadenilación sobre el extremo 5' del genoma (Berns, 1990).

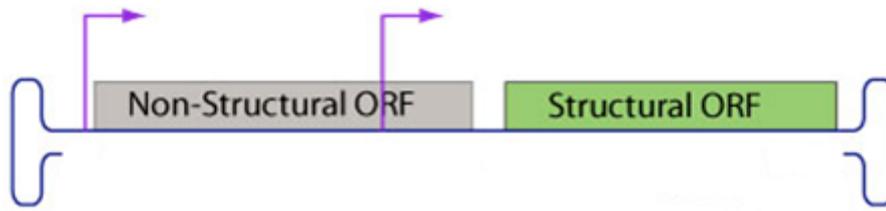


Figura 2 – Representación gráfica del genoma de CPV-2. Se detallan las estructuras tipo horquilla sobre los extremos del genoma, los dos marcos de lectura abiertos (ORFs) y el sitio de inicio de la transcripción a partir de los promotores p4 y p38, marcados con flechas. Tomado y adaptado de: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/199.html, Swiss Institute of Bioinformatics.

1.3.2 Proteínas virales

Mediante empalme alternativo, el ORF izquierdo origina las proteínas NS1 de 667 aminoácidos (aa) y NS2 de 165 aa. El extremo N-terminal de ambas proteínas es idéntico (87 aa), pero el extremo C-terminal difiere, ya que en *ns2* se genera un corrimiento en el marco de lectura por la remoción de un intrón (Hoelzer et al., 2008b) (Figura 3).

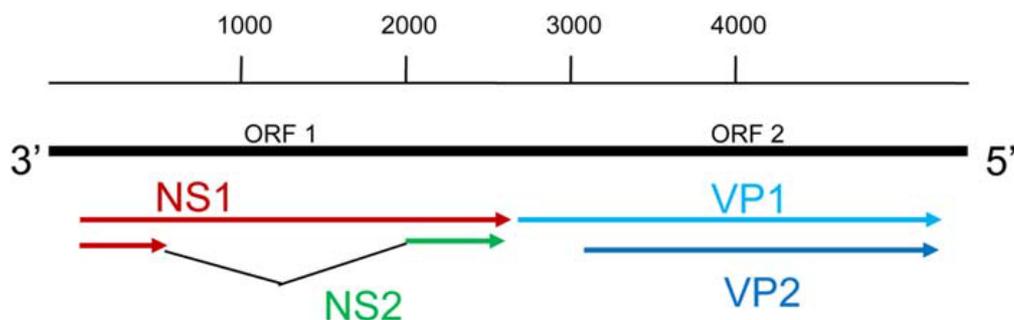


Figura 3 – Representación gráfica del genoma de CPV-2 junto con las proteínas codificadas por el mismo. Se indican posiciones nucleotídicas, marcos abiertos de lectura (ORFs) y proteínas virales. Tomado y adaptado de Hoelzer et al., 2008b, material suplementario.

NS1 es una fosfoproteína nuclear que actúa como la proteína iniciadora de la replicación dependiente de ATP. Se une al DNA en forma específica, lo cual junto a su actividad helicasa, permite el inicio de la síntesis de DNA en sitios específicos (Cotmore & Tattersall, 2007). También está implicada en la expresión de genes (Carter & Pintel, 1992; Naeger et al., 1990) y regula positivamente al propio promotor p4 (Cotmore & Tattersall, 2007). Además, NS1 actúa transactivando al promotor p38, que determina la síntesis del transcripto vp (Clemens & Pintel,

1988). Por último, se sugiere que esta proteína controla el empaquetamiento del DNA en la cápside (Daeffer et al., 2003) y la apoptosis celular (Parrish & Kawaoka, 2005).

La proteína NS2 está implicada en la generación de efecto citotóxico, pero su rol no está tan bien comprendido como para NS1 (Brandenburger et al., 1990). Se ha reportado que participa en la replicación viral y que es necesaria para la producción eficiente de partículas virales en fibroblastos murinos (Naeger et al., 1990). Además, se cree que participa en la regulación de la expresión génica (Wang et al., 1998), y en el tráfico hacia el núcleo (Parrish & Kawaoka, 2005).

El ORF derecho codifica para las proteínas VP1, VP2 y VP3. La proteína VP2 (584 aa) es una variante de VP1 (727 aa) generada por empalme alternativo, y por lo tanto, su secuencia aminoacídica se encuentra contenida en su totalidad dentro de VP1. VP1 posee un dominio adicional de 143 aa en su región N-terminal (dominio N-terminal adicional) (Hoelzer et al., 2008b) (Figura 3). VP3 (562 aa) se genera por procesamiento proteolítico post-traducciona de 22 a 25 aa del extremo N-terminal de VP2 (Cotmore & Tattersall, 2007).

La proteína VP1 es uno de los componentes de la cápside viral (Muzyczka & Berns, 2001). Es indispensable para la infectividad del virión (Tullis et al., 1993) ya que contiene una serie de elementos, como el dominio fosfolipasa, esenciales para el tráfico intracelular (Cotmore & Tattersall, 2007). Además, se propone que el dominio N-terminal adicional en VP1 también cumple una función importante en la infectividad del virión (Spitzer et al., 1997), y que secuencias básicas presentes en éste podrían controlar el transporte hacia el núcleo (Parrish & Kawaoka, 2005).

La proteína VP2 constituye aproximadamente el 90% de la cápside viral y su función es principalmente estructural. Interacciona con el receptor celular de la transferrina (TfR) y con receptores de ácido siálico (SA), permitiendo el ingreso del virus a la célula hospedera. Además, los determinantes antigénicos se encuentran en VP2 y son los blancos principales del sistema inmune del hospedero (Parrish & Kawaoka, 2005).

La proteína VP3 es un componente minoritario de la cápside y su procesamiento proteolítico ocurre cuando el virus ingresa a la célula hospedera. *In vitro* VP3 se genera únicamente en presencia de partículas virales completas, es decir, partículas virales que han empaquetado su genoma (Fields et al; 2001; Tsao et al., 1991). No se conoce con exactitud su función.

1.3.3 Estructura del virión

La pequeña cápside de CPV-2, de 26 nm de diámetro, simetría icosaédrica y número de triangulación $T = 1$, está conformada por 60 subunidades compuestas por las proteínas VP1, VP2 y VP3 (Cotmore & Tattersall, 2007) (Figura 4).

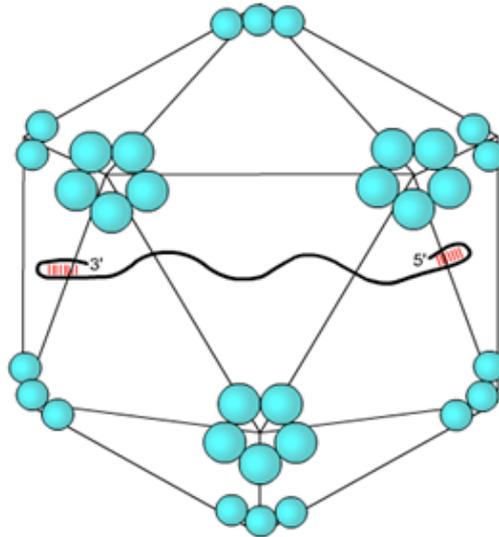


Figura 4 – Representación esquemática de la cápside de CPV-2 donde se destacan algunas de las proteínas VPs (círculos) y el genoma monohebra de DNA en su interior. Tomado y adaptado de: <http://viralzone.expasy.org/>.

La proteína VP2 posee una estructura compuesta por ocho láminas β antiparalelas, en forma de barril β , conectadas por lazos (*loops*) expuestos en la superficie del virión (Figura 5) (Chapman & Rossmann, 1993; Tsao et al., 1991). El motivo barril β contiene únicamente 1/3 de la proteína, mientras que los 2/3 restantes se encuentran en los lazos, sobre los que se han identificado a nivel estructural y genético un número de propiedades biológicas relevantes. Estas incluyen especificidad de hospedero, tropismo celular, unión al receptor y distintas propiedades antigénicas (Muzyczka & Berns, 2001). Esta clase de organización estructural le otorga estabilidad, pero también cierto grado de flexibilidad en la superficie, siendo capaz de tolerar cambios aminoacídicos como los observados durante la emergencia y evolución de CPV-2 (Langeveld et al. 1993).

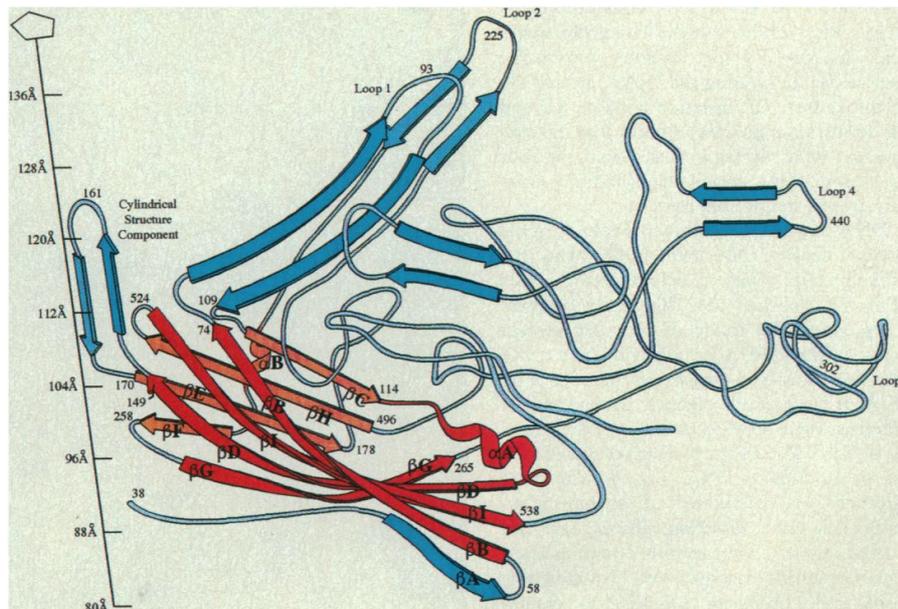


Figura 5 – Representación gráfica de la topología de VP2. En rojo se muestra la estructura en forma de barril β , y en azul los lazos que conforman la superficie de la cápside. Además se incluyen algunas posiciones aminoacídicas estratégicas. Se detalla la distancia radial (ángstroms) desde el centro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

En la cápside viral existen tres ejes de simetría: dimérico, trimérico y pentamérico, cada uno con distinta topología (Figura 6). En el eje de simetría dimérico, se encontró una depresión de 15 ángstroms (A). En esta depresión se identificaron residuos que determinan el reconocimiento de oligosacáridos, y parcialmente, la especificidad de tejido (Cotmore & Tattersall, 2007). En el eje de simetría trimérico, se encontró una protrusión o espícula de 22 A, en la cual se encuentran los residuos vinculados a las propiedades antigénicas y de tropismo del virus (Tsao et al., 1991). Al menos dos epítopes de CPV-2 se encuentran expuestos en los vértices de estas protrusiones (Chang et al., 1992; Horiuchi et al., 1994; Parker & Parrish, 1997; Tsao et al; 1991). La especificidad de hospedero está determinada por tres regiones estructurales distintas, ubicadas también en las espículas (Hueffer & Parrish, 2003). Por último, en cada eje de simetría pentamérico se identificó un cañón de 15 A formado por 5 lazos proteicos. Se cree que el cañón actúa como poro, conectando el interior de la partícula viral con el exterior, y que éste sería el sitio de unión al receptor (Goodman et al., 2010; Palermo et al., 2003). Además, se cree que a través de este poro VP2 expone su porción N-terminal para que sufra procesamiento proteolítico y de lugar a VP3 (Fields, 2001).

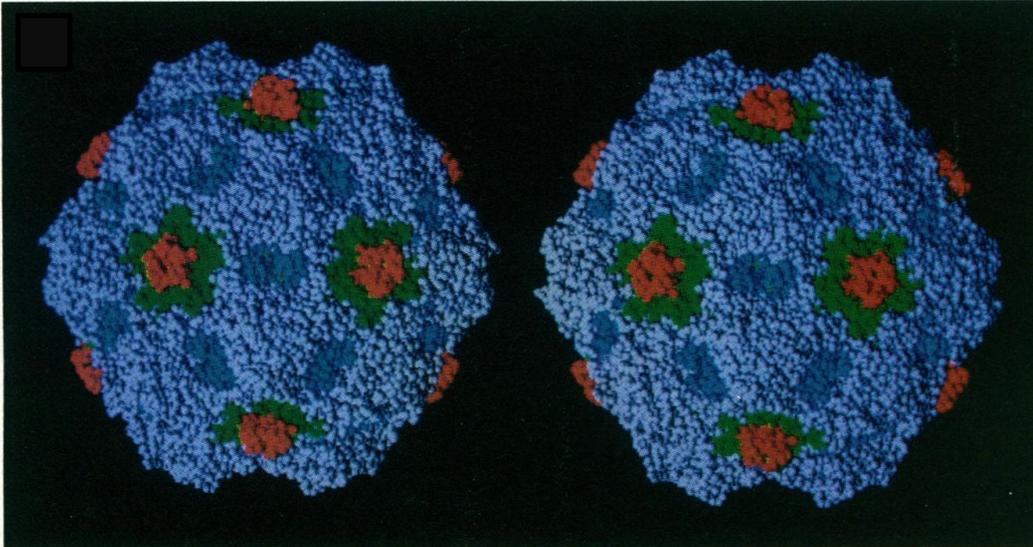


Figura 6 – Estructura del virión de CPV-2. Las regiones coloreadas en azul claro corresponden a las espículas en el eje de simetría 3, las coloreadas en rojo, a los cañones formados por estructuras cilíndricas en el eje de simetría 5, en azul las regiones que forman las depresiones en el eje de simetría 2, y en verde las estructuras en forma de barril β , ocluidas en todas las regiones a excepción de los cañones. Tomado de Tsao et al., 1991.

1.3.4 Ciclo replicativo

CPV-2 es capaz de replicarse en células de cánidos, félidos y algunos carnívoros salvajes (Nandi & Kumar, 2010). El tropismo tisular está marcado principalmente por la presencia del receptor TfR (Hueffer et al., 2003a). Éste se encuentra en abundancia en células de tejido intestinal y linfoide, que además se encuentran en constante división, otro de los requisitos para que el virus replique (Cotmore & Tattersall, 1987).

Básicamente el ciclo consiste en el ingreso del virus a la célula, transporte por el citoplasma hacía el núcleo, replicación del DNA, transcripción y expresión de proteínas, y por último ensamblado y liberación (Figura 7).

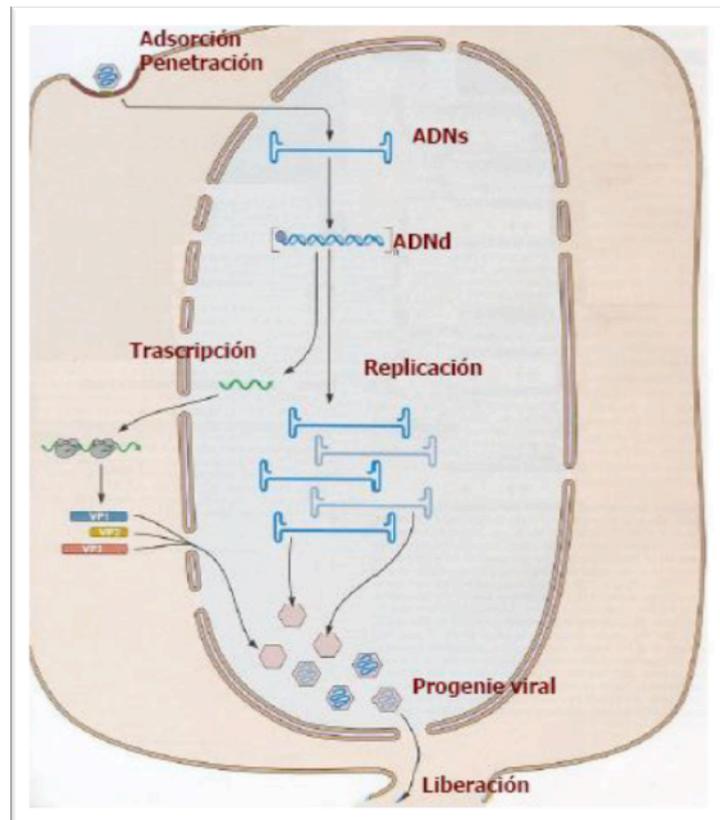


Figura 7 – Representación gráfica del ciclo replicativo de CPV-2 en una célula en fase S del ciclo celular.

1.3.4.1 Ingreso viral a la célula blanco

CPV-2 ingresa a la célula blanco a través de su interacción con el receptor TfR (Hueffer et al., 2003a; Parker et al., 2001). El receptor TfR es una proteína dimérica compuesta por dominios apicales y transmembrana. La interacción CPV-2 – TfR se da a través del cañón en el eje de simetría 5 de la partícula viral, y a través de residuos críticos en el dominio apical del TfR (Goodman et al., 2010; Palermo et al., 2003). Dado que las células son capaces de internalizar el receptor por vía endocítica a través de vesículas recubiertas de clatrina (Booth & Wilson, 1981), el virus utiliza este mecanismo para ingresar a la célula (Cureton et al., 2012). En etapas posteriores, el virus es depositado en los lisosomas tardíos a través del sistema microtubular, donde el bajo pH es requerido para la iniciación de la infección (Vihinen-Ranta et al., 1998).

A continuación ocurre el lento proceso de penetración hacia el citosol. Las cápsides son liberadas de las vesículas en compartimentos perinucleares, donde probablemente sufran procesamiento; y finalmente son transportadas al núcleo a través del complejo del poro nuclear en un proceso dependiente de ATP y mediado por señales de localización nuclear (Vihinen-Ranta et al., 2004).

1.3.4.2 Replicación del genoma

CPV-2 utiliza un mecanismo de replicación de su genoma conocido como horquilla rodante (*rolling hairpin*), el cual es una variante del mecanismo de círculo rodante (Berns, 1990). La mayoría de los trabajos se han realizado sobre el virus diminuto del ratón (MVM), prototipo de los parvovirus autónomos, aunque aún no se cuenta con evidencia experimental que soporte cada uno de los pasos implicados en el mismo (Muzyczka & Berns, 2001).

Las secuencias palindrómicas en los extremos 3' y 5' del genoma son fundamentales ya que actúan como cebadores para la DNA polimerasa celular. Cuando la célula entra en la fase S del ciclo celular, la maquinaria celular reconoce la secuencia palindrómica en el extremo 3' y se sintetiza la hebra complementaria por extensión, generándose una molécula de DNA doble cadena. El dúplex de DNA generado actuará como molde para producir los primeros transcritos virales que sintetizarán la proteína iniciadora de la replicación NS1, que junto a NS2 y proteínas accesorias modifican el microambiente del hospedero de forma que se proceda a la replicación del genoma viral (Cotmore & Tattersall, 2013).

La replicación comienza cuando se sintetiza la hebra complementaria, tal como lo descrito para la transcripción (Berns, 1990). Sobre el extremo 5' se produce una ligación entre la cadena recientemente sintetizada y la parental, generando una molécula doble hebra covalentemente cerrada en ambos extremos (Cotmore et al., 1989). Luego, la proteína NS1 corta la cadena complementaria aproximadamente a 20 nucleótidos (nts) del final del extremo 5' y se une covalentemente, generando un extremo 3'OH libre en la cadena complementaria. La polimerasa restablece el extremo derecho sobre esta hebra, y se genera un nuevo dúplex. Luego, los extremos derechos vuelven a plegarse sobre sí mismos adoptando la configuración conocida con el nombre de "orejas de conejo" y esto provee un nuevo sitio de inicio de la replicación, gracias al extremo 3'OH libre y al nuevo "cebador". Se sintetiza así una nueva hebra de DNA por desplazamiento de la hebra genómica. Esto conduce a la formación de concatémeros (dímeros de intermediario doble hebra), que luego darán lugar a dos intermediarios doble hebra: uno con su extremo 5' covalentemente cerrado y otro abierto. El primero volverá a sufrir replicación, y el segundo dará lugar a otro molde de replicación (hebra sentido 5'-3'), y al genoma viral (hebra sentido 3'-5') que será encapsidado (Figura 8) (Muzyczka & Berns, 2001). Visualización: <https://www.youtube.com/watch?v=-Qf67AKpKJM>.

1990). VP3 recién se generará cuando la progenie viral ingrese a una nueva célula (Muzyczka & Berns, 2001).

La progenie viral emergerá de la célula por lisis, produciendo el efecto citopático de CPV-2 (Muzyczka & Berns, 2001).

1.4 Evolución Viral

1.4.1 Generalidades

Los virus son los parásitos intracelulares más exitosos de todo el planeta tierra. Han sido capaces de infectar todas las especies conocidas y perpetuarse en el tiempo utilizando su capacidad para adaptarse a nuevos entornos. Los principales factores responsables de ello son sus elevadas tasas de mutación, su gran tamaño poblacional y sus tiempos generacionales cortos (De Filippis & Villarreal, 2001).

Como cualquier otro organismo, los virus están gobernados por leyes evolutivas que influyen en sus niveles de variabilidad genética. Los mecanismos moleculares por los que se genera esta variabilidad comprenden primero y principalmente a la mutación, pero también a otros procesos como la co-infección, recombinación, el *reassortment* y la distribución tipo cuasiespecie. En este trabajo nos centraremos en algunos de ellos, de manera de lograr una mayor comprensión de la evolución de CPV-2.

1.4.1.1 Mutación, tasas de mutación y tasas de sustitución nucleotídica

Las mutaciones genéticas hacen referencia a todos aquellos cambios heredables que alteran o modifican la secuencia nucleotídica de un organismo. Dos parámetros que nos ayudan a comprender el impacto de la mutación sobre la evolución viral son las tasas de mutación y de sustitución nucleotídica. Las tasas de mutación, definidas como el “número de cambios genéticos (mutaciones puntuales, inserciones, deleciones) incorporados por ronda de replicación” (Drake, 1993; Duffy et al., 2008), nos dan una idea de la “predisposición” de ese organismo a evolucionar. Una vez generada la modificación genética, sobre ella actuarán las fuerzas evolutivas, como la selección natural y la deriva génica, para definir cuáles de estas mutaciones se fijarán y cuáles no. Aquellas que se fijan serán consideradas para definir las tasas de sustitución nucleotídica: “número de mutaciones que se fijan por sitio por unidad de tiempo (en general años)” (Duffy et al., 2008). Así, las tasas de sustitución nucleotídica nos darán una idea de que tan “rápido” puede ese organismo evolucionar.

Las tasas de mutación en los virus varían en el orden de 10^{-3} a 10^{-9} mutaciones por sitio por ronda de replicación. Los virus con genoma RNA presentan los valores mayores, del orden de 10^{-3} a 10^{-6} mutaciones por sitio por ronda de replicación. Los virus con genoma DNA presentan valores del orden de 10^{-5} mutaciones por sitio por ronda de replicación para virus shDNA como CPV-2, y del orden de 10^{-9} mutaciones por sitio por ronda de replicación para virus DNA doble hebra (dhDNA) (Duffy et al., 2008).

Varios factores determinan e influyen en los valores de las tasas de mutación. Estos pueden ser clasificados en factores propios del virus, factores intrínsecos del hospedero o factores ambientales (Combe & Sanjuán, 2014).

Dentro de los factores virales, uno de los más importantes es la arquitectura genómica. La naturaleza genómica, DNA o RNA, determinará qué tipo de polimerasa se empleará para la replicación. Así, los virus RNA emplearán RNA polimerasas RNA dependientes (RdRp) que carecen de actividad correctora, resultando en la incorporación de varios errores por ciclo replicativo (Drake, 1993). Los retrovirus emplearán retrotranscriptasas que presentan fidelidad intermedia (Menéndez-Arias, 2009; Roberts et al., 1988), y los virus DNA como CPV-2 emplearán polimerasas propias o celulares que presentan actividad correctora, resultando en la incorporación de menos errores durante el proceso de síntesis de DNA (López-Bueno et al., 2006).

Además, el tamaño y el carácter mono hebra o doble hebra son determinantes. Virus RNA y shDNA con genomas pequeños, como CPV-2, tendrán tasas de mutación más elevadas que sus contrapartes más grandes (Duffy et al., 2008). Dado un mismo valor de tasa de error, genomas más grandes sufrirán mutaciones letales más frecuentemente que aquellos genomas más pequeños. Por otro lado, la generación de estructuras secundarias en el genoma puede producir pausas en la polimerasa, lo cual aumenta las chances de que se produzca un cambio de hebra, pudiendo introducir errores en la cadena naciente (Pathak & Temin, 1992; Pita et al., 2007).

Otro factor dependiente del virus implica el mecanismo de replicación empleado. La forma en que se acumulan las mutaciones –lineal o geométrica- está determinada por el mecanismo de replicación utilizado: “sellado” (*stamping machine*) cuando la partícula viral que inició la infección dará lugar a toda la progenie, y “replicación genómica geométrica” cuando los genomas de la progenie se convierten en molde para una siguiente ronda de replicación (Chao et al., 2002; French & Stenger, 2003). La velocidad de replicación (estrechamente relacionada

al mecanismo de replicación empleado) será también determinante en la introducción de errores, donde a mayor velocidad aumentan las tasas de mutación (Baer et al., 2007). Para CPV-2 se ha sugerido que su particular mecanismo de replicación, podría generar elevadas tasas de error (López-Bueno et al., 2006; Muzyczka & Berns, 2001).

Con respecto a los factores propios del hospedero, las tasas de error pueden depender del hospedero que aloja al virus. La polimerasa del virus del mosaico de pepino (CMV) exhibe diferencias en su fidelidad entre plantas de morrón y de tabaco (Pita et al., 2007). La expresión de distintos genes celulares también puede afectar las tasas de error virales, en especial la expresión de genes de familias de enzimas oxidativas, metilasas o deaminasas que pueden introducir nuevos errores (Drake et al., 1993; Domingo & Holland, 1997; Walsh & Xu, 2006). Por ejemplo, las APOBEC3 citidina deaminasas provocan hipermutación (Mangeat et al., 2003), y la adenosina deaminasa RNA dependiente (ADAR) también provoca hipermutación en varios virus RNA como los rhabdovirus (O'Hara et al., 1984), paramyxovirus (Cattaneo et al., 1988) y retrovirus (Hajjar & Linial, 1995). CPV-2 bien podría estar expuesto a estos procesos mutacionales, en especial por su estructura monohebra (Shackelton et al., 2005).

Finalmente, los factores ambientales que afectan las tasas de error en virus están vinculados al metabolismo celular. Por ejemplo, las especies reactivas del oxígeno (ROS) derivadas del etanol pueden dañar el RNA de virus como el de la hepatitis C, mientras que otras moléculas como el glutatión o agentes quelantes generan el efecto contrario (Seronello et al., 2011).

Centrándonos ahora en las tasas de sustitución nucleotídica, encontramos que para virus con genoma RNA se han registrado valores de tasas de sustitución del orden de 10^{-2} a 10^{-5} sustituciones nucleotídicas por sitio por año (French & Stenger, 2003; Jenkins et al., 2002). Para retrovirus, estos valores se encuentran entre 10^{-3} a 10^{-8} sustituciones nucleotídicas por sitio por año. Para virus shDNA como CPV-2, se han determinado tasas de sustitución del orden de 10^{-4} sustituciones nucleotídicas por sitio por año, y para virus dhDNA valores entre 10^{-6} a 10^{-9} sustituciones nucleotídicas por sitio por año (Duffy et al., 2008).

Las tasas de sustitución nucleotídica se ven influenciadas evidentemente por las tasas de error subyacentes, pero existen otros factores que las afectan. Los factores virales abarcan los tiempos de generación, los tamaños poblacionales y el *fitness* viral (Duffy et al., 2008). En términos generales, se ha observado que a tiempos generacionales menores, mayores son las tasas de sustitución nucleotídica. La forma de transmisión del virus también puede ser importante, ya que se ha observado en muchos casos que una transmisión directa genera

tasas elevadas, mientras que la transmisión a través de vectores provoca tasas de sustitución nucleotídica mas bajas (Duffy et al., 2008).

Con respecto a los factores vinculados a las fuerzas evolutivas, encontramos que la selección positiva favorece tasas de sustitución nucleotídica altas, mientras que la selección purificadora promueve tasas bajas.

A *priori* se creía que para virus DNA que infectan animales sus tasas de sustitución deberían ser similares a las de sus hospederos, bajo el supuesto de que existía co-evolución entre ambos (McGeoch & Gatherer, 2005; Shadan & Villarreal, 1993). Este fenómeno no siempre ocurre, y se han encontrado virus de DNA que evolucionan sensiblemente más rápido que sus hospederos, tal como el caso de CPV-2, para el cual se registraron valores del orden de 10^{-4} sustituciones por sitio por año (Shackelton et al., 2005). Se han planteado algunas hipótesis para explicar tan elevada tasa de sustitución nucleotídica y se estableció que durante su emergencia, CPV-2 fue sometido a una presión de selección positiva en ausencia de eventos de recombinación que, junto a elevadas tasas de error subyacente, explican las altas tasas de sustitución nucleotídica (Shackelton et al., 2005).

1.4.1.2 Cuasiespecies

El concepto de cuasiespecie como forma de organización de los virus RNA fue propuesto hace ya varios años, dónde se define una cuasiespecie como una “nube de variantes genómicas organizadas en torno a un genoma central, que se vinculan entre sí y dónde la unidad de selección es la población” (Eigen & Biebriche, 1988). Mucho se ha trabajado sobre este concepto y se demostró empíricamente en el año 2006 para poliovirus (Vignuzzi et al., 2006). Las ventajas de una distribución tipo cuasiespecie radican en la posibilidad de que se generen mutantes en la población con potenciales características ventajosas que se traducen a la población viral, como por ejemplo la generación de mutantes de escape a la respuesta inmune del hospedero.

Si bien este mecanismo de generación de variabilidad fue definido para virus con genoma RNA, la elevada diversidad poblacional encontrada en algunos virus con genoma shDNA y sus grandes tamaños poblacionales, ha llevado a algunos autores a sugerir una posible organización tipo cuasiespecies (López-Bueno et al., 2006; Sarker et al., 2014; Van Loy et al., 2013). Para algunos parvovirus como MVM se ha evidenciado una gran heterogeneidad genética y compleja distribución de la población viral en infecciones en ratones cuando se

compararon secuencias consenso con secuencias obtenidas a partir de distintos clones (López-Bueno et al., 2006). Además, en este mismo estudio, se identificaron mutantes de escape generados rápidamente frente al tratamiento antiviral, similar a lo observado en cuasiespecies en virus de RNA (López-Bueno et al., 2003).

Incluso para CPV-2, aplicando metodologías de clonado, se ha sugerido una posible distribución tipo cuasiespecie en función de la elevada variabilidad genética encontrada en algunas muestras (Battilani et al., 2006, 2011).

1.4.1.3 Co-infección

La co-infección hace referencia a la infección simultánea de dos patógenos dentro de un mismo organismo o dentro de una misma célula. Esta puede abarcar infecciones entre distintas especies de patógenos (Gizzi et al., 2014), entre virus estrechamente relacionados, como por ejemplo CPV-2 y RaPV, MEV, etc., o entre cepas y variantes genéticas de un mismo virus. En este sentido podemos ver a la co-infección como un mecanismo de generación de variabilidad genética *per se*, además de ser un prerrequisito para que se produzca recombinación y *reassortment* (reordenamiento de segmentos genómicos en virus con genoma segmentado).

Existe evidencia de que la co-infección de dos o más virus puede dar lugar a complementación, si alguno de ellos es defectivo o presenta alguna desventaja. En este caso, la variabilidad genética se vería elevada por la co-infección, ya que permite la persistencia de los virus defectivos o con *fitness* reducidos (Manrubia & Lazaro, 2006; Szathmáry, 1992). Por otro lado, se han reportado casos donde poblaciones co-infectantes tendrían menor variabilidad genética que poblaciones clonales, ya que estas últimas experimentarían el efecto de interferencia clonal (Hughes et al., 2012; Keller et al., 2012; Raynes et al., 2012) que disminuye la efectividad de la selección en la purga de la variabilidad genética (Dennehy et al., 2013). Incluso, otro estudio mostró que poblaciones a alto MOI (*multiplicity of infection*) del fago $\phi 6$ eran menos diversas que las de bajo MOI luego de 300 generaciones (Dennehy et al., 2013). Además, la co-infección entre distintas cepas podría generar infecciones con nuevas características a nivel molecular e infectivo, en base a diferencias en su virulencia (Camp et al., 2013; Einer-Jensen et al., 2014; Huang et al., 2013; Liu et al., 2013; Moon et al., 2008; Weesendorp et al., 2013).

Los reportes de eventos de co-infección en CPV-2 han sido escasos, estando la mayoría restringidos a gatos, tal vez porque los felinos son susceptibles a distintos tipos de parvovirus

(Battilani et al., 2006, 2011). En cánidos, se detectaron co-infecciones entre las distintas cepas de CPV-2 (Battilani et al., 2006, 2007; Hoelzer et al., 2008a; Vieira et al., 2008), y co-infecciones entre cepas vacunales y de campo (Decaro et al., 2006b). También se han registrado co-infecciones entre CPV-2 y cepas típicas de la panleucopenia felina (FPV) (Battilani et al., 2011, 2013).

1.4.1.4 Recombinación

La recombinación constituye otra fuente importante de variabilidad genética. El proceso ocurre por la formación de moléculas de ácidos nucleicos quiméricas, y requiere la presencia de dos o más genomas parentales (co-infección) dentro de una misma célula hospedera (Simon-Loriere & Holmes, 2011). Las secuencias parentales pueden ser diversas: genomas virales de la misma especie, de distintas especies, cepas vacunales, genoma del hospedero o plasmídico (De Filippis & Villarreal, 2001). La recombinación puede darse de varias maneras: homóloga, homóloga aberrante y no homóloga (Lai, 1992; Worobey & Holmes, 1999).

En virus shDNA como los parvovirus, se ha encontrado evidencia de recombinación, pero el proceso por el cual se genera es poco conocido, aunque probablemente este influenciado por el método de replicación (horquilla rodante en CPV-2). Durante la replicación se generan pausas que podrían generar un distanciamiento prematuro del complejo de replicación, pudiendo éste posicionarse sobre un nuevo molde de DNA, generando una molécula quimérica (Martin et al., 2011). Esto es similar a lo que ocurre en un tipo de recombinación empleada por virus RNA conocida como *copy choice* (Simon-Loriere & Holmes, 2011). Por otro lado, durante la replicación del DNA se generaran intermediarios DNA doble cadena, y si se producen roturas en estos, es probable que induzcan a los sistemas de reparación del DNA del hospedero, que utilizan mecanismos de recombinación homóloga (Xu & Price, 2011).

Se ha postulado que la recombinación podría ser un evento frecuente entre los distintos parvovirus (Hueffer & Parrish 2003; Shackelton et al., 2007). Este es el caso para el bocavirus porcino (Lau et al., 2011), bocavirus humano (Kapoor et al., 2010), parvovirus porcinos, de visón y de roedores (Shackelton et al., 2007) y dependovirus (Rabinowitz et al., 1999).

En el caso de CPV-2, se han registrado eventos de recombinación entre cepas vacunales y algunas de la cepas circulantes de CPV-2 (Mochizuki et al., 2008), y entre CPV-2 y virus relacionados (Oshima & Mochizuki, 2009; Wang et al., 2012). También se registraron recombinaciones durante el proceso de atenuación de la cepa vacunal (Badgett et al., 2002).

1.4.2 Origen e historia evolutiva de CPV-2

CPV-2 fue aislado e identificado en el año 1978, luego de que se generara una gran pandemia en canes, caracterizada por gastroenteritis o miocarditis (Apple et al., 1978; Burtonboy et al., 1979; Kelly et al., 1979). Éste fue llamado CPV-2 para distinguirlo del Parvovirus Canino tipo 1 (CPV-1), un parvovirus de otro género que causa enteritis en cachorros neonatos (Harrison et al., 1992).

El virus emergió como una variante de hospedero de FPV o de otro parvovirus estrechamente relacionado (Hoelzer & Parrish, 2010). La acumulación de mutaciones que alteraron la capacidad infectiva del virus probablemente le otorgaron la capacidad de infectar células caninas, perdiendo la capacidad de infectar células felinas (Hueffer et al., 2003a). Las mutaciones más relevantes fueron Lys93Asn y Asp323Asn, ubicadas en las espículas de la cápside (Chang et al., 1992; Hueffer et al., 2003a, 2003b). Se cree que el proceso ocurrió como una adaptación gradual, dónde los cambios aminoacídicos fueron introducidos paso a paso (Hueffer & Parrish, 2003). Algunos de estos cambios se produjeron en el nuevo hospedero (Shackelton et al., 2005), posibilitando el uso eficiente del receptor TfR (Hueffer et al., 2003a).

CPV-2 se dispersó rápidamente por todo el mundo entre 1978 y 1979 generando una gran pandemia (Shackelton et al., 2005). En el lapso de un año fue reemplazado totalmente por una variante conocida como CPV-2a que se diferenció en 5 aa ubicados en VP2, y que le otorgó una mayor capacidad infectiva y expansión en el rango de hospederos, ya que adquirió la capacidad de replicarse en félidos, además de cánidos (Parrish et al., 1988; Steinell et al., 2000; Truyen et al., 1996). Aparentemente, las sustituciones involucradas en la capacidad para infectar ambos hospederos fueron los cambios Met87Leu, Ala300Gly y Asp305Tyr ubicados en los lazos expuestos en la superficie de VP2 (Hueffer et al., 2003a, 2003b). Otro de los cambios observados se dio en la posición 297 de VP2, y estaría vinculado a la estabilidad de la cápside, o podría participar en la interacción con el receptor TfR debido a su proximidad física con los residuos que controlan dicha interacción (residuos 299 y 300) (Hoelzer et al., 2008 b; Hoelzer & Parrish, 2010). No se volvió a tener registro de CPV-2, y CPV-2a continuo evolucionando originando todas las cepas que circulan en la actualidad.

En 1984 surge una variante antigénica conocida como CPV-2b que se diferenció por unos pocos aminoácidos de CPV-2a (Parrish et al., 1991). El cambio más relevante ocurrió en la posición 426 de la proteína VP2 y dio lugar a un nuevo epítipo. En el año 2000 se describió la variante antigénica CPV-2c en Italia, la cual se expandió rápidamente por todo el mundo

(Buonavoglia et al., 2001). CPV-2c también presentó un cambio de aminoácido en la posición 426 de VP2, generando un nuevo epítipo (Buonavoglia et al., 2001). El hecho de que tanto CPV-2b como CPV-2c presenten cambios aminoacídicos en la posición 426 de la proteína VP2 sustenta un rol fundamental de este residuo en la infección o en la evasión de la respuesta inmune (Hoelzer et al., 2008b; Hoelzer & Parrish, 2010). En la Tabla 1 se presentan todas las sustituciones aminoacídicas registradas para CPV-2 desde su emergencia, y en la Figura 9 se mapean algunas de las más relevantes.

Tabla 1 – Cambios aminoacídicos registrados en la población global de CPV-2 desde su emergencia. Tomado y adaptado de Hoelzer & Parrish, 2010.

Mutación en VP2	Virus o cepa	Año
80 Arg>Lys 93 Lys>Asn 103 Val>Ala 323 Asp>Asn 564 Asn>Ser 568 Ala>Gly	FPV a CPV-2	Previo a 1978
87 Met>Leu 101 Ile>Thr 300 Ala>Gly 305 Asp>Tyr	CPV-2a	1979
297 Ser>Ala 426 Asn>Asp	CPV-2b	1990 1984
426 Asp>Glu 440 Thr>Ala	CPV-2c	2001 2005

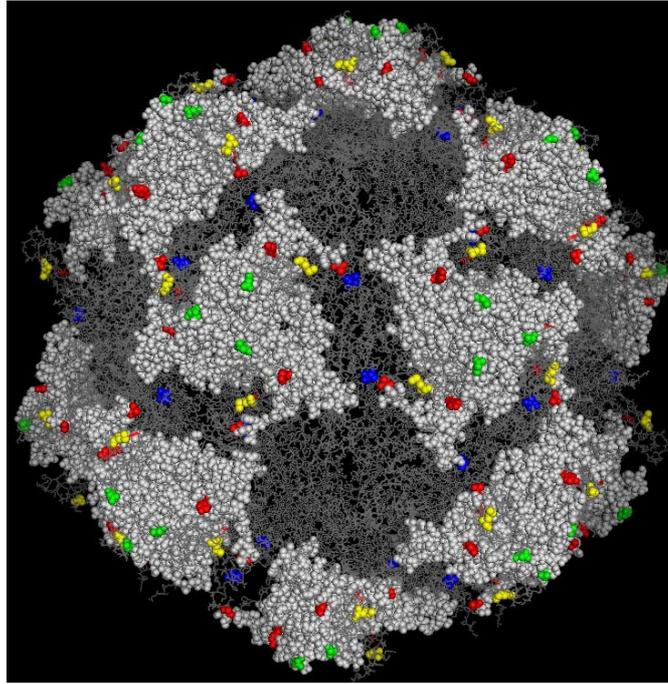


Figura 9 – Estructura de la cápside de CPV-2/FPV dónde se destacan algunos de los residuos relevantes para la evolución de CPV-2. En rojo aquellos residuos seleccionados positivamente entre FPV y CPV-2 (101, 300 y 323). En azul residuos seleccionados positivamente únicamente en FPV (562). En amarillo residuos seleccionados positivamente únicamente en CPV-2 (87). En verde el residuo 426. Tomado de Hoelzer et al; 2008b.

En la actualidad, CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c circulan a nivel mundial y son clasificadas en función de los cambios en el residuo 426 de la proteína VP2 (Hueffer et al., 2003a; Martella et al., 2006) (Tabla 2). La frecuencia con la que circulan varía según su procedencia geográfica (Anwar et al., 2015; Decaro & Buonavoglia, 2012; Gallo Calderón et al., 2015; Geng et al., 2015; Kaur et al., 2015; Miranda et al., 2015; Nivy et al., 2015; Yang et al., 2015; Zhao et al., 2015; Zhong et al., 2014).

Tabla 2 - Se detalla el aminoácido encontrado en la posición 426 de la proteína VP2.

	Aminoácido en la posición 426 de la proteína VP2
CPV-2a	Asparagina (Asn – AAT)
CPV-2b	Ácido aspártico (Asp – GAT)
CPV-2c	Ácido glutámico (Glu – GAA)

1.4.3 Evolución de CPV-2 en Uruguay

La historia evolutiva de CPV-2 en Uruguay está marcada por algunos eventos sumamente particulares, los cuales tornan a nuestro territorio en un escenario interesante para el estudio de la evolución de CPV-2.

El grupo de Genética de Microorganismos de la Sección Genética Evolutiva (Facultad de Ciencias, UdelaR) viene desarrollando, desde el año 2006, metodologías de diagnóstico y caracterización molecular para colaborar en la implementación de planes de vigilancia sanitaria y en el estudio de la evolución del parvovirus canino.

Nuestro grupo reportó por primera vez en el continente americano, la presencia de CPV-2c en muestras colectadas durante el año 2006 (Pérez et al., 2007). Durante el período comprendido entre 2007 y 2009, la cepa CPV-2c fue la única detectada en nuestro territorio (Pérez et al., 2012). En 2010 un inesperado cambio ocurrió con la detección de CPV-2a en Uruguay (Pérez et al., 2012). Ésta se expandió rápidamente, generando una población heterogénea y alcanzando una prevalencia del 38% en el año 2010, un 77% en el año 2011, 70% en 2012 y 97% en 2013, exhibiendo una marcada tendencia a la sustitución de CPV-2c (Tabla 3). Es de destacar, que ésta es la primera vez que se registra una tendencia de reemplazo de CPV-2c por CPV-2a en el mundo.

Tabla 3 – Tabla de muestras diagnosticadas y caracterizadas por nuestro laboratorio entre los años 2010 – 2013 como CPV-2a o CPV-2c mediante PCR tiempo final, posterior ensayo de polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción (RFLP) y secuenciación.

	CPV-2a	CPV-2c	Prevalencia CPV-2a	Prevalencia CPV-2c
2010	21	35	38%	62%
2011	57	11	77%	23%
2012	38	16	70%	30%
2013	33	1	97%	3%

Estos datos evidenciaron un nuevo escenario epidemiológico en nuestro país que, según información brindada por médicos veterinarios, podría estar asociado a cambios en la presentación de la enfermedad. En estudios posteriores donde secuenciamos el gen completo que codifica para la proteína VP2 y realizamos análisis filogenéticos, determinamos que el origen de CPV-2c era probablemente europeo, mientras que CPV-2a presentaba un origen probablemente asiático (Maya et al., 2013). Más adelante secuenciamos los genomas

completos de CPV-2a y CPV-2c, y los comparamos mediante herramientas bioinformáticas. Los análisis confirmaron la alta divergencia entre las cepas CPV-2a y CPV-2c que circulan en Uruguay, tal como lo indican las posiciones en el genoma donde identificamos polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) que distinguen CPV-2a de CPV-2c.

En el marco de otro proyecto de investigación, detectamos en el 2011, una muestra co-infectante (CPV 370). Ésta ingreso al laboratorio y fue sometida a diagnóstico y caracterización molecular mediante PCR-RFLP siguiendo el protocolo descrito en Pérez et al., en 2012. Sorpresivamente, el ensayo reveló ambos patrones de bandeo, uno característico de CPV-2a (634 y 408 pares de bases (pb)) y otro de CPV-2c (634, 352 y 56 pb) (Figura 10).

CPV 370 CPV-2a CPV-2c

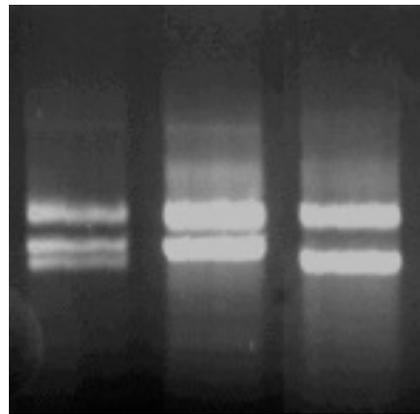


Figura 10 – Ensayo de RFLP de la muestra CPV 370. Carril 1 – Patrón de bandeo para CPV 370. Carril 2 – Patrón de bandeo para el control positivo CPV-2a. Carril 3 – Patrón de bandeo para el control positivo CPV -2c. Nótese que la muestra CPV 370 presenta tres bandas, una de 634 pb, otra de 408 pb y una de 352 pb. La banda de 56 pb no logra visualizarse.

Esto nos indicó que la muestra CPV 370 podría tratarse de una muestra co-infectante. El hecho de que hubiéramos logrado visualizar ambos patrones de bandeo sugería que las cepas presentes en la muestra se encontraban en altas proporciones. Para confirmar nuestra hipótesis, la muestra fue sometida a secuenciación automática por Sanger. Al analizar el cromatograma, observamos picos dobles en aquellas posiciones en que se diferencian CPV-2a y CPV-2c (Figura 11). Mediante la aplicación de protocolos de secuenciación profunda se confirmó la co-infección y se determinó que ambas cepas estaban en proporción cercana al 50% (Pérez et al. 2014).

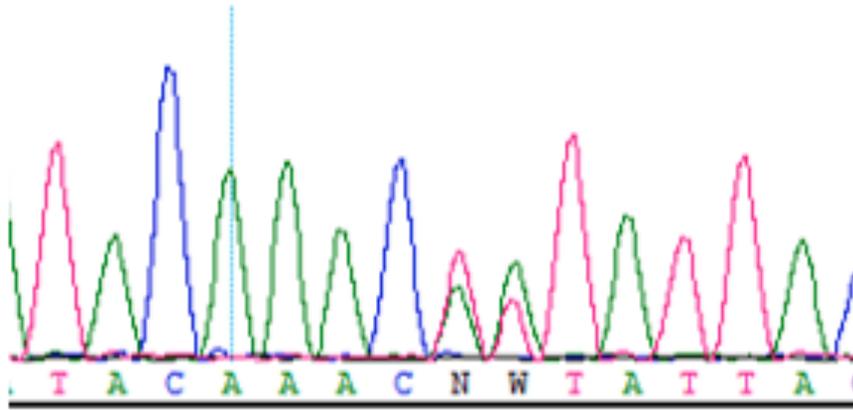


Figura 11 – Cromatograma de la muestra CPV 370 secuenciada por metodología de Sanger. Nótese el doble pico en las posiciones 3484 y 3485, dónde se diferencian CPV-2a y CPV-2c.

Durante esta investigación, también se identificó una cepa recombinante (CPV 364) mediante secuenciación automática por Sanger sobre las regiones genómicas NS y VP. CPV 364 fue sometida a protocolos de secuenciación profunda, confirmando la presencia del evento de recombinación y mostrando que, además de la cepa recombinante, en la muestra existía una cepa CPV-2a en menor proporción (Pérez et al. 2014).

El escenario particular que plantea la población heterogénea de CPV-2 en Uruguay, marcada por la co-circulación de CPV-2a y CPV-2c, la alta divergencia genética detectada entre las mismas, y la detección de una muestra co-infectantes y una co-infectante y recombinante, motivo la realización de este trabajo.

1.5 Hipótesis de Trabajo

Partiendo del escenario particular que se plantea en Uruguay, marcado por la co-circulación durante los años 2010 a 2013 de CPV-2a y CPV-2c, y la detección aislada de eventos de co-infección y recombinación, planteamos como hipótesis que estos eventos ocurren frecuentemente en el territorio nacional.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo General

Analizar la generación de variabilidad genética mediada por los mecanismos de co-infección y recombinación en la población heterogénea de CPV-2 en Uruguay.

1.6.2 Objetivos Específicos

- i) Desarrollar y validar una metodología rápida capaz de distinguir entre CPV-2a y CPV-2c cuando se encuentran presentes en una misma muestra biológica.
- ii) Realizar un relevamiento de muestras biológicas obtenidas entre 2010-2013 con la metodología desarrollada.
- iii) Realizar un análisis en profundidad de la composición genética en el genoma completo de cepas de CPV-2 que presenten evidencia de co-infección y/o recombinación.

2 - MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Estrategia de investigación

La detección de muestras co-infectantes y/o recombinantes se realizó inicialmente mediante el desarrollo de una metodología por PCR a tiempo final con cebadores que presentaron especificidad por CPV-2a o CPV-2c para ambos ORFs del genoma (Figura 12). En aquellas muestras donde se obtuvo doble amplificación para uno u otro ORF, tal que sugirieron la existencia de co-infección y/o recombinación, se amplificó el genoma completo, y se analizó por tecnología de secuenciación profunda para determinar la composición genética exacta de estas muestras.

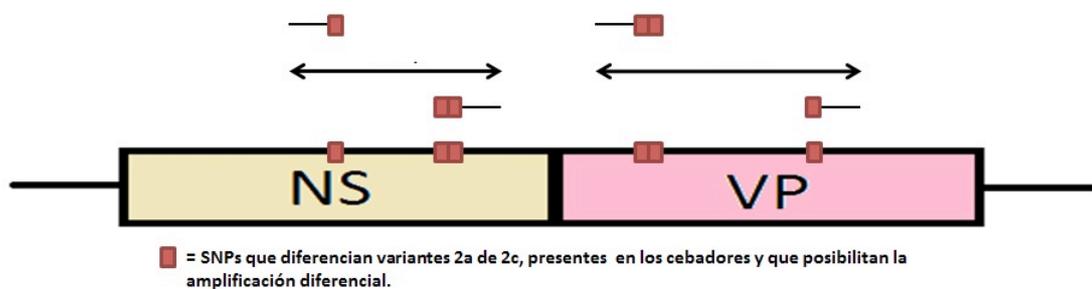


Figura 12 – Genoma completo de CPV-2 mostrando ambos ORFs, 3' izquierdo y 5' derecho, zonas de hibridación de los cebadores variante específicos y fragmentos amplificados.

2.2 Material biológico

Se analizaron 214 muestras de materia fecal colectadas en el período 2010-2013. Todas ellas fueron extraídas por el método de *fast boiling* (Schunck et al., 1995), diagnosticadas positivas para CPV-2 y caracterizadas molecularmente por integrantes del grupo (y no en el marco de esta tesis) (Pérez et al., 2012) (Tabla 4).

Dos clones de referencia conteniendo el genoma completo de cepas CPV-2a y CPV-2c uruguayas fueron utilizados para optimizar la técnica y como controles en las reacciones de PCR.

Tabla 4 – Tabla de muestras utilizadas en este trabajo, diagnosticadas y caracterizadas por nuestro laboratorio entre los años 2010 – 2013 por metodología de PCR-RFLP y/o secuenciación automática.

	CPV-2a	CPV-2c	Co-infectante	Recombinante	Total
2010	21	35	0	0	56
2011	57	11	1	1	69
2012	38	16	0	0	54
2013	33	1	0	0	35
Total	149	63	1	1	214

Un total de 15 muestras fueron seleccionadas para el análisis por secuenciación profunda en base a su patrón de amplificación con cebadores variante específicos. Partimos nuevamente del DNA extraído por el método de *fast boiling* (Schunck et al., 1995), y se realizó una re-extracción del mismo. En la Tabla 5 se presentan cada una de las muestras seleccionadas junto con el año de colecta, algunos datos clínicos del animal y el resultado del diagnóstico y caracterización molecular por PCR-RFLP.

Tabla 5 – Tabla de muestras seleccionadas para análisis por secuenciación profunda. Se indica el nombre de la muestra, año de colecta, edad del can, plan de vacunación, sintomatología, evolución y el resultado del diagnóstico por PCR-RFLP.

Muestra	Año de Colecta	Edad	Plan de vacunación	Sintomatología	Evolución	PCR-RFLP
CPV 247	2010	6 meses	Vacunación Incompleta	Vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea hemorrágica, depresión	Desconocida	CPV-2c
CPV 260	2010	3 meses	Vacunación Incompleta	Desconocida	Desconocida	CPV-2c
CPV 290	2010	7 meses	Hexadog	Desconocida	Desconocida	CPV-2a
CPV 347	2011	-	Desconocido	Desconocida	Desconocida	CPV-2a
CPV 382	2012	-	C4 Merial	Vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea, depresión, movimientos oscilatorios de cabeza	Falleció	CPV-2c
CPV 383	2012	4 meses	Hexadog	Vómitos, gastroenteritis hemorrágica, diarrea hemorrágica	Falleció	CPV-2a
CPV 389	2012	6 meses	Hexadog	Fiebre, vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea	Falleció	CPV-2a
CPV 405	2012	4 meses	Desconocido	Fiebre, vómitos, gastroenteritis, diarrea hemorrágica	Falleció	CPV-2c
CPV 407	2012	2 meses	Desconocido	Fiebre, hipotermia, vómitos, gastroenteritis, diarrea hemorrágica	Falleció	CPV-2c
CPV 409	2012	3 meses	Recombitek	Fiebre, vómitos, gastroenteritis, diarrea hemorrágica	Falleció	CPV-2c
CPV 410	2012	8 meses	Sin vacunación	Vómitos, diarrea	Desconocida	CPV-2c
CPV 426	2012	4 meses	Recombitek	Fiebre 40°, vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea acuosa con restos de mucosa, depresión, decaimiento	Desconocida	CPV-2c
CPV 437	2012	2 meses	Sin vacunación	Vómitos, diarrea hemorrágica	Sobrevivió	CPV-2c
CPV 443	2013	4 meses	Desconocido	Vómitos, gastroenteritis, diarrea, depresión y decaimiento	Falleció	CPV-2a
CPV 453	2013	3 meses	C4 Merial	Neumonía, vómitos, anorexia, piodermia abdominal, gastroenteritis, diarrea mucoide y roja	Falleció	CPV-2a

2.3 Relevamiento por PCR con cebadores variante específicos (PCR-CVE)

2.3.1 Diseño de cebadores variante específicos (CVE) para CPV-2a y CPV-2c

Se realizó un alineamiento utilizando el *software* computacional MEGA 6 (Tamura et al., 2013) con el programa de alineamiento *Muscle* en el que se incluyeron 42 secuencias completas de cepas de campo de CPV-2 uruguayas. Se diseñaron 4 pares de CVE que poseen en sus extremos 3' diferencias de hasta 2 nucleótidos que le otorgan especificidad por CPV-2a o por CPV-2c. Dos de los 4 pares de CVE hibridan sobre un fragmento del ORF NS o izquierdo; los otros 2 hibridan sobre un fragmento del ORF VP o derecho. En una última etapa se verificó la temperatura de disociación (*melting*), formación de estructuras secundarias y heterodímeros con la herramienta OligoAnalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>).

2.3.2 Optimización y validación de la técnica

2.3.2.1 Optimización de la reacción de PCR-CVE que hibridan en el ORF VP (PCR-CVE-VP) y en el ORF NS (PCR-CVE-NS)

Antes de comenzar, es importante aclarar que iniciamos el trabajo con los CVE que hibridan sobre el ORF VP, debido a que esta secuencia incluye a la posición 426 de VP2 utilizada para clasificar CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c.

La reacción de PCR-CVE se optimizó empleando los clones de referencia CPV-2a y CPV-2c.

Se emplearon distintas concentraciones de DNA molde para determinar la cantidad óptima a emplear en cada reacción de PCR-CVE. Las cantidades utilizadas para los otros reactivos de PCR corresponden a las indicadas por el fabricante.

Los parámetros de ciclado de la reacción de PCR-CVE, se debieron ajustar para asegurarnos que la amplificación fuera lo suficientemente astringente. Uno de los más importantes fue la temperatura de hibridación (*annealing*). Tomando como referencia la temperatura de disociación de cada par de cebadores (Tabla 16, apartado 3.1.1), y empleando un termociclador de gradiente en un rango entre 48°C y 60 °C, se ajustó la temperatura de hibridación de la reacción.

La mezcla de reacción y los parámetros de ciclado se encuentran en el apartado 2.3.3 de esta sección.

2.3.2.2 Validación de la técnica mediante ensayo de RFLP sobre amplicones diferenciales obtenidos con PCR-CVE-VP

Para confirmar la secuencia nucleotídica subyacente de los amplicones diferenciales obtenidos por PCR-CVE-VP tras la optimización, se realizó un ensayo de RFLP (Buonavoglia et al., 2001; Pérez et al., 2012). En este ensayo se analizan y comparan los tamaños de los fragmentos obtenidos tras digestión enzimática con una endonucleasa específica. Se utilizó la enzima MbolI (Fermentas) que reconoce la secuencia específica GAAGA. El codón presente en la posición 426 de CPV-2c contiene esta secuencia y se genera un sitio de corte adicional, permitiendo diferenciar CPV-2c de CPV-2a (Tabla 2, apartado 1.4.2). La digestión del amplicón correspondiente a CPV-2c da lugar a 3 fragmentos de 328 pb, 432pb y 56 pb, mientras que la digestión de amplicones correspondientes a CPV-2a da lugar a 2 fragmentos de 328 pb y 488 pb (Pérez et al., 2012). La reacción se realizó según lo especificado en la Tabla 6 y se incubó durante 2 horas a 37 °C.

Tabla 6 - Reactivos y sus correspondientes volúmenes utilizados en la reacción de RFLP.

Reactivo	Volumen (μl)
Producto de PCR	15
Buffer de la enzima 10x (B) (Fermentas)	1,5
Enzima MbolI (5 U/μl) (Fermentas)	0,6
Agua	12,9
Volumen final	30

2.3.2.3 Validación de la técnica por secuenciación automática de amplicones diferenciales obtenidos por PCR-CVE-VP y PCR-CVE-NS

Los amplicones diferenciales obtenidos tras la optimización de la PCR-CVE-VP y PCR-CVE-NS, se purificaron y se secuenciaron por metodología de Sanger en forma bidireccional utilizando los cebadores específicos para cada amplicón (F3737a/R4563a - F3737c/R4563c y F1697a/R 2107a - F1697C/R2107c, Tabla 16, apartado 3.1.1). Los cromatogramas de las secuencias se visualizaron y editaron con el programa SeqMan 4.00 (DNASTAR Inc. Lasergene) y las secuencias se alinearon con genomas de referencia empleando el programa MEGA 6 (Tamura et al., 2013).

2.3.2.4 Determinación de la sensibilidad de la técnica

Para determinar la sensibilidad de la técnica para la detección de co-infectantes, se realizaron mezclas de los clones de referencia CPV-2a y CPV-2c en distintas proporciones (1:999, 1:499, 1:99, 5:95, 10:90, 50:50, 90:10, 95:5, 99:1, 499:1, 999:1). Sobre éstas se realizó la PCR-CVE-VP. Se determinó la sensibilidad de la técnica en función de presencia o ausencia de amplicón en cada dilución.

2.3.3 Relevamiento por PCR-CVE-VP y PCR-CVE-NS

Una vez optimizada y validada la técnica para la detección de los co-infectantes, se realizó una primera prueba del sistema PCR-CVE-VP y PCR-CVE-NS sobre la muestra de campo CPV 370, identificada previamente como co-infectante (apartado 1.4.3). Luego, el relevamiento se realizó sobre el total de muestras de campo diagnosticadas como positivas para CPV-2 colectadas entre 2010 y 2013. En todos los casos se incluyó un blanco (agua), un control positivo CPV-2a (clon de referencia CPV-2a), un control positivo CPV-2c (clon de referencia CPV-2c), y una mezcla CPV-2a/CPV-2c 50:50 a modo de “control positivo de co-infección”. Los reactivos utilizados y las condiciones de ciclado de la PCR-CVE-VP se detallan en la Tabla 7 y Tabla 8 respectivamente, y los de la PCR-CVE-NS en la Tabla 9 y Tabla 10 respectivamente.

Tabla 7 - Reactivos y cantidades de los mismos utilizados en la PCR-CVE-VP. H₂O = agua, MgCl₂ = cloruro de magnesio.

Reactivo	Cantidad (μl)
H ₂ O	6,30
Buffer de reacción 10x	1,00
MgCl ₂ (25 mM)	0,80
dNTPs (10 mM)	0,20
Cebador F3737 (10 μM)	0,25
Cebador R4563 (10 μM)	0,25
DNA (5-20 ng/μl)	1,00
Taq polimerasa (5 U/μl)	0,20
Volumen final	10,00

Tabla 8 - Condiciones de ciclado utilizado para la PCR-CVE-VP.

Ciclado	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	N° ciclos
Desnaturalización inicial	98	03:00	1
Desnaturalización	95	00:30	30
Hibridación	56	00:30	
Extensión	72	00:40	
Extensión final	72	10:00	1

Tabla 9 - Reactivos y cantidades de los mismos utilizados en la PCR-CVE-NS. H₂O = agua, MgCl₂ = cloruro de magnesio.

Reactivo	Cantidad (μl)
H ₂ O	6,30
Buffer de reacción 10x	1,00
MgCl ₂ (25 mM)	0,80
dNTPs (10 mM)	0,20
Cebador F3737 (10 μM)	0,25
Cebador R4563 (10 μM)	0,25
DNA (5-20 ng/μl)	1,00
Taq polimerasa (5 U/μl)	0,20
Volumen final	10,00

Tabla 10 - Condiciones de ciclado utilizado para la PCR-CVE-NS.

Ciclado	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	N° ciclos
Desnaturalización inicial	98	03:00	1
Desnaturalización	95	00:30	30
Hibridación	56	00:30	
Extensión	72	01:00	
Extensión final	72	10:00	1

2.3.4 Preparación de muestras para secuenciación profunda

2.3.4.1 Extracción de DNA con kit QIAmp DNA de QIAGEN

Las muestras que presentaron un patrón de bandeo sugerente de co-infección y/o recombinación fueron re-extraídas utilizando el kit QIAmp DNA de QIAGEN a partir del DNA

obtenido por la extracción tipo *fast boiling* (Schunck et al., 1995). En el siguiente recuadro se describen brevemente los pasos del protocolo.

- Agregar 30 μ l de proteasa o proteinasa K (>600 mAU/ml) al fondo de un tubo tipo eppendorf.
- Agregar 300 μ l de DNA extraído por *fast boiling* (Schunck et al., 1995).
- Agregar 4 μ l de solución stock de RNase (100 mg/ml).
- Agregar 300 μ l de *buffer* AL y mezclar por *vortex* durante 15 segundos.
- Incubar 10 minutos a 56°C y realizar una centrifugación tipo *spin*.
- Agregar 300 μ l de etanol puro (96% – 100%), mezclar por *vortex* durante 15 segundos y realizar una centrifugación tipo *spin*.
- Transferir la totalidad del volumen a una columna de purificación suplementada por el *kit* y centrifugar a 60000g durante 1 minuto.
- Transferir la columna a un nuevo tubo colector y agregar 500 μ l de *buffer* AW1. Centrifugar a 6000g durante 1 minuto.
- Descartar el filtrado y agregar 500 μ l de *buffer* AW2. Centrifugar a máxima velocidad (20000g) durante 3 minutos.
- Transferir la columna a un nuevo tubo eppendorf y agregar 50 μ l de agua o *buffer* AE. Incubar 1-5 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar a 6000g durante 1 minuto.
- Conservar el DNA eluído a -20°C.

2.3.4.2 PCR para amplificar genomas completos

A partir del DNA altamente puro se amplificó el genoma completo de las muestras seleccionadas en dos fragmentos solapantes que corresponden aproximadamente al ORF NS y VP. El laboratorio ya contaba con estos cebadores que fueron diseñados en base a la secuencia CPV m38245 (número de acceso M38245) (Tabla 11). Se empleó la enzima *Long PCR Enzyme Mix*, que exhibe tres veces más fidelidad de copia que polimerasas comunes. Los reactivos, cantidades y condiciones de ciclado para cada reacción se describen en las Tablas 12, 13 y 14. Nótese que esta enzima emplea un ciclado doble, dónde varían las temperaturas de extensión.

Tabla 11 - Cebadores utilizados para la amplificación del genoma completo. Se detalla el nombre, secuencia nucleotídica, posición en el genoma y tamaño del amplicón obtenido.

Cebador	Secuencia	Posición	Tamaño amplicón
NS Fext	GACCGTACTGACATTGCTTC	206 - 227	2255 pb
NS Rext	GAAGGGTTAGTTGGTTCTCC	2441 - 2460	
CPV 2161 F	TTGGCGTACTCACAAAGACGTGC	2161 - 2184	2663 pb
CPV 4823 R	ACCAACCACCCACACCATAACAAC	4800 - 4823	

Tabla 12 - Reactivos y cantidades de los mismos utilizados en la amplificación de los genomas completos con la enzima *Long PCR Enzyme Mix* para los fragmentos solapantes NS y VP.

Reactivo	Cantidad (ul)
H ₂ O	26,0
Buffer de reacción 10x	4,0
MgCl ₂ (25 mM)	-
dNTPs (10 mM)	3,2
Cebador Forward (10 μM)	2,4
Cebador Reverse (10 μM)	2,4
DNA (20 ng/μl)	1,5
Long polimerasa (5 U/μl)	0,5
Vol final	40

Tabla 13 - Condiciones de ciclado utilizadas para la amplificación del genoma completo del fragmento NS con la enzima *Long PCR Enzyme Mix*.

Ciclado	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	N° ciclos
Desnaturalización inicial	98	03:00	1
Desnaturalización	94	00:20	10
Hibridación	58	00:30	
Extensión	68	02:15	
Desnaturalización	94	00:20	20
Hibridación	58	00:30	
Extensión	68	02:30	
Extensión final	68	10:00	1

Tabla 14 - Condiciones de ciclado utilizado para la amplificación del genoma completo del fragmento VP con la enzima *Long PCR Enzyme Mix*.

Ciclado	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	N° ciclos
Desnaturalización inicial	98	03:00	1
Desnaturalización	94	00:20	10
Hibridación	61	00:30	
Extensión	68	02:45	
Desnaturalización	94	00:20	20
Hibridación	61	00:30	
Extensión	68	03:00	
Extensión final	68	10:00	1

2.3.4.3 Purificación de los genomas completos obtenidos en fragmentos solapantes

Los fragmentos obtenidos por PCR se purificaron empleando el *kit Zymo DNA clean & Concentrator*. En el siguiente recuadro se describen brevemente los pasos del protocolo.

- Llevar el producto de PCR a un volumen final de 50 µl con agua.
- Agregar 250 µl de *binding buffer* y mezclar por *vortex*.
- Transferir la totalidad del volumen a una columna de purificación suplementada por el *kit*, centrifugar 30 segundos a 13000g y descartar el eluido.
- Agregar 200 µl de *wash buffer*, centrifugar 30 segundos a 13000g y descartar el eluido.
- Repetir el paso anterior.
- Agregar 40 µl de *DNA elution buffer* e incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
- Transferir la columna a un tubo eppendorf y centrifugar 30 segundos a 13000g.
- Conservar el DNA eluido a -20°C.

2.3.4.4 Electroforesis

Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% para la visualización de productos de PCR y al 2% para visualización de productos de digestión enzimática, con tinción con bromuro de etidio (0.6 µg/µl) durante 30 minutos a 100 Volts. La corrida electroforética se realizó en *buffer TAE 1x* (40 mM Tris base (pH 7.6), 20 mM ácido acético glacial y EDTA 1 mM). Se visualizó el resultado en transiluminador con luz ultravioleta (UV).

2.4 Secuenciación profunda

Los ensayos de secuenciación profunda fueron realizados en el Laboratorio de Poblaciones Virales y Patogénesis, Institut Pasteur Paris, París, Francia, a cargo del Dr. Marco Vignuzzi, en el marco de una pasantía de investigación realizada durante los meses de Julio y Agosto de 2014.

2.4.1 Cuantificación del DNA purificado

La cuantificación del DNA de los fragmentos que contienen los genomas completos se realizó empleando la sonda fluorescente PicoGreen (Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit Invitrogen), que se une al DNA y forma un complejo luminiscente. La lectura de fluorescencia se realizó en el fluorómetro MFX (Dynex Technologies). En el siguiente recuadro se describen brevemente los pasos del protocolo.

- En una placa de 96 pocillos agregar 50 μ l de *buffer* TE-3 (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA) en un pocillo (blanco) y en los restantes agregar 48 μ l de *buffer* TE-3 y 2 μ l de DNA.
- Agregar 50 μ l del reactivo PicoGreen previamente diluido (1:200 en *buffer* TE-3) en cada pocillo.
- Incubar la placa durante 5 minutos a temperatura ambiente en ausencia de luz
- Realizar la toma de medidas en el fluorómetro.

2.4.2 Fragmentación del DNA

El objetivo de la fragmentación de las muestras es obtener pequeños fragmentos de DNA (aproximadamente 70 pb) que luego se purifican y ligan a los adaptadores. Teniendo en cuenta las medidas de concentración de DNA obtenidas en el paso anterior, se adicionan distintos volúmenes de DNA de interés a 0.4 μ l de la proteína seroalbúmina bovina (BSA), 4 μ l de *buffer* de reacción 10x y 4 μ l de la enzima fragmentasa NEBnextds DNA (New England Biolabs). Esta mezcla de reacción se incuba a 37°C durante 50 minutos. La reacción se detiene mediante el agregado de EDTA 0.5M.

2.4.3 Purificación del DNA fragmentado

El DNA fragmentado fue purificado utilizando cuentas magnéticas (*beads*) AgencourtAMPure XP (BeckmanCoulter). Estas cuentas son capaces de unirse al DNA con alta especificidad y permiten la recuperación de DNA de altísima pureza. En el siguiente recuadro se describen brevemente los pasos del protocolo.

- Mezclar por *vortex* la solución de cuentas magnéticas y agregar 65 μ l por pocillo a una placa de 96 pocillos.
- Mezclar el DNA fragmentado y agregar a cada pocillo.
- Incubar la placa durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Colocar la placa en agitador magnético a temperatura ambiente durante 15 minutos adicionales o hasta que el líquido se torne incoloro.
- Descartar el sobrenadante en cada pocillo y agregar 200 μ l de etanol 80%.
- Incubar la placa por 1 minuto y realizar un segundo lavado con etanol 80% en agitador magnético durante 5 minutos.
- Remover la placa del agitador magnético y dejar reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Resuspender el *pellet* en 62.5 μ l de *buffer* de resuspensión e incubar la placa a temperatura ambiente por 2 minutos.
- Colocar la placa en el agitador magnético durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Conservar 60 μ l de sobrenadante de cada pocillo correspondientes al DNA altamente puro a -20°C.

2.4.4 Construcción de librerías

Las librerías se construyeron con el *kit* NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina® (New England Biolabs) (procedimiento realizado por la unidad de secuenciación profunda). En el mismo se agregan terminadores al DNA fragmentado y se ligan adaptadores específicos para Illumina en sus extremos. Estos adaptadores hibridarán con cebadores para la generación de *clusters* de amplificación (Figura 13).

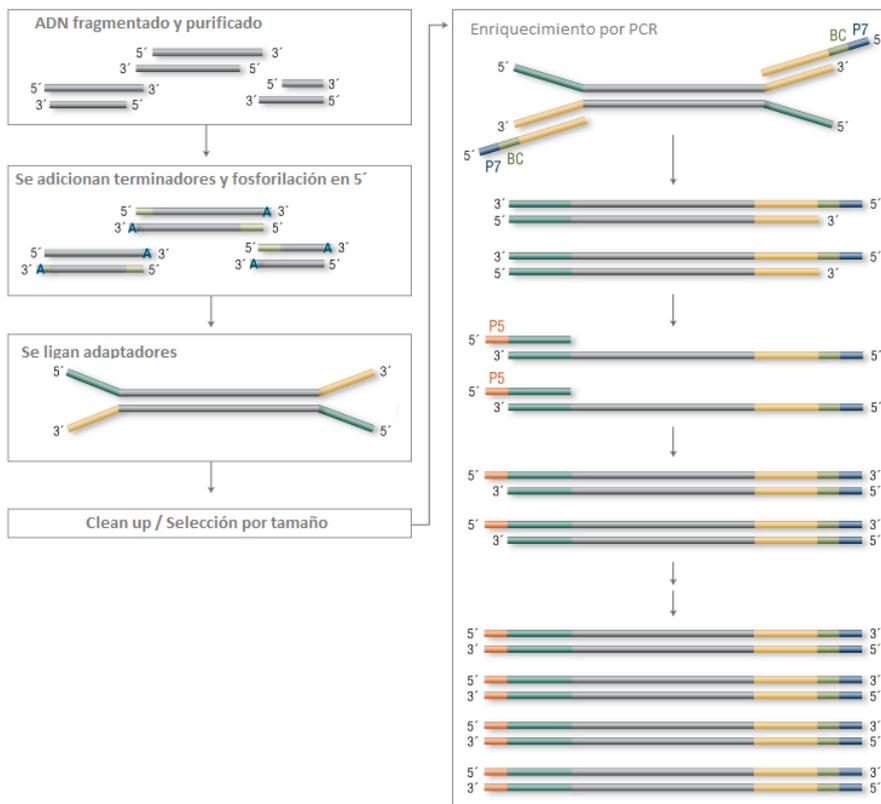


Figura 13 – Esquema de trabajo que representa los pasos a seguir para la generación de librerías para secuenciación profunda. Tomado y adaptado de: <https://www.neb.com/products/e7370-nebnext-ultra-dna-library-prep-kit-for-illumina#pd-description>.

2.4.5 Secuenciación por síntesis

Los fragmentos de DNA purificados que contienen adaptadores en sus extremos fueron hibridados a cebadores universales presentes en la celda de secuenciación a través de los propios adaptadores. Se produce la síntesis de la hebra complementaria a partir de los cebadores y se remueve la hebra molde. Luego se realiza la primera ronda de *bridge PCR*, dónde el DNA se sintetiza empleando una enzima de alta fidelidad por extensión del extremo 3' desde la zona de hibridación entre los cebadores y adaptadores. Así se forman los puentes de dhDNA, que posteriormente son desnaturalizados dando lugar a dos hebras simples. En los pasos siguientes, estas moléculas shDNA hibridarán nuevamente con los cebadores de la matriz, generando nuevos puentes y repitiendo el proceso. Luego de varias rondas de replicación se generarán *clusters* clonales. En un paso posterior se eliminan las secuencias complementarias, permaneciendo sólo aquellas que presenten la orientación correcta (Figura 14).

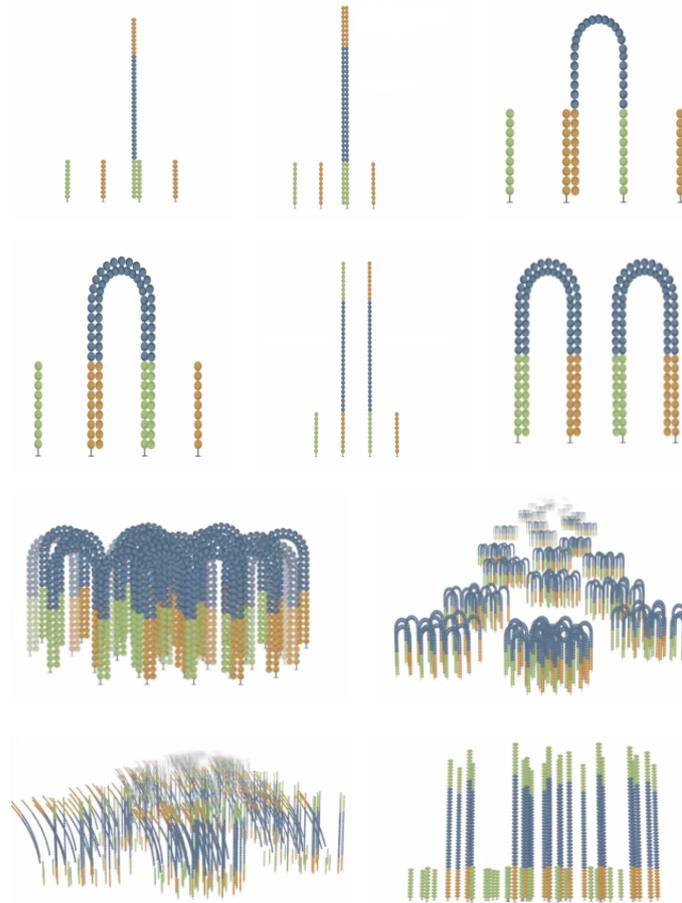


Figura 14 - Esquema que representa los pasos a seguir para la generación de *clusters* clonales mediante *bridge PCR*. Tomado y adaptado de: [https://www.youtube.com/embed/HMyCqWhwB8E?iframe&rel=0&autoplay=.](https://www.youtube.com/embed/HMyCqWhwB8E?iframe&rel=0&autoplay=)

Por último, un cebador de secuenciación híbrida con su secuencia complementaria, presente en los extremos libres de las cadenas simple hebra. Se incorporan uno a uno los nucleótidos correspondientes y comienza así el proceso de secuenciación por síntesis (SBS) de la hebra complementaria. Éste método emplea nucleótidos que presentan terminadores fluorescentes, que a medida que van siendo incorporados a la cadena naciente son detectados por el equipo. Así, la síntesis de la cadena complementaria de DNA permite la lectura de cada nucleótido (Figura 15). Una vez detectado el nucleótido, los terminadores fluorescentes son removidos, permitiendo que el proceso se extienda cíclicamente hasta 100 veces sobre cada una de las copias de shDNA hibridadas a la matriz.

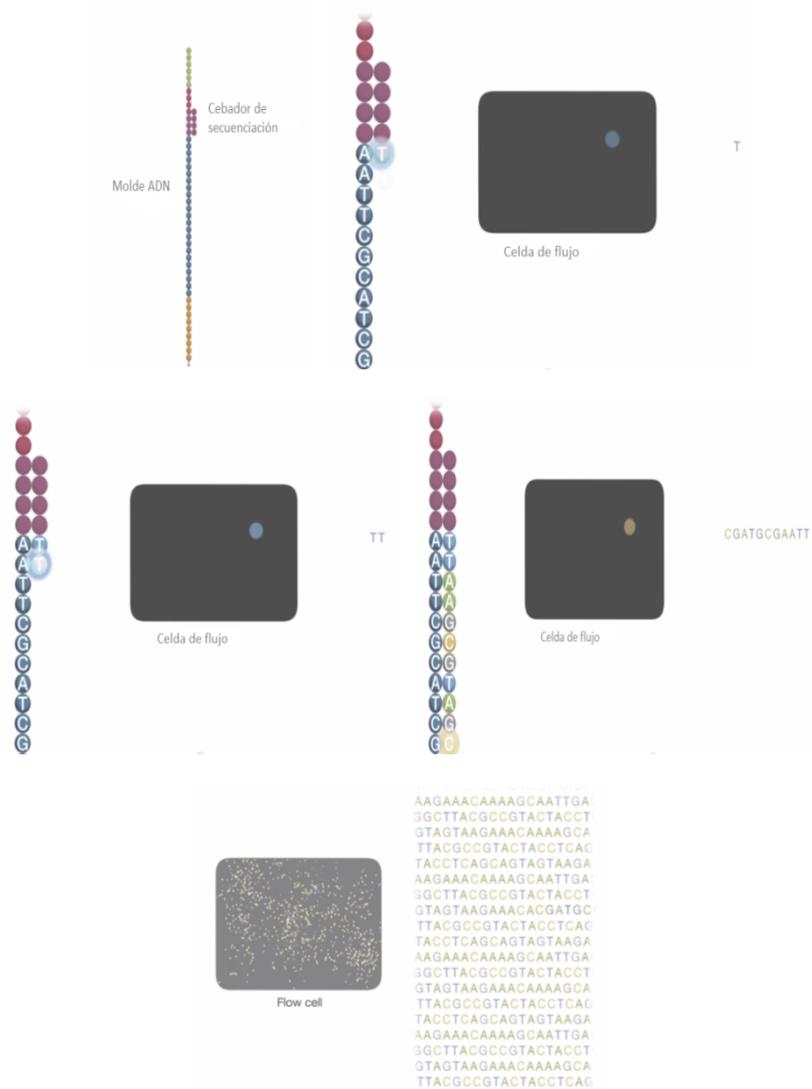


Figura 15 – Esquema representativo de los pasos de la secuenciación por síntesis (SBS). Tomado y adaptado de: <https://www.youtube.com/embed/HMyCqWhwB8E?iframe&rel=0&autoplay=1>.

2.5 Análisis bioinformáticos

2.5.1 Control de calidad y alineamiento de los *reads*

Los datos de secuenciación crudos (archivo fastq), fueron sometidos a un control de calidad inicial mediante la herramienta fastq-mcf, y las secuencias que no superaron este control fueron eliminadas. Los *reads* que superaron este control inicial fueron alineados con la secuencia de referencia CPV2a-UY243.10 (KM457102), para la cual se dispone del genoma completo.

2.5.2 Implementación del programa *Viral Variance Analysis* (ViVan)

Todas las secuencias que superaron éste primer filtro fueron analizadas con el *pipeline* computacional ViVan desarrollado para la identificación, caracterización y comparación de poblaciones virales con datos obtenidos por secuenciación profunda (Isakov et al., 2015). El programa brinda información del número de lecturas para cada base en cada posición nucleotídica, frecuencia de cada una, cobertura, sustituciones sinónimas y no sinónimas significativas en la población, cambios aminoacídicos generados, heterogeneidad de distintas regiones, valores de entropía de Shannon, tasas de transversión y transición, entre otros. El resultado final es un archivo en formato .csv (valores separados por coma), que es fácilmente visualizado en hojas de cálculo Excel. En el Anexo I se encuentran los archivos Excel obtenidos para cada muestra analizada, que se presentan en dos hojas de cálculo. En la primera, “Frecuencias”, se encuentran los datos de la lectura de corrida de secuenciación. En la columna A se encuentra la posición en el genoma, en la columna B el nucleótido de referencia encontrado en cada posición, en la columna C la cobertura, en las columnas D a G la cantidad y tipo de bases secuenciados en cada posición, en las columnas H a K la frecuencia relativa de cada nucleótido para cada posición en el genoma, y en la columna L el gen o *feature* en el que se ubican. En la segunda hoja denominada “Sustituciones” se encuentran todos los cambios a nivel nucleotídico que se generan con respecto a la secuencia de referencia. En la columna A el gen dónde se ubica el cambio, en la columna B la posición genómica, en la columna C la cobertura, en la columna D el nucleótido de referencia, en la columna E el nucleótido alternativo, en la columna F la frecuencia en que se encuentra el nucleótido alternativo, en la columna G la posición dentro del gen, en la columna H la posición del aminoácido en que se produce el cambio, y en la columna I el tipo de sustitución que genera.

2.5.3 Identificación de variantes nucleotídicas

Según nos indicaron los técnicos en secuenciación del laboratorio del Dr. Vignuzzi, en nuestra corrida se registraron en todas las muestras valores de frecuencia de entre 0% – 3% en la mayoría de las posiciones nucleotídicas, que fueron considerados parte del error de la corrida de secuenciación. Tomando en cuenta ello, definimos para nuestro estudio el término “variantes nucleotídicas” como todas las posiciones nucleotídicas que presenten uno (o más) nucleótido/s en frecuencia/s superior/es al 3%. Así cada posición genómica podrá tener una variante nucleotídica, dos, tres o hasta cuatro (en este caso, frecuencias de A, T, C y G superiores a 3% en una misma posición en el genoma).

2.5.3.1 Identificación de co-infectantes y recombinantes CPV-2a/CPV-2c

Consideramos una muestra co-infectante entre CPV-2a/CPV-2c, cuando en la mayoría de los SNPs que las distinguen (marcadores) (Tabla 15, apartado 3.1.1), encontramos 2 variantes nucleotídicas correspondientes a CPV-2a y CPV-2c. Consideramos recombinantes a aquellas muestras en que se distinguiera claramente un patrón de recombinación, donde una porción del genoma correspondiera a la cepa CPV-2a o CPV-2c, y la porción restante a la cepa alternativa.

2.5.4 Reconstrucción de las secuencias consenso y alineamiento

Con la información de la frecuencia en cada posición genómica se construyeron las secuencias consenso para cada muestra. En las muestras identificadas como co-infectantes entre CPV-2a y CPV-2c se infirieron las secuencias, tanto de CPV-2a como de CPV-2c. Todas las secuencias obtenidas fueron alineadas utilizando el programa MEGA 6 (Tamura et al., 2013) mediante el método ClustalW (Anexo II).

2.5.5 Análisis de Recombinación

Mediante el software computacional RDP4 (Martin et al., 2015) realizamos un análisis de incongruencia filogenética. En estos análisis se generan arboles filogenéticos con distintas regiones genómicas, y se espera que las relaciones filogenéticas de muestras presuntamente recombinantes cambien de acuerdo a la región utilizada. Se incluyeron todas las secuencias obtenidas en este trabajo detalladas en el apartado 2.5.4, secuencias de referencia CPV-2a y CPV-2c obtenidas a partir de muestras de campo (CPV 250, CPV 72, CPV 243, CPV 386, CPV 261, CPV 317 y CPV 95) y la secuencia de referencia de CPV-2 (NC001539.1). Se construyó un árbol filogenético con secuencias desde la posición 1 a la 2490 y otro con secuencias desde la posición 2491 a la 4269. Además este programa también brinda la posibilidad de aplicar algoritmos de búsqueda de recombinantes que brindan información del punto donde se produjo el sitio de recombinación (*breakpoint*) y sobre las posibles secuencias parentales.

Luego, se utilizó el programa SplitsTree4 (Huson & Bryant, 2006) para inferir una red de recombinación a partir de todas las secuencias consenso utilizadas en el análisis previo. Estas redes permiten identificar secuencias que presenten relaciones ancestrales en conflicto producidas por evolución tipo no vertical, como podría ser un evento de recombinación. Además, se aplicó el "Phi test" que otorga soporte estadístico a los resultados obtenidos

mediante la asignación de un valor de probabilidad de existencia de secuencias recombinantes en un determinado *dataset*. Se consideran estadísticamente significativos valores de “Phi test” menores a 0.05 como evidencia de recombinación.

3 - RESULTADOS

3.1 Diseño, optimización y validación de la técnica

3.1.1 Obtención de cebadores variante específicos (CVE) para CPV-2a y CPV-2c

El alineamiento de las secuencias codificantes (cds) de 42 muestras de campo uruguayas permitió identificar 27 posiciones nucleotídicas marcadoras (SNPs), en las que consistentemente se diferencian los genomas de CPV-2a y CPV-2c que circulan en nuestro territorio (Tabla 15).

Tabla 15 - Posiciones nucleotídicas en la secuencia codificante (SNPs) en las que se diferencian CPV-2a y CPV-2c circulantes en Uruguay. Sombreados en verde aquellos SNPs que pertenecen al ORF NS y en naranja los que pertenecen

	81	342	516	1062	1098	1173	1542	1714	1875
CPV-2a	A	C	A	A	A	C	C	A	A
CPV-2c	G	T	G	G/A	G/A	T	T	G	G

	1975	2059	2063	2085	2086	2432	2550	2574	2817
CPV-2a	T	A	G	G	A	G	G	T	C
CPV-2c	C	G	A	A	G	A	A	A	T

	3246	3314	3345	3484	3485	3790	3792	3832	4266
CPV-2a	C	A	C	A	T	A	T	G	C
CPV-2c	T	T	T	T	A	G	A	A/G	T

Basados en estos SNPs se diseñaron 4 pares de CVE que presentan diferencias nucleotídicas en sus extremos 3' que les otorgan especificidad por CPV-2a o por CPV-2c (Figura 16, Tabla 16).



Figura 16 – Parte del alineamiento de las 42 secuencias de CPV-2 uruguayas. Se muestran las secuencias de referencia CPV2a-UY386.12 y CPV2c-UY261.10 (KM457123). Recuadrados en azul las secuencias de los 4 pares de CVE, dónde se aprecian los SNPs que diferencian las cepas y que posibilitan la amplificación diferencial. A y B hibridan sobre el ORF NS y C y D sobre el ORF VP.

Tabla 16 – CVE diseñados para la amplificación diferencial. Se detalla el nombre, secuencia nucleotídica, posición en el genoma, tamaño del amplicón obtenido y temperatura de disociación.

Cebador	Secuencia	Posición	Tamaño amplicón	Temperatura de disociación
F1697a	CGGAGCCTAAAATACAAA	1697 – 1714	410 pb	46.9°C
F1697c	CGGAGCCTAAAATACAAG	1697 – 1714		47.6°C
R2107a	AACACATACTTAGTTAAGTTATC	2085 – 2107		45.9°C
R2107c	AACACATACTTAGTTAAGTTACT	2085 – 2107		47.1°C
F3737a	TCAAATGGGAAATACAAACAT	3737 – 3758	816 pb	48.0°C
F3737c	TCAAATGGGAAATACAAACTA	3737 – 3758		47.2°C
R4563a	ACATAAAAACATAGTAAGTATGTTAG	4538 – 4563		47.4°C
R4563c	ACATAAAAACATAGTAAGTATGTTAA	4538 – 4563		47.0°C

Dos de estos (par 2a F1697a - R2107a y par 2c F1697c - R2107c), hibridan sobre el extremo 3' del genoma (izquierdo) y otros dos (par 2a F3737a – R4563a y par 2c F3737c – R4563c) hibridan sobre el extremo 5' (derecho), contemplando lo que sucede en ambas regiones del genoma (Figura 12, ver 2.1 Estrategia de Investigación).

3.1.2 Optimización de la PCR-CVE en el ORF VP (PCR-CVE-VP) y en el ORF NS (PCR-CVE-NS)

La reacción de PCR-CVE-VP fue optimizada utilizando los pares de cebadores diferenciales F3737a/R4563a y F3737c/R4563c y la reacción de PCR-CVE-NS utilizando los pares de cebadores diferenciales F1697a/R2107a y F1697c/R2107c (Tabla 16, apartado 3.1.1).

La cantidad de DNA molde óptima fue 5-20 ng en ambas reacciones.

Se ajustaron los parámetros de ciclado y se determinó que la temperatura de hibridación óptima para ambas reacciones es a 56°C.

Se logró optimizar la reacción de PCR-CVE-VP y PCR-CVE-NS por obtención de amplificación diferencial (Figura 17 y Figura 18).

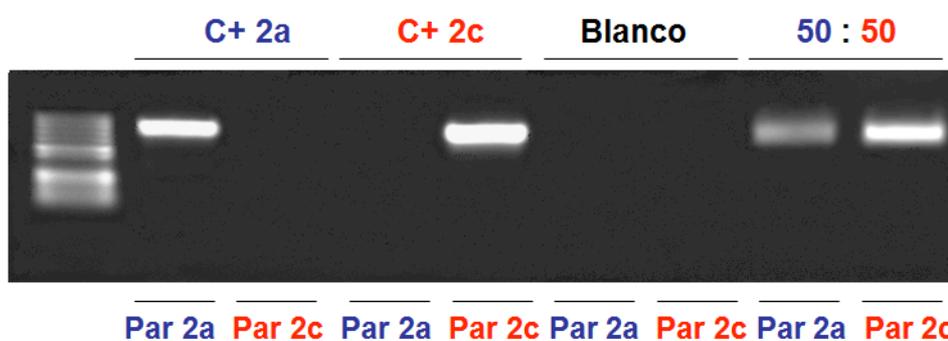


Figura 17 - Optimización de la reacción de PCR-CVE-VP. En azul CVE para 2a y en rojo CVE para 2c. Carril 1: Marcador de peso molecular (*Low range* Fermentas). Carriles 2 y 3: Clon CPV-2a. Carriles 4 y 5: Clon CPV-2c. Carriles 6 y 7: Blanco. Carriles 8 y 9: Mezcla CPV-2a/CPV-2c 50:50. Gel de agarosa al 1%. Tinción con bromuro de etidio.

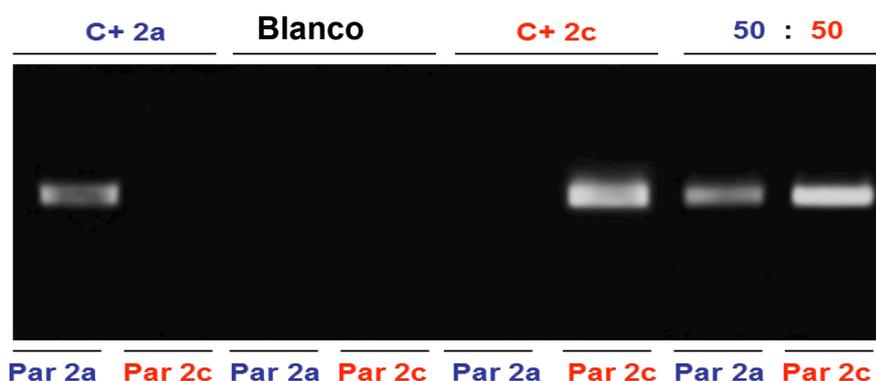


Figura 18 - Optimización de la reacción de PCR-CVE-NS. En azul CVE para 2a y en rojo CVE para 2c. Carriles 1 y 2: Clon CPV-2a. Carriles 3 y 4: Blanco. Carriles 5 y 6: Clon CPV-2c. Carriles 7 y 8: Mezcla CPV-2a/CPV-2c 50:50. Gel de agarosa al 1%. Tinción con bromuro de etidio.

3.1.3 Validación de la técnica mediante ensayo de RFLP

Los amplicones obtenidos por PCR-CVE-VP sobre los clones de referencia y la mezcla CPV-2a/CPV-2c 50:50 fueron caracterizados por RFLP. Se observan dos patrones de bandeo: uno característico de los amplicones CPV-2a (2 fragmentos de 328 pb y 488 pb), y otro de los amplicones CPV-2c (3 fragmentos de 328 pb, 56 pb y 432pb) (Figura 19). En las digestiones de los amplicones CPV-2a/CPV-2c 50:50 observamos los patrones de bandeo esperados según los cebadores con los que fueron amplificados, verificando así que la amplificación por PCR-CVE-VP fue diferencial.

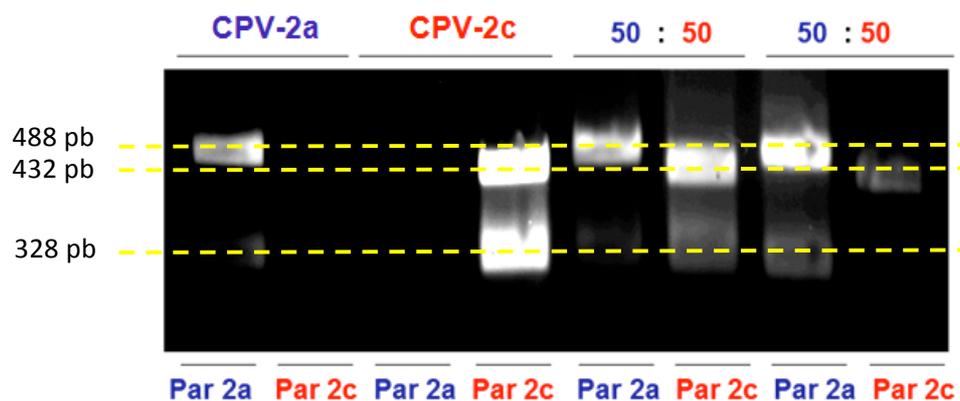


Figura 19 – Productos de digestión con enzima MbolI. Se indica el origen del amplicón (arriba) y los cebadores con los que fueron obtenidos en la PCR-CVE-VP (abajo): en azul CVE CPV-2a y en rojo CVE CPV-2c. Carriles 1 y 2: Productos de digestión obtenidos del amplicón diferencial del clon CPV-2a. Carriles 3 y 4: Productos de digestión obtenidos del amplicón diferencial del clon CPV-2c. Carriles 5, 6, 7 y 8: Productos de digestión obtenidos del amplicón diferencial de la mezcla CPV-2a/CPV-2c 50:50. Nótese que el fragmento de 56 pb no es visualizado. Gel de agarosa al 1%. Tinción con bromuro de etidio.

3.1.4 Validación de la técnica mediante secuenciación automática

Para validar la técnica se secuenciaron de forma automática los amplicones obtenidos mediante PCR-CVE-VP y mediante PCR-CVE-NS obtenidos a partir de la mezcla CPV-2a/CPV-2c 50:50. Las secuencias se alinearon con genomas de referencia, se confirmó la identidad de los amplicones en base a los 27 SNPs que distinguen CPV-2a y CPV-2c (Figura 20 y Figura 21) y se confirmó la validez de la técnica.

1. CPV2a-UY243.10	AGATCCAATTGGAGGTAAAGCAGGAATTAACTATACTAATA:
2. CPV-2a 50:50 CPV-2c VP2a_F3737a_FP	AGATCCAATTGGAGGTAAAGCAGGAATTAACTATACTAATA:
3. CPV-2a 50:50 CPV-2c VP2a_R4563a_FP	AGATCCAATTGGAGGTAAAGCAGGAATTAACTATACTAATA:
4. CPV2c-UY95.07	AGATCCAATTGGAGGTAAAGCAGGAATTAACTATACTAATA:
5. CPV-2a 50:50 CPV-2c VP2c_F3737c_FP	AGATCCAATTGGAGGTAAAGCAGGAATTAACTATACTAATA:
6. CPV-2a 50:50 CPV-2c VP2c_R4563c_FP	AGATCCAATTGGAGGTAAAGCAGGAATTAACTATACTAATA:

Figura 20 - Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los genomas de referencia CPV-2a (CPV2a-UY243.10) y CPV-2c (CPV2c-UY95.07) y de amplicones CPV-2a/CPV-2c 50:50 obtenidos por PCR-CVE-VP. El recuadro marca uno de los SNPs que distinguen CPV-2a y CPV-2c utilizado para confirmar la identidad de los amplicones.

1. CPV2a-UY243.10	TGCAGAAACTGC AAAATCAATCAAACCAACTTGGCGTTA
2. CPV-2a 50:50 CPV-2c Ns2a_F1697a_FP	TGCAGAAACTGC AAAATCAATCAAACCAACTTGGCGTTA
3. CPV-2a 50:50 CPV-2c Ns2a_R2107a_FP	TGCAGAAACTGC AAAATCAATCAAACCAACTTGGCGTTA
4. CPV2c-UY95.07	TGCAGAAACTGC AAAATCAATCAAACCAACTTGGCGTTA
5. CPV-2a 50:50 CPV-2c Ns2c_F1697c_FP	TGCAGAAACTGC AAAATCAATCAAACCAACTTGGCGTTA
6. CPV-2a 50:50 CPV-2c Ns2c_R2107c_FP	TGCAGAAACTGC AAAATCAATCAAACCAACTTGGCGTTA

Figura 21 - Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los genomas de referencia CPV-2a (CPV2a-UY243.10) y CPV-2c (CPV2c-UY95.07) y de amplicones CPV-2a/CPV-2c 50:50 obtenidos por PCR-CVE-NS. El recuadro marca uno de los SNPs que distinguen CPV-2a y CPV-2c utilizado para confirmar la identidad de los amplicones.

3.1.5 Determinación de la sensibilidad de la técnica

Se realizaron mezclas con los clones de referencia CPV-2a y CPV-2c en distintas proporciones (1:999, 1:499, 1:99, 5:95, 10:90, 50:50, 90:10, 95:5, 99:1, 499:1, 999:1). Se obtuvo amplificación incluso en mezclas de proporciones 1:999 y 999:1 (Figura 22).

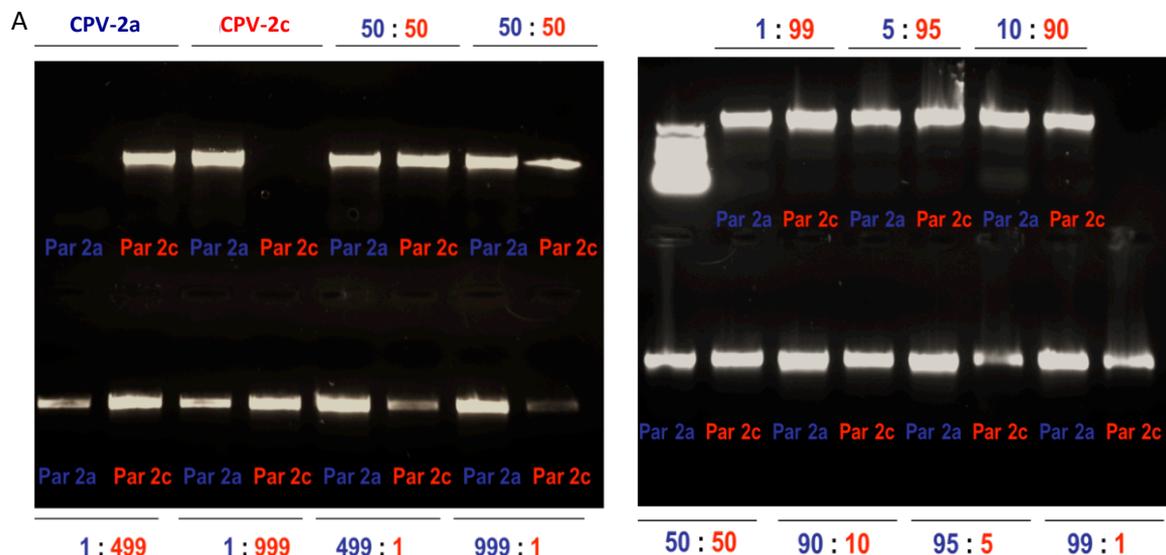


Figura 22 - Sensibilidad de la reacción. En azul CVE CPV-2a y en rojo CVE CPV-2c. A. Arriba: Carriles 1 y 2: Clon CPV-2a. Carriles 3 y 4: Clon CPV-2c. Carriles 5, 6, 7 y 8: Proporciones iguales (50:50) de CPV-2a y CPV-2c. Abajo: Carriles 1-8: Proporciones 1:499, 1:999, 499:1 y 999:1 de CPV-2a y CPV-2c, respectivamente. B. Arriba: Carril 1: Marcador de peso molecular (*Low range* Fermentas). Carriles 2-7: Proporciones 1:99, 5:99, 10:90 de CPV-2a y CPV-2c respectivamente. Abajo: Carriles 1-8: Proporciones 50:50, 90:10, 95:5 y 99:1 de CPV-2a y CPV-2c respectivamente. Gel de agarosa al 1%. Tinción con bromuro de etidio.

3.2 Relevamiento por PCR-CVE en muestras de campo

3.2.1 PCR-CVE sobre CPV 370

La primera prueba del sistema de PCR-CVE sobre aislamientos de campo se realizó sobre la muestra identificada previamente como co-infectante (CPV 370) (apartado 1.4.3). Se incluyeron los controles CPV-2a, CPV-2c y un blanco; el resultado mostró doble amplificación por PCR-CVE-VP y por PCR-CVE-NS (Figura 23 y Figura 24).

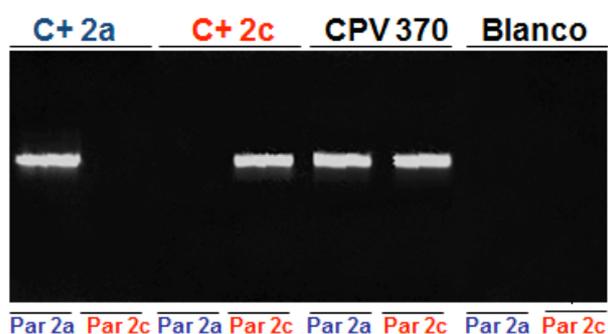


Figura 23 – Prueba PCR-CVE-VP sobre CPV 370. En azul CVE CPV-2a y en rojo CVE CPV-2c. Carriles 1 y 2: Clon CPV-2a. Carriles 3 y 4: Clon CPV-2c. Carriles 5 y 6: CPV 370. Carriles 7 y 8: Blanco. Gel de agarosa al 1%. Tinción con bromuro de etidio.

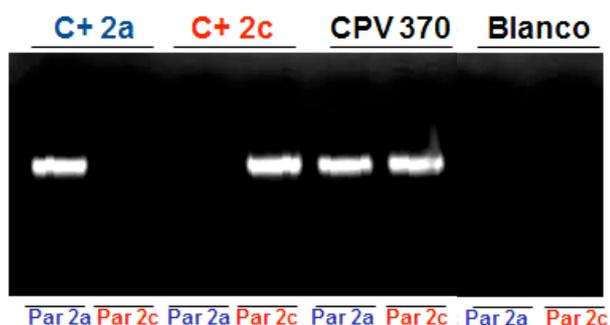


Figura 24 – Prueba PCR-CVE-NS sobre CPV 370. En azul CVE CPV-2a y en rojo CVE CPV-2c. Carriles 1 y 2: Clon CPV-2a. Carriles 3 y 4: Clon CPV-2c. Carriles 5 y 6: CPV 370. Carriles 7 y 8: Blanco. Gel de agarosa al 1%. Tinción con bromuro de etidio.

3.2.2 Relevamiento por PCR-CVE-VP

Se realizó un relevamiento por PCR-CVE-VP sobre todas las muestras biológicas. En la Figura 25 se muestra una electroforesis de una misma corrida de PCR que ejemplariza algunas situaciones: los controles positivos CPV-2a, CPV-2c, el mix CPV-2a/CPV-2c 50:50, el blanco y

muestras que amplificaron únicamente con los CVE 2a y una muestra que amplifica con ambos CVE 2a y 2c.

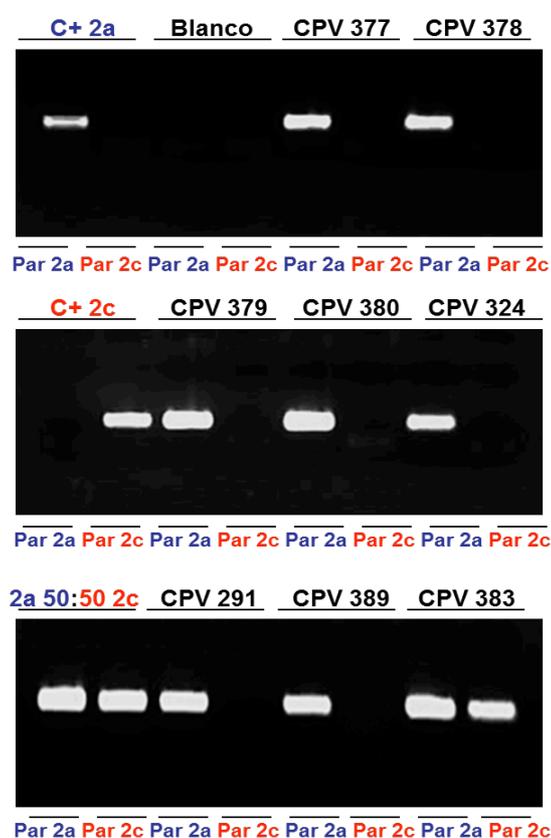


Figura 25 - Productos de PCR-CVE-VP. En azul CVE para CPV-2a y en rojo CVE para CPV-2c. Arriba - Carriles 1 y 2: Clon CPV-2a. Carriles 3 y 4: Blanco. Carriles 5 y 6: CPV 377. Carriles 7 y 8: CPV 378. Medio - Carriles 1 y 2: Clon CPV-2c. Carriles 3 y 4: CPV 379. Carriles 5 y 6: CPV 380. Carriles 7 y 8: CPV 324. Abajo: Carriles 1 y 2: CPV-2a/CPV-2c 50:50. Carriles 3 y 4: CPV 291. Carriles 5 y 6: CPV 389. Carriles 7 y 8: CPV 383. Todos los amplicones fueron obtenidos en una misma corrida de PCR. Gel de agarosa al 1%. Tinción con bromuro de etidio.

Los resultados indicaron que 147 muestras de las 214 analizadas exhibieron patrón de amplificación tipo CPV-2a, 60 muestras patrón de amplificación tipo CPV-2c, 5 muestras doble patrón de amplificación y en 2 muestras no se logró amplificación (Tabla 17).

Tabla 17 – Tabla de resultados del relevamiento por PCR-CVE-VP, discriminados por año y patrón de amplificación.

Cebadores VP	2010	2011	2012	2013	Total
Amplificación CPV-2a	21	56	37	33	147
Doble amplificación	0	1	3	1	5
Amplificación CPV-2c	35	11	13	1	60
Indeterminado	0	1	1	0	2
Total	56	69	54	35	214

3.2.3 Relevamiento por PCR-CVE-NS

Las mismas muestras biológicas fueron sometidas al relevamiento por PCR-CVE-NS. En la Figura 26 se muestra una electroforesis de una misma corrida de PCR que ejemplariza algunas situaciones: los controles positivos CPV-2a, CPV-2c, la mezcla CPV-2a/CPV-2c 50:50, el blanco y muestras que amplificaron únicamente con el par de CVE 2a y dos muestras que amplifican con ambos CVE 2a y 2c.

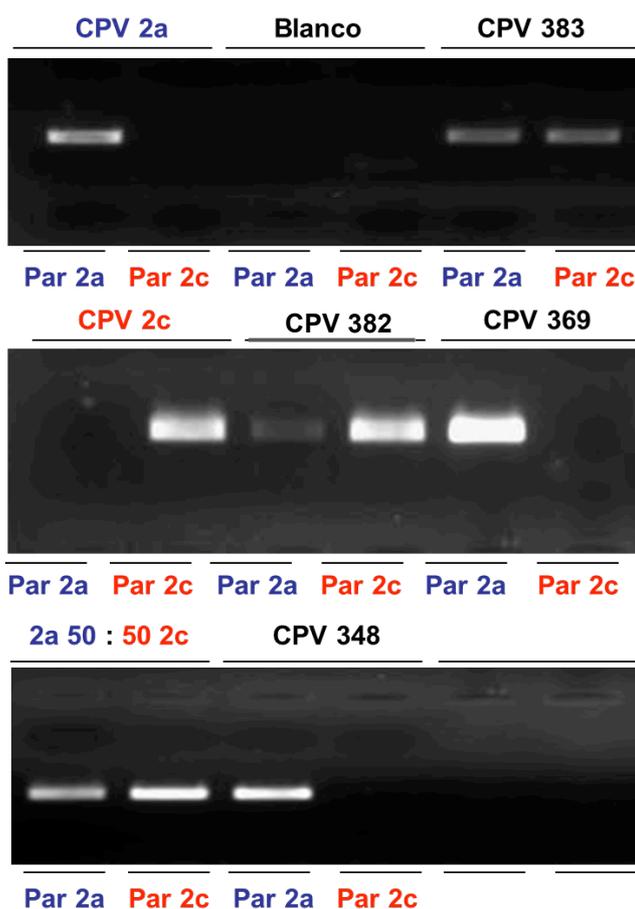


Figura 26 - Productos de PCR-CVE-NS. En azul CVE para CPV-2a y en rojo CVE para CPV-2c. Arriba - Carriles 1 y 2: Clon CPV-2a. Carriles 3 y 4: Blanco. Carriles 5 y 6: CPV 383. Medio - Carriles 1 y 2: Clon CPV-2c. Carriles 3 y 4: CPV 382. Carriles 5 y 6: CPV 369. Abajo: Carriles 1 y 2: CPV-2a/CPV-2c 50:50. Carriles 3 y 4: CPV 348. Todos los amplicones fueron obtenidos en una misma corrida de PCR. Gel de agarosa al 1%. Tinción con bromuro de etidio.

Los resultados de esta segunda ronda de relevamiento indicaron que 144 muestras de las 214 analizadas exhibieron patrón de amplificación tipo CPV-2a, 56 muestras patrón de amplificación tipo CPV-2c y 14 muestras doble patrón de amplificación (Tabla 18).

Tabla 18 – Tabla de resultados del relevamiento por PCR-CVE-NS, discriminados por año y patrón de amplificación.

Cebadores NS	2010	2011	2012	2013	Total
Amplificación CPV-2a	20	55	36	33	144
Doble amplificación	3	3	7	1	14
Amplificación CPV-2c	33	11	11	1	56
Indeterminado	0	0	0	0	0
Total	56	69	54	35	214

En la Tabla 19 se detallan los resultados obtenidos por PCR-CVE-VP y PCR-CVE-NS para todas las muestras analizadas. Además, se incluye el resultado de caracterización molecular por PCR-RFLP (Pérez et al., 2012) obtenido previamente en nuestro laboratorio en el marco de otro trabajo de investigación.

Tabla 19 – Tabla de resultados del relevamiento. Se incluye año, muestras, resultado de la caracterización PCR-RFLP, resultado del relevamiento por PCR-CVE-VP y resultado del relevamiento por PCR-CVE-NS. En naranja se resaltan las que presentaron doble patrón de bandeo por PCR-CVE-VP y en celeste las que presentaron doble patrón de bandeo por PCR-CVE-NS.

Año	Muestra	PCR-RFLP	PCR-CVE-VP	PCR-CVE-NS
2010	CPV 227–CPV242, CPV 248, CPV 254–CPV 258, CPV 261–CPV 267, CPV 269, CPV 271, CPV 275–CPV 277, CPV 283–CPV 285, CPV 287–CPV 288	CPV-2c	CPV-2c	CPV-2c
	CPV 242–CPV 246, CPV 250–CPV 253, CPV 259, CPV 268, CPV 270, CPV 272, CPV 279–CPV 282, CPV 286, CPV 289, CPV 291	CPV-2c	CPV-2c	CPV-2c
	CPV 247	CPV-2c	CPV-2c	CPV-2a y CPV-2c
	CPV 260	CPV-2c	CPV-2c	CPV-2a y CPV-2c
	CPV 290	CPV-2a	CPV-2a	CPV-2a y CPV-2c
2011	CPV 293–CPV298, CPV 301, CPV 303–CPV 306, CPV 308–CPV 315, CPV 319–CPV 324, CPV 327–CPV 345, CPV 348, CPV 350–CPV 353, CPV 357–CPV 367, CPV 369, CPV 371–CPV 374, CPV 376	CPV-2a	CPV-2a	CPV-2a
	CPV 300, CPV 302, CPV 307, CPV 316–CPV 318, CPV 326, CPV 346, CPV 349, CPV 354, CPV 368, CPV 375	CPV-2c	CPV-2c	CPV-2c
	CPV 347	CPV-2a	-	CPV-2a y CPV-2c
	CPV 370	Co-infectante	CPV-2a y CPV-2c	CPV-2a y CPV-2c
2012	CPV 377–CPV 381, CPV 384–CPV 388, CPV 390, CPV 392–CPV 404, CPV 406, CPV 412–CPV 414, CPV 417–CPV 422, CPV 424–425, CPV 427–CPV 428, CPV 432–CPV 435, CPV 441	CPV-2a	CPV-2a	CPV-2a
	CPV 391, CPV 408, CPV 416, CPV 423, CPV 430–CPV 431, CPV 438–CPV 440	CPV-2c	CPV-2c	CPV-2c
	CPV 382	CPV-2c	CPV-2c	CPV-2a y CPV-2c
	CPV 383	CPV-2a	CPV-2a y CPV-2c	CPV-2a y CPV-2c
	CPV 389	CPV-2a	CPV-2a	CPV-2a y CPV-2c
	CPV 405	CPV-2c	-	CPV-2a y CPV-2c
	CPV 407	CPV-2c	CPV-2a y CPV-2c	CPV-2c
	CPV 409	CPV-2c	CPV-2c	CPV-2a y CPV-2c
	CPV 410	CPV-2c	CPV-2c	CPV-2a y CPV-2c
CPV 426	CPV-2c	CPV-2a y CPV-2c	CPV-2c	
CPV 437	CPV-2c	CPV-2c	CPV-2a y CPV-2c	
2013	CPV 442, CPV 444–CPV 452, CPV 454–CPV 465, CPV 468–CPV 479	CPV-2a	CPV-2a	CPV-2a
	CPV 467	CPV-2c	CPV-2c	CPV-2c
	CPV 443	CPV-2a	CPV-2a	CPV-2a y CPV-2c
	CPV 453	CPV-2a	CPV-2a y CPV-2c	CPV-2a

Todas las muestras que exhibieron patrón doble de amplificación por PCR-CVE-VP y/o PCR-CVE-NS fueron seleccionadas como presuntas co-infectantes y/o recombinantes. En la Tabla 20 se resumen los patrones de bandeo para todas ellas.

Tabla 20 – Se resumen los patrones de amplificación para las muestras que presentaron amplificación doble por PCR-CVE-VP y/o PCR-CVE-NS.

Muestra	PCR-CVE-VP	CPV-CVE-NS
CPV 247	CPV-2c	CPV-2a y CPV-2c
CPV 260	CPV-2c	CPV-2a y CPV-2c
CPV 290	CPV-2	CPV-2a y CPV-2c
CPV 347	-	CPV-2a y CPV-2c
CPV 370	CPV-2a y CPV-2c	CPV-2a y CPV-2c
CPV 382	CPV-2c	CPV-2a y CPV-2c
CPV 383	CPV-2a y CPV-2c	CPV-2a y CPV-2c
CPV 389	CPV-2a	CPV-2a y CPV-2c
CPV 405	-	CPV-2a y CPV-2c
CPV 407	CPV-2a y CPV-2c	CPV-2c
CPV 409	CPV-2c	CPV-2a y CPV-2c
CPV 410	CPV-2c	CPV-2a y CPV-2c
CPV 426	CPV-2a y CPV-2c	CPV-2c
CPV 437	CPV-2c	CPV-2a y CPV-2c
CPV 443	CPV-2a	CPV-2a y CPV-2c
CPV 453	CPV-2a y CPV-2c	CPV-2a

3.3 Secuenciación Profunda (NGS)

En función de los patrones de amplificación observados para las 214 muestras analizadas (detallados en Tabla 19), se seleccionaron 15 muestras que mostraron doble amplificación en alguno de los ORFs estudiados (Tabla 20), para ser analizadas por secuenciación profunda.

3.3.1 Amplificación de los genomas completos de muestras presuntamente co-infectantes y/o recombinantes

Se realizó una re-extracción o purificación del DNA de las 15 muestras seleccionadas. Se amplificaron los genomas completos en dos fragmentos solapantes de 2255 pb y 2663 pb (NS y VP respectivamente). Se obtuvieron 30 amplicones, incluidos los de las muestras CPV 347 y CPV 405, que no habían podido ser amplificadas con los CVE del ORF VP. Los productos de PCR obtenidos se purificaron y se cuantificaron (Figura 27 y Figura 28).

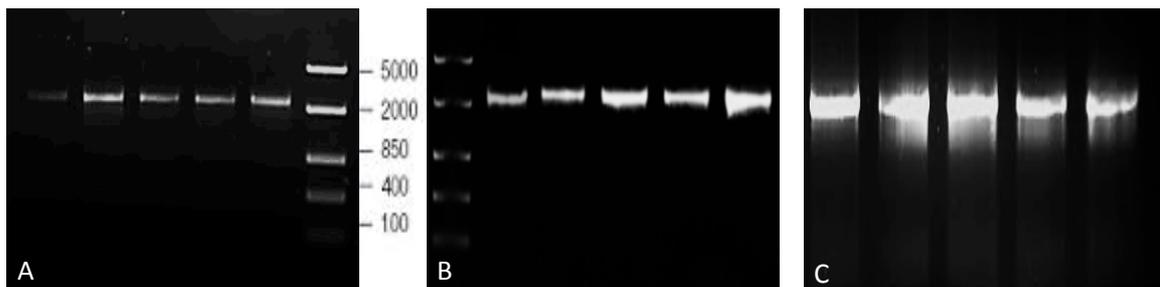


Figura 27 - Fragmento NS (2255 pb) purificado para cada muestra seleccionada. A – Carril 1: CPV 347. Carril 2: CPV 383. Carril 3: CPV 405. Carril 4: CPV 443. Carril 5: CPV 453. Carril 6: Marcador de peso molecular *Fast Ruler Middle Range DNA ladder* Life Technologies. B – Carril 1: Marcador de peso molecular *Fast Ruler Middle Range DNA ladder* Life Technologies. Carril 2: CPV 290. Carril 3: CPV 409. Carril 4: CPV 382. Carril 5: CPV 389. Carril 6: CPV 426. C – Carril 1: CPV 407. Carril 2: CPV 410. Carril 3: CPV 247. Carril 4: CPV 260. Carril 5: CPV 437. Tinción con bromuro de etidio.

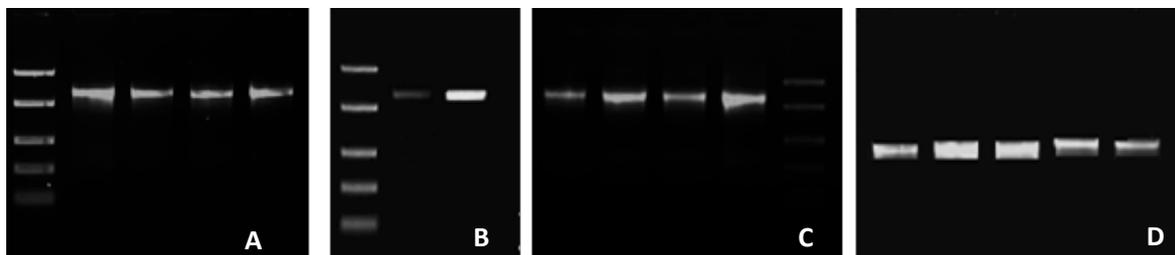


Figura 28 - Fragmento VP (2663 pb) purificado para cada muestra seleccionada. A – Carril 1: Marcador de peso molecular *Fast Ruler Middle Range DNA ladder* Life Technologies. Carril 2: CPV 453. Carril 3: CPV 443. Carril 4: CPV 405. Carril 5: CPV 4383. B – Carril 1: Marcador de peso molecular *Fast Ruler Middle Range DNA ladder* Life Technologies. Carril 2: CPV 347. Carril 3: CPV 290. C - Carril 1: CPV 409. Carril 2: CPV 382. Carril 3: CPV 389. Carril 4: CPV 426. Carril 5 - Marcador de peso molecular *Fast Ruler Middle Range DNA ladder* Life Technologies. D – Carril 1: CPV 247. Carril 2: CPV 260. Carril 3: CPV 437. Carril 4: CPV 407. Carril 5: CPV 410. Tinción con bromuro de etidio.

3.3.2 Secuenciación profunda por tecnología MiSeq (Illumina) de las muestras seleccionadas

Un total de 30 amplicones purificados, correspondientes a las 15 muestras seleccionadas fueron cuantificados mediante *PicoGreen* (Tabla 21), fragmentados y nuevamente purificados mediante cuentas magnéticas (*beads*). Luego se aplicaron protocolos de secuenciación profunda.

Tabla 21 - Valores de cuantificación de DNA (ng/ μ L) por PicoGreen para cada uno de los fragmentos NS y VP.

Muestra	NS	VP
CPV 247	66,6	71,1
CPV 260	42,9	68,8
CPV 290	54,6	55,5
CPV 347	3,0	15,6
CPV 382	63,3	60,1
CPV 383	18,3	51,3
CPV 389	53,2	45,3
CPV 405	9,3	60,6
CPV 407	57,3	67,3
CPV 409	45,5	35,3
CPV 410	49,8	58,5
CPV 426	64,8	70,9
CPV 437	64,0	59,7
CPV 443	12,2	93,0
CPV 453	14,6	73,5

3.3.3 Análisis de las secuencias obtenidas

Las secuencias obtenidas para las 15 muestras superaron el control de calidad inicial de la herramienta fastq-mcf. Todas ellas fueron analizadas con el *pipeline* computacional ViVan (Isakov et al., 2015), y a partir de éste se obtuvieron datos de cantidad de bases secuenciadas, cobertura y posición de los nucleótidos secuenciados (Tabla 22) (Anexo I).

Tabla 22 – Detalle del número total de bases secuenciadas, cobertura promedio y nucleótidos secuenciados discriminados por muestra.

Muestra	Bases secuenciadas	Cobertura Promedio	Nucleótidos secuenciados (posición cds)
CPV 247	199.986.849	51810	1 – 4269
CPV 260	308.161.894	72186	1 – 4269
CPV 290	266.963.709	62535	1 – 4269
CPV 347	158.924.925	37228	1 – 4269
CPV 382	297.739.069	69744	1 – 4269
CPV 383	287.105.345	67254	1 – 4269
CPV 389	487.400.704	115007	1 – 4259
CPV 405	284.439.772	66629	1 – 4269
CPV 407	115.251	27	1 – 4269
CPV 409	52.129.030	32743	2678 – 4269
CPV 410	151.126.334	35576	1 – 4269
CPV 426	180.452.565	42270	1 – 4269
CPV 437	3.973.342	931	1 – 4269
CPV 443	13.135.240	3077	1 – 4269
CPV 453	310.079.791	72635	1 – 4269

Para 11 de las 15 muestras se obtuvieron valores en el orden de 10^8 bases secuenciadas. Para las 4 muestras restantes se obtuvieron valores en el orden de 10^7 , 10^6 y 10^5 bases secuenciadas. No se obtuvieron datos de secuenciación profunda para el amplicón NS de la muestra CPV 409.

3.3.4 Caracterización de la composición genética de las muestras a partir de los datos obtenidos del programa ViVan

Para cada muestra analizada se construyeron tablas indicando para cada uno de los 27 SNPs que diferencian CPV-2a y CPV-2c, la frecuencia de cada nucleótido y la cobertura (Tabla 23 a Tabla 38). Los datos para todas las posiciones genómicas se encuentran en el Anexo I.

3.3.4.1 Análisis de la muestra biológica CPV 247

Para esta muestra se secuenciaron aproximadamente 2.00×10^8 bases con una cobertura promedio de 51810 *reads* por nucleótido secuenciado (Tabla 22).

Tabla 23 – Perfil de secuenciación profunda de la muestra CPV 247. Se indican las frecuencias obtenidas para cada nucleótido en aquellas posiciones donde se distinguen CPV-2a de CPV-2c, los nucleótidos de referencia (rosa para CPV-2a y celeste para CPV-2c) y la cobertura.

Posición	2a	2c	Frecuencia				Cobertura
			A	T	C	G	
81	A	G	-	-	-	99,6	139530
342	C	T	-	98,5	-	-	42978
516	A	G	-	-	-	99,8	57421
1062	A	G/A	-	-	-	99,6	75316
1098	A	G/A	98,7	-	-	-	62934
1173	C	T	-	98,7	-	-	55567
1542	C	T	-	98,6	-	-	49918
1714	A	G	-	-	-	99,8	67254
1875	A	G	-	-	-	99,8	60072
1975	T	C	-	-	99,8	-	138921
2059	A	G	-	-	-	99,5	157592
2063	G	A	96,3	-	-	-	114766
2085	G	A	99,0	-	-	-	149062
2086	A	G	-	-	-	99,6	179907
2432	G	A	99,1	-	-	-	13512
2550	G	A	96,7	-	-	-	8007
2574	T	A	97,5	-	-	-	9185
2817	C	T	-	99,0	-	-	29659
3246	C	T	-	98,6	-	-	33541
3314	A	T	-	91,9	-	-	41570
3345	C	T	-	98,2	-	-	35737
3484	A	T	-	96,5	-	-	25085
3485	T	A	97,8	-	-	-	27316
3790	A	G	-	-	-	99,8	30406
3792	T	A	98,9	-	-	-	27735
3832	G	A/G	98,4	-	-	-	22420
4266	C	T	-	96,8	-	-	895

En las 27 posiciones nucleotídicas en que se diferencian CPV-2a de CPV-2c, encontramos un único nucleótido, característico de CPV-2c. Este perfil indica la presencia de la cepa CPV-2c en la muestra.

3.3.4.2 Análisis de la muestra biológica CPV 260

Para esta muestra se secuenciaron aproximadamente 3.08×10^8 bases con una cobertura promedio de 72186 *reads* por nucleótido secuenciado (Tabla 22).

Tabla 24 – Perfil de secuenciación profunda de la muestra CPV 260. Se indican las frecuencias obtenidas para cada nucleótido en las posiciones donde se distinguen CPV-2a de CPV-2c, los nucleótidos de referencia (rosa para CPV-2a y celeste para CPV-2c) y la cobertura.

Posición	2a	2c	Frecuencia				Cobertura
			A	T	C	G	
81	A	G	-	-	-	99,7	188093
342	C	T	-	98,6	-	-	66343
516	A	G	-	-	-	99,8	85390
1062	A	G/A	-	-	-	99,9	123684
1098	A	G/A	-	-	-	99,9	133210
1173	C	T	-	98,6	-	-	83580
1542	C	T	-	98,6	-	-	73603
1714	A	G	-	-	-	99,8	96705
1875	A	G	-	-	-	99,9	84092
1975	T	C	-	-	99,9	-	220166
2059	A	G	-	-	-	99,5	271714
2063	G	A	96,3	-	-	-	196271
2085	G	A	98,9	-	-	-	239706
2086	A	G	-	-	-	99,7	283538
2432	G	A	99,0	-	-	-	17722
2550	G	A	96,7	-	-	-	10192
2574	T	A	97,5	-	-	-	11265
2817	C	T	-	99,1	-	-	40291
3246	C	T	-	98,7	-	-	43432
3314	A	T	-	92,5	-	-	52503
3345	C	T	-	98,3	-	-	45428
3484	A	T	-	96,6	-	-	33031
3485	T	A	97,6	-	-	-	36209
3790	A	G	-	-	-	99,8	45141
3792	T	A	98,9	-	-	-	41095
3832	G	A/G	98,4	-	-	-	35069
4266	C	T	-	96,0	-	-	1241

En las 27 posiciones nucleotídicas en que se diferencian CPV-2a de CPV-2c, encontramos un único nucleótido, característico de CPV-2c. Este perfil indica la presencia de la cepa CPV-2c en la muestra.

3.3.4.3 Análisis de la muestra biológica CPV 290

Para esta muestra se secuenciaron aproximadamente 2.67×10^8 bases con una cobertura promedio de 62535 *reads* por nucleótido secuenciado (Tabla 22).

Tabla 25 – Perfil de secuenciación profunda de la muestra CPV 290. Se indican las frecuencias obtenidas para cada nucleótido en aquellas posiciones donde se distinguen CPV-2a de CPV-2c, los nucleótidos de referencia (rosa para CPV-2a y celeste para CPV-2c) y la cobertura.

Posición	2a	2c	Frecuencia (%)				Cobertura
			A	T	C	G	
81	A	G	90,6	-	-	8,3	131257
342	C	T	-	5,8	94,1	-	66870
516	A	G	91,5	-	-	7,7	67018
1062	A	G/A	91,1	-	-	7,9	84636
1098	A	G/A	91,0	-	-	7,9	92932
1173	C	T	-	5,1	94,7	-	97128
1542	C	T	-	4,9	95,0	-	87927
1714	A	G	91,8	-	-	7,3	74477
1875	A	G	88,6	-	-	9,9	47122
1975	T	C	-	88,6	9,0	-	109507
2059	A	G	88,7	-	-	9,7	91228
2063	G	A	5,2	-	-	94,6	118581
2085	G	A	6,3	-	-	93,6	120733
2086	A	G	91,7	-	-	7,8	118181
2432	G	A	7,9	-	-	91,2	15592
2550	G	A	4,6	-	-	95,4	20064
2574	T	A	6,7	93,1	-	-	14209
2817	C	T	-	7,5	92,1	-	38049
3246	C	T	-	4,4	95,5	-	66791
3314	A	T	93,2	6,3	-	-	59152
3345	C	T	-	4,6	95,3	-	67549
3484	A	T	94,6	5,3	-	-	51661
3485	T	A	5,3	94,5	-	-	50280
3790	A	G	93,5	-	-	5,5	50977
3792	T	A	8,9	90,9	-	-	42991
3832	G	A/G	4,8	-	-	95,1	49572
4266	C	T	-	-	99,8	-	36817

En 26 de las 27 posiciones nucleotídicas en que se diferencian CPV-2a de CPV-2c, encontramos dos nucleótidos, característicos de CPV-2a y CPV-2c. Este perfil indica la presencia de las cepas CPV-2a y CPV-2c en la muestra. CPV-2c se encuentra en 93% en promedio mientras que CPV-2a en 7% en promedio. En la posición 4266 encontramos un único nucleótido (C en un 99.8%).

3.3.4.4 Análisis de la muestra biológica CPV 347

Para esta muestra se secuenciaron aproximadamente 1.59×10^8 bases con una cobertura promedio de 37228 *reads* por nucleótido secuenciado (Tabla 22).

Tabla 26 – Perfil de secuenciación profunda de la muestra CPV 347. Se indican las frecuencias obtenidas para cada nucleótido en aquellas posiciones donde se distinguen CPV-2a de CPV-2c, los nucleótidos de referencia (rosa para CPV-2a y celeste para CPV-2c) y la cobertura.

Posición	2a	2c	Frecuencia				Cobertura
			A	T	C	G	
81	A	G	-	-	-	99,1	74907
342	C	T	-	97,8	-	-	27025
516	A	G	-	-	-	99,1	31114
1062	A	G/A	-	-	-	99,1	28712
1098	A	G/A	-	-	-	99,1	30756
1173	C	T	-	97,9	-	-	20785
1542	C	T	-	97,4	-	-	23654
1714	A	G	-	-	-	99,1	31073
1875	A	G	-	-	-	99,3	26441
1975	T	C	-	-	98,4	-	131566
2059	A	G	-	-	-	98,9	62916
2063	G	A	94,4	3,1	-	-	43097
2085	G	A	98,2	-	-	-	56243
2086	A	G	-	-	-	99,1	67655
2432	G	A	98,5	-	-	-	17597
2550	G	A	95,9	-	-	-	10415
2574	T	A	97,0	-	-	-	11873
2817	C	T	-	98,5	-	-	37265
3246	C	T	-	98,1	-	-	38730
3314	A	T	-	90,1	-	-	45401
3345	C	T	-	97,5	-	-	37040
3484	A	T	3,3	96,3	-	-	29730
3485	T	A	97,2	-	-	-	32856
3790	A	G	-	-	-	99,4	46778
3792	T	A	98,4	-	-	-	43006
3832	G	A/G	97,9	-	-	-	40673
4266	C	T	-	64,3	33,9	-	2038

En 24 de las 27 posiciones nucleotídicas en que se distinguen CPV-2a de CPV-2c, encontramos un único nucleótido, característico de CPV-2c. Este perfil indica la presencia de la cepa CPV-2c en la muestra. Encontramos dos nucleótidos en las posiciones 2063 (A en un 94.4% y T en un 3.1%), 3484 (T en un 96.3% y A en un 3.3%) y 4266 (T en un 64.3% y C en un 33.9%).

3.3.4.5 Análisis de la muestra biológica CPV 382

Para esta muestra se secuenciaron aproximadamente 2.98×10^8 bases con una cobertura promedio de 69744 *reads* por nucleótido secuenciado (Tabla 22).

Tabla 27 – Perfil de secuenciación profunda de la muestra CPV 382. Se indican las frecuencias obtenidas para cada nucleótido en aquellas posiciones donde se distinguen CPV-2a de CPV-2c, los nucleótidos de referencia (rosa para CPV-2a y celeste para CPV-2c) y la cobertura.

Posición	2a	2c	Frecuencia				Cobertura
			A	T	C	G	
81	A	G	-	-	-	99,5	168083
342	C	T	-	98,5	-	-	58995
516	A	G	-	-	-	99,7	74596
1062	A	G/A	98,4	-	-	-	92359
1098	A	G/A	98,3	-	-	-	101426
1173	C	T	-	98,7	-	-	82180
1542	C	T	-	98,4	-	-	70576
1714	A	G	-	-	-	99,8	91431
1875	A	G	-	-	-	99,8	77541
1975	T	C	-	-	99,8	-	198798
2059	A	G	-	-	-	99,4	227354
2063	G	A	96,4	-	-	-	164860
2085	G	A	98,9	-	-	-	200952
2086	A	G	-	-	-	99,6	238853
2432	G	A	99,0	-	-	-	23307
2550	G	A	96,6	-	-	-	12739
2574	T	A	97,0	-	-	-	14033
2817	C	T	-	98,9	-	-	46091
3246	C	T	-	98,5	-	-	50964
3314	A	T	-	91,6	-	-	63661
3345	C	T	-	98,0	-	-	53989
3484	A	T	3,1	96,4	-	-	38766
3485	T	A	97,6	-	-	-	42760
3790	A	G	-	-	-	99,7	50047
3792	T	A	98,8	-	-	-	45598
3832	G	A/G	98,3	-	-	-	37584
4266	C	T	-	89,6	7,8	-	1332

En 25 de las 27 posiciones nucleotídicas en que se diferencian CPV-2a de CPV-2c, encontramos un único nucleótido, característico de CPV-2c. Este perfil indica la presencia de la cepa CPV-2c en la muestra. Encontramos dos nucleótidos en las posiciones 3484 (T en un 96.4% y A en un 3.1%) y 4266 (T en un 89.6% y C en un 7.8%).

3.3.4.6 Análisis de la muestra biológica CPV 383

Para esta muestra se secuenciaron aproximadamente 2.87×10^8 bases con una cobertura promedio de 67254 *reads* por nucleótido secuenciado (Tabla 22).

Tabla 28 – Perfil de secuenciación profunda de la muestra CPV 383. Se indican las frecuencias obtenidas para cada nucleótido en aquellas posiciones donde se distinguen CPV-2a de CPV-2c, los nucleótidos de referencia (rosa para CPV-2a y celeste para CPV-2c) y la cobertura.

Posición	2a	2c	Frecuencia				Cobertura
			A	T	C	G	
81	A	G	93,7	-	-	5,1	143162
342	C	T	-	3,7	96,2	-	62609
516	A	G	94,0	-	-	5,2	67442
1062	A	G/A	93,8	-	-	5,0	65704
1098	A	G/A	93,9	-	-	5,0	70818
1173	C	T	-	3,0	96,8	-	75922
1542	C	T	-	3,1	96,8	-	81515
1714	A	G	94,5	-	-	4,6	68428
1875	A	G	93,0	-	-	5,8	42671
1975	T	C	-	91,5	5,9	-	166169
2059	A	G	92,0	-	-	6,5	168030
2063	G	A	3,4	-	-	96,4	221101
2085	G	A	4,4	-	-	95,6	226352
2086	A	G	93,9	-	-	5,5	214943
2432	G	A	5,3	-	-	93,8	24640
2550	G	A	2,3*	-	-	97,7	28598
2574	T	A	4,7	95,1	-	-	19757
2817	C	T	-	4,7	94,9	-	40018
3246	C	T	-	2,9*	97,1	-	68422
3314	A	T	95,4	4,3	-	-	62035
3345	C	T	-	3,0*	96,8	-	69853
3484	A	T	95,7	4,2	-	-	55393
3485	T	A	4,1	95,7	-	-	54080
3790	A	G	95,4	-	-	3,6	56216
3792	T	A	7,0	92,9	-	-	47309
3832	G	A/G	2,9*	-	-	97,1	55245
4266	C	T	-	-	99,8	-	45806

En 26 de las 27 posiciones nucleotídicas en que se diferencian CPV-2a de CPV-2c, encontramos dos nucleótidos, característicos de CPV-2a y CPV-2c. Vale aclarar que para este caso se incluyen algunos valores de frecuencias inferiores a 3% (*) para demostrar que se encuentra el nucleótido característico de CPV-2c. Este perfil indica la presencia de las cepas CPV-2a y CPV-2c en la muestra. CPV-2a se encuentra en un 95% en promedio, mientras que CPV-2c en un 5%. Encontramos un único nucleótido en la posición 4266 (C en un 99.8%).

3.3.4.7 Análisis de la muestra biológica CPV 389

Para esta muestra se secuenciaron aproximadamente 4.87×10^8 bases con una cobertura promedio de 115007 *reads* por nucleótido secuenciado (Tabla 22).

Tabla 29 – Perfil de secuenciación profunda de la muestra CPV 389. Se indican las frecuencias obtenidas para cada nucleótido en aquellas posiciones donde se distinguen CPV-2a de CPV-2c, los nucleótidos de referencia (rosa para CPV-2a y celeste para CPV-2c) y la cobertura.

Posición	2a	2c	Frecuencia				Cobertura
			A	T	C	G	
81	A	G	98,4	-	-	-	164108
342	C	T	-	-	99,4	-	124244
516	A	G	98,8	-	-	-	130991
1062	A	G/A	98,8	-	-	-	150457
1098	A	G/A	98,7	-	-	-	169719
1173	C	T	-	-	99,7	-	198186
1542	C	T	-	-	99,8	-	194842
1714	A	G	98,9	-	-	-	166014
1875	A	G	97,7	-	-	-	107122
1975	T	C	-	97,3	-	-	167251
2059	A	G	98,0	-	-	-	110251
2063	G	A	-	-	-	99,8	146390
2085	G	A	-	-	-	99,8	141724
2086	A	G	99,2	-	-	-	136004
2432	G	A	-	-	-	99,1	30240
2550	G	A	-	-	-	99,9	43432
2574	T	A	-	98,3	-	-	29929
2817	C	T	-	-	99,5	-	74499
3246	C	T	-	-	99,9	-	130314
3314	A	T	99,0	-	-	-	113108
3345	C	T	-	-	99,8	-	131365
3484	A	T	98,4	-	-	-	122161
3485	T	A	-	98,8	-	-	146699
3790	A	G	98,9	-	-	-	98336
3792	T	A	3,4	96,4	-	-	82753
3832	G	A/G	-	-	-	99,8	93707
4266	C	T	-	-	-	-	

En 25 de las 27 posiciones nucleotídicas en que se diferencian CPV-2a de CPV-2c, encontramos un único nucleótido, característico de CPV-2a. Este perfil indica la presencia de la cepa CPV-2a. En la posición 3792 encontramos dos nucleótidos (T en 96.4% y A en un 3.4%). En la posición 4266 no se registraron datos de secuenciación profunda.

3.3.4.8 Análisis de la muestra biológica CPV 405

Para esta muestra se secuenciaron aproximadamente 2.84×10^8 bases con una cobertura promedio de 66629 *reads* por nucleótido secuenciado (Tabla 22).

Tabla 30 – Perfil de secuenciación profunda de la muestra CPV 405. Se indican las frecuencias obtenidas para cada nucleótido en aquellas posiciones donde se distinguen CPV-2a de CPV-2c, los nucleótidos de referencia (rosa para CPV-2a y celeste para CPV-2c) y la cobertura.

Posición	2a	2c	Frecuencia				Cobertura
			A	T	C	G	
81	A	G	-	-	-	99,7	191250
342	C	T	-	98,8	-	-	85754
516	A	G	-	-	-	99,9	106892
1062	A	G/A	-	-	-	99,6	100109
1098	A	G/A	-	-	-	99,6	110384
1173	C	T	-	99,0	-	-	76295
1542	C	T	-	98,5	-	-	87349
1714	A	G	-	-	-	99,8	116853
1875	A	G	-	-	-	99,9	98197
1975	T	C	-	-	99,6	-	129387
2059	A	G	-	-	-	99,3	94748
2063	G	A	95,7	-	-	-	66458
2085	G	A	98,7	-	-	-	79794
2086	A	G	-	-	-	99,5	95633
2432	G	A	98,2	-	-	-	13841
2550	G	A	95,4	-	-	-	9576
2574	T	A	97,2	-	-	-	11178
2817	C	T	-	98,5	-	-	37025
3246	C	T	-	97,9	-	-	40771
3314	A	T	-	92,8	-	-	50781
3345	C	T	-	97,4	-	-	43989
3484	A	T	3,6	96,1	-	-	33701
3485	T	A	97,1	-	-	-	37156
3790	A	G	-	-	-	99,4	44396
3792	T	A	98,6	-	-	-	40243
3832	G	A/G	97,8	-	-	-	32498
4266	C	T	-	71,4	26,4	-	1458

En 25 de las 27 posiciones nucleotídicas en que se diferencian CPV-2a de CPV-2c, encontramos un único nucleótido, característico de CPV-2c. Este perfil indica la presencia de la cepa CPV-2c en la muestra. Encontramos dos nucleótidos en las posiciones 3484 (T en un 96.1% y A en un 3.6%) y 4266 (T en un 71.4% y C en un 26.4%).

3.3.4.9 Análisis de la muestra biológica CPV 407

Para esta muestra se secuenciaron aproximadamente 1.15×10^4 bases con una cobertura promedio de 27 *reads* por nucleótido secuenciado (Tabla 22).

Tabla 31 – Perfil de secuenciación profunda de la muestra CPV 407. Se indican las frecuencias obtenidas para cada nucleótido en aquellas posiciones donde se distinguen CPV-2a de CPV-2c, los nucleótidos de referencia (rosa para CPV-2a y celeste para CPV-2c) y la cobertura.

Posición	2a	2c	Frecuencia				Cobertura
			A	T	C	G	
81	A	G	68,8	-	-	31,3	48
342	C	T	-	4,0	71,4	14,0	14
516	A	G	68,0	-	-	32,0	25
1062	A	G/A	85,0	5,0	-	10,0	20
1098	A	G/A	93,3	-	-	7,7	15
1173	C	T	-	7,1	92,9	-	28
1542	C	T	-	16,1	83,9	-	31
1714	A	G	72,7	-	-	27,3	22
1875	A	G	34,3	5,7	-	60,0	35
1975	T	C	11,1	41,3	47,6	-	63
2059	A	G	66,7	4,5	-	28,8	66
2063	G	A	16,9	-	-	83,1	65
2085	G	A	18,2	-	-	81,8	66
2086	A	G	68,0	-	-	29,3	75
2432	G	A	40,0	-	-	60,0	65
2550	G	A	11,1	-	-	88,9	9
2574	T	A	27,8	72,2	-	-	18
2817	C	T	-	17,6	82,4	-	17
3246	C	T	-	4,3	95,7	-	23
3314	A	T	88,9	11,1	-	-	18
3345	C	T	-	5,3	94,7	-	19
3484	A	T	84,6	15,4	-	-	13
3485	T	A	8,3	91,7	-	-	12
3790	A	G	94,7	-	-	5,3	19
3792	T	A	18,7	81,3	-	-	16
3832	G	A/G	-	-	-	100,0	13
4266	C	T	-	-	100,0	-	9

Si bien la cobertura es sumamente baja, en 20 de las 27 posiciones nucleotídicas en que se diferencian CPV-2a de CPV-2c, encontramos dos nucleótidos, característicos de CPV-2a y CPV-2c. En 5 posiciones se registran tres nucleótidos, dos de ellos característicos de CPV-2a y CPV-2c. Este perfil indica la presencia de las cepas CPV-2a y CPV-2c en la muestra. No es posible

establecer las proporciones promedio para cada una ya que varían en forma muy significativa debido a que la cobertura es demasiado baja. De cualquier manera podemos especular con que CPV-2a se encuentra en mayor proporción que CPV-2c, por las frecuencias observadas. Encontramos un único nucleótido en las posiciones 3832 (G en un 100%) y 4266 (C en un 100%). Como se mencionó, encontramos tres nucleótidos en las posiciones 342 (C en un 71.4%, G en un 14.0% y T en un 4.0%), 1062 (A en un 85.0%, G en un 10.0% y T en un 5.0%), 1875 (G en un 60.0%, A en un 34.3% y T en un 5.7%), 1975 (C en un 47.6%, T en un 41.3% y A en un 11.1%) y 2059 (A en un 66.7%, G en un 28.8% y T en un 4.5%), aunque es altamente probable que esto se deba a la pobre cobertura registrada.

3.3.4.10 Análisis de la muestra biológica CPV 409

Para esta muestra se secuenciaron aproximadamente 5.20×10^8 bases con una cobertura promedio de 32743 *reads* por nucleótido secuenciado (Tabla 32).

Tabla 32 – Perfil de secuenciación profunda de la muestra CPV 409. Se indican las frecuencias obtenidas para cada nucleótido en aquellas posiciones donde se distinguen CPV-2a de CPV-2c, los nucleótidos de referencia (rosa para CPV-2a y celeste para CPV-2c) y la cobertura.

Posición	2a	2c	Frecuencia				Cobertura
			A	T	C	G	
81	A	G					
342	C	T					
516	A	G					
1062	A	G/A					
1098	A	G/A					
1173	C	T					
1542	C	T					
1714	A	G					
1875	A	G					
1975	T	C					
2059	A	G					
2063	G	A					
2085	G	A					
2086	A	G					
2432	G	A					
2550	G	A					
2574	T	A					
2817	C	T	-	98,8	-	-	29591
3246	C	T	-	98,4	-	-	31215
3314	A	T	-	91,6	-	-	37839
3345	C	T	-	98,1	-	-	31597
3484	A	T	3,8	95,9	-	-	21811
3485	T	A	97,8	-	-	-	23251
3790	A	G	-	-	-	99,8	41645
3792	T	A	98,9	-	-	-	35737
3832	G	A/G	98,8	-	-	-	35398
4266	C	T	-	96,8	-	-	1548

Se obtuvieron datos de lectura a partir de la posición 2678 del genoma, y por lo tanto no se cuenta con información sobre el ORF NS. En 9 de 10 posiciones que diferencian CPV-2a de CPV-2c encontramos un único nucleótido, característico de CPV-2c. Este perfil indica la presencia de la cepa CPV-2c, al menos en lo que respecta al ORF VP. Encontramos dos nucleótidos en la posición 3484 (T en un 95.9% y A en un 3.8%).

3.3.4.11 Análisis de la muestra biológica CPV 410

Para esta muestra se secuenciaron aproximadamente 1.51×10^8 bases con una cobertura promedio de 35576 *reads* por nucleótido secuenciado (Tabla 22).

Tabla 33 – Perfil de secuenciación profunda de la muestra CPV 410. Se indican las frecuencias obtenidas para cada nucleótido en aquellas posiciones donde se distinguen CPV-2a de CPV-2c, los nucleótidos de referencia (rosa para CPV-2a y celeste para CPV-2c) y la cobertura.

Posición	2a	2c	Frecuencia				Cobertura
			A	T	C	G	
81	A	G	-	-	-	99,6	78762
342	C	T	-	98,6	-	-	36801
516	A	G	-	-	-	99,9	45687
1062	A	G/A	-	-	-	99,8	68250
1098	A	G/A	-	-	-	99,8	71915
1173	C	T	-	98,7	-	-	40910
1542	C	T	-	98,2	-	-	33630
1714	A	G	-	-	-	99,7	47058
1875	A	G	-	-	-	99,8	35940
1975	T	C	-	-	99,9	-	90595
2059	A	G	-	-	-	99,4	85545
2063	G	A	95,8	-	-	-	66757
2085	G	A	98,8	-	-	-	74081
2086	A	G	-	-	-	99,6	98529
2432	G	A	98,6	-	-	-	9700
2550	G	A	97,1	-	-	-	4788
2574	T	A	97,5	-	-	-	5255
2817	C	T	-	98,8	-	-	23224
3246	C	T	-	98,3	-	-	25194
3314	A	T	-	92,7	-	-	30593
3345	C	T	-	98,1	-	-	25655
3484	A	T	3,3	83,7	12,8	-	18061
3485	T	A	97,6	-	-	-	19127
3790	A	G	-	-	-	99,8	31274
3792	T	A	98,8	-	-	-	26848
3832	G	A/G	98,7	-	-	-	26694
4266	C	T	-	96,8	-	-	1113

En 26 de las 27 posiciones nucleotídicas en que se diferencian CPV-2a de CPV-2c, encontramos un único nucleótido, característico de CPV-2c. Este perfil indica la presencia de la cepa CPV-2c. Encontramos tres nucleótidos en la posición 3484 (T en un 83.7%, C en un 12.8% y A en un 3.3%).

3. 3.4.12 Análisis de la muestra biológica CPV 426

Para esta muestra se secuenciaron aproximadamente 1.80×10^8 bases con una cobertura promedio de 42270 *reads* por nucleótido secuenciado (Tabla 22).

Tabla 34 – Perfil de secuenciación profunda de la muestra CPV 426. Se indican las frecuencias obtenidas para cada nucleótido en aquellas posiciones donde se distinguen CPV-2a de CPV-2c, los nucleótidos de referencia (rosa para CPV-2a y celeste para CPV-2c) y la cobertura.

Posición	2a	2c	Frecuencia				Cobertura
			A	T	C	G	
81	A	G	-	-	-	99,7	81657
342	C	T	-	98,5	-	-	38725
516	A	G	-	-	-	99,9	48695
1062	A	G/A	99,1	-	-	-	58322
1098	A	G/A	98,8	-	-	-	55464
1173	C	T	-	98,5	-	-	45159
1542	C	T	-	98,2	-	-	36793
1714	A	G	-	-	-	99,8	50252
1875	A	G	-	-	-	99,9	38409
1975	T	C	-	-	99,9	-	119403
2059	A	G	-	-	-	99,5	132166
2063	G	A	96,1	-	-	-	104974
2085	G	A	98,0	-	-	-	107592
2086	A	G	-	-	-	98,9	138879
2432	G	A	98,7	-	-	-	12714
2550	G	A	97,3	-	-	-	6705
2574	T	A	97,2	-	-	-	7468
2817	C	T	-	98,7	-	-	29742
3246	C	T	-	98,2	-	-	33150
3314	A	T	-	93,0	-	-	41600
3345	C	T	-	98,1	-	-	34823
3484	A	T	4,0	95,6	-	-	23153
3485	T	A	97,6	-	-	-	24814
3790	A	G	-	-	-	99,8	42035
3792	T	A	98,8	-	-	-	36113
3832	G	A/G	-	-	-	99,8	39959
4266	C	T	-	96,5	-	-	1616

En 26 de las 27 posiciones nucleotídicas en que se diferencian CPV-2a de CPV-2c, encontramos un único nucleótido, característico de CPV-2c. Este perfil indica la presencia de la cepa CPV-2c. Encontramos dos nucleótidos en la posición 3484 (T en un 95.6% y A en un 4.0%).

3.3.4.13 Análisis de la muestra biológica CPV 437

Para esta muestra se secuenciaron aproximadamente 4.00×10^6 bases con una cobertura promedio de 931 *reads* por base secuenciada (Tabla 22).

Tabla 35 – Perfil de secuenciación profunda de la muestra CPV 437. Se indican las frecuencias obtenidas para cada nucleótido en aquellas posiciones donde se distinguen CPV-2a de CPV-2c, los nucleótidos de referencia (rosa para CPV-2a y celeste para CPV-2c) y la cobertura.

Posición	2a	2c	Frecuencia				Cobertura
			A	T	C	G	
81	A	G	36,4	-	-	62,6	805
342	C	T	-	54,0	45,3	-	561
516	A	G	33,2	-	-	66,2	681
1062	A	G/A	28,4	-	-	70,9	838
1098	A	G/A	31,6	-	-	67,1	852
1173	C	T	-	45,2	54,3	-	692
1542	C	T	-	91,1	7,8	-	4804
1714	A	G	14,1	-	-	85,7	2538
1875	A	G	35,5	-	-	62,8	699
1975	T	C	-	41,8	55,8	-	1219
2059	A	G	53,8	-	-	45,6	1176
2063	G	A	29,4	-	-	69,4	1372
2085	G	A	35,8	-	-	64,0	1349
2086	A	G	48,3	-	-	51,1	1237
2432	G	A	60,9	-	-	37,6	550
2550	G	A	10,3	-	-	88,9	522
2574	T	A	16,6	82,8	-	-	487
2817	C	T	-	59,9	39,2	-	367
3246	C	T	-	44,7	54,8	-	416
3314	A	T	46,5	49,7	-	-	445
3345	C	T	-	44,0	54,9	-	432
3484	A	T	48,6	51,2	-	-	475
3485	T	A	53,4	46,2	-	-	442
3790	A	G	25,5	-	-	73,6	656
3792	T	A	75,5	24,3	-	-	604
3832	G	A/G	65,0	-	-	33,7	489
4266	C	T	-	22,3	77,7	-	94

Si bien la cobertura es baja, en las 27 posiciones nucleotídicas en que se diferencian CPV-2a de CPV-2c, encontramos dos nucleótidos, característicos de CPV-2a y CPV-2c. Este perfil indica la presencia de las cepas CPV-2a y CPV-2c. No es posible establecer las proporciones promedio para cada una ya que estas varían en forma muy significativa debido a que la cobertura es demasiado baja. De cualquier manera podemos especular con que CPV-2c se encuentra en mayor proporción que CPV-2a por las frecuencias observadas.

3.3.4.14 Análisis de la muestra biológica CPV 443

Para esta muestra se secuenciaron aproximadamente 1.30×10^6 bases con una cobertura promedio de 3077 *reads* por base secuenciada (Tabla 22).

Tabla 36 – Perfil de secuenciación profunda de la muestra CPV 443. Se indican las frecuencias obtenidas para cada nucleótido en aquellas posiciones donde se distinguen CPV-2a de CPV-2c, los nucleótidos de referencia (rosa para CPV-2a y celeste para CPV-2c) y la cobertura.

Posición	2a	2c	Frecuencia				Cobertura
			A	T	C	G	
81	A	G	-	-	-	98,3	3979
342	C	T	-	98,2	-	-	3179
516	A	G	-	-	-	99,1	3733
1062	A	G/A	-	-	-	99,0	3697
1098	A	G/A	-	-	-	99,0	3879
1173	C	T	-	98,0	-	-	2551
1542	C	T	-	97,5	-	-	3099
1714	A	G	-	-	-	99,3	4437
1875	A	G	-	-	-	99,5	3286
1975	T	C	-	-	99,0	-	6052
2059	A	G	-	-	-	98,3	3073
2063	G	A	93,6	-	-	-	2273
2085	G	A	96,9	-	-	-	2475
2086	A	G	-	-	-	98,3	2980
2432	G	A	97,7	-	-	-	1129
2550	G	A	-	-	-	99,4	1401
2574	T	A	-	98,3	-	-	994
2817	C	T	-	-	99,1	-	2288
3246	C	T	-	-	99,5	-	3923
3314	A	T	98,6	-	-	-	3625
3345	C	T	-	-	99,2	-	3973
3484	A	T	98,0	-	-	-	3433
3485	T	A	-	98,2	-	-	3408
3790	A	G	98,4	-	-	-	3572
3792	T	A	3,5	96,3	-	-	2951
3832	G	A/G	-	-	-	99,4	3682
4266	C	T	-	-	99,9	-	2838

En las 26 de las 27 posiciones nucleotídicas en que se diferencian CPV-2a de CPV-2c, encontramos un único nucleótido. En las primeras 15, sobre el extremo izquierdo del genoma (ORF NS), encontramos los nucleótidos correspondientes a CPV-2c, mientras que en las 12 posiciones nucleotídicas restantes, sobre el extremo derecho del genoma (ORF VP), encontramos los nucleótidos correspondientes a CPV-2a. Esto indicaría la presencia de una

muestra recombinante con una composición genética tipo ORF NS CPV-2c ORF VP CPV-2a. El punto de recombinación estaría comprendido entre la posición 2432 y 2550 del genoma, basándonos en las diferencias en frecuencias nucleotídicas observadas en los SNPs presentes en estas posiciones. Encontramos dos nucleótidos en la posición 3792 (T en un 96.3% y A en un 3.5%).

3.3.4.15 Análisis de la muestra biológica CPV 453

Para esta muestra se secuenciaron aproximadamente 3.10×10^8 bases con una cobertura promedio de 72635 *reads* por nucleótido secuenciado (Tabla 22).

Tabla 37 – Perfil de secuenciación profunda de la muestra CPV 453. Se indican las frecuencias obtenidas para cada nucleótido en aquellas posiciones donde se distinguen CPV-2a de CPV-2c, los nucleótidos de referencia (rosa para CPV-2a y celeste para CPV-2c) y la cobertura.

Posición	2a	2c	Frecuencia				Cobertura
			A	T	C	G	
81	A	G	98,5	-	-	-	198551
342	C	T	-	-	99,5	-	80839
516	A	G	98,7	-	-	-	84096
1062	A	G/A	99,0	-	-	-	78682
1098	A	G/A	98,8	-	-	-	84979
1173	C	T	-	-	99,6	-	96107
1542	C	T	-	-	99,6	-	96082
1714	A	G	98,6	-	-	-	81779
1875	A	G	98,1	-	-	-	55807
1975	T	C	-	97,0	-	-	133299
2059	A	G	97,6	-	-	-	119116
2063	G	A	-	-	-	99,6	161827
2085	G	A	-	-	-	99,5	159457
2086	A	G	99,2	-	-	-	154139
2432	G	A	-	-	-	98,1	17284
2550	G	A	-	-	-	99,7	23930
2574	T	A	-	98,4	-	-	16690
2817	C	T	-	-	99,2	-	39855
3246	C	T	-	-	99,7	-	80457
3314	A	T	98,8	-	-	-	66403
3345	C	T	-	-	99,7	-	75547
3484	A	T	98,2	-	-	-	59439
3485	T	A	-	98,6	-	-	57296
3790	A	G	98,8	-	-	-	59317
3792	T	A	3,5	96,5	-	-	49706
3832	G	A/G	-	-	-	99,7	59152
4266	C	T	-	-	99,9	-	51761

En 26 de las 27 posiciones nucleotídicas en que se diferencian CPV-2a de CPV-2c, encontramos un único nucleótido, característico de CPV-2a. Este perfil indica la presencia de la cepa CPV-2a. Encontramos dos nucleótidos en la posición 3792 (T en un 96.5% y A en un 3.5%).

3.3.5 Reconstrucción de las secuencias consenso

Se determinaron las secuencias consenso de cada muestra, a partir de los datos de secuenciación profunda (Anexo II). Para las muestras CPV 247, CPV 260, CPV 290, CPV 347, CPV 382, CPV 383, CPV 405, CPV 407, CPV 410, CPV 426, CPV 437, CPV 443 y CPV 453 se obtuvieron secuencias de 4269 nucleótidos. Para la muestra CPV 389 se obtuvo una secuencia consenso de 4259 nucleótidos y para la muestra CPV 409 se obtuvo una secuencia consenso de 1591 nucleótidos.

Se identificaron las posiciones (SNPs) en que varían las secuencias consenso, y encontramos que las cepas CPV-2c presentan 35 posiciones variables, mientras que las CPV-2a presentan 9 posiciones variables.

3.3.6 Identificación de otras variantes nucleotídicas

Para cada muestra se analizaron todas las posiciones genómicas y se identificaron aquellas que presentaron más de una variante nucleotídica (Anexo I). Una vez identificadas, descartamos para cada una de ellas la variante que se encontró en mayor frecuencia, y trabajamos únicamente con la o las variante(s) que se encontraban en frecuencias inferiores. Además, en muestras con evidencia de co-infección CPV-2a/CPV-2c, excluimos las variantes que se produjeron en las 27 posiciones marcadoras (SNPs), ya que estas son producto de la co-infección CPV-2a/CPV-2c y ya fueron consideradas. En la Tabla 38 se indica el número de variantes nucleotídicas finalmente consideradas, discriminado por muestra. Al analizar en detalle estas variantes nucleotídicas, vemos que algunas de ellas se ubican en todas las muestras en la misma posición, e incluso encontramos algunas se encuentran próximas entre sí en algunas regiones genómicas (Anexo III).

Las muestras CPV 407 y CPV 437 fueron excluidas de este análisis ya que debido a su pobre cobertura, las variantes nucleotídicas se encuentran sobre-representadas (a modo de ejemplo, se indicaban 305 variantes nucleotídicas para la muestra CPV 437) (Anexo I).

Tabla 38 - Se indica el número de variantes nucleotídicas consideradas, discriminado por muestra.

Muestra	Variante nucleotídicas
CPV 247	19
CPV 260	25
CPV 290	36
CPV 347	24
CPV 382	32
CPV 383	35
CPV 389	47
CPV 405	25
CPV 409	40
CPV 410	40
CPV 426	32
CPV 443	41
CPV 453	38

3.3.7 Análisis de recombinación

Para la muestra recombinante 443 se realizó un análisis de incongruencia filogenética y se obtuvieron 2 árboles filogenéticos que abarcan aproximadamente la región izquierda y derecha del genoma (Figura 29A y Figura 29B).

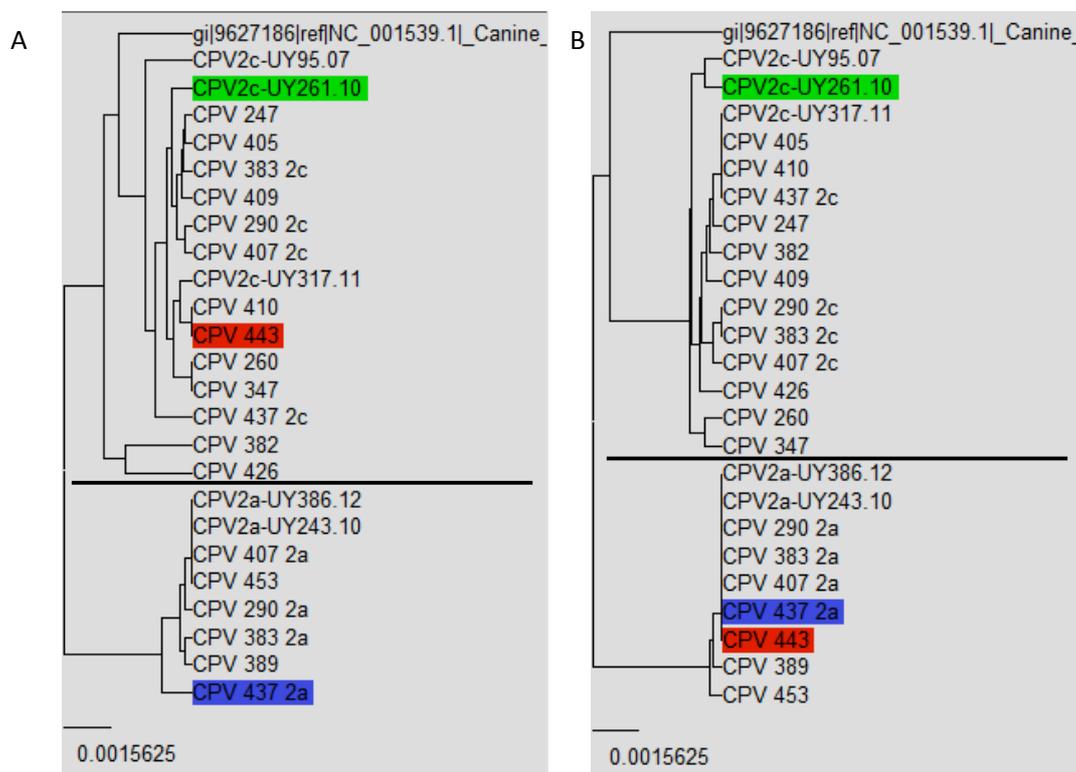


Figura 29 – Análisis de incongruencia filogenética construido con secuencias consenso obtenidas en este trabajo junto con secuencias de referencia de CPV-2, CPV-2a y CPV-2c. A: porción del genoma que va desde el nucleótido 1 al 2110. B: porción del genoma que va desde el nucleótido 2111 al 4269. En rojo se destaca CPV 443 (recombinante), y en azul y en verde secuencias con mayor probabilidad de ser las secuencias parentales según datos del software RDP4.

En ambos árboles filogenéticos se distinguen dos clados: uno perteneciente a CPV-2c (superior) y otro perteneciente a CPV-2a (inferior). Se demostró incongruencia filogenética para la muestra CPV 443 al observar que para el fragmento 1-2110 la misma se relaciona con las cepas CPV-2c, mientras que para el fragmento 2111-4269 se relaciona con las cepas CPV-2a. Este resultado coincide con la composición genética determinada por el análisis de los datos de secuenciación profunda.

Luego, a partir del alineamiento de todas las secuencias consenso se construyó una red filogenética (Figura 30).

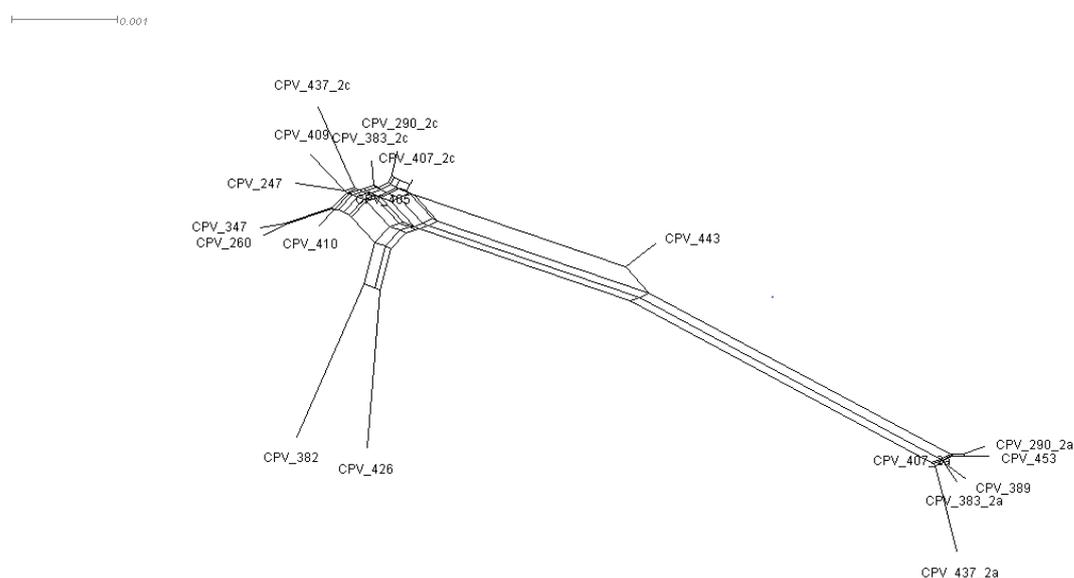


Figura 30 – Red filogenética construida con el programa SplitTree4 (Huson & Bryant, 2006) a partir de secuencias consenso obtenidas en este trabajo y de secuencias de referencia de CPV-2a y CPV-2c. Las secuencias inferidas como CPV-2a y CPV-2c a partir de las muestras co-infectantes CPV-2a/CPV-2c se agruparon correctamente. Éstas pueden observarse con el número de muestra seguido de 2a o 2c según corresponda, distribuidas en los correspondientes grupos. El análisis confirma a CPV 443 como recombinante, que se ocupa una posición intermedia en la red filogenética.

Se obtuvieron dos grupos bien diferenciados, uno correspondiente a CPV-2a y otro correspondiente a CPV-2c. La muestra 443 ocupa una posición intermedia en la red filogenética, confirmando su carácter recombinante. Esto fue validado por el “Phi test” que fue altamente significativo (0.005209).

Por último, empleamos nuevamente el software computacional RDP4 (Martin et al., 2010) para obtener información tal como el punto donde se produjo el sitio de recombinación y las posibles secuencias parentales (Figura 31).

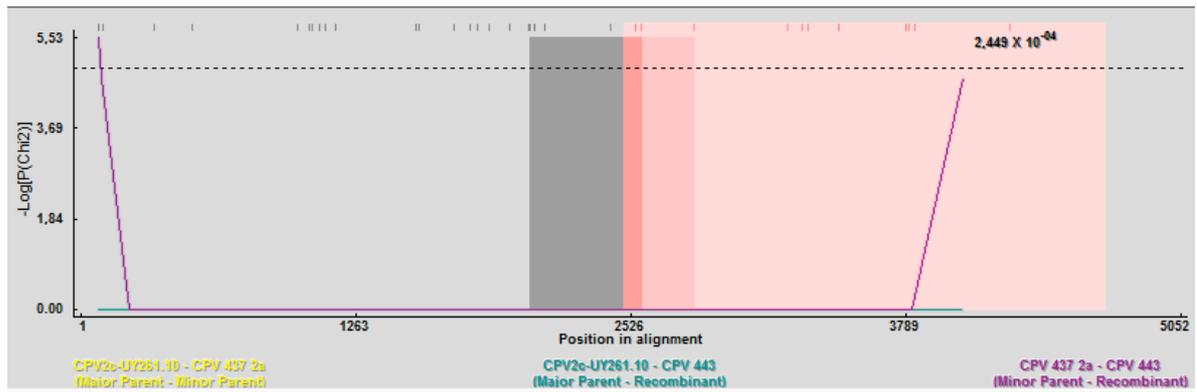


Figura 31 – Análisis de la secuencia de la muestra CPV 443 identificada como recombinante con el programa RDP4 (Martín et al., 2010) que permitió identificar el punto de recombinación y sugerir posibles secuencias parentales.

El modelo MaxChi sugirió la existencia de un evento de recombinación para la secuencia CPV 443, con sitio de recombinación entre las posiciones 2044 y 2550 del alineamiento (posiciones cds). Además, estimó que la secuencia parental más probable corresponde a la de la cepa CPV2c_UY261.10 (similitud 99.8%), y a la cepa CPV 437 2a (100% similitud).

4 - DISCUSIÓN

La relevancia de la parvovirus en la salud animal junto con el escenario particular que presenta la población de CPV-2 en Uruguay, sustentan la investigación en este modelo de interés sanitario y evolutivo.

La caracterización molecular de las cepas circulantes en nuestro territorio se realiza desde el año 2006 utilizando metodologías indirectas (RFLP) y directas (secuenciación) (Pérez et al., 2007, 2012). CPV-2c circula al menos desde ese año, producto de un evento de invasión por una cepa de probable origen europeo, mientras que CPV-2a circula desde el año 2010, producto de una invasión de probable origen asiático. Posteriormente ambas experimentaron diferenciación local, en especial CPV-2c que ha permanecido más tiempo en nuestro país (Pérez et al., 2007, 2012; Maya et al., 2013).

La co-circulación de CPV-2a y CPV-2c proporciona el marco adecuado para que se produzcan eventos de co-infección y eventual recombinación. Además, si consideramos la alta prevalencia de CPV-2 y su capacidad para sobrevivir en superficies por largos períodos de tiempo (Nandi & Kumar, 2010), se incrementan las chances de que los canes se infecten con ambas cepas.

Durante 2011 detectamos una muestra biológica co-infectante (CPV 370) y una recombinante (CPV 364) mediante RFLP y secuenciación Sanger y profunda (Pérez et al., 2014). Esto motivó continuar nuestra investigación, en la cual nos propusimos desarrollar una metodología rápida y sencilla para detectar posibles eventos de co-infección y/o recombinación. En una segunda etapa aquellas muestras que evidenciaron posibles eventos de co-infección y/o recombinación fueron sometidas a protocolos de secuenciación profunda con el objetivo de determinar su composición genética exacta.

Basados en la alta divergencia encontrada entre CPV-2a y CPV-2c, con 27 posiciones nucleotídicas diferenciales (SNPs) (Tabla 15, apartado 3.1.1), desarrollamos PCRs con cebadores variante específicos (PCR-CVE) para analizar la población uruguaya de CPV-2. El hecho de que estos SNPs se ubiquen a lo largo de todo el genoma nos permitió analizar ambos ORF individualmente. Esta metodología no solo tiene el potencial para identificar muestras co-infectantes entre CPV-2a y CPV-2c y muestras recombinantes, sino que constituye un método de diagnóstico y caracterización molecular en una única reacción de PCR. Esto supone una

disminución de los costos económicos, de los tiempos de trabajo, y de los errores introducidos por el operador y/o equipamientos.

A continuación se analizará la efectividad de la técnica desarrollada mediante comparación entre los resultados obtenidos previamente por PCR-RFLP, resultados de PCR-CVE en los casos en que corresponde, y por secuenciación profunda (Tabla 19, apartado 3.2.3 y Tabla 39).

Para comparar los resultados obtenidos por PCR-RFLP y PCR-CVE excluimos las muestras identificadas como co-infectantes y/o recombinantes mediante PCR-CVE. El diagnóstico por PCR-RFLP no detecta este tipo de muestras, tal como sucedió con la muestra CPV 364. Ésta fue diagnosticada mediante RFLP como CPV-2a y posteriormente como recombinante por secuenciación Sanger, mientras que su análisis por secuenciación profunda demostró la presencia de una co-infección entre una cepa CPV-2a (13%) con una recombinante (87%) (Pérez et al., 2014). La muestra CPV 370 podría considerarse una excepción, ya que por presentar proporciones similares de CPV-2a y CPV-2c fue detectada co-infectante por RFLP por obtención de patrón doble de digestión. Para este análisis consideramos entonces un total de 198 muestras, de las cuales 144 correspondieron a CPV-2a y 54 a CPV-2c mediante PCR-CVE. Idénticos resultados se obtuvieron con el ensayo de RFLP, revelando una total concordancia en cada una de las muestras (Tabla 19, apartado 3.2.3). Este resultado sustenta que la metodología propuesta es efectiva y certera para el diagnóstico y caracterización molecular.

A la hora de comparar los resultados obtenidos mediante relevamiento por PCR-CVE con los de las muestras sometidas a protocolos de secuenciación profunda (Tabla 39), se ponen de manifiesto aciertos y limitaciones de las técnicas desarrolladas.

Tabla 39 – Se detallan los resultados obtenidos por PCR-RFLP, relevamiento con PCR-CVE-NS y PCR-CVE-VP y los resultados obtenidos mediante secuenciación profunda con la tecnología de Illumina Mi-Seq. Se resaltan en rosa aquellas muestras donde se confirmó por secuenciación profunda co-infección CPV-2a/CPV-2c y/o recombinación. Frec. indet. = frecuencia indeterminada.

Muestra	Resultado PCR-RFLP	Relevamiento		Secuenciación profunda MiSeq (Illumina)
		PCR-CVE-NS	PCR-CVE-VP	
CPV 247	CPV-2c	CPV-2a y CPV-2c	CPV-2c	CPV-2c
CPV 260	CPV-2c	CPV-2a y CPV-2c	CPV-2c	CPV-2c
CPV 290	CPV-2a	CPV-2a y CPV-2c	CPV-2a	93% CPV-2a – 7% CPV-2c
CPV 347	CPV-2a	CPV-2a y CPV-2c	-	CPV-2c
CPV 382	CPV-2c	CPV-2a y CPV-2c	CPV-2c	CPV-2c
CPV 383	CPV-2a	CPV-2a y CPV-2c	CPV-2a y CPV-2c	95% CPV-2a – 5% CPV-2c
CPV 389	CPV-2a	CPV-2a y CPV-2c	CPV-2a	CPV-2a
CPV 405	CPV-2c	CPV-2a y CPV-2c	-	CPV-2c
CPV 407	CPV-2c	CPV-2c	CPV-2a y CPV-2c	CPV-2a – CPV-2c frec. indet.*
CPV 409	CPV-2c	CPV-2a y CPV-2c	CPV-2c	Sin datos NS -CPV-2c VP
CPV 410	CPV-2c	CPV-2a y CPV-2c	CPV-2c	CPV-2c
CPV 426	CPV-2c	CPV-2c	CPV-2a y CPV-2c	CPV-2c
CPV 437	CPV-2c	CPV-2a y CPV-2c	CPV-2c	CPV-2a – CPV-2c frec. indet.*
CPV 443	CPV-2a	CPV-2a y CPV-2c	CPV-2a	ORF NS CPV-2c ORF VP CPV-2a *
CPV 453	CPV-2a	CPV-2a	CPV-2a y CPV-2c	CPV-2a

* Baja cobertura

Vemos que en las muestras CPV 383 y CPV 409 se registró concordancia entre los resultados obtenidos mediante PCR-CVE y los obtenidos por secuenciación profunda. El relevamiento por PCR-CVE para la muestra CPV 383 sugería que ésta era una co-infectante CPV-2a/CPV-2c. El análisis de los resultados de secuenciación profunda confirmó que es una co-infectante compuesta por las cepas CPV-2a y CPV-2c. La muestra CPV 409 fue identificada por secuenciación profunda como CPV-2c en el ORF VP, pero no se obtuvieron datos de secuenciación para el ORF NS. Mediante PCR-CVE-NS obtuvimos patrón doble de amplificación, mientras que por PCR-CVE-VP obtuvimos patrón simple de amplificación, siendo que este último coincide con el resultado de secuenciación. Restaría conocer lo que sucede en el ORF NS para confirmar el resultado.

Para cuatro de las muestras (CPV 290, CPV 407, CPV 437 y CPV 443) se obtuvo concordancia parcial entre los resultados obtenidos mediante PCR-CVE y secuenciación profunda. El relevamiento por PCR-CVE sugería que todas ellas eran co-infectantes y recombinantes. El análisis de los datos de secuenciación profunda indicó que tres de ellas (CPV 290, CPV 407 y CPV 437) son co-infectantes CPV-2a/CPV-2c, mientras que CPV 443 está constituida por una forma recombinante (ORF NS CPV-2c ORF VP CPV-2a).

Por último, en nueve de las muestras analizadas (CPV 247, CPV 260, CPV 347, CPV 382, CPV 389, CPV 405, CPV 410, CPV 426 y CPV 453) no hubo concordancia entre los resultados obtenidos mediante PCR-CVE y los obtenidos mediante secuenciación profunda. El relevamiento por PCR-CVE sugería que todas ellas eran co-infectantes y recombinantes (Tabla 20, todas aquellas que presentaron amplificación doble para algún ORF, y simple en el ORF alternativo), a excepción de CPV 405 que había sido identificado sólo como co-infectante. Los resultados de secuenciación profunda para las muestras CPV 389 y CPV 453 indicaron que están constituidas únicamente por CPV-2a, mientras que las muestras restantes están constituidas únicamente por CPV-2c.

Es posible que la técnica de PCR-CVE sea afectada por factores que condicionan su precisión y especificidad. Se ha observado que la ocurrencia de mutaciones y cambios en la astringencia de la reacción de PCR pueden limitar la especificidad y alcance de los ensayos con cebadores variante específicos (Park et al., 2012; Decaro et al., 2005).

Al analizar los factores que podrían haber afectado nuestro desarrollo metodológico, vemos que la mutación es uno de ellos. En la muestra CPV 290, co-infectante CPV-2a/CPV-2c, se registró únicamente una variante nucleotídica en la posición 4266 (C), lo cual indica que ambas cepas son iguales en esa posición (Tabla 25). En este sitio habíamos considerado la existencia de un SNP marcador de cepa (T para CPV-2c y C para CPV-2a), que se utilizó para la construcción de uno de los cebadores variante específicos. Esto revela que en esta cepa CPV-2c se produjo una sustitución T>C que afecta la unión al cebador R4563c en el extremo 3' (Tabla 15). De esta forma, el cebador R4563c no es capaz de hibridar con los genomas CPV-2c que tengan esta mutación, aunque si podría hacerlo el cebador R4563a, alterando nuestra interpretación de los resultados.

Debemos también tener en cuenta que en el análisis de los datos de secuenciación profunda consideramos variantes nucleotídicas sólo a aquellas que se encuentran en frecuencias superiores al 3%. Por lo tanto, aquellas muestras co-infectantes CPV-2a/CPV-2c que presenten una determinada cepa en frecuencia inferior al 3% no fueron consideradas. Sin embargo, cuando determinamos la sensibilidad de la técnica PCR-CVE, encontramos que ésta metodología identifica muestras co-infectantes con proporciones de hasta 0.1% (Figura 22, apartado 3.1.5). Es posible entonces que algunas de las muestras caracterizadas por PCR-CVE como co-infectantes, pero determinadas como de cepa única por secuenciación profunda,

sean realmente muestras co-infectantes CPV-2a/CPV-2c, dónde una de las cepas tenga frecuencias muy reducidas (inferiores a 3%).

También vemos que en varios casos donde no se obtuvo concordancia entre los resultados de la PCR-CVE y secuenciación profunda, partíamos de muestras donde la amplificación doble se habría producido en la región NS (CPV 247, CPV 260, CPV 347, CPV 382, CPV 389, CPV 405, CPV 410, CPV 453), mientras que en la región VP habíamos obtenido amplificación simple (Tabla 39). Esto podría implicar un grado de especificidad menor por parte del juego de cebadores que amplifican en el ORF NS. Igualmente también encontramos muestras donde la amplificación inespecífica se produjo en VP (CPV 426 y CPV 453) (Tabla 39). La secuenciación profunda de muestras que por PCR-CVE fueran determinadas únicamente como CPV-2a o CPV-2c, podría actuar como “control negativo” y ayudar a verificar la concordancia de los datos.

A modo de conclusión, encontramos entonces que las amplificaciones dobles por PCR-CVE-NS y PCR-CVE-VP, están correlacionados con perfiles co-infectantes por secuenciación profunda. Para los casos donde se obtiene amplificación doble para una única región genómica, los resultados del relevamiento por PCR-CVE no siempre coinciden con los de secuenciación profunda. Es conveniente considerar la técnica de PCR-CVE como un paneo general que nos permite identificar muestras co-infectantes que son factibles de ser analizadas con técnicas de secuenciación profunda.

4.1 Co-infección entre CPV-2a y CPV-2c en Uruguay

La detección de muestras co-infectantes en CPV-2 *a priori* podría suponerse difícil, ya que el virus permanece dos semanas dentro del hospedero y luego es excretado en grandes cantidades a través de las heces durante 8-12 días post-infección (Pollock, 1982). Así, la entrada de una segunda cepa debe producirse en esta breve ventana de tiempo, y antes de que se desarrolle una repuesta inmune del hospedero. Este escenario podría parecer poco frecuente para canes que se encuentran aislados en hogares. Pero debido a la alta resistencia del virus en el ambiente, el encuentro entre CPV-2a y CPV-2c podría ocurrir frecuentemente en lugares pasibles de contacto, como veterinarias, perreras, parques y refugios (Nandi & Kumar, 2010).

De hecho se han reportado algunos eventos de co-infección en CPV-2, aunque estos ocurrieron en forma aislada. En 2006, empleando métodos de clonado del gen *vp2* y posterior secuenciación, se describió una co-infección entre CPV-2a y CPV-2c en un gato, y se propuso

que existirían más de 10 variantes genéticas de CPV-2 dentro del mismo hospedero (Battilani et al., 2006). En cánidos se describieron co-infecciones entre CPV-2a/CPV-2c, y CPV-2b/CPV-2c empleando técnicas de clonado y secuenciación del gen *vp2*, y PCR tiempo real con sondas MGB (Battilani et al., 2006, 2007; Vieira et al., 2008). También se ha descrito una muestra co-infectante con dos variantes genéticas de CPV-2b, mediante la amplificación, clonado y secuenciación del genoma completo de CPV-2 (Hoelzer et al., 2008a). Existen además reportes de co-infecciones entre cepas vacunales y cepas de campo, detectadas también empleando sondas MGB (Decaro et al., 2006b). En 2011 se describió, mediante clonado y secuenciación del genoma completo, una cepa que presentó a nivel genómico características intermedias entre CPV-2a y FPV, y que podría haberse originado como producto de una co-infección entre estos virus (Battilani et al., 2011, 2013).

Cuando tomamos en cuenta estos antecedentes, vemos que la mayoría de los trabajos no tenían como objetivo la identificación del evento de co-infección, sino que esta detección se produjo como un hecho fortuito o secundario, sin el análisis en una población natural establecida en un determinado período de tiempo. Tal vez eso podría explicar porque estos reportes se han realizado en forma aislada y en baja frecuencia. De hecho, una de las hipótesis sobre las que se fundó este trabajo es que la co-infección ocurre en las poblaciones naturales de CPV-2 en mayor frecuencia de lo reportado, y que la co-infección sería además un mecanismo relevante en la generación de variabilidad genética *per se*, ya sea a través de la interacción de variantes dentro del hospedero o proporcionando el marco adecuado para que se generen eventos de recombinación.

Para confirmar nuestras hipótesis nos propusimos realizar este estudio con una metodología sencilla y rápida, complementada por un paso posterior de secuenciación profunda que nos brinda información adicional. Esta metodología parecería ser más adecuada para la detección de co-infecciones en comparación al clonado o a las sondas MGB empleados en los reportes previos, particularmente porque brinda información sobre todo el genoma y la composición genética de la muestra. Nuestro objeto de estudio fue la población natural heterogénea establecida de CPV-2 en Uruguay en un período de tiempo de 4 años. Si tomamos en cuenta la rápida emergencia y evolución de CPV-2 a fines de los años 70 (Shackelton et al., 2005), es evidente que 4 años bien podrían traducirse en importantes cambios en la evolución del virus.

Durante este período de tiempo encontramos 4 muestras co-infectantes entre CPV-2a y CPV-2c detectadas en el marco de esta tesis (CPV 290, CPV 383, CPV 407 y CPV 437) (Tabla 39), y

dos más reportadas previamente (CPV 364 y CPV 370) (Pérez et al., 2014). Con estos datos procedimos a calcular las frecuencias de co-infección como el cociente entre el número de eventos confirmados para co-infección CPV-2a/CPV-2c y el número total de muestras analizadas por relevamiento PCR-CVE (214):

$$\text{Frecuencia Coinfectantes} = \frac{\text{Coinfectantes}}{\text{Total}} \times 100$$

Figura 32 – Fórmula para realizar el cálculo de frecuencias de co-infección entre CPV-2a y CPV-2c.

El valor de frecuencia de co-infección entre CPV-2a/CPV-2c obtenido para el período comprendido entre 2010 y 2013 en Uruguay es de 2.8%.

Si asumimos que todos los eventos de co-infección entre CPV-2a y CPV-2c se producen al azar, la probabilidad de que se produzcan está dada por el producto de las frecuencias de prevalencia de CPV-2a y CPV-2c en la población, durante el período de tiempo analizado. Estas frecuencias se calculan como el porcentaje de CPV-2a o CPV-2c con respecto al total de muestras. Para CPV-2a la frecuencia promedio calculada es 0.7 y para CPV-2c es 0.3. Así, encontramos que la probabilidad de que se genere una co-infección CPV-2a/CPV-2c al azar es de 0.21 o 21% ($0.7 \times 0.3 = 0.21$). Resulta informativo comparar estos valores, y encontramos que la frecuencia de co-infección CPV-2a/CPV-2c calculada (2.8%), representa un 13.3% ($2.8\%/21.0\% = 13.3\%$) de las esperadas por azar (21%). Esto demuestra claramente que la co-infección entre CPV-2a y CPV-2c efectivamente ocurre en la población uruguaya de CPV-2 en una frecuencia considerable. Además, el hecho de que estas muestras co-infectantes estén distribuidas a lo largo de los 4 años indica que no se trata de eventos puntuales o esporádicos, sino de un fenómeno que ocurre consistentemente, sustentando nuestra hipótesis.

4.2 Recombinación entre CPV-2a y CPV-2c en Uruguay

La existencia de eventos de co-infección genera el marco genético adecuado para la ocurrencia de recombinación entre las cepas.

Los reportes de eventos de recombinación en CPV-2 son también relativamente escasos y aislados. Se han descrito casos de recombinación entre cepas vacunales y CPV-2b y/o CPV-2a (Mochizuki et al., 2008), así como entre FPV y CPV-2 (Ohshima & Mochizuki, 2009). Mediante análisis filogenéticos y algoritmos apropiados para detectar secuencias recombinantes se identificó en 2012 una cepa recombinante entre MEV y CPV-2 (Wang et al., 2012). También se

observaron patrones de mutación seguidos por eventos de recombinación durante el proceso de atenuación *in vivo* de la cepa vacunal (Badgett et al., 2002). La identificación de eventos de recombinación se ve condicionada por la co-circulación y el grado de divergencia de las cepas parentales. En poblaciones altamente homogéneas sería dificultosa la identificación de recombinantes aunque estos ocurrieran, ya que al contar con pocos SNPs marcadores, no podríamos discernir entre mutación en un SNP o su cambio por recombinación con otra cepa. En ese sentido, la población uruguaya marcada por la co-circulación de cepas CPV-2a y CPV-2c muy divergentes, posibilita la identificación de recombinantes.

En el año 2011, nuestro grupo reportó la existencia de una recombinante, CPV 364, mediante clonado del genoma completo y la posterior aplicación de protocolos de secuenciación profunda (Pérez et al., 2014). En el marco de esta tesis, confirmamos otra muestra recombinante circulante durante 2013, CPV 443, por análisis con el sistema de PCR-CVE aquí desarrollado y protocolos de secuenciación profunda. Comprobamos que a nivel de sus secuencias consenso, la recombinante CPV 364 es idéntica a la CPV 443, a pesar de que su detección se produjo dos años más tarde. Esto sugeriría que en la población de CPV-2 uruguaya se produjo al menos un evento de recombinación exitoso, que fue capaz de persistir en la población como una forma circulante recombinante (CRF). Además, el hecho de que ambas recombinantes fueron detectadas durante la eliminación del virus en las heces sustentan su capacidad infectiva. La ausencia de las cepas parentales en CPV 443 y la elevada frecuencia del genoma recombinante (87%) en la muestra CPV 364 (Pérez et al., 2014), reafirma que las recombinantes son capaces de dispersarse en la población e infectar por sí mismas.

La cepa recombinante tiene en la región izquierda del genoma (NS) de CPV-2c, y la región derecha (VP) de CPV-2a. El punto de recombinación se hallaría en la región intergénica *vp1/vp2* comprendida entre las posiciones genómicas 2432 y 2550 (Figura 29, 30 y 31, apartado 3.3.7). Esta localización es coherente con la propuesta de que los puntos de recombinación no ocurren al azar, sino en sitios específicos como las regiones intergénicas, permitiendo la viabilidad de las variantes recombinantes y evitando la generación de genomas deletéreos (Martin et al., 2011). Patrones similares de recombinación también fueron identificados entre algunos de los virus relacionado como FPV y MEV (Oshima & Mochizuki, 2009; Wang et al., 2012).

4.3 Variabilidad poblacional de CPV-2 en Uruguay

Además de la co-infección y la recombinación entre cepas, existen otros mecanismos implicados en la generación de variabilidad genética, entre los cuales la mutación es sumamente relevante en CPV-2 (Shackelton et al., 2005).

En nuestro estudio determinamos la secuencia consenso de todas las muestras analizadas, incluso de las co-infectantes CPV-2a y CPV-2c, donde pudimos establecer la secuencia consenso de cada cepa presente (Anexo II). El alineamiento y comparación de las secuencias obtenidas en este trabajo, muestra que 26 de los 27 marcadores nucleotídicos que distinguen CPV-2a de CPV-2c (Tabla 15, apartado 3.1.1), son constantes y se mantienen en la población (Anexo II). Un SNP en la posición 4266 no se conserva en las cepas CPV-2c de las muestras CPV 290 y CPV 383 (co-infectantes CPV-2a/CPV-2c), donde aparentemente se registró una sustitución tipo T>C. En la muestra co-infectante CPV 407 también encontramos esta sustitución en la secuencia consenso de CPV-2c, sin embargo se debe tener en cuenta que los valores de cobertura son extremadamente bajos. Este cambio no se había registrado en muestras uruguayas, aunque la sustitución inversa (C>T) si fue reportada para CPV-2a en muestras de origen Chino disponibles en el GenBank (número de acceso KKR002801, KR002895, KR002894, KR002892).

Además, el alineamiento de las secuencias consenso también evidencia que existen en la población una gran cantidad de SNPs adicionales a los 27 marcadores. La comparación de todas las cepas CPV-2a revelaron la presencia de 9 sitios variables, mientras que la comparación de las cepas CPV-2c mostró 35 sitios variables (Anexo II). Era de esperar encontrar esta variabilidad debido al continuo proceso evolutivo al que se expone CPV-2. Los resultados indican que las cepas CPV-2c evidencian una mayor variabilidad, probablemente como consecuencia de una mayor permanencia en el territorio uruguayo que condujo a la acumulación de un mayor número de mutaciones. Claramente la población de CPV-2 uruguayas está caracterizada por diferentes tiempos de ingreso al territorio, seguidos de una rápida expansión donde ocurren procesos de diferenciación local por mutación y recombinación (Maya et al., 2013; Pérez et al. 2014).

4.4 Variabilidad de CPV-2 intra-hospedero: presencia de variantes nucleotídicas en cepas de una misma muestra

En las muestras se detectó la presencia de variantes nucleotídicas en posiciones del genoma que no pueden ser directamente asociadas a la presencia de co-infectantes CPV-2a/CPV-2c (Tabla 38, apartado 3.3.6) (Anexo III). La presencia de estas variantes nucleotídicas es relevante, ya que podrían tener importancia funcional en el curso de la infección y funcionar además como indicadores de la variabilidad genética intra-hospedero. Se pueden elaborar algunas hipótesis sobre el origen y significado de estos cambios.

En primer lugar, estos cambios podrían ser reflejo de múltiples co-infecciones entre cepas del mismo tipo (CPV-2a o CPV-2c), cada una con mutaciones o SNPs exclusivos. De esta forma, dos cepas del mismo tipo que difieran en determinado número de SNPs, generarán un perfil de secuenciación profunda con la presencia de variantes nucleotídicas en tantos sitios como número de SNPs, y con frecuencias que reflejaran la proporción de las cepas co-infectantes. El hecho de que el ingreso del virus en el hospedero no se produce por una única partícula viral, sino por varias, sustenta esta hipótesis.

Éste escenario podría corresponder a lo observado en algunas de las muestras identificadas como CPV-2c. A modo de ejemplo, tomemos el caso de la muestra CPV 405 (Tabla 31): en la posición 4266 (cds) encontramos al nucleótido C en un 26,4%, y al nucleótido T en un 71.4%. Así, esta muestra podría estar compuesta por al menos dos variantes genéticas de CPV-2c en distinta proporción (71.4% y 26.4%) que difieran en un SNP (T/C). Este ejemplo constituiría el caso más sencillo, dónde co-infectan 2 variantes genéticas, pero bien podríamos especular con co-infecciones entre múltiples variantes. Tal podría ser el caso de la muestra CPV 410 (Tabla 34), donde encontramos en la posición 3484 (cds) al nucleótido A en un 3.3%, al nucleótido T en un 83.7% y al nucleótido C en un 12.8%. Así, esta muestra podría tratarse de una co-infección entre tres variantes genéticas de CPV-2c que difieran en el nucleótido 3484 (A/T/C), y presenten diferencias en su frecuencia (83.3%, 12.8%, y 3.3%). En ambas muestras se generan además otras variantes nucleotídicas en otras posiciones (Tabla 38, apartado 3.3.6; Anexo III), que también podrían estar representando a distintas cepas del mismo tipo co-infectando en la misma muestra.

Igualmente, también sería posible que algunos de estos cambios se produzcan *de novo* dentro del hospedero en cada ciclo replicativo. Esta hipótesis se sustenta en el hecho de que CPV-2

podría presentar tasas de mutación intrínsecas muy elevadas (Shackelton et al., 2005), y de que sus tamaños poblacionales son enormes, posibilitando la generación de millones de partículas virales diarias (López Bueno et al., 2006). Estos cambios se generarían por mutación y su persistencia en la población sería dependiente de la deriva y/o presiones selectivas, aunque esto no implica necesariamente ninguna función adaptativa o de complementación con otras variantes. Para comprender mejor esto sería interesante estudiar lo que sucede antes y después de cada ciclo replicativo a nivel poblacional *in vitro* y/o *in vivo* mediante secuenciación profunda. Podríamos comparar así las poblaciones a nivel genético, y determinar la generación de nuevas variantes y la frecuencia de las mismas. Incluso se podría trabajar con mutágenos que acelerarían el proceso de introducción de errores, aumentando las tasas de mutación y la velocidad de evolución.

En una tercera hipótesis podríamos especular con una organización "tipo cuasiespecie" para CPV-2 como fue sugerido por Battilani et al., en 2006 y 2011. Esto implicaría que CPV-2 utiliza mecanismos de evolución similares a los de virus RNA, dónde a través de la generación de una gran cantidad de mutaciones en cada ciclo replicativo se generan poblaciones virales genéticamente muy diversas y con ciertas ventajas adaptativas. Sin embargo, no está claro que los virus DNA tenga este nivel de complejidad.

Por último, no podemos descartar que parte de estos cambios se deban en realidad a cuestiones asociadas a la técnica de secuenciación profunda. Si bien consideramos un umbral relativamente alto (>3%) para definir una variante nucleotídica, es posible que algunas de ellas sean en realidad productos de errores en algunos de los pasos de la secuenciación profunda. Cuando consideramos los resultados obtenidos previamente para la muestra CPV 370 y CPV 364 (Pérez et al., 2014), realizados en otra corrida y con un equipo diferente, vemos que el número de variantes nucleotídicas es menor al registrado en las muestras secuenciadas en este trabajo. Esto indica que la metodología de secuenciación profunda puede presentar cierto grado de variabilidad inter-ensayo que debe considerarse cuando se analizan cambios en baja frecuencia.

A los efectos de esta tesis no es posible inclinarnos por ninguna de éstas hipótesis. Incluso podríamos especular con la posibilidad de que estos cambios se estén generando por varios de estos factores actuando en conjunto. Sería interesante abordar esta problemática en estudios siguientes.

Por último, vale destacar que algunos de estos cambios se encuentran muy próximos entre sí en algunas regiones, lo cual podría indicar zonas que se encuentran particularmente susceptibles a la introducción de errores. Tal es el caso de la región comprendida entre los nucleótidos ubicados de la posición 1866 a 1890 donde se observa un gran número de variantes nucleotídicas. Lo mismo se observa en la región comprendida entre los nucleótidos 2445 y 2459. Esta región se encuentra inmediatamente antes un tracto de 13 adeninas consecutivas (poly-A), que se ha asociado a pausas en la polimerasa durante la síntesis de DNA (Klarmann et al., 1993). El efecto sobre las polimerasas podría ser importante para la recombinación ya que favorecería el salto de la polimerasa durante la replicación, tal como lo descrito en la recombinación por *copy choice* para virus RNA (Simon-Loriere & Holmes, 2011).

Considerando los resultados obtenidos en este trabajo mediante combinación de técnicas de PCR y secuenciación profunda, encontramos que la co-infección y la recombinación explican parte de la variabilidad genética observada en poblaciones naturales de CPV-2.

5 – CONCLUSIONES

- Se desarrolló una metodología útil para el diagnóstico y caracterización molecular de CPV-2, que resuelve ambos en una única reacción de PCR.
- La metodología desarrollada es una buena aproximación para el estudio de aislamientos co-infectantes y/o recombinantes en CPV-2.
- Se determinó la ocurrencia de eventos de co-infección y recombinación entre CPV-2a y CPV-2c en una población natural establecida.
- Se detectó un único evento de recombinación que generó cepas con capacidad infectiva.
- Se detectó un nivel de variación genética considerable dentro de cada muestra, cuyo origen y significado alientan estudios más profundos.

6 – PERSPECTIVAS

- Implementar en forma rutinaria la metodología de relevamiento por PCR-CVE para realizar el diagnóstico y caracterización molecular de CPV-2, y como aproximación a la identificación de muestras co-infectantes y/o recombinantes.
- Mediante infecciones *in vitro* e *in vivo* a condiciones controladas, determinar si existen diferencias en el *fitness* y patogénesis de las variantes CPV-2a y CPV-2c, e incluso si existen diferencias cuando estas se encuentran co-infectando una misma muestra.
- Profundizar en la relevancia biológica de la muestra recombinante en la infección de CPV-2, mediante la determinación del *fitness* viral *in vitro* o *in vivo*, y mediante ensayos de competencia con las variantes CPV-2a y CPV-2c circulantes en Uruguay.
- Diseñar experimentos para estudiar en profundidad las variantes nucleotídicas presentes en una misma muestra. Para ello se podría estudiar mediante secuenciación profunda la variabilidad de cada muestra antes y después de un ciclo replicativo. Incluso se podrían monitorear la aparición de cambios frecuentes en varias muestras, y tal vez atribuirle un rol a alguno de ellos mediante ensayos de genética reversa.

7 – BIBLIOGRAFÍA

- Anwar A, Abbas G & Rasheed I (2015). Canine Parvovirus-2 in a young German shepherd dog A Case Report. *International Journal of Molecular Veterinary Research* 5(2), 1-3 doi: 10.5376/ijmvr.2015.05.0002.
- Apple M, Cooper B, Greisen H & Carmichael L (1978). Status report: canine viral enteritis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 173, 1516–1518.
- Apple M, Cooper B, Greissen H, Scott F & Carmichael L (1979a). Canine viral enteritis. I. Status report on corona- and parvo-like viral enteritides. *Cornell Vet* 69, 123-133.
- Apple M, Scott F & Carmichael L (1979b). Isolation and immunization studies of a canine parvo-like virus from dogs with hemorrhagic enteritis. *Veterinary Research* 105, 156–159.
- Badgett M, Auer A, Carmichael L, Parrish C & Bull J (2002). Evolutionary Dynamics of Viral Attenuation. *Journal of Virology* 76 (20), 10524-10529.
- Baer C, Miyamoto M & Denver D (2007). Mutation rate variation in multicellular eukaryotes: causes and consequences. *Nature Reviews Genetics* 8, 619–631.
- Battilani M, Scagliarini A, Ciulli S, Morganti L & Prospero S (2006). High genetic diversity of the VP2 gene of a canine parvovirus strain detected in a domestic cat. *Virology* 352, 22–26.
- Battilani M, Gallina L, Vaccari F & Morganti L (2007). Co-infection with multiple variants of canine parvovirus type 2 (CPV-2). *Veterinary Research Communications* 31 (Suppl. 1), 209–212.
- Battilani M, Balboni A, Ustulin M, Giunti M, Scagliarini A & Prospero S (2011). Genetic complexity and multiple infections with more Parvovirus species in naturally infected cats. *Veterinary Research* 42 (1), 43 doi: 10.1186/1297-9716-42-43.
- Battilani M, Balboni A, Giunti M & Prospero S (2013). Co-infection with feline and canine parvovirus in a cat. *Veterinaria Italiana* 49 (1), 127-129.
- Berns K (1990). Parvovirus replication. *Microbiological Reviews* 54, 316-329.
- Booth A & Wilson M (1981). Human placental coated vesicles contain receptor-bound transferrin. *Biochemical Journal* 196 (1), 355-362.
- Brandenburger A, Legendre D, Avalosse B & Rommelaere J (1990). Synergistic action of NS-1 and NS-2 proteins in the cytopathogenicity of parvovirus MVMp. *Virology* 174, 576-584.
- 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. *Journal of General Virology* 82, 1555–1560.
- Burtonboy G, Goignoul F, Delferriere N & Pastoret P (1979). Canine hemorrhagic enteritis: detection of viral particles by electron microscopy. *Archives of Virology* 61, 1–11.
- Camp J, Chu Y, Chung D, McAllister R, Adcock R, Gerlach R, Wiemken T, Peyrani P, Ramirez J, Summersgill J & Jonsson C (2013). Phenotypic differences in virulence and immune response in closely related clinical isolates of influenza A 2009 H1N1 pandemic viruses in mice. *PLoS One* 8(2), e56602doi: 10.1371/journal.pone.0056602.

- Carmichael L, Joubert J & Pollock R (1980). Hemagglutination by canine parvovirus: serologic studies and diagnostic application. *American Journal of Veterinary Research* 40, 784–91.
- Carmichael L & Binn L (1981). New enteric virus in the dog. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine* 25, 1–27.
- Cattaneo R, Schmid A, Eschle D, Baczko K, Ter Meulen V & Billeter M (1988). Biased hypermutation and other genetic changes in defective measles viruses in human brain infections. *Cell* 55, 255–265.
- Carter J & Pintel D (1992). The small non-structural protein NS2 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is required for virus growth in murine cells. *Journal of General Virology* 73, 1839–1843.
- Chang S, Sgro J & Parrish C (1992). Multiple amino acids in the capsid structure of canine parvovirus coordinately determine the canine host range and specific antigenic and hemagglutination properties. *Journal of Virology* 66, 6858–6567.
- Chao L, Rang C & Wong L (2002). Distribution of spontaneous mutants and inferences about the replication mode of the RNA bacteriophage ϕ 6. *Journal of Virology* 76, 3276–3281.
- Chapman M & Rossmann M (1993). Structure, sequence, and function correlations among Parvoviruses. *Virology* 194, 491–508.
- Cho H, Song J, Park Y & Park N (2004). Diagnosis of the canine parvovirus in faecal samples by in situ hybridization. *Indian Veterinary Journal* 81, 855–859.
- Clegg S, Coyne K, Parker J, Dawson S, Godsall S, Pinchbeck G, Cripps P, Gaskell R & Radford A (2011). Molecular Epidemiology and Phylogeny Reveal Complex Spatial Dynamics in Areas Where Canine Parvovirus Is Endemic. *Journal of Virology* 85(15), 7892-7899.
- Clemens K & Pintel D (1988). The two transcription units of the autonomous parvovirus minute virus of mice are transcribed in a temporal order. *Journal of Virology* 62, 1448–1451.
- Combe M & Sanjuán R (2014). Variation in RNA Virus Mutation Rates across Host Cells. *PLoS Pathogens* 10(1): e1003855.
- Comité Internacional de Taxonomía de Viruses (ICTV) (2014). Virus Taxonomy: 2014 Release. Disponible: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> Acceso 19 de Abril de 2015.
- Cotmore S & Tattersall P (1987). The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Advances in Virus Research* 33, 91–174.
- Cotmore S, Gunther M & Tattersall P (1989). Evidence for a ligation step in the DNA replication of the autonomous parvovirus MVM. *Journal of Virology* 63, 1002.
- Cotmore S & Tattersall P (2007). Parvoviral Host Range and Cell Entry Mechanisms. *Advances in Virus Research* 70 (07), 183-232.
- Cotmore S & Tattersall P (2013). Parvovirus Diversity and DNA Damage Responses. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5(2):a012989 doi:10.1101/cshperspect.a012989.
- Cureton D, Harbison C, Cocucci E, Parrish C & Kirchhausen T (2012). Limited Transferrin Receptor Clustering Allows Rapid Diffusion of Canine Parvovirus into Clathrin Endocytic Structures. *Journal of Virology* 86(9), 5330-5340 doi:10.1128/JVI.07194-11.

- Daeffer L, Hörlein R, Rommelaere J & Nüesch J (2003). Modulation of minute virus of mice cytotoxic activities through site-directed mutagenesis within the NS coding region. *Journal of Virology* 77, 12466–12478.
- De Filippis V & Villarreal L (2001). Virus evolution. In: Knipe D, Howley P (eds) *Fields virology*, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Decaro N, Elia G, Campolo M, Desario C, Lucente M & Bellacicco A (2005a). New approaches for molecular characterization of canine parvovirus type-2 strains. *Journal of Veterinary Medicine Series B* 52, 316–9.
- Decaro N, Elia G, Martella V, Descario C, Campolo M, Di Trani L, Tarsitano E, Tempesta M & Buonavoglia C (2005b). A real-time PCR assay for rapid detection and quantification of Canine Parvovirus type 2 DNA in the feces of dogs. *Veterinary Microbiology* 105, 19-28.
- Decaro N, Elia G, Martella V, Campolo M, Desario C & Camero M (2006a). Characterization of the canine parvovirus type 2 variants using minor groove binder probe technology. *Journal of Virological Methods* 133, 92–99.
- Decaro N, Desario C, Elia G, Campolo M, Lorusso A, Mari V, Martella V & Buonavoglia C (2006b). Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: a clinical and laboratory diagnostic dilemma. *Vaccine* 25, 1161–1166.
- Decaro N, Martella V, Elia G, Desario C, Campolo M, Lorusso E, Colaianni M, Lorusso A & Buonavoglia C (2007). Tissue distribution of the antigenic variants of canine parvovirus type 2 in dogs. *Veterinary Microbiology* 121, 39–44.
- Decaro N & Buonavoglia C (2012). Canine parvovirus – a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Veterinary Microbiology* 155, 1–12.
- Dennehy J, Duffy S, O’Keefe K, Edwards S & Turner P (2013). Frequent Coinfection Reduces RNA Virus Population Genetic Diversity. *Journal of Heredity* 104 (5), 704-712doi: 10.1093/jhered/est038.
- 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, 179-185.
- Domingo E & Holland J (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual Review of Microbiology* 51, 151–178.
- Drake J (1993). Rates of spontaneous mutations among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 4171–4175.
- Duffy S, Shackelton L & Holmes E (2008). Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nature Reviews Genetics* 9 (4), 267-76.
- Eigen M & Biebriche C (1988). Sequence space and quasispecies distribution. In Domingo E, Holland J & Ahlquist P (ed.), *RNA genetics*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Einer-Jensen K, Harmache A, Biacchesi S, Bremont M, Stegmann A & Lorenzen N (2014). High virulence differences among phylogenetically distinct isolates of the fish rhabdovirus viral hemorrhagic septicaemia virus are not explained by variability of the surface glycoprotein G or

the non-virion protein Nv. *Journal of General Virology* 95 (Pt 2), 307-16doi: 10.1099/vir.0.057448-0.

Fields B, Knipe D, Howley P & Griffin D (2001). *Fields virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

French R & Stenger D (2003). Evolution of wheat streakmosaic virus: dynamics of population growth within plants may explain limited variation. *Annual Review of Phytopathology* 41, 199–214.

Gallo Calderón M, Romanutti C, Wilda M, D' Antuono A, Keller L, Giacomodonato M, Mattion N & La Torre J (2015). Resurgence of canine parvovirus 2a strain in the domestic dog population from Argentina. *Journal of Virological Methods* 222, 145-9 doi: 10.1016/j.jviromet.2015.06.012.

Geng Y, Guo D, Li C, Wang E, Wei S, Wang Z, Yao S, Zhao X, Su M, Wang X, Wang J, Wu R, Feng L & Sun D (2015). Co-Circulation of the Rare CPV-2c with Unique Gln370Arg Substitution, New CPV-2b with Unique Thr440Ala Substitution, and New CPV-2a with High Prevalence and Variation in Heilongjiang Province, Northeast China. *PLoS ONE* 10(9), e0137288. doi:10.1371/journal.pone.0137288.

Gizzi A, Oliveira S, Leutenegger C, Estrada M, Kozemjak D, Stedile R, Marcondes M & Biondo A (2014). Presence of infectious agents and co-infections in diarrheic dogs determined with a real-time polymerase chain reaction-based panel. *BMC Veterinary Research* 10, 23doi: 10.1186/1746-6148-10-23.

Goddard A & Leisewitz A (2010). Canine Parvovirus. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice* 40, 1041–1053 doi:10.1016/j.cvsm.2010.07.007.

Godsall S, Clegg S, Stravisky J, Radford A & Pinchbeck G (2010). Epidemiology of canine parvovirus and coronavirus in dogs presented with severe diarrhea to PDSA PetAid hospitals. *Veterinary Record* 167, 196-201 doi:10.1136/vr.c3095.

Goodman L, Lyi S, Johnson N, Cifuentes J, Hafenstein S & Parrish C (2010). Binding site on the transferrin receptor for the parvovirus capsid and effects of altered affinity on cell uptake and infection. *Journal of Virology* 84(10), 4969-4978.

Hajjar A & Linial M (1995). Modification of retroviral RNA by double stranded RNA adenosine deaminase. *Journal of Virology* 69, 5878–5882.

Harrison L, Styer E, Pursell A, Carmichael L & Nietfeld J (1992). Fatal disease in nursing puppies associated with minute virus of canines. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 4, 19–22.

Hirasawa T, Kaneshige T & Mikazuki K (1994). Sensitive detection of canine parvovirus DNA by the nested polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology* 41, 135–145.

Ho-Seong C, Jong K & Nam-Yong P (2006). Detection of canine parvovirus in fecal samples using loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18, 81–84.

Hoelzer K, Shackelton L, Holmes E & Parrish C (2008a). Within-Host Genetic Diversity of Endemic and Emerging Parvoviruses of Dogs and Cats. *Journal of Virology* 82(22), 11096.

- Hoelzer K, Shackelton L, Parrish C & Holmes E (2008b). Phylogenetic analysis reveals the emergence, evolution and dispersal of canine parvoviruses. *Journal of General Virology* 89, 2280-2289.
- Hoelzer K & Parrish C (2010). The emergence of parvoviruses of carnivores. *Veterinary Research* 41, 39.
- Horiuchi M, Goto H, Ishiguro N & Shinagawa M (1994). Mapping of determinants of the host range for canine cells in the genome of canine parvovirus using canine parvovirus/mink enteritis virus chimeric viruses. *Journal of General Virology* 75, 1319–1328.
- Huang Y, Tang Q, Rayner S, Gong K, Song B & Liang G (2013). Pathogenicity of rabies viruses isolated in China: two fixed strains and a street strain. *Biomedical and Environmental Sciences* 26(7), 552-561doi: 10.3967/0895-3988.2013.07.006.
- Hueffer K & Parrish C (2003). Parvovirus host range, cell tropism and evolution. *Current Opinion in Microbiology* 6, 392–398.
- Hueffer K, Parker J, Weichert W, Geisel R, Sgro J & Parrish C (2003a). 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, 1718-1726.
- Hueffer K, Govindasamy L, Agbandje-McKenna M & Parrish C (2003b). Combinations of two capsid regions controlling canine host range determine canine transferrin receptor binding by canine and feline parvoviruses. *Journal of Virology* 77, 10099–10105.
- Hughes J, Lohman B, Deckert G, Nichols E, Settles M, Abdo Z & Top E (2012). The role of clonal interference in the evolutionary dynamics of plasmid-host adaptation. *mBio* 3:e00077–e00012.
- Huson D & Bryant D (2006). Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Molecular Biology and Evolution* 23(2), 254-267.
- Isakov O, Bordería A, Golan D, Hamenahem A, Celniker G, Yoffel L, Blanc H, Vignuzzi M & Shomron N (2015). Deep sequencing analysis of viral infection and evolution allows rapid and detailed characterization of viral mutant spectrum. *Bioinformatics* 1–10 doi: 10.1093/bioinformatics/btv101.
- Jenkins G, Rambaut A, Pybus O & Holmes E (2002). Rates of molecular evolution in RNAviruses: a quantitative phylogenetic analysis. *Journal of Molecular Evolution* 54, 156–165.
- Jezyk P, Haskins M & Jones C (1979). Myocarditis of probable viral origin in pups of weaning age. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 174, 1204-1207.
- Kapoor A, Simmonds P, Slikas E, Li L, Bodhidatta L, Sethabutr O, Triki H, Bahri O, Oderinde B, Baba M, Bukbuk D, Besser J, Bartkus J & Delwart E (2010). Human Bocaviruses Are Highly Diverse, Dispersed, Recombination Prone, and Prevalent in Enteric Infections. *Journal of Infectious Diseases* 201(11), 1633-1643 doi: 10.1086/652416.
- Kaur G, Chandra M, Dwivedi P & Sharma N (2015). Isolation of Canine parvovirus with a view to identify the prevalent serotype on the basis of partial sequence analysis. *Veterinary World* 8(1): 52-56.

- Keller T, Wilke C & Bull J (2012). Interactions between evolutionary processes at high mutation rates. *Evolution* 66, 2303–2314.
- Kelly W & Atwell R (1979). Diffuse subacute myocarditis of possible viral aetiology-A cause of sudden death in pups. *Australian Veterinary Journal* 55(1), 36-37 doi: 10.1111/j.1751-0813.1979.tb09549.x.
- Klarmann G, Schaubert C & Preston B (1993). Template-directed pausing of DNA synthesis by HIV-1 reverse transcriptase during polymerization of HIV-1 sequences in vitro. *The Journal of Biological Chemistry* 268, 9793–9802.
- Kumar A, Dharmadheeran J, Kumar S & Thakral S (2004). Strain identification and characterization of VP1 and VP2 gene of canine parvovirus of Indian origin. *Journal of Applied Animal Research* 25, 57–60.
- Kuntz-Simon G, Bashir T, Rommelaere J & Willwand K (1999). Neoplastic Transformation-Associated Stimulation of the In Vitro Resolution of Concatemer Junction Fragments from Minute Virus of Mice DNA. *Journal of Virology* 73(3), 2552-2558.
- Lai, M (1992). RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiological Reviews* 56, 61-79.
- Langeveld J, Casal J, Vela C, Dalsgaard K, Smale S, Puijk W & Melen R (1993). B-cell epitopes of canine parvovirus: distribution on the primary structure and exposure on the viral surface. *Journal of Virology* 67, 765–772.
- Lau S, Woo P, Yip C, Fu C, Huang Y, Chan K, Yuen K & Li K (2011). Co-existence of multiple strains of two novel porcine bocaviruses in the same pig, a previously undescribed phenomenon in members of the family Parvoviridae, and evidence for inter- and intra-host genetic diversity and recombination. *Journal of General Virology* 92, 2047–2059.
- Liu H, Zhang P, Wu P, Chen S, Mu G, Duan X, Hao H, Du E, Wang X & Yang Z (2013). Phylogenetic characterization and virulence of two Newcastle disease viruses isolated from wild birds in China. *Infection, Genetics and Evolution* 20, 215-224 doi: 10.1016/j.meegid.2013.08.021.
- López-Bueno A, Mateu M & Almendral J (2003). High mutant frequency in populations of a DNA virus allows evasion from antibody therapy in an immunodeficient host. *Journal of Virology* 77, 2701-2708.
- López-Bueno A, Villarreal L & Almendral J (2006). Parvovirus Variation for Disease: A Difference with RNA viruses?. In Domingo E (ed.) *Quasispecies: Concepts and Implications for Virology*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Mangeat B, Turelli P, Caron G, Friedli M, Perrin L & Trono D (2003). Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 424, 99–103.
- Manrubia S & Lázaro E (2006). Viral evolution. *Physics of Life Review* 3, 65–92.
- Martella V, Decaro N & Buonavoglia C (2006). Evolution of CPV-2 and importance for antigenic/genetic characterization. *Virus Genes* 33, 11-13.

- Martin D, Biagini P, Lefeuvre P, Golden M, Roumagnac P & Varsani A (2011). Recombination in eukaryotic single stranded DNA viruses. *Viruses* 3, 1699–1738.
- Martin D, Murrell B, Golden M, Khoosal A & Muhire B (2015). RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution* 1 vev003 doi: 10.1093/ve/vev003.
- 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.
- McGeoch D & Gatherer D (2005). Integrating reptilian herpesviruses into the family Herpesviridae. *Journal of Virology* 79, 725–731.
- Menéndez-Arias L (2009). Mutation rates and intrinsic fidelity of retroviral reverse transcriptases. *Viruses* 1, 1137–1165.
- Miranda C, Carvalheira J, Parrish C & Thompson (2015). Factors affecting the occurrence of canine parvovirus in dogs. *Veterinary Microbiology* 180(1-2), 59-64 doi: 10.1016/j.vetmic.2015.08.002.
- Mochizuki M, San Gabriel M, Nakatani H, Yoshida M & Harasawa R (1993). Comparison of polymerase chain reaction with virus isolation, haemagglutination assays for the detection of canine parvoviruses in faecal specimens. *Research in Veterinary Science* 55, 60–63.
- Mochizuki M, Ohshima T, Une Y & Yachi A (2008). Recombination Between Vaccine and Field Strains of Canine Parvovirus is Revealed by Isolation of Virus in Canine and Feline Cell Cultures. *Journal of Veterinary Medical Science* 70(12), 1305–1314.
- Mohan R, Nauriyal D & Singh K (1993). Detection of canine parvovirus in feces, using a parvovirus ELISA test kit. *Indian Veterinary Journal* 70, 301–303.
- Moon H, Lee S, Choi R, Jeoung S, Kim D & Hyun C (2008). Comparison of the pathogenicity in three different Korean canine parvovirus 2 (CPV-2) isolates. *Veterinary Microbiology* 131, 47–56.
- Muzyczka N & Berns K (2001). Parvoviridae: The viruses and Their Replication. In: Knipe D, Howley P (eds) *Fields virology*, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Naeger L, Cater J & Pintel D (1990). The small nonstructural protein (NS2) of the parvovirus minute virus of mice is required for efficient DNA replication and infectious virus production in a cell-type-specific manner. *Journal of Virology* 64, 6166–6175.
- Nandi S, Kumar M, Anbazhagan R, Chidri S & Chauhan R (2007). A sensitive method to detect canine parvoviral DNA in the stool samples by polymerase chain reaction. *Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases* 27, 56–57.
- Nandi S & Kumar M (2010). Canine Parvovirus: Current Perspective. *Indian Journal of Virology* 21(1), 31–44 doi 10.1007/s13337-010-0007-y.
- Nivy R, Hahn S, Perl S, Karnieli A, Karnieli O & Aroch I (2015). A Fatal Outbreak of Parvovirus Infection: First Detection of Canine Parvovirus Type 2c in Israel with Secondary Escherichia coli Septicemia and Meningoencephalitis. *Israel Journal of Veterinary Medicine* 66(3), 96 – 102.

- O'Hara P, Nichol S, Horodyski F & Holland J (1984). Vesicular stomatitis virus defective interfering particles can contain extensive genomic sequence rearrangements and base substitutions. *Cell* 36, 915–924.
- Ohshima T & Mochizuki M (2009). Evidence for Recombination Between Feline Panleukopenia Virus and Canine Parvovirus Type 2. *Journal of Veterinary Medical Science* 71(4), 403–408.
- Palermo L, Hueffer K & Parrish C (2003). Residues in the apical domain of the feline and canine transferrin receptors control host-specific binding and cell infection of canine and feline parvoviruses. *Journal of Virology* 77(16), 8915-8923.
- Park SA, Park S-Y, Song C-S, Song C-S, Choi I-S, Kim HY, Lee J-B & Lee NH (2012). Development of a novel vaccine against canine parvovirus infection with a clinical isolate of the type 2b strain. *Clinical and Experimental Vaccine Research*. 1(1), 70-76 doi:10.7774/cevr.2012.1.1.70.
- Parker J & Parrish C (1997). Canine parvovirus host range is determined by the specific conformation of an additional region of the capsid. *Journal of Virology* 71, 9214–9222.
- Parker J, Murphy W, Wang D, O'Brien S & Parrish C (2001). Canine and Feline Parvoviruses Can Use Human or Feline Transferrin Receptors To Bind, Enter, and Infect Cells. *Journal of Virology* 75(8), 3896-3902 doi:10.1128/JVI.75.8.3896-3902.2001.
- Parrish C, Aquadro C & Carmichael L (1988). Canine host range and a specific epitope map along with variant sequences in the capsid protein gene of canine parvovirus and related feline, mink and racoon parvoviruses. *Virology* 166, 293–307.
- Parrish C, Aquadro C, Strassheim M, Evermann J, Sgro J & Mohammed H (1991). Rapid antigenic-type replacement and DNA and sequence evolution of canine parvovirus. *Journal of Virology* 65, 6544–6552.
- Parrish C & Kawaoka Y (2005). The origins of new pandemic viruses: The acquisition of new host range by Canine Parvovirus and Influenza A viruses. *Annual Review of Microbiology* 59, 553 – 586.
- Pathak V & Temin H (1992). 5-azacytidine and RNA secondary structure increase the retrovirus mutation rate. *Journal of Virology* 66, 3093–3100.
- Pereira C, Monezi T, Mehnert D, D'Angelo M & Durigon E (2000). Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by PCR. *Veterinary Microbiology* 75, 127–133.
- 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, 147-152.
- 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, Calleros L, Marandino A, Sarute N, Iraola G, Grecco S, Blanc H, Vignuzzi M, Isakov O, Shomron N, Carrau L, Hernández M, Francia L, Sosa K, Tomás G, & Panzera Y (2014). Phylogenetic and Genome-Wide Deep-Sequencing Analyses of Canine Parvovirus Reveal Co-Infection with Field Variants and Emergence of a Recent Recombinant Strain. *PLoS ONE* 9(11): e111779.

- Pita J, De Miranda J, Schneider W & Roossinck M (2007). Environment determines fidelity for an RNA virus replicase. *Journal of Virology* 81, 9072–9077.
- Pollock R (1982). Experimental canine parvovirus infection in dogs. *Cornell Veterinary* 72, 103–119.
- Rabinowitz J, Xiao W & Samulski R (1999). Insertional mutagenesis of AAV2 capsid and the production of recombinant virus. *Virology* 265, 274–285.
- Ramadass P & Khadher T (1982). Diagnosis of canine parvovirus infection by agar gel precipitation test and fluorescent antibody techniques. *Cherion* 11, 323–328.
- Raynes Y, Gazzara M & Sniegowski P (2012). Contrasting dynamics of a mutator allele in asexual populations of differing size. *Evolution* 66, 2329–2334.
- Reed A, Jones E & Miller T (1988). Nucleotide sequence and genome organization of Canine parvovirus. *Journal of Virology* 62, 299-276.
- Roberts J, Bebenek K & Kunkel T (1988). The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* 242, 1171–1173.
- Robinson W, Huxtable C & Howell J (1979). Clinical and electrocardiographic findings in suspected viral myocarditis of puppies. *Australian Veterinary Journal* 55(8), 351-355.
- Robinson W, Wilcox G & Flower R (1980). Canine parvovirus disease: experimental reproduction of the enteric form with a parvovirus isolated from a case of myocarditis. *Veterinary Pathology* 17, 589-599.
- Sarker S, Patterson E, Peters A, Baker G, Forwood J, Ghorashi S, Holdsworth M, Baker R, Murray N & Raidal S (2014). Mutability Dynamics of an Emergent Single Stranded DNA Virus in a Naïve Host. *PLoS One* 9(1), e85370doi: 10.1371/journal.pone.0085370.
- Schunck B, Kraft W & Truyen U (1995). A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in feces. *Journal of Virological Methods* 55, 427–433.
- Seronello S, Montanez J, Presleigh K, Barlow M, Park S & Choi, J (2011). Ethanol and reactive species increase basal sequence heterogeneity of hepatitis C virus and produce variants with reduced susceptibility to antivirals. *PLoS One* 6: e27436.
- Shackelton L, Parrish C, Truyen U & Holmes E (2005). High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 379–384.
- Shackelton L, Hoelzer K, Parrish C & Holmes E (2007). Comparative analysis reveals frequent recombination in the parvoviruses. *Journal of General Virology* 88, 3294–3301.
- Shadan F & Villarreal L (1993). Co-evolution of persistently infecting small DNA viruses and their hosts linked to host-interactive regulatory domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 4117–4121.
- Simon-Loriere E & Holmes E (2011). Why do RNA viruses recombine?. *Nature Reviews Microbiology* 9(8), 617-626.

- Spitzer A, Parrish C & Maxwell I (1997). Tropic determinant for Canine Parvovirus and Feline Panleukopenia virus functions through the capsid protein VP2. *Journal of General Virology* 78, 925-928.
- Steinel A, Munson L, Van Vuuren M & Truyen U (2000). Genetic characterization of Feline parvovirus sequences from various carnivores. *Journal of General Virology* 81, 345-350.
- Swiss Institute of Bioinformatics (2015). Viral Zone: Protoparvovirus. Disponible: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/199.html Acceso 19 de Abril de 2015.
- Szathmáry E (1992). Natural selection and dynamical coexistence of defective and complementing virus segments. *Journal of Theoretical Biology* 157, 383-406.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A & Kumar S (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725-2729.
- Tattersall P (1972). Replication of the parvovirus MVM I. Dependence of virus multiplication and plaque formation on cell growth. *Journal of Virology* 10(4), 586-590.
- Truyen U, Evermann J, Vieler E & Parrish C (1996). Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range. *Virology* 215, 186-189.
- 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 A0106.0100.
- Tsao J, Chapman N, Agbandje M, Keller W, Smith K, Wu H, Luo M, Smith T, Rossmann M, Compans R & Parrish C (1991). The three dimensional structure of Canine Parvovirus and its functional implications. *Science* 251, 1456 - 1464.
- Tullis G, Burger L & Pintel D (1993). The minor capsid protein VP1 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is dispensable for encapsidation of progeny single-stranded DNA but is required for infectivity. *Journal of Virology* 67, 131-141.
- Url A, Truyen U, Rebel-Bauder B, Weissenböck H & Schmidt P (2003). Evidence of Parvovirus Replication in Cerebral Neurons of Cats. *Journal of Clinical Microbiology* 41(8), 3801-3805 doi: 10.1128/JCM.41.8.3801-3805.2003.
- Uwatoko K, Sunairi M, Nakajima M & Yamaura K (1995). Rapid method utilizing the polymerase chain reaction for detection of canine parvovirus in feces of diarrheic dogs. *Veterinary Microbiology* 43, 315-323.
- Van Loy T, Thys K, Tritsmans L & Stuyver L (2013). Quasispecies Analysis of JC Virus DNA Present in Urine of Healthy Subjects. *PLoS One* 8(8), e70950.
- Vieira J, Silva E, Desario C, Decaro N, Carvalheira J, Buonavoglia C & Thompson G (2008). Natural Co-infection with 2 Parvovirus Variants in Dog. *Emerging Infectious Diseases* 14(4), 678-679.
- Vignuzzi M, Stone J, Arnold J, Cameron C & Andino R (2006). Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* 439, 344-348.

Vihinen-Ranta M, Kalela A, Mäkinen P, Kakkola L, Marjomäki V & Vuento M (1998). Intracellular Route of Canine Parvovirus Entry. *Journal of Virology* 72(1), 802-806.

Vihinen-Ranta M, Suikkanen S & Parrish C (2004). Pathways of Cell Infection by Parvoviruses and Adeno-Associated Viruses. *Journal of Virology* 78(13), 6709–6714 doi: 10.1128/JVI.78.13.6709–6714.2004.

Walsh C & Xu G (2006). Cytosine methylation and DNA repair. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 301, 283–315.

Wang D, Yuan W, Davis I & Parrish C (1998). Nonstructural protein-2 and the replication of canine parvovirus. *Virology* 240, 273-281.

Wang J, Cheng S, Yi L, Cheng Y, Yang S, Xu H, Zhao H, Yan X & Wu H (2012). Evidence for natural recombination between mink enteritis virus and canine parvovirus. *Virology Journal* 9, 252.

Weesendorp E, Morgan S, Stockhofe-Zurwieden N, Popma-De Graaf D, Graham S & Rebel J (2013). Comparative analysis of immune responses following experimental infection of pigs with European porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of differing virulence. *Veterinary Microbiology* 163(1-2), 1-12doi: 10.1016/j.vetmic.2012.09.013.

Worobey M & Holmes E (1999). Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *Journal of General Virology* 80(10), 2535-2543.

Xu Y & Price B (2011). Chromatin dynamics and the repair of DNA double strand breaks. *Cell Cycle* 10, 261–267.

Yang D, Kang K, Jo H, Kim H, Choi S & Song J (2015). Isolation and identification of canine parvovirus type 2b in Korean dogs. *Korean Journal of Veterinary Research* 55(3), 163-167.

Zhao H, Wang J, Jiang Y, Cheng Y, Lin P, Zhu H, Han G, Yi L, Zhang S, Guo L & Cheng S (2015). Typing of Canine Parvovirus Strains Circulating in North-East China. *Transboundary and Emerging Diseases* doi: 10.1111/tbed.12390.

Zhong Z, Liang L, Zhao J, Xu X, Cao X, Liu X, Zhou Z, Ren Z, Shen L, Geng Y, Gu X & Peng G (2014). First Isolation of New Canine Parvovirus 2a from Tibetan Mastiff and Global Analysis of the Full-Length VP2 Gene of Canine Parvoviruses 2 in China. *International Journal of Molecular Sciences* 15(7), 12166-12187 doi:10.3390/ijms150712166.

Anexo I

Archivos Excel con los datos crudos de secuenciación profunda para cada una de las 15 muestras analizadas.

Link en Dropbox:

<https://www.dropbox.com/sh/xeymwtbtd4jkwg/AABMv7nKsnXJSWZwVPS7iVB3a?dl=0>

Anexo II – Secuencias consenso de las muestras analizadas por secuenciación profunda

Alineamiento de todas las secuencias consenso determinadas en este trabajo con el programa MEGA 6 (Tamura et al., 2014).

Link en Dropbox:

https://www.dropbox.com/sh/jv61ya6e6x8ugvb/AAD14kj6ZK5TSEOAnd_sAa65a?dl=0

Anexo III – Tabla de cambios mayoritarios para las 15 muestras analizadas por secuenciación profunda

Tabla 40 – Tabla donde se indican todos los cambios generados por variantes nucleotídicas (entre 3% y 49%), discriminados por muestra y gen. Se indica el número de cambios sinónimos, número de cambios no sinónimos, cambio aminoacídico generado y su posición en la proteína, frecuencia y posición en el cds. Aquellos cambios que se repiten en más de una muestra se resaltan en el mismo color.

Muestra	Gen	Numero de cambios sinónimos	Numero de cambios no sinónimos	Cambio aminoacídico	Frecuencia	Posición
CPV 247	ns1	1	5	283 V>E	3,10%	848
				389 Q>L	3,30%	1166
				476 Q>L	3,50%	1427
				630 L>F	6,90%	1888
				632 V>D	3,40%	1895
	ns2	1	2	139 T>I	6,90%	1888
				140 W>R	7,20%	1890
	vp1	4	4	33 N>I	7,00%	2183
				96 L>*	3,30%	2372
				120 H>Q	9,90%	2445
121 I>N				4,10%	2447	
vp2	2	0				
CPV 260	ns1	1	6	266 V>E	3,10%	797
				283 V>E	3,10%	848
				389 Q>L	3,60%	1166
				476 Q>L	3,90%	1427
				630 L>F	6,40%	1888
				632 V>D	3,70%	1895
	ns2	1	2	139 T>I	6,40%	1888
				140 W>R	7,90%	1890
	vp1	1	9	3 P>S	9,40%	2020
				33 N>I	7,50%	2183
				59 Y>N	3,00%	2260
				96 L>*	3,50%	2372
				120 H>Q	9,60%	2445
121 I>N				4,50%	2447	
168 N>I				3,10%	2588	
vp2	4	1	25 N>I	3,10%	2588	

Muestra	Gen	Numero de cambios sinónimos	Numero de cambios no sinónimos	Cambio aminoacídico	Frecuencia	Posición
CPV 290	ns1	5	6	266 V>E	3,00%	797
				283 V>E	3,00%	848
				389 Q>L	3,20%	1166
				476 Q>L	3,40%	1427
				630 L>F	4,10%	1888
				632 V>D	3,60%	1895
	ns2	0	3	132 C>S	3,10%	1866
				139 T>I	4,10%	1888
				140 W>R	7,60%	1890
	vp1	8	9	33 N>I	6,40%	2183
				96 L>*	3,80%	2372
				120 H>Q	9,30%	2445
				121 I>N	4,80%	2447
				124 N>K	3,20%	2457
				140 N>k	3,10%	2505
				156 P>S	4,40%	2551
				168 N>I	3,20%	2588
715 V>I				3,00%	4228	
25 N>I				8,90%	2588	
572 V>I	3,00%	4228				
CPV 347	ns1	1	6	266 V>E	3,20%	797
				283 V>E	3,20%	848
				389 Q>L	3,30%	1166
				476 Q>L	3,80%	1427
				630 L>F	10,20%	1888
				632 V>D	4,50%	1895
	ns2	1	2	139 T>I	10,50%	1888
				140 W>R	13,00%	1890
	vp1	7	5	33 N>I	5,70%	2183
				95 V>E	3,20%	2369
				96 L>*	4,20%	2372
				120 H>Q	9,60%	2445
				121 I>N	4,10%	2447
vp2	2	0				
CPV 382	ns1	2	5	266 V>E	3,20%	797
				283 V>E	3,30%	848

Muestra	Gen	Numero de cambios sinónimos	Numero de cambios no sinónimos	Cambio aminoacídico	Frecuencia	Posición
				389 Q>L	3,80%	1166
				630 L>F	6,90%	1888
				632 V>D	3,70%	1895
	ns2	1	2	139 T>I	7,00%	1888
				140 W>R	8,00%	1890
	vp1	9	8	33 N>I	6,90%	2183
				95 V>E	3,10%	2369
				96 L>*	3,60%	2372
				120 H>Q	10,20%	2445
				121 I>N	5,10%	2447
				124 N>K	3,30%	2457
				125 L>H	3,30%	2459
	vp2	4	1	168 N>I	3,30%	2588
				25 N>I	3,40%	2588
CPV 383	ns1	2	8	266 V>E	3,10%	797
				283 V>E	3,20%	848
				333 L>*	3,10%	998
				351 N>K	5,10%	1053
				389 Q>L	3,20%	1166
				476 Q>L	4,20%	1427
				630 L>F	8,00%	1888
				632 V>D	4,40%	1895
	ns2	1	2	135 T>A	5,80%	1875
				139 T>I	8,00%	1888
	vp1	7	10	33 N>I	6,90%	2183
				96 L>*	3,60%	2372
				120 H>Q	9,90%	2445
				121 I>N	4,70%	2447
				124 N>K	3,60%	2457
				125 L>H	3,50%	2459
				150 Q>H	3,20%	2535
				168 N>I	4,10%	2588
				189 N>Y	3,10%	2650
	vp2	1	4	241 L>F	3,00%	2808
7 Q>H				3,20%	2535	

Muestra	Gen	Numero de cambios sinónimos	Numero de cambios no sinónimos	Cambio aminoacídico	Frecuencia	Posición		
CPV 389				25 N>I	4,10%	2588		
				46 N>Y	3,10%	2650		
				98 L>F	3,00%	2808		
	ns1	3	9	266 V>E	3,20%	797		
				283 V>E	3,20%	848		
				387 N>D	9,40%	1159		
				389 Q>L	3,30%	1166		
				476 Q>L	3,80%	1427		
				518 C>W	9,40%	1554		
				551 Y>C	9,40%	1652		
				632 V>D	3,10%	1895		
				635 K>R	9,40%	1904		
		ns2	2	3	129 C>S	3,00%	1857	
					132 W>R	3,20%	1866	
					140 W>R	5,10%	1890	
		vp1	9	12	8 A>S	9,40%	2035	
					33 N>I	5,50%	2183	
					96 L>*	3,70%	2372	
					120 H>Q	9,50%	2445	
					121 I>N	4,50%	2447	
					124 N>K	3,10%	2457	
	140 N>k				3,10%	2505		
	150 Q>H				3,00%	2535		
	168 N>I				3,30%	2588		
	189 N>Y				3,10%	2650		
	241 L>F				3,00%	2808		
569 N>K	3,40%				3792			
vp2	4				5	7 Q>H	3,00%	2535
						25 N>I	3,30%	2588
		46 N>Y	3,10%	2650				
		98 L>F	3,00%	2808				
		426 N>K	3,40%	3792				
CPV 405	ns1	1	5	266 V>E	3,30%	797		
				283 V>E	3,30%	848		
				333 L>*	3,00%	998		

Muestra	Gen	Numero de cambios sinónimos	Numero de cambios no sinónimos	Cambio aminoacídico	Frecuencia	Posición			
				389 Q>L	3,60%	1166			
				476 Q>L	4,00%	1427			
				ns2	0	1	140 W>R	4,80%	1890
				vp1	7	7	33 N>I	6,70%	2183
							96 L>*	3,70%	2372
							120 H>Q	8,90%	2445
							121 I>N	4,10%	2447
							140 N>K	3,10%	2505
							168 N>I	3,20%	2588
							189 N>Y	3,00%	2650
				vp2	2	2	25 N>I	3,20%	2588
							46 N>Y	3,00%	2650
CPV 409	ns1	2	8	266 V>E	3,00%	797			
				283 V>E	3,40%	848			
				389 Q>L	3,10%	1166			
				476 Q>L	3,40%	1427			
				630 L>F	9,00%	1888			
				654 F>I	3,20%	1960			
				659 L>*	4,00%	1976			
				667 L>M	3,00%	1999			
	ns2	0	4	132 C>S	3,10%	1866			
				139 T>I	9,00%	1888			
				163 L>H	3,20%	1960			
				166 *>R	3,20%	1968			
	vp1	10	7	58 L>*	3,10%	2258			
				59 Y>N	3,40%	2260			
				77 W>R	3,10%	2314			
				120 H>Q	7,00%	2445			
				189 N>Y	3,00%	2650			
				241 L>F	3,10%	2808			
				283 S>C	3,00%	2932			
	vp2	6	3	46 N>Y	3,00%	2650			
				98 L>F	3,10%	2808			
				140 S>C	3,00%	2932			
	CPV 410	ns1	1	8	266 V>E	3,40%	797		
					283 V>E	3,40%	848		

Muestra	Gen	Numero de cambios sinónimos	Numero de cambios no sinónimos	Cambio aminoacídico	Frecuencia	Posición
				389 Q>L	8,20%	1888
				476 Q>L	3,60%	1427
				630 L>F	8,20%	1888
				643 W>R	3,10%	1927
				654 F>I	3,40%	1960
				659 L>*	3,90%	1976
	ns2	0	4	139 T>I	8,20%	1888
				152 V>E	3,10%	1927
				163 L>H	3,40%	1960
				166 *>R	3,10%	1968
	vp1	10	8	58 L>*	3,30%	2258
				59 Y>N	3,40%	2260
				96 L>*	3,30%	2372
				120 H>Q	7,60%	2445
				121 I>N	3,30%	2447
				181 V>E	3,20%	2627
				283 S>C	3,00%	2932
				467 I>L	12,70%	3484
	vp2	6	3	38 V>E	3,20%	2627
				140 S>C	3,00%	2932
				324 I>L	12,70%	3484
CPV 426	ns1	1	7	266 V>E	3,20%	797
				283 V>E	3,40%	848
				389 Q>L	3,20%	1166
				476 Q>L	3,80%	1472
				630 L>F	12,00%	1888
				654 F>I	3,20%	1960
				659 L>*	4,00%	1976
				139 T>I	11,80%	1888
	ns2	0	3	163 L>H	3,20%	1960
				166 *>R	3,10%	1968
				58 L>*	3,60%	2258
	vp1	9	5	59 Y>N	3,50%	2260
				120 H>Q	7,00%	2445
				241 L>F	3,40%	2808
				283 S>C	3,30%	2932

Muestra	Gen	Numero de cambios sinónimos	Numero de cambios no sinónimos	Cambio aminoacídico	Frecuencia	Posición
	vp2	5	2	98 L>F	3,40%	2808
				140 S>C	3,30%	2932
CPV 443	ns1	2	5	67 M>K	3,00%	200
				266 V>E	3,30%	797
				283 V>E	3,60%	848
				598 T>S	3,30%	1792
				613 S>R	3,10%	1839
	ns2	0	3	67 M>K	3,00%	200
				107 N>I	3,30%	1792
				123 Y>N	3,10%	1839
	vp1	11	10	33 N>I	3,10%	2183
				95 V>E	3,40%	2369
				96 L>*	3,20%	2372
				120 H>Q	6,90%	2445
				121 I>N	3,60%	2447
				140 N>K	3,30%	2505
				187 T>S	3,30%	2644
				189 N>Y	3,10%	2650
				479 V>D	3,00%	3251
	vp2	6	4	44 T>S	3,30%	2644
				46 N>Y	3,10%	2650
				336 V>D	3,00%	3251
426 N>K				3,50%	3792	
CPV 453	ns1	1	7	26 F>V	9,40%	76
				27 S>*	9,40%	80
				283 V>E	3,20%	848
				389 Q>L	3,20%	1166
				476 Q>L	3,10%	1427
				630 L>F	3,60%	1888
				632 V>D	3,80%	1895
	ns2	1	4	26 F>V	9,40%	76
				27 S>*	9,40%	80
				139 T>I	3,60%	1888
				140 W>R	7,70%	1890
	vp1	9	9	33 N>I	6,60%	2183

Muestra	Gen	Numero de cambios sinónimos	Numero de cambios no sinónimos	Cambio aminoacídico	Frecuencia	Posición
				96 L>*	3,60%	2372
				120 H>Q	10,00%	2445
				121 I>N	4,90%	2447
				124 N>K	3,40%	2457
				125 L>H	3,30%	2459
				168 N>I	3,30%	2588
				348 P>T	4,50%	3127
				569 N>K	3,40%	3792
	vp2	4	3	25 N>I	3,30%	2588
	vp2	4	3	205 P>T	4,50%	3127
	vp2	4	3	426 N>K	3,40%	3792

ANEXO IV: Publicaciones

1. Pérez R, Calleros L, Marandino A, Sarute N, Iraola G, Grecco S, Blanc H, Vignuzzi M, Isakov O, Shomron N, Carrau L, Hernández M, Francia L, Sosa K, Tomás G & Panzera Y (2014). Phylogenetic and Genome-Wide Deep-Sequencing Analyses of Canine Parvovirus Reveal Co-Infection with Field Variants and Emergence of a Recent Recombinant Strain. *PLoS ONE*, 9(11), e111779.

Abstract: Canine parvovirus (CPV), a fast-evolving single-stranded DNA virus, comprises three antigenic variants (2a, 2b, and 2c) with different frequencies and genetic variability among countries. The contribution of co-infection and recombination to the genetic variability of CPV is far from being fully elucidated. Here we took advantage of a natural CPV population, recently formed by the convergence of divergent CPV-2c and CPV-2a strains, to study co-infection and recombination. Complete sequences of the viral coding region of CPV-2a and CPV-2c strains from 40 samples were generated and analyzed using phylogenetic tools. Two samples showed co-infection and were further analyzed by deep sequencing. The sequence profile of one of the samples revealed the presence of CPV-2c and CPV-2a strains that differed at 29 nucleotides. The other sample included a minor CPV-2a strain (13.3% of the viral population) and a major recombinant strain (86.7%). The recombinant strain arose from inter-genotypic recombination between CPV-2c and CPV-2a strains within the VP1/VP2 gene boundary. Our findings highlight the importance of deep-sequencing analysis to provide a better understanding of CPV molecular diversity.