

Diagnóstico y caracterización genética de parvovirus canino en Uruguay durante 2012 y 2013

Sofía Grecco Patiño

Tesina de grado de la Licenciatura en
Bioquímica

Sección Genética Evolutiva, Facultad de
Ciencias, Universidad de la República.

Orientador: Dr. Ruben Pérez

Co-orientadora: Mag. Lucía Calleros

2014

ÍNDICE

1.	RESUMEN	4
2.	INTRODUCCIÓN	5
2.1.	Familia <i>Parvoviridae</i>	5
2.2.	El parvovirus canino tipo 2, estructura y características.....	6
2.2.1.	Genoma	6
2.2.2.	Ciclo viral	7
2.2.3.	Proteínas virales, expresión y funciones	7
2.3.	Formación y estructura de la cápside viral	9
2.4.	Parvovirus canina, aspectos clínicos y diagnóstico.....	12
2.5.	Origen, evolución y variabilidad	14
3.	OBJETIVOS	19
3.1.	Objetivo General	19
3.2.	Objetivos Específicos	19
4.	ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN	20
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
5.1.	Diagnóstico de cepas de parvovirus canino en Uruguay	21
5.1.1.	Muestras analizadas	21
5.1.2.	Extracción de ADN viral	26
5.1.3.	Amplificación por PCR	26
5.2.	Genotipificación de CPV	27
5.2.1.	Caracterización por RFLP	27
5.2.2.	Secuenciación	29
5.3.	Análisis bioinformáticos comparativos y filogenéticos	30
5.4.	Análisis estadísticos de los datos epidemiológicos	31
6.	RESULTADOS	32
6.1.	Diagnóstico y caracterización de parvovirus canino en muestras fecales	32
6.1.1.	Detección del virus	32
6.1.2.	Genotipificación de las muestras por RFLP	32
6.2.	Secuenciación, genotipificación y análisis comparativos	33
6.3.	Análisis filogenéticos	34
6.4.	Datos epidemiológicos y su relación con la variante CPV	36
7.	DISCUSIÓN.....	40
8.	CONCLUSIONES	47

9.	PERSPECTIVAS	48
10.	BIBLIOGRAFÍA	49
11.	AGRADECIMIENTOS.....	56

1. RESUMEN

La parvovirus canina es una de las infecciones más comunes en canes de entre seis y doce semanas de edad. Esta enfermedad, causada por el parvovirus canino de tipo 2 (CPV), provoca cuadros graves de gastroenteritis hemorrágica y tiene una alta tasa de mortalidad. CPV es un virus autónomo de ADN simple hebra de 5,2 kb, de polaridad negativa, cuyo genoma codifica proteínas de cápside (VP1 y VP2) y proteínas no-estructurales (NS1 y NS2). Actualmente existen tres variantes de CPV distribuidas mundialmente en distinta proporción y con diferentes características genéticas, no existiendo una explicación clara de los mecanismos que generan y mantienen la variabilidad en las distintas poblaciones caninas. La clasificación de las variantes se basa en el aminoácido presente en la posición 426 de la proteína VP2: Asn (2a), Asp (2b) y Glu (2c). En Uruguay, CPV-2c fue la variante prevalente durante 2006-2010. A mediados del 2010, la población canina uruguaya fue invadida por una cepa CPV-2a de origen asiático. En este trabajo se analizaron muestras fecales de perros con síntomas presuntivos de parvovirus canina obtenidas durante el 2012 y 2013 en Uruguay. Para la clasificación se utilizó un sistema de PCR-RFLP que distingue rápidamente las variantes 2c. Se analizaron 100 muestras fecales, 88 fueron positivas para CPV, siendo 18 clasificadas como 2c y 70 como no-2c. Se secuenció el lazo GH de la proteína de cápside VP2 de 10 muestras no-2c. Se determinó que tenían el aminoácido asparagina en la posición 426, por lo que se clasificaron como CPV-2a. Además, se analizó la variabilidad genética de las cepas y se las comparó con cepas encontradas en años anteriores en el país y en el resto del mundo, para poder establecer la dinámica poblacional de CPV circulante en Uruguay. Se observaron cambios en la frecuencia de las variantes circulantes: la cepa 2c ha disminuido su frecuencia y prácticamente desaparecido en 2013 como consecuencia de la expansión de la variante 2a. Se analizaron los datos clínicos e información aportada por los veterinarios para establecer su posible correlación con las variantes circulantes. Nuestros hallazgos indican que cepas de campo de parvovirus continúan siendo la principal causa de gastroenteritis hemorrágica en cachorros. La severidad de la enfermedad parece mantenerse independientemente de la variante circulante. Desde el punto de vista evolutivo, los resultados indican que Uruguay presenta un escenario epidemiológico único caracterizado por dos eventos de invasión y reemplazo por cepas que se originaron en diferentes continentes.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Familia *Parvoviridae*

La familia *Parvoviridae* (del latín *parvo*: pequeño) está formada por virus pequeños, isométricos y no envueltos, que poseen un genoma simple hebra de ADN lineal. Cada virión contiene una única molécula genómica de entre 4 y 6 kilobases (kb) que se encapsida en un único sentido (negativo) o en ambos, dependiendo del virus. El genoma de los parvovirus es de los más pequeños en los virus ADN, lo que condiciona su ciclo de vida (Berns 1990). Este pequeño tamaño genómico implica una reducción de las dimensiones del virión (aproximadamente 280 Å de diámetro), permitiendo que el mismo sea importado intacto al núcleo a través de los poros nucleares de la célula infectada (Kerr et al. 2006). El genoma posee dos marcos abiertos de lectura (ORFs) que codifican proteínas no estructurales (NS) y estructurales (VPs) (Lukashov et al. 2001).

La familia *Parvoviridae* se divide en dos subfamilias dependiendo del rango de hospedero que infecta: *Parvovirinae*, que infecta vertebrados, y *Densovirinae*, que infecta insectos y otros artrópodos (Lukashov et al. 2001). Dentro de la subfamilia *Densovirinae* se encuentran cuatro géneros: *Brevidensovirus*, *Densovirus*, *Iteravirus* y *Pefudensovirus*. La subfamilia *Parvovirinae* se divide en cinco géneros definidos en base a análisis filogenéticos (Figura 1): *Parvovirus*, donde se agrupan la mayoría de los parvovirus que infectan vertebrados, *Amdovirus*, *Bocavirus*, *Dependovirus*, y *Erythrovirus* (Lukashov et al. 2001; Cotmore et al. 2007; Kerr et al. 2006).

Los virus pertenecientes al género *Parvovirus* infectan una amplia variedad de mamíferos: cerdos, varios roedores y algunos miembros del orden Carnívora. Estos últimos son infectados por tres parvovirus autónomos muy relacionados entre sí, el parvovirus canino de tipo 2 (CPV-2, CPV), el virus de la panleucopenia felina (FPV) y el virus de la enteritis del visón (Hoelzer et al. 2010).

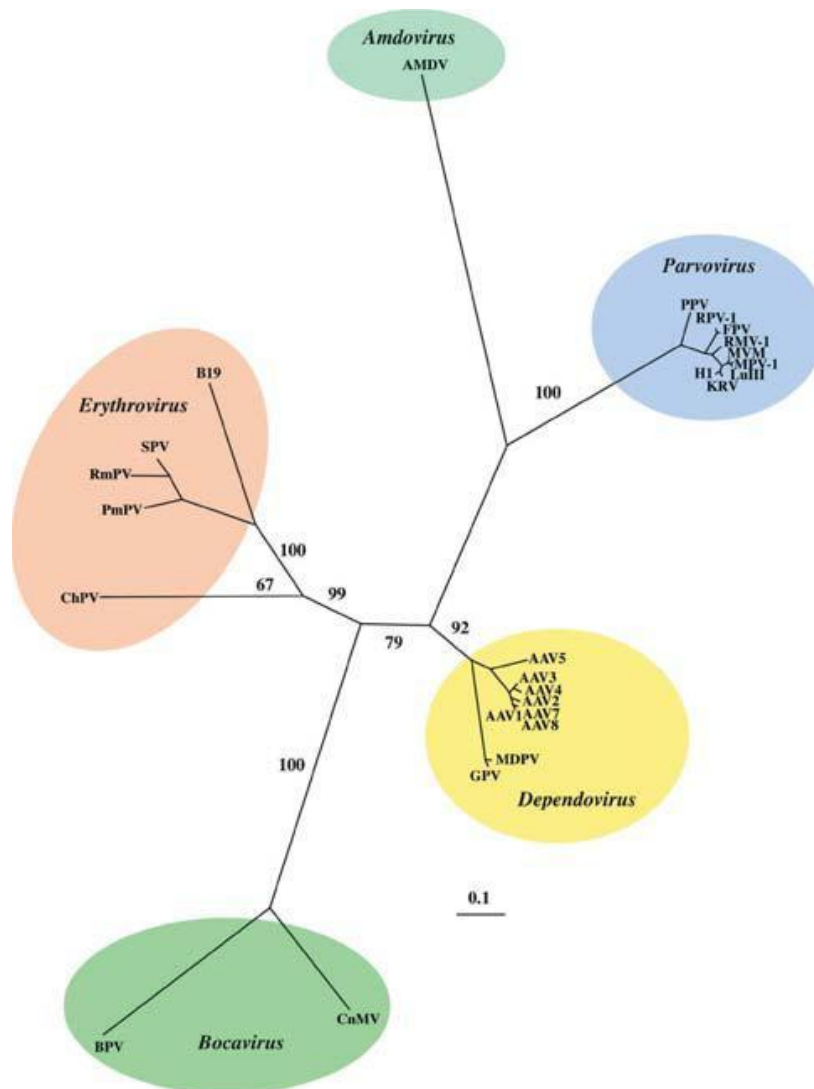


Figura 1. Relaciones filogenéticas entre los genes no estructurales de los miembros de la subfamilia *Parvovirinae*. El árbol filogenético fue construido por Z. Zadori y P. Tijssen usando programas incluidos en el paquete PHYLIP (Kerr et al. 2006).

2.2. El parvovirus canino tipo 2, estructura y características

2.2.1. Genoma

CPV tiene un genoma de polaridad negativa y aproximadamente 5,2 kb de largo, con dos ORFs. El ORF del extremo 3' (izquierda del genoma) codifica las proteínas no estructurales NS1 y NS2, mientras que el ORF del extremo 5' (derecha del genoma) codifica para las proteínas estructurales VP1 y VP2 que conforman la cápside del virión (Reedet al. 1988; Berns 1990) (Figura 2). El genoma tiene además secuencias palindrómicas no codificantes en sus extremos 5' y 3', que forman horquillas que funcionan como cebadores para la replicación del ADN y el mantenimiento de la integridad de las secuencias terminales (Berns 1990).

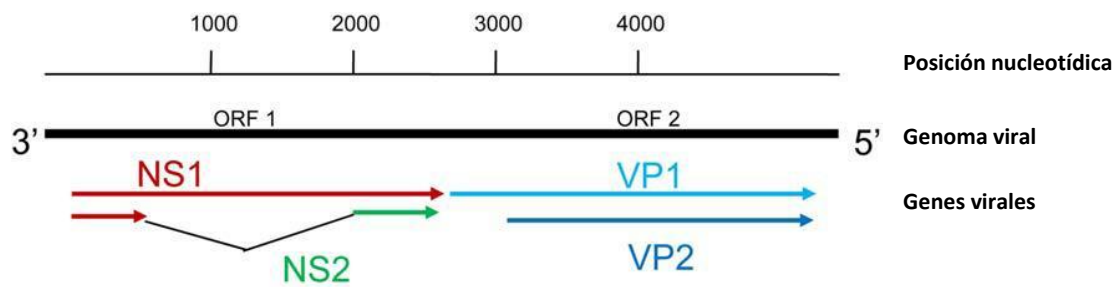


Figura 2. Esquema del genoma de parvovirus canino. Se indican las posiciones nucleotídicas, marcos abiertos de lectura (ORFs) y las proteínas codificadas (modificado de Hoelzer et al. 2008).

2.2.2. Ciclo viral

El ingreso del virus a la célula huésped ocurre mediante la interacción de las proteínas de la cápside con el receptor celular de la transferrina (TfR). Este complejo es internalizado por endocitosis en vesículas recubiertas por clatrina y transportado por vías endosomales hasta localizaciones perinucleares (Harbison et al. 2009). La cápside es liberada de la vesícula endocítica al citosol, siendo transportada al núcleo por microtúbulos y por la proteína motora dineína. Debido a su pequeño tamaño, el virus pasaría a través del poro nuclear y entraría intacto para iniciar el ciclo replicativo (Vihinen-Ranta et al. 2004).

2.2.3. Proteínas virales, expresión y funciones

CPV emplea diversas estrategias de regulación para la expresión de sus proteínas, como la utilización de diferentes promotores, el uso de diferentes sitios donadores y aceptores de empalme, la utilización de codones de inicio no canónicos, y el clivaje proteolítico (Berns 1990). Cuando la célula infectada entra en fase S, la horquilla ubicada en el extremo 3' del genoma actúa como cebador para la síntesis de la hebra complementaria de ADN, generando un dúplex para realizar la transcripción viral (Cotmore et al. 2007). A partir de los promotores, denominados P4 y P38, se transcriben los ARN para las proteínas NS1 y NS2 y las VP1 y VP2, respectivamente. Estos transcritos originan por empalme alternativo los ARN mensajeros (ARNm) correspondientes (Wang et al. 1998).

En el caso del ARNm que produce las proteínas NS, ocurre un corte y empalme diferencial, eliminando un intrón, lo que genera un cambio en la traducción del ORF de NS2 (Figura 2), por lo que se obtienen proteínas que comparten idéntica secuencia en

el extremo N-terminal y difieren en la secuencia del extremo C-terminal (Hoelzer et al. 2008).

NS1 es la proteína no estructural mayoritaria y posee múltiples funciones relacionadas con la citotoxicidad, la regulación transcripcional y la iniciación de la replicación del ADN viral. En particular, NS1 actúa como factor en trans, activando al promotor P38 que controla la expresión de los genes que codifican para las proteínas de cápside (Nüesch et al. 1998). Además, NS1 estimula su propia expresión a partir del promotor P4 mediante interacción con los repetidos terminales y amplificación de ADN (Hanson et al. 1991). También es blanco de fosforilación por miembros de la familia de las protein quinasas C, modificación necesaria para que la proteína NS1 tenga actividad helicasa y ATPasa (Nuesch et al. 1998).

Las funciones y propiedades de NS2 son menos conocidas, y no se le ha atribuido una función enzimática intrínseca específica. Interacciona con proteínas celulares asociadas y sufre, como NS1, modificaciones postraduccionales como fosforilaciones. Se la vincula con funciones de control de tráfico nuclear y citoplasmático, ya que interacciona con el factor de exportación nuclear CRM1 (Daeffler et al. 2003).

La formación de VP1 y VP2 ocurre por corte y empalme alternativo de la segunda unidad transcripcional generada a partir del promotor P38 (Hoelzer et al. 2008). Hay dos sitios donadores de empalme (uno para VP1 y otro para VP2), y sólo un aceptor de empalme común a ambas proteínas (Figura 3). El transcripto que origina la proteína VP1 utiliza el donador de empalme para VP1 y el sitio de empalme común, por lo que el codón de inicio de traducción se ubica entre los dos sitios donadores de empalme y genera una proteína estructural que tiene 727 aminoácidos. Los transcriptos que se encuentran en mayor proporción emplean el donador de empalme para VP2, por lo que se utiliza el siguiente codón de inicio de traducción, ubicado 400 nucleótidos corriente abajo, produciendo proteínas de 584 aminoácidos (Cotmore et al. 2007). Las dos proteínas son idénticas en secuencia, excepto por el tramo amino terminal de 143 aminoácidos que es único para VP1 (Hoelzer et al. 2008). VP1 y VP2 se expresan en proporción 1:5 (Cotmore et al. 2007). La proteína VP3 se genera de manera postraducciona, por clivaje proteolítico de 15 a 20 aminoácidos del extremo amino terminal de VP2 (Tsao et al. 1991).

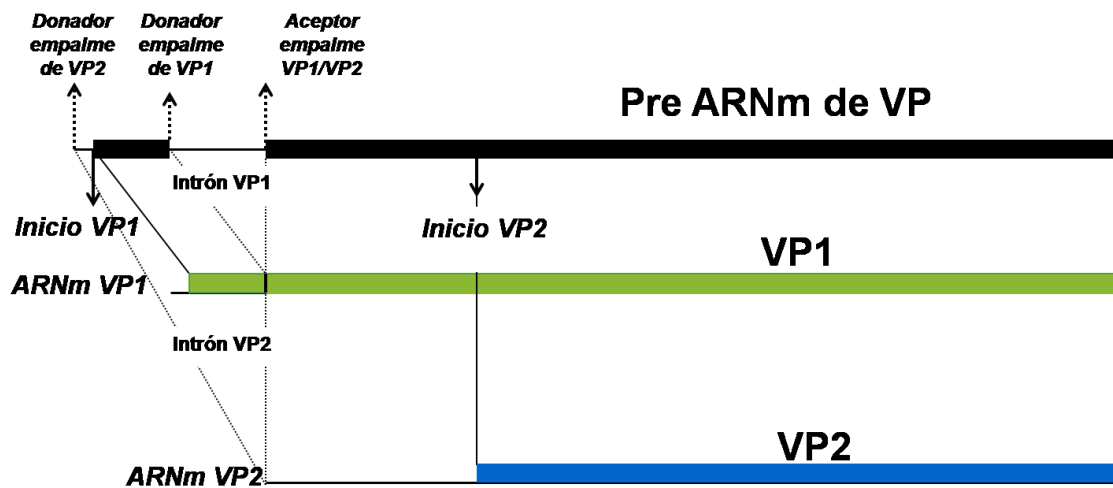


Figura 3. Esquema del proceso de maduración del ARNm de las proteínas VP por empalme alternativo. Con flechas punteadas se indican los donadores y el aceptor de empalme. En líneas grises se indican los intrones eliminados. Las flechas negras indican los sitios de inicio de la traducción de cada proteína (imagen tomada de Maya 2011; Tesis de maestría).

Como ya se mencionó, VP1 posee una secuencia amino terminal única de 143 aminoácidos, donde se encuentra una señal de localización nuclear que provoca el transporte de las partículas virales al núcleo de la célula huésped (Vihinen-Ranta et al. 2002). VP1 también posee un dominio fosfolipasa, que se requeriría durante las etapas tardías de entrada a la célula huésped para liberarse de las vesículas perinucleares o endosomas tardíos (Kerr et al. 2006).

Las proteínas VP2 se ensamblan para formar la cápside viral, donde se empaqueta y protege el ADN viral. También se encargan de la interacción con el receptor celular de la transferrina y poseen los epítopes antigénicos contra los cuales el sistema inmune de hospedero genera anticuerpos para eliminar la infección (Parrish et al. 2005).

2.3. Formación y estructura de la cápside viral

La formación de la cubierta proteica ocurre mediante el ensamblaje de 60 copias de las proteínas VPs. Se asocian con una simetría icosaédrica (número de triangulación =1), y poseen tres ejes de simetría (segundo, tercero y quinto) que sirven como referencia para describir la topología de la cápside (Kerr et al. 2006).

La superficie de la cápside viral posee características topológicas que son determinantes para sus funciones principales. Cada unidad posee una espícula en el tercer eje de simetría, una depresión baja denominada hoyuelo en el segundo eje de simetría, mientras que en el quinto eje de simetría se observa una depresión tipo

cañón y una estructura de cilindro hueco que contiene un poro central que conecta el interior del virión con la parte externa de la partícula (Figura 4). En la espícula del tercer eje mapean los sitios de unión para anticuerpos neutralizantes y es allí también donde contactan los receptores proteicos para esos serotipos. Las secuencias virales que determinan la especificidad de tejido y el reconocimiento de oligosacáridos se encuentran en la depresión tipo hoyuelo del segundo eje y sobre el borde adyacente de la espícula del tercer eje (Cotmore et al. 2007).

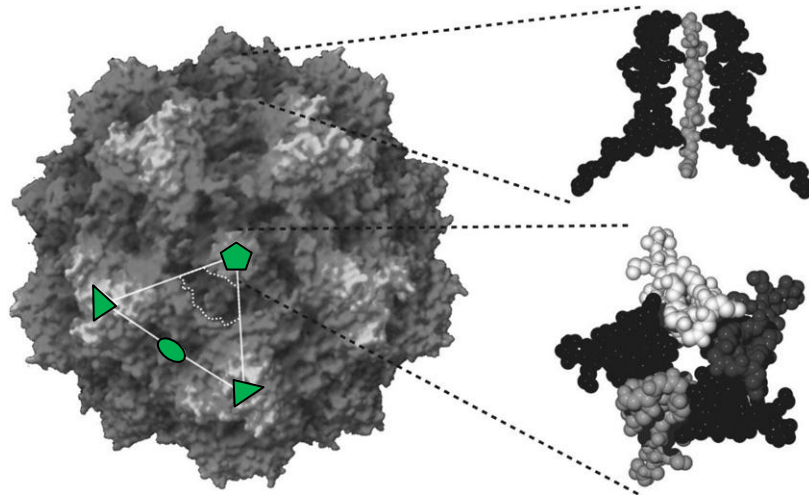


Figura 4. Topología de la partícula de parvovirus. Se indica con el triángulo grande la unidad que forma al icosaedro. Se muestran los ejes de simetría: segundo (óvalo), terceros (triángulos) y quinto (pentágono). A la derecha se muestra la estructura de cilindro del quinto eje visto desde distintos ángulos (modificado de Cotmore et al. 2007).

VP2 es la proteína mayoritaria de la cápside; VP1 es la de mayor tamaño, está presente en aproximadamente 10 copias por cápside y no es esencial para el ensamblaje del virión (Cotmore et al. 2007; Spitzer et al. 1997); VP3 está sólo en cápsides completas que incluyen el ADN viral (Tsao et al. 1991).

Las tres proteínas de cápside poseen una estructura secundaria común de barril β tipo "jelly-roll". Ésta consiste en ocho láminas β anti paralelas, llamadas B, C, D, E, F, G, H e I que se agrupan de a cuatro para formar dos hojas, BIDG Y CHEF. Estas dos hojas se enfrentan para formar la estructura de barril y se distribuyen de manera de que la estructura que contiene la hoja BIDG están más cerca del ADN del virión, y la hoja CHEF es más corta y cercana a la superficie viral. Esta estructura se encuentra principalmente por debajo de la superficie y contiene un tercio de los aminoácidos del polipéptido. Los dos tercios restantes son largos insertos o lazos (loops) entre las láminas β que conforman la superficie viral y se nombran de acuerdo a las láminas β

que conectan. Los lazos son de longitud y disposición variables, siendo los más largos los que se ubican entre las hojas B y C (36 aa), el lazo EF (74 aa), y el lazo GH (223 aa) que incluye los sub-lazos 3 y 4 (Figura 5 y 6) (Tsao et al. 1991; Agbandje et al. 1995).

El lazo GH forma la espícula en el tercer eje de simetría, una de las principales características topológicas de la estructura de la cápside viral (Tsao et al. 1991). Además, es en el tercer eje donde los sub-lazos de áreas adyacentes se interdigitan y se apilan uno sobre otro, lo que lleva a un gran incremento en la superficie compartida por subunidades adyacentes (Xie et al. 1996). En el lazo GH es donde se encuentra la mayor variabilidad de la proteína de cápside del virus (Chapman et al. 1993).

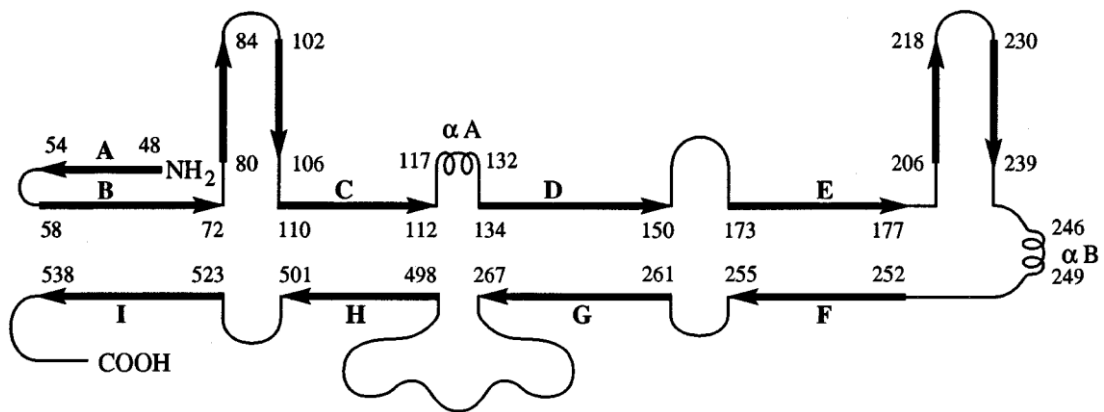


Figura 5. Esquema de la estructura secundaria de VP. Se muestran las láminas β con flechas y los lazos que las conectan. Se enumeran algunos residuos aminoacídicos (tomado de Agbandje et al. 1995).

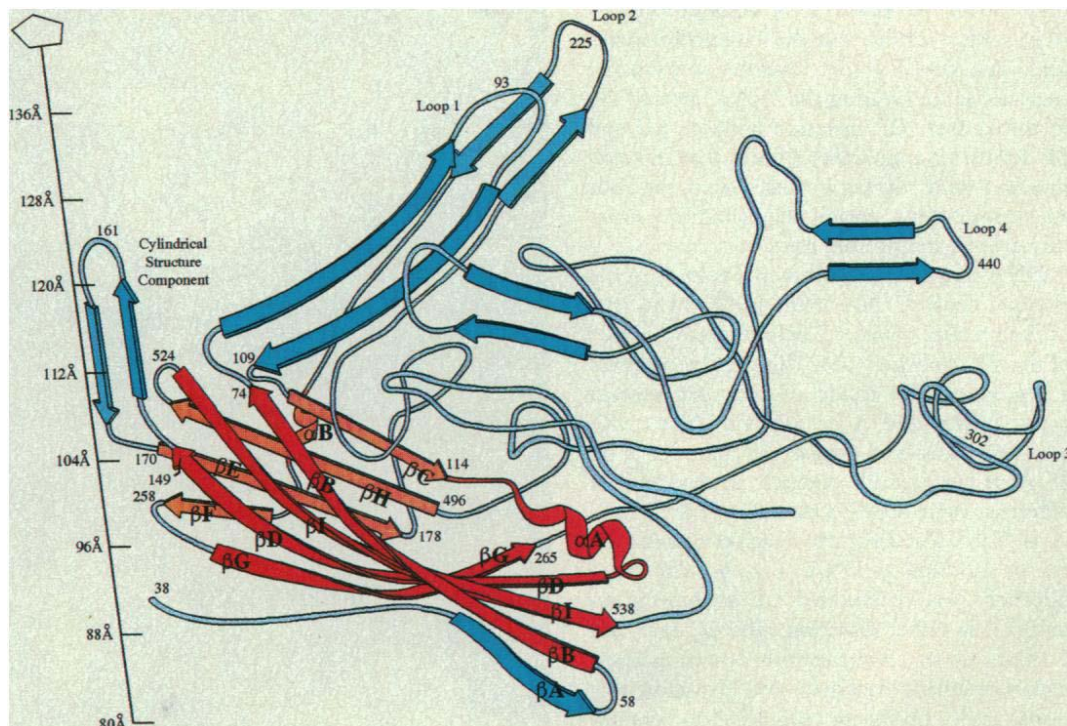


Figura 6. Diagrama de la topología de la proteína VP2. Se observan las láminas β en disposición anti paralela, que forman la estructura del barril tipo "jelly-roll" en rojo, los lazos que las conectan en azul. Los números representan algunos aminoácidos de referencia (tomado de Tsao et al. 1991).

2.4. Parvovirus canina, aspectos clínicos y diagnóstico

La infección por CPV tiene una distribución mundial y afecta a perros domésticos y a otros miembros de la familia *Canidae*, como lobos, coyotes y el perro mapache asiático (Nandi et al. 2010). La patogénesis de la infección depende en gran parte de la necesidad del virus de infectar células con altas tasas de proliferación para poder replicarse. El virus ingresa al huésped vía nasofaríngea y orofaríngea, donde realiza una primera replicación en tejidos linfoides y en amígdalas. Unos días después se propaga de manera sistémica, causando una infección generalizada de los tejidos linfoides y linfocitos circulantes, lo que produce una diseminación del virus hacia otros tejidos (Kerr et al. 2006). En los días siguientes el virus llega a nuevos órganos con tejidos muy proliferativos, como el intestino y la médula ósea, donde la infección provoca una caída en el conteo de glóbulos blancos (Nandi et al. 2010). Es la infección intestinal la que provoca mayor daño, ya que CPV infecta las células epiteliales de la cripta de las vellosidades intestinales del íleon y del yeyuno que se encuentran en rápida división. El grado y la severidad de la infección están determinados por el ritmo de recuperación de las células del epitelio intestinal, y es durante esta fase cuando el virus es excretado en las heces en grandes cantidades (Truyen 2002). La infección es más severa en cachorros menores de 3 meses, y es más común entre las 6 semanas y los 4 meses de edad (Nandi et al. 2010).

La parvovirus canina se caracteriza por cuadros de enteritis y diarrea, siendo ésta más grave en cachorros, en los que puede ocasionar la muerte por miocarditis. El síntoma característico es la gastroenteritis hemorrágica (Pollock et al. 1979). Además se pueden observar como síntomas: depresión y decaimiento, pérdida de apetito, vómitos, fiebre alta, deshidratación, pudiendo resultar en la muerte del animal. El curso de la enfermedad es variable y depende de la dosis viral infectiva. La morbilidad y mortalidad varían con la edad del animal, la gravedad de la infección, y la presencia de otras enfermedades provocadas por patógenos oportunistas. El parvovirus canino se propaga principalmente a través del contacto oral con materia fecal, superficies, u objetos contaminados. Es un virus muy resistente que puede permanecer en el ambiente hasta por 5 meses si las condiciones son favorables (Nandi et al. 2010).

El diagnóstico clínico de CPV resulta dificultoso en algunos casos, ya que otros patógenos causan síntomas similares. Existen muchos métodos para corroborar la presencia del virus que varían en el grado de especificidad, sensibilidad y complejidad de ejecución. El test de hemaglutinación (HA), el ensayo de ELISA y la inmunocromatografía son métodos simples y rápidos para detectar al virus en las muestras fecales. Éstos métodos se emplean de manera rutinaria, pero poseen la desventaja de que requieren carga viral relativamente alta para la detección (Desario et al. 2005). Si se cuenta con el equipamiento adecuado, se puede visualizar el virus con un microscopio electrónico. También puede realizarse una caracterización bioquímica y molecular mediante aislamiento viral en varias líneas celulares de origen felino y canino, sin embargo, los cultivos celulares son laboriosos y requieren más tiempo (Truyen 2002). Los métodos basados en detección del ácido nucleico del virus mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ya sea por tiempo final o tiempo real, son una buena alternativa de gran sensibilidad, rapidez y precisión para el diagnóstico de la enfermedad (Desario et al. 2005).

Con respecto a la terapia adecuada con la cual tratar al animal, lo más importante es restaurar el balance electrolítico de fluidos y de nutrientes debido a los vómitos y diarrea, además de prevenir contra infecciones secundarias de otros virus y/o bacterias. Para poder controlar la enfermedad se requiere una apropiada higiene de los espacios que utiliza el perro y un plan de vacunación riguroso (Nandi et al. 2010). Las principales causas de fallas en la inmunización contra CPV son la interferencia debida a anticuerpos maternos y al tipo de vacuna utilizada (Prittie 2004). Los cachorros nacidos de madres inmunes están protegidos durante las primeras semanas de vida por los anticuerpos maternos adquiridos a través del calostro luego del segundo y tercer día de vida. La vida media de los anticuerpos es de 9 a 10 días, por lo que en cachorros los títulos de anticuerpos muy bajos no se consideran protectores contra la infección, pero interfieren con la inmunización porque neutralizan al virus vacunal. Se genera un período crítico de vulnerabilidad donde los anticuerpos no son suficientes y la vacunación aún es incompleta, por lo que el cachorro no está protegido

(Nandi et al. 2010). Existen varios tipos de vacunas efectivas para prevenir la infección por CPV, ya sean vacunas a virus vivo atenuado o vacunas de virus inactivado. Ambas se preparan a partir de variantes antigénicas diferentes y generan inmunidad de manera eficiente, siendo más efectiva la vacuna atenuada (Pratelli et al. 2001). La mayoría de las vacunas disponibles en el mercado incluyen en su formulación a la cepa original CPV-2. Las vacunas de cepa original son muy potentes y capaces de prevenir la enfermedad e incluso la infección, y gracias a éstas se transformó la pandemia de CPV en una situación endémica controlada (Truyen 2006). La WSAVA (World Small Animal Veterinary Association) indica iniciar la vacunación a las 8 ó 9 semanas de edad, y continuar vacunando cada 3 ó 4 semanas, hasta que el cachorro tenga entre 14 a 16 semanas de edad. En un plan completo de vacunación se deberían administrar 3 ó 4 dosis, y se recomienda revacunar al año y posteriormente cada 3 años (Day et al. 2010).

2.5. Origen, evolución y variabilidad

CPV-2 se detectó por primera vez a finales del verano de 1978, reportándose la enfermedad en Estados Unidos, aunque estudios serológicos posteriores indican que el virus estaba presente en Europa en 1976 (Hoelzer et al. 2010). Pocas semanas después del primer aislamiento de CPV-2, se determinó por serología convencional que el nuevo virus era muy similar al virus de la panleucopenia felina (FPV) y a otros parvovirus que causan enteritis en visones, mapaches y otras especies de carnívoros (Carmichael 2005). La nueva enfermedad se dispersó globalmente en pocos meses, generando una pandemia que provocó la muerte de miles de canes (Nandi et al. 2010).

La cepa específica que originó a CPV aún no se ha identificado, pero parece haber derivado de FPV o de un virus estrechamente relacionado que infectaba carnívoros silvestres. Análisis filogenéticos de varias cepas de virus relacionados a FPV, colectados durante las décadas de 1960, 1970 y 1980, revelaron que una cepa de un zorro polar (*Alopex lagopus*) de Finlandia podría ser el ancestro más cercano de CPV, mientras que secuencias parciales de parvovirus de un zorro rojo (*Vulpes vulpes*) de origen alemán indican que éste sería el intermediario entre FPV y CPV (Hoelzer et al. 2010). Estudios recientes basados en análisis de secuencias de parvovirus carnívoros sugieren que existen ciclos silvestres que involucran varias especies de carnívoros, y que la transferencia entre especies domésticas y silvestres sería relativamente común y bidireccional (Allison et al. 2014).

A nivel de secuencia nucleotídica, las diferencias entre FPV y CPV-2 constituyen el 1% del genoma (Wang et al. 2005). Esta variabilidad permite observar diferencias en el rango de huésped y en la antigenicidad detectada por anticuerpos monoclonales (Horiuchi et al. 1998). La adquisición de la habilidad para infectar canes y la pérdida de

la capacidad para infectar félidos, serían consecuencia de los cambios aminoacídicos en las posiciones 93 y 323 de la proteína VP2, donde cambia una lisina por una asparagina y un aspartato por una asparagina, respectivamente. Estos también serían los causantes de generar el epítipo antigénico específico para CPV-2. Los cambios en la proteína VP2, en las posiciones 80, 564 y 568 estarían impidiendo la replicación en felinos y determinando en parte el rango de huésped (Chang et al. 1992; Truyen et al. 1996).

En el año 1979, poco después del surgimiento de CPV-2, emergió una variante viral, denominada CPV-2a, que reemplazó por completo a la variante original en sólo un par de años, y originó todas las variantes que circulan actualmente en la población canina (Hoelzer et al. 2010). Esta nueva variante recuperó la capacidad de infectar felinos, mediante nuevos cambios en su secuencia. Estas nuevas mutaciones se ubican en las posiciones 87, 300 y 305, y se encuentran próximos en la cápside viral (Truyen et al. 1996). En la Figura 7 se detallan las principales diferencias entre CPV y FPV.

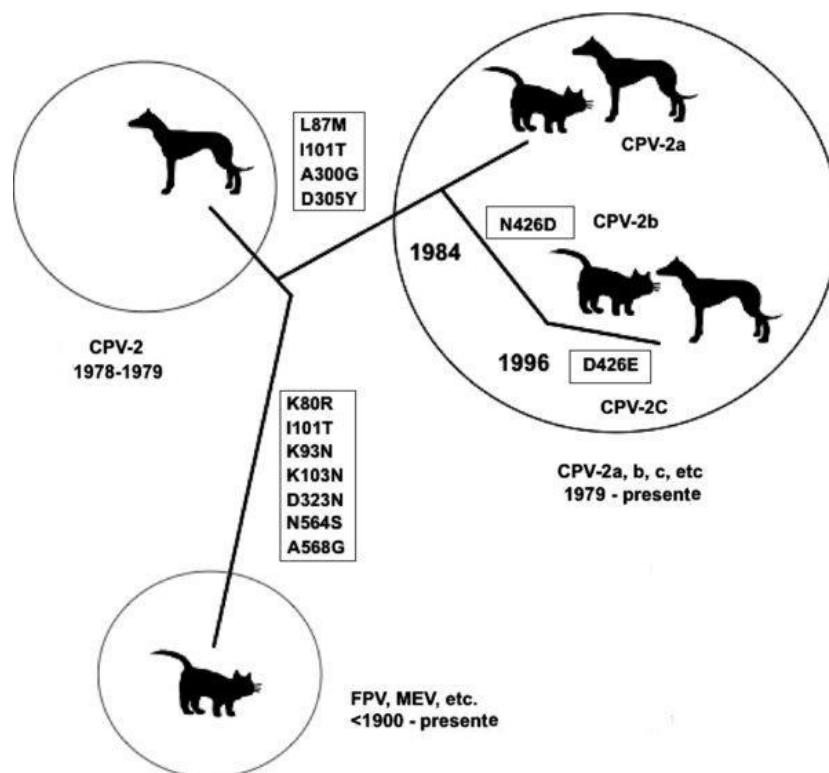


Figura 7. Esquema de las relaciones genéticas y rango de huésped de FPV y CPV durante su historia reciente. Se muestran las diferencias aminoacídicas y su posición en VP2 para todas las variantes, año de surgimiento y rango de huésped. Tomado y modificado de Hoelzer et al. 2010.

En la Figura 8 se muestra la ubicación de las sustituciones aminoacídicas en el mapa topográfico de una de las subunidades proteicas de la cápside viral. La “región 300”

comprende a los aminoácidos de las posiciones 87, 300 y 305 que, junto con los residuos en las posiciones 93 y 323, abarcan los bordes de la región de la espícula de la superficie de la cápside y representan la zona de unión al receptor de la transferrina celular. Además los residuos 93 y la región 300 están dentro de los sitios para unión de anticuerpos neutralizantes. Por lo tanto estas regiones estarían sujetas a importantes presiones selectivas (Shackelton et al. 2005).

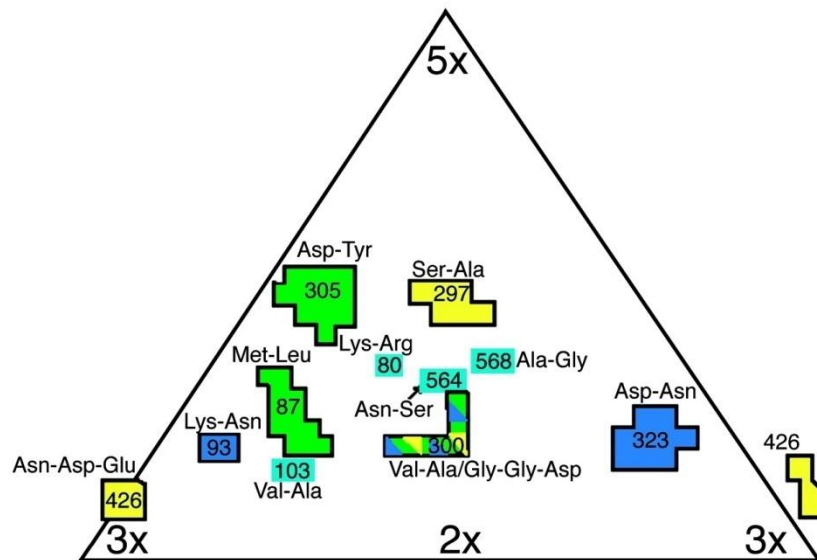


Figura 8. Mapa topográfico de una de las subunidades proteicas de la cápside viral. Se muestran los ejes de simetría: segundo (2x), terceros (3x) y quinto (5x) (Shackelton et al. 2005).

Mediante análisis filogenéticos se determinó que las cepas de CPV se dividen en dos linajes independientes, uno de ellos conteniendo la variante original y el otro a las cepas actuales derivadas del ancestro CPV-2a (Hoelzer et al. 2010).

En 1984 se identificó una nueva variante antigénica del linaje 2a, denominada CPV-2b, que difiere en el epítipo antigénico debido a las sustituciones en la posición 426 de VP2, cambiando asparagina por aspartato, y en la posición 555, donde una isoleucina cambia por una valina (Parrish et al. 1985). En el año 2000 se identificó en Italia una nueva variante que poseía glutamato en la posición 426 (Buonavoglia et al. 2001). Mutaciones en este sitio afectan la región del sitio antigénico más importante, ubicado en la espícula del tercer eje de simetría. Existen anticuerpos monoclonales que han sido desarrollados para detectar específicamente las diferentes variantes de CPV (Parrish et al. 1991; Nakamura et al. 2004).

El análisis de las secuencias de cepas recientes de CPV-2a muestran una reversión en la posición 555 de VP2, observándose nuevamente valina, por lo que el residuo 426 es el

único que diferencia las tres variantes antigénicas (Decaro et al. 2006). En la Tabla 1 se muestran las diferencias aminoacídicas y las variantes asociadas a ellas.

Otras mutaciones, ubicadas en los residuos en las posiciones 297 o 440 parecen proporcionar alguna ventaja al virus, ya que desde su surgimiento, se han diseminado y permanecen en la población viral circulante (Truyen 2006).

Tabla 1. Mutaciones en determinados residuos de CPV y variante a la cual se asocian.

Residuo y posición en VP2	Virus o variante implicado
Arg 80 Lys Lys 93 Asn Val 103 Ala Asp 323 Asn Asn 564 Ser Ala 568 Gly	FPV a CPV-2
Met 87 Leu Ile 101 Thr Ala 300 Gly Asp 305 Tyr	CPV-2 a CPV-2a
Asn 426 Asp	CPV-2b
Asp 426 Glu	CPV-2c

A pesar de la creencia de que los virus ADN poseen bajas tasas de evolución porque replican su genoma utilizando la polimerasa de la célula huésped, es cada vez más evidente que este no es el caso para los virus con genoma de ADN simple hebra. Las tasas de mutación serían intermedias entre las observadas para virus con genomas ARN y ADN de doble hebra (Duffy et al. 2008). Una de las características más notables que poseen los parvovirus de carnívoros es que tienen una tasa de sustitución más parecida a la observada en virus con genoma ARN que en virus cuyo genoma sea ADN (Shackelton et al. 2005), a pesar de que repliquen su genoma utilizando la maquinaria celular del huésped. CPV evoluciona incluso significativamente más rápido que FPV, a una tasa estimada de 2×10^{-4} sustituciones/sitio/año, debido probablemente a una relajación de las presiones selectivas del virus en un hospedero sin defensas específicas contra el virus (Hoelzer et al. 2008). En Uruguay se reportó una tasa de sustitución estimada de $5,77 \times 10^{-4}$ sustituciones/sitio/año calculada para la variante 2c, lo que representa un nucleótido por gen de VP2 por año aproximadamente (Maya et al. 2013). A nivel celular, estos valores podrían explicarse debido a que en los procesos de replicación no estén actuando la totalidad de las subunidades, o factores involucrados en la replicación del genoma del huésped. Otra causa posible es que el genoma simple hebra de estos virus lo haga más vulnerable a procesos mutacionales como la deaminación (Shackelton et al. 2005).

El surgimiento de CPV como nuevo patógeno en perros constituye una oportunidad única para comprender los procesos de adaptación de un virus a un nuevo hospedero estudiando los virus ancestrales y sus variantes derivadas durante el proceso de adaptación (Hueffer et al. 2003).

En Uruguay se ha dado un fenómeno particular de evolución para este modelo viral. Durante la pasada década en la población canina uruguaya ocurrieron dos eventos sucesivos de invasión por variantes de CPV con orígenes geográficos diferentes (Maya et al. 2013). En el año 2007 nuestro laboratorio reportó la detección por primera vez de CPV-2c en Sudamérica (Pérez et al. 2007) y durante el período entre los años 2007 a 2009 esta variante circuló de manera exclusiva en el territorio local. En abril del año 2010 se detectó una nueva variante, CPV-2a, co-circulando con la población homogénea de cepas 2c. Mediante análisis filogenéticos se determinó que la nueva variante era de origen asiático y muy divergente respecto a la variante 2c, de origen europeo (Pérez et al. 2012; Maya et al. 2013).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Caracterizar la evolución de parvovirus canino en Uruguay.

3.2. Objetivos Específicos

- Diagnosticar la presencia de parvovirus canino en Uruguay durante los años 2012 y 2013.
- Determinar las variantes circulantes durante dichos años en el país.
- Establecer la variabilidad genética de las cepas mediante el análisis de secuencias.
- Analizar datos clínicos y su correlación con la variante CPV.

4. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

El virus se diagnosticó mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa), y se caracterizó utilizando RFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) y secuenciación parcial del genoma viral. Se analizaron los datos de cada muestra y se evaluó la significancia estadística de los mismos. Se emplearon programas bioinformáticos para comparar las secuencias, obtenidas durante este trabajo, con secuencias de años previos reportadas en Uruguay y en el resto del mundo (Figura 9).

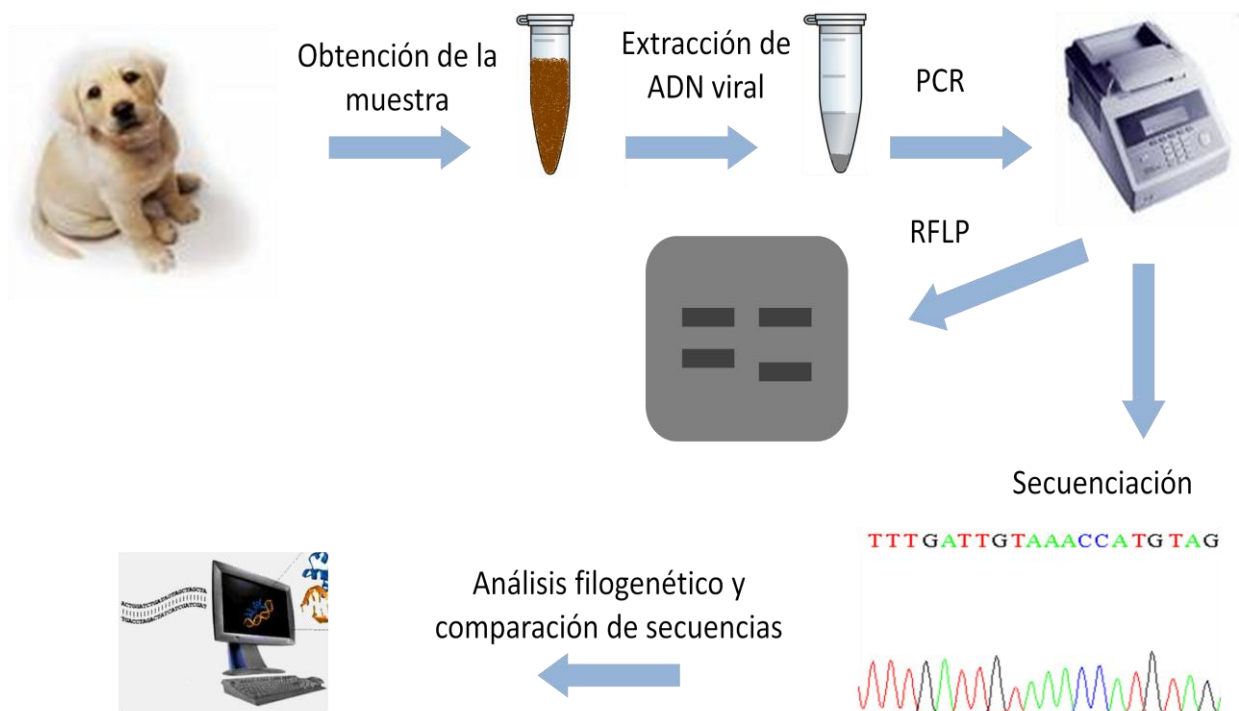


Figura 9. Esquema de la metodología utilizada.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Diagnóstico de cepas de parvovirus canino en Uruguay

5.1.1. Muestras analizadas

Se analizaron 100 muestras fecales de canes con diagnóstico clínico presuntivo de parvovirus. Los síntomas de los canes incluían fiebre, vómitos, anorexia, diarrea, gastroenteritis hemorrágica, depresión y decaimiento. Los perros estaban vacunados total o parcialmente, o carecían de vacunación; eran de diversas razas y tenían entre 1 mes y 9 años de edad (Tabla 2). Las muestras fueron tomadas por médicos veterinarios de diferentes regiones del país durante el 2012 (n=65) y 2013 (n=35).

Tabla 2. Información acerca de las muestras obtenidas. Se detallan los síntomas clínicos, si el animal muere, datos de vacunación, edad (en meses y años), sexo (Macho o Hembra), lugar de procedencia y época del año en la cual se enfermaron. En la columna del número de muestra (Nº) se sombrea en caso de que la muestra haya sido negativa para parvovirus.

Nº	Sintomatología	Muere	Vacunación	Edad	Sexo	Procedencia	Estación
2012							
373	Vómitos, diarrea	Muere	3 dosis	3 meses	H	Montevideo	Verano
375	Vómitos, diarrea		1 dosis	4 meses	H	Colonia	Verano
377	Vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta		2 dosis	3 meses	M	Montevideo	Verano
378	Fiebre, vómitos, gastroenteritis, diarrea hemorrágica		1 dosis	3 meses	H	Montevideo	Verano
379	Vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta	Muere	4 dosis	4 meses	H	Montevideo	Verano
380	Fiebre, vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta	Muere	4 dosis	7 meses	M	Montevideo	Verano
381	Vómitos, diarrea sanguinolenta, deshidratación		No tiene	Sin datos	M	Montevideo	Verano
382	Vómitos, gastroenteritis, diarrea	Muere	1 dosis	Sin datos	M	Montevideo	Verano
383	Vómitos, gastroenteritis hemorrágica, diarrea	Muere	3 dosis	4 meses	H	Montevideo	Verano
384	Vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta	Muere	No tiene	1 mes	H	Montevideo	Verano
385	Vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta		1 dosis	1 mes	H	Montevideo	Verano
386	Fiebre, vómitos, gastroenteritis, diarrea hemorrágica	Muere	1 dosis	1 mes	M	Montevideo	Verano
388	Vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta		3 dosis	5 meses	M	Canelones	Verano
389	Fiebre, vómitos, gastroenteritis, diarrea	Muere	3 dosis	6 meses	M	Montevideo	Verano
390	Fiebre, vómitos, diarrea hemorrágica		3 dosis	8 meses	H	Montevideo	Verano
391	Fiebre, vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta		2 dosis	3 meses	H	Montevideo	Verano
392	Fiebre, vómitos, diarrea sanguinolenta		3 dosis	5 meses	H	Montevideo	Verano
393	Hermano de 383		3 dosis	4 meses	M	Montevideo	Verano
394	Fiebre, gastroenteritis		1 dosis	4 meses	M	Montevideo	Otoño
395	Vómitos, gastroenteritis, diarrea hemorrágica		2 dosis	4 meses	H	Montevideo	Otoño
396	Fiebre, vómitos, gastroenteritis, diarrea hemorrágica	Muere	No tiene	7 años	M	Montevideo	Otoño
399	Fiebre, vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta	Muere	2 dosis	3 meses	M	Canelones	Otoño
400	Fiebre, vómitos, diarrea		No tiene	5 meses	M	Canelones	Otoño
401	Sin datos		Sin datos	4 años	Sin datos	Montevideo	Otoño
402	Fiebre, vómitos, gastroenteritis, diarrea		No tiene	5 meses	H	Montevideo	Otoño
403	Vómitos, diarrea sanguinolenta		1 dosis	2 meses	M	Maldonado	Otoño
404	Fiebre, vómitos, gastroenteritis, diarrea hemorrágica		2 dosis	6 meses	M	Maldonado	Otoño
405	Fiebre, vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta	Muere	No tiene	4 meses	M	Maldonado	Otoño

Nº	Sintomatología	Muere	Vacunación	Edad	Sexo	Procedencia	Estación
406	Fiebre, vómitos, hiperqueratosis	Muere	No tiene	3 meses	H	Maldonado	Otoño
407	Fiebre, vómitos, gastroenteritis, diarrea hemorrágica	Muere	No tiene	2 meses	H	Maldonado	Otoño
408	Vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta	Muere	No tiene	1 mes	H	Maldonado	Otoño
409	Fiebre, vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta	Muere	2 dosis	3 meses	M	Maldonado	Otoño
410	Vómitos, diarrea		No tiene	8 meses	M	Canelones	Otoño
411	Vómitos, gastroenteritis hemorrágica, diarrea		3 dosis	3 meses	H	Canelones	Invierno
412	Vómitos, diarrea sanguinolenta	Muere	3 dosis	8 meses	M	Montevideo	Invierno
413	Gastroenteritis hemorrágica		Sin datos	9 años	H	Maldonado	Otoño
414	Vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta	Muere	2 dosis	2 meses	H	Maldonado	Otoño
415	Vómitos, diarrea sanguinolenta		Sin datos	4 años	H	Montevideo	Invierno
416	Fiebre, vómitos, gastroenteritis, diarrea	Muere	1 dosis	1 mes	M	Montevideo	Invierno
417	Vómitos, gastroenteritis, diarrea hemorrágica		3 dosis	5 meses	H	Montevideo	Invierno
418	Vómitos, gastroenteritis, diarrea		No tiene	4 meses	M	Maldonado	Invierno
419	Vómitos, gastroenteritis hemorrágica		No tiene	4 meses	H	Maldonado	Invierno
420	Vómitos, gastroenteritis, diarrea	Muere	1 dosis	1 mes	M	Montevideo	Invierno
421	Fiebre, vómitos, gastroenteritis, diarrea	Muere	3 dosis	4 meses	M	Canelones	Invierno
422	Vómitos, gastroenteritis hemorrágica		4 dosis	4 meses	M	Montevideo	Invierno
423	Fiebre, vómitos, gastroenteritis hemorrágica		2 dosis	2 meses	M	Montevideo	Invierno
424	Fiebre, vómitos, gastroenteritis, diarrea hemorrágica	Muere	2 dosis	2 meses	H	Canelones	Invierno
425	Vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta		4 dosis	3 meses	M	Montevideo	Invierno
426	Fiebre, vómitos, gastroenteritis, diarrea		3 dosis	4 meses	H	Colonia	Primavera
427	Vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta		No tiene	2 meses	H	Colonia	Invierno
428	Fiebre, vómitos, diarrea sanguinolenta	Muere	1 dosis	2 meses	M	Colonia	Invierno
429	Gastroenteritis, diarrea sanguinolenta		No tiene	2 meses	H	Maldonado	Primavera
430	Gastroenteritis, diarrea sanguinolenta, dolor abdominal	Muere	1 dosis	2 meses	H	Maldonado	Invierno
431	Fiebre, vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta		No tiene	3 meses	M	Maldonado	Invierno
432	Vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta		3 dosis	4 meses	M	San José	Invierno
433	Vómitos, diarrea sanguinolenta	Muere	No tiene	4 meses	M	Colonia	Primavera
434	Vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta		2 dosis	2 meses	M	Canelones	Primavera
435	Fiebre, vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta		2 dosis	3 meses	M	Canelones	Primavera
436	Vómitos, gastroenteritis hemorrágica, diarrea		No tiene	4 meses	M	Rivera	Primavera
437	Vómitos, diarrea sanguinolenta	Muere	No tiene	2 meses	M	Rivera	Primavera

Nº	Sintomatología	Muere	Vacunación	Edad	Sexo	Procedencia	Estación
438	Vómitos, diarrea sanguinolenta	Muere	No tiene	2 meses	M	Rivera	Primavera
439	Diarrea sanguinolenta	Muere	No tiene	1 mes	M	Rivera	Primavera
440	Gastroenteritis hemorrágica, diarrea	Muere	3 dosis	7 meses	H	Maldonado	Primavera
441	Fiebre, vómitos, diarrea sanguinolenta		1 dosis	2 meses	M	Montevideo	Primavera
448	Fiebre, vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta		2 dosis	3 meses	H	Montevideo	Verano
2013							
442	Vómitos, gastroenteritis, diarrea		No tiene	4 meses	M	Montevideo	Verano
443	Vómitos, gastroenteritis, diarrea	Muere	No tiene	4 meses	M	Montevideo	Verano
444	Vómitos, gastroenteritis		2 dosis	Sin datos	H	Montevideo	Verano
445	Fiebre, vómitos, diarrea		3 dosis	3 meses	M	Montevideo	Verano
446	Vómitos, gastroenteritis, diarrea		3 dosis	3 meses	M	Montevideo	Verano
447	Vómitos, gastroenteritis, diarrea		3 dosis	3 meses	M	Montevideo	Verano
449	Vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta	Muere	1 dosis	2 meses	M	Canelones	Verano
450	Vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta	Muere	3 dosis	4 meses	M	Montevideo	Verano
451	Gastroenteritis, diarrea sanguinolenta	Muere	2 dosis	3 meses	M	Montevideo	Verano
452	Fiebre, vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta	Muere	3 dosis	4 meses	M	Montevideo	Verano
453	Vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta	Muere	2 dosis	3 meses	M	Canelones	Verano
454	Fiebre, vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta	Muere	4 dosis	4 meses	H	Montevideo	Otoño
455	Vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta, leucopenia		2 dosis	3 meses	M	Montevideo	Otoño
456	Vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta, leucopenia		2 dosis	3 meses	H	Montevideo	Otoño
457	Vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta, leucopenia		2 dosis	3 meses	H	Montevideo	Otoño
458	Fiebre, vómitos, gastroenteritis, diarrea hemorrágica	Muere	1 dosis	3 meses	H	Canelones	Otoño
459	Vómitos, gastroenteritis, diarrea hemorrágica	Muere	No tiene	4 meses	M	Canelones	Otoño
460	Vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta		2 dosis	3 meses	M	Montevideo	Otoño
461	Vómitos, gastroenteritis, diarrea		2 dosis	2 meses	H	Montevideo	Otoño
462	Fiebre, vómitos, gastroenteritis, diarrea hemorrágica		3 dosis	5 meses	M	Canelones	Otoño
463	Fiebre, vómitos, gastroenteritis, diarrea hemorrágica	Muere	3 dosis	3 meses	M	Canelones	Otoño
464	Vómitos, gastroenteritis, diarrea hemorrágica		2 dosis	3 meses	H	Canelones	Otoño
465	Vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta	Muere	3 dosis	5 meses	H	Canelones	Invierno
466	Fiebre, vómitos, gastroenteritis, diarrea		3 dosis	2 años	M	Montevideo	Invierno
467	Vómitos, gastroenteritis, diarrea		3 dosis	3 meses	M	Canelones	Invierno
468	Vómitos, gastroenteritis, diarrea hemorrágica		3 dosis	4 meses	H	Canelones	Invierno

Nº	Sintomatología	Muere	Vacunación	Edad	Sexo	Procedencia	Estación
469	Fiebre, vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta		2 dosis	Sin datos	H	Montevideo	Invierno
470	Fiebre, vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta	Muere	2 dosis	3 meses	M	Canelones	Otoño
471	Vómitos, gastroenteritis, diarrea	Muere	1 dosis	Sin datos	M	Canelones	Invierno
472	Vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta		3 dosis	2 meses	M	Montevideo	Invierno
473	Fiebre, vómitos, gastroenteritis hemorrágica		1 dosis	2 meses	H	Montevideo	Invierno
474	Vómitos, gastroenteritis hemorrágica, diarrea	Muere	3 dosis	3 meses	M	Montevideo	Primavera
475	Fiebre, vómitos, gastroenteritis, diarrea sanguinolenta		1 dosis	2 meses	H	Montevideo	Primavera
476	Vómitos, gastroenteritis, diarrea		1 dosis	2 meses	M	Montevideo	Primavera
477	Vómitos, diarrea, gastroenteritis hemorrágica		2 dosis	3 meses	H	Montevideo	Primavera

5.1.2. Extracción de ADN viral

Se realizó la extracción del genoma viral a partir de la materia fecal mediante el método “*fast-boiling*” (Schunck et al. 1995), con algunas modificaciones. El método consiste en homogeneizar 0,1 g de la muestra en 1 mL de buffer fosfato salino (PBS), pH 7,5. El homogeneizado se hierve durante 10 minutos para liberar los componentes celulares y virales, luego se enfría en hielo por 5 minutos para inhibir la actividad enzimática. A continuación se realiza una centrifugación por 20 minutos a 3000 rpm para precipitar los contaminantes y remanentes celulares. Por último se recupera el sobrenadante obtenido, donde se encuentra el ADN viral. Este sobrenadante se almacena a -20 °C y se utiliza puro o diluido como molde en la reacción de PCR.

5.1.3. Amplificación por PCR

El virus se detectó mediante amplificación por PCR de un fragmento de 1316 pb del gen que codifica para la proteína de cápside VP2 (Ikeda 2000). En la Tabla 3 se muestran las secuencias de los cebadores y sus posiciones en el genoma de referencia CPV-2, M38245. El amplicón incluye el codón del aminoácido 426, que diferencia las variantes antigénicas de CPV.

Tabla 3. Cebadores utilizados para la amplificación por PCR diseñados por Ikeda et al. (2000). Se detalla nombre, secuencia en sentido 5'-3' y la posición en la que se ubican en el genoma.

Cebador	Secuencia de cebadores	Posición
CPV F1 <i>forward</i>	AGATAGTAATAACTATGCCATT	3316-3340
CPV R3 <i>reverse</i>	CCTATATCAAATACAAGTACAATA	4609-4632

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 20 µL, utilizando los reactivos, concentraciones y volúmenes detallados en la Tabla 4. El sobrenadante de la extracción se utilizó diluido (1:10) para realizar la PCR. Las muestras que en primera instancia fueron negativas se volvieron a repetir variando las proporciones del ADN molde para descartar que sea un falso negativo debido a diferencias en los títulos virales. La PCR se realizó en un termociclador Applied Biosystems 2720 siguiendo el programa de amplificación que se detalla en la Tabla 5. Se utilizó como control positivo un plásmido que posee un amplicón obtenido previamente con el mismo juego de cebadores; como blanco de la reacción se utilizó agua como molde.

Tabla 4. Detalle de los reactivos con sus respectivos volúmenes y concentraciones para la amplificación del fragmento de 1316 pb.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen utilizado (μL)
Agua			Csp 20 μL
Buffer de la Taqpol	10X	1X	2,0
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,4
Cebador F1 <i>forward</i>	10 μM	1 μM	2,0
Cebador R3 <i>reverse</i>	10 μM	1 μM	2,0
Taq polimerasa (SBS Genetech)	5 U/μL	0,0375U/μL	0,15
ADN molde			2,0

Tabla 5. Se describe el ciclado utilizado para la amplificación del fragmento de 1316 pb con la temperatura y duración de cada etapa.

Etapa	Temperatura	Tiempo	
Desnaturalización inicial	94º	10 minutos	
Desnaturalización	94º	30 segundos	30 ciclos
Hibridación	42º	1 minuto	
Extensión	72º	1 minuto	
Extensión final	72º	10 minutos	

Para visualizar los productos de PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (90 V) con buffer TAE 1X. Se corrieron 5 μL del producto de amplificación y se tiñó el gel con bromuro de etidio a una concentración final de 0,6 μg/μL. La visualización se realizó bajo un transiluminador de luz UV, se fotografió el gel con una cámara digital y se editó la imagen para su análisis.

5.2. Genotipificación de CPV

5.2.1. Caracterización por RFLP

La variante viral se determina con un análisis del tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP). El mismo consiste en una digestión con la enzima *MbolI* (Fermentas) de los productos amplificados, seguida de una electroforesis. La enzima reconoce la secuencia diana GAAGA, que está presente sólo una vez en la posición 4006-4010 de los fragmentos de las muestras CPV-2, CPV-2a y CPV-2b. El sitio de restricción aparece dos veces en la variante CPV-2c, en los sitios 4006-4010 y 4062-4066; este último sitio incluye el codón GAA que codifica para el aminoácido característico de CPV-2c (Glu426).

Este RFLP permite además identificar las cepas vacunales de CPV-2 porque produce un amplicón mayor debido a la presencia de una secuencia repetida en el extremo izquierdo del genoma; las cepas de campo tienen un único monómero de aproximadamente 60 pb, mientras que las cepas vacunales poseen dos. Esta diferencia de tamaño produce un patrón particular en el análisis por RFLP. De esta manera, gracias a la diferencia en los patrones de restricción, las muestras pueden clasificarse en vacunales de tipo 2 (CPV-2), CPV-2c y cepas no-2c (2a/2b). Se detalla el tamaño de los fragmentos obtenidos en la Figura 10. En el esquema aparece el resultado esperado en la electroforesis en gel de agarosa, donde el fragmento de 56 pb no se observa debido su pequeño tamaño.

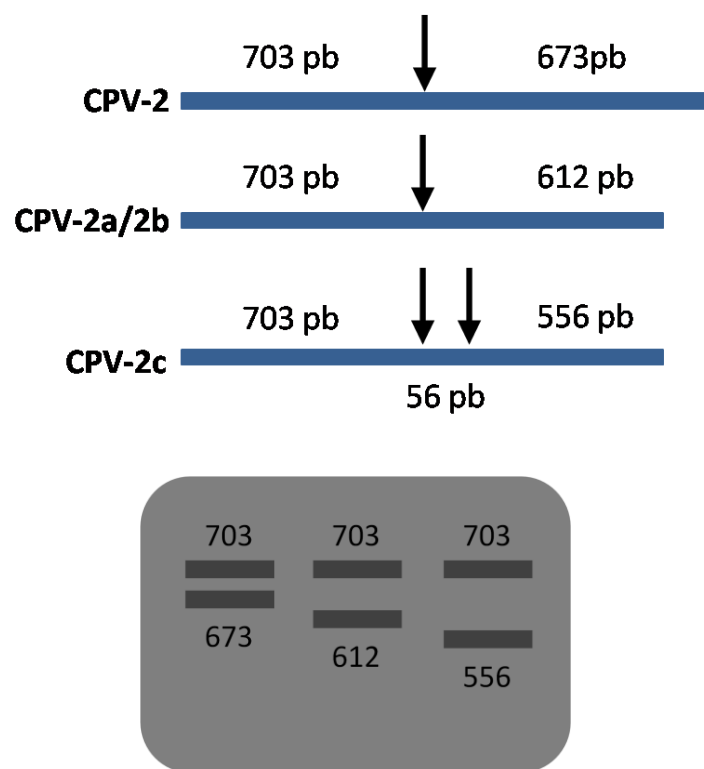


Figura 10. Esquema de la región amplificada por los cebadores F1 y R3. Con las flechas se identifican los sitios de restricción (GAGAA) de la enzima *MbolI*. Se muestran los tamaños de los fragmentos obtenidos luego de la digestión enzimática y un esquema del resultado esperado en la electroforesis en gel de agarosa.

La reacción para la digestión enzimática se hizo en un volumen final de 30 μ L, incluyendo los reactivos que se detalla en la Tabla 6. Se incubó durante dos horas a 37°C.

Tabla 6. Reactivos y volúmenes utilizados para la reacción de RFLP.

Reactivo	Volumen utilizado (µL)
ADN producto de PCR	15,0
Buffer (B) de enzima (Fermentas)	1,5
Enzima <i>MbolI</i> (Fermentas)	0,6
Agua	12,9
Volumen final	30

Los productos obtenidos de la digestión enzimática se observaron en un gel de agarosa al 1,5% (90 V) en las mismas condiciones previamente descritas.

5.2.2. Secuenciación

Para determinar a qué variante pertenecían algunas de las muestras clasificadas como no-2c se realizó la secuenciación directa del amplicón de 1316 pb. Para esto se seleccionaron al azar 10 muestras clasificadas como no-2c, y se incluyeron 2 muestras 2c como control (Tabla 7).

Los amplicones fueron purificados con el kit AxiPrep™ PCR Clean-up de AXYGEM siguiendo el protocolo del fabricante. La secuenciación de los fragmentos amplificados se realizó utilizando los cebadores F1 y R3 (Tabla 3) en el servicio de secuenciación del Instituto Pasteur (Montevideo) con un secuenciador automático ABI prism 377 – Perkin Elmer.

Tabla 7. Muestras elegidas para secuenciación, se detallan el número de muestra, el resultado de la caracterización por RFLP y el año en que fueron colectadas.

Nº de muestra	Caracterización	Año
M381	CPV-2a/2b	2012
M386	CPV-2a/2b	2012
M400	CPV-2a/2b	2012
M406	CPV-2a/2b	2012
M408	CPV-2c	2012
M427	CPV-2a/2b	2012
M445	CPV-2a/2b	2013
M453	CPV-2a/2b	2013
M459	CPV-2a/2b	2013
M467	CPV-2c	2013
M470	CPV-2a/2b	2013
M476	CPV-2a/2b	2013

5.3. Análisis bioinformáticos comparativos y filogenéticos

Se utilizó la secuencia codificante del lazo GH, que es el sitio de mayor variabilidad del genoma de parvovirus y forma parte de VP2. El lazo GH abarca desde el aminoácido 267 al 498 (232 residuos), y es codificado por los nucleótidos localizados entre las posiciones 3585 y 4280. Comprende 696 pb dentro del amplicón de 1316 pb amplificado por los cebadores F1 y R3. Las secuencias de las 12 muestras fueron editadas y comparadas utilizando el programa SeqMan del paquete Lasergene (DNASTar). Estas secuencias se compararon con secuencias obtenidas durante 2006-11 por otros investigadores del laboratorio (Tabla 8), y con secuencias de distintas regiones del mundo (Tabla 9). Se realizó un alineamiento nucleotídico utilizando el algoritmo Clustal W en Phylemon2 (Sánchez et al. 2011). Se eligió el modelo de sustitución nucleotídica HKY + G, que es el que mejor describe la evolución de las secuencias según los criterios de información de Akaike y Bayesiano implementados en jModelTest (Posada 2008). Se realizó un árbol filogenético de máxima verosimilitud utilizando PhyML (Guindon et al. 2003) con análisis de *bootstrap* para dar soporte estadístico a los nodos internos del árbol. Se utilizó la secuencia de referencia CPV-2 (M38245) como grupo externo. Para visualizar y editar el árbol filogenético obtenido se utilizó el programa TreeGraph2 (Stöver et al. 2010).

Tabla 8. Muestras uruguayas utilizadas como referencia para realizar los análisis comparativos. Se detallan el número de muestra de cada una, qué variante de CPV son, en qué año fueron colectadas y el número de acceso a la base de datos GenBank, a la que fueron ingresadas previamente (Maya et al. 2013).

Nº de muestra	Caracterización	Año	Nº Acceso
M06	CPV-2a	2006	EF375482
M52	CPV-2c	2006	KC196087
M82	CPV-2c	2007	KC196083
M120	CPV-2c	2008	KC196109
M187	CPV-2c	2009	KC196101
M243	CPV-2a	2010	JF906788
M250	CPV-2a	2010	JF906792
M261	CPV-2c	2010	JF906814
M315	CPV-2a	2011	KC196113
M344	CPV-2a	2011	KC196112
M368	CPV-2c	2011	KC196088

Tabla 9. Secuencias que codifican para el lazo GH utilizadas de diferentes regiones del mundo para realizar análisis filogenéticos. Se detallan el número de muestra de cada una, qué variante de CPV son, en qué año y donde fueron colectadas y el número de acceso a la base de datos GenBank.

Nº de muestra	Caracterización	Origen geográfico	Año	Nº Acceso
CPV-b	CPV-2	USA	1978	M38245
M9	CPV-2a	Argentina	2003	JF346754
M46	CPV-2a	Brasil	1995	DQ340430
BJ-1	CPV-2a	China	2011	JX121623
w-3	CPV-2a	China	2006-2008	GQ169539
ME12	CPV-2a	Ecuador	2011	KF149978
ME19	CPV-2a	Ecuador	2011	KF149977
ME35	CPV-2a	Ecuador	2011	KF149976
ME36	CPV-2a	Ecuador	2011	KF149979
ME39	CPV-2a	Ecuador	2011	KF149982
ME40	CPV-2a	Ecuador	2011	KF149983
ME41	CPV-2a	Ecuador	2011	KF149975
ME42	CPV-2a	Ecuador	2011	KF149974
KU13	CPV-2a	Tailandia	2008	GQ379042
KU14	CPV-2a	Tailandia	2009	GQ379045
M82	CPV-2b	Alemania	1997	FJ005260
ME6	CPV-2b	Ecuador	2011	KF149972
ME20	CPV-2b	Ecuador	2011	KF149985
O4S22	CPV-2b	Francia	-	DQ025991
M36	CPV-2b	USA	2003	AY742955
M35	CPV-2c	Argentina	2008	JF414819
M32	CPV-2c	Argentina	2008	JF414818
M44	CPV-2c	Argentina	2009	JF414820
Thor	CPV-2c	Brasil	2010	-
Lucy	CPV-2c	Brasil	2010	-
ME28	CPV-2c	Ecuador	2011	KF149984
M128	CPV-2c	España	2008	FJ005246
M09	CPV-2c	Grecia	2009	GQ865519
M56	CPV-2c	Italia	2000	FJ222821
M19	CPV-2c	Italia	2008	FJ005250

5.4. Análisis estadísticos de los datos epidemiológicos

Se analizó la información incluida en la ficha de la muestra provista por los veterinarios (Tabla 2). Se utilizaron tablas de contingencia para determinar la asociación de las variantes de CPV con distintas variables. Se estimó la correlación entre las variantes de CPV y las variables mediante la prueba de χ^2 de Pearson, usando un grado de libertad y calculando el *p*-valor, utilizando el software GraphPad online (<http://graphpad.com/>).

6. RESULTADOS

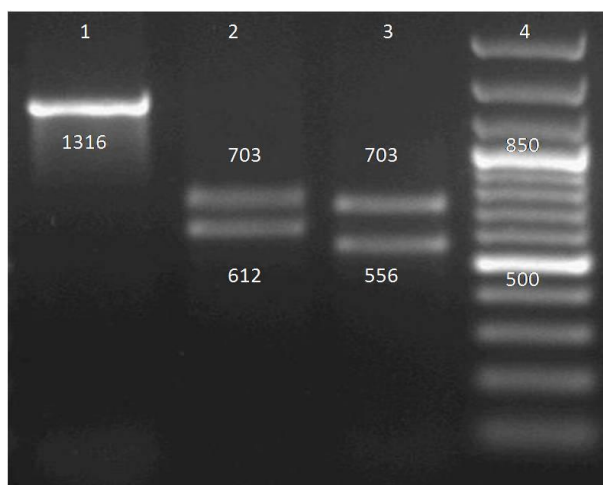
6.1. Diagnóstico y caracterización de parvovirus canino en muestras fecales

6.1.1. Detección del virus

Mediante PCR se amplificó el fragmento de 1316 pb del gen VP2 (Figura 11), y se detectó el virus en 88 de 100 muestras analizadas (88%). De ellas, 56 pertenecían a muestras tomadas durante el año 2012 (n=65), y 32 fueron colectadas durante el 2013 (n=35) (Figura 11).

6.1.2. Genotipificación de las muestras por RFLP

Las variantes de CPV se diferenciaron por los patrones de restricción resultantes. De las muestras positivas para CPV, 18 correspondieron a la variante 2c por caracterización directa debido a dos sitios de restricción generados por RFLP, observando dos bandas de 703 y 556 pb en la electroforesis en gel de agarosa (Figura 10 y 11). De las restantes, 70 muestras se clasificaron como no-2c. Diez de estas muestras fueron enviadas a secuenciar para su caracterización precisa. El resto de las muestras que no fueron secuenciadas durante este trabajo, se caracterizaron mediante otros métodos alternativos implementados en nuestro laboratorio; todas las muestras no-2c se caracterizaron como 2a (datos no publicados de Tesinas en ejecución).



6.2. Secuenciación, genotipificación y análisis comparativos

Las 10 muestras no-2c seleccionadas (Tabla 7) se secuenciaron parcialmente y se compararon con secuencias de referencia obtenidas por otros integrantes del laboratorio (Tabla 8). Se utilizó la secuencia codificante del lazo GH, sitio de mayor variabilidad del genoma de parvovirus. Este fragmento incluye al aminoácido 426, ya que se observó el codón para la Asn característico en esta posición, se determinó que las 10 muestras correspondían a cepas 2a. Asimismo se confirmó que las 2 muestras clasificadas como 2c secuenciadas efectivamente poseen el aminoácido Glu en la posición 426 de la proteína VP2 (Figura 12).

	Asn 426																													
CPV2a-UY6.06 (1>718) →	C	T	T	C	C	T	G	T	A	A	C	A	A	A	T	G	A	T	A	A	T	G	T	A	T	T	G	C		
CPV2a-UY243.10 (1>718) →	C	T	T	C	C	T	G	T	A	A	C	A	A	A	T	G	A	T	A	A	T	G	T	A	T	T	G	C		
CPV2a-UY250.10 (1>718) →	C	T	T	C	C	T	G	T	A	A	C	A	A	A	T	G	A	T	A	A	T	G	T	A	T	T	G	C		
CPV2a-UY315.11 (1>718) →	C	T	T	C	C	T	G	T	A	A	C	A	A	A	T	G	A	T	A	A	T	G	T	A	T	T	G	C		
CPV2a-UY344.11 (1>718) →	C	T	T	C	C	T	G	T	A	A	C	A	A	A	T	G	A	T	A	A	T	G	T	A	T	T	G	C		
CPV2a-UY386.12 (1>718) →	C	T	T	C	C	T	G	T	A	A	C	A	A	A	T	G	A	T	A	A	T	G	T	A	T	T	G	C		
CPV2a-UY397.12 (1>718) →	C	T	T	C	C	T	G	T	A	A	C	A	A	A	T	G	A	T	A	A	T	G	T	A	T	T	G	C		
CPV2a-UY406.12 (1>718) →	C	T	T	C	C	T	G	T	A	A	C	A	A	A	T	G	A	T	A	A	T	G	T	A	T	T	G	C		
CPV2a-UY427.12 (1>718) →	C	T	T	C	C	T	G	T	A	A	C	A	A	A	T	G	A	T	A	A	T	G	T	A	T	T	G	C		
CPV2a-UY445.13 (1>718) →	C	T	T	C	C	T	G	T	A	A	C	A	A	A	T	G	A	T	A	A	T	G	T	A	T	T	G	C		
CPV2a-UY453.13 (1>718) →	C	T	T	C	C	T	G	T	A	A	C	A	A	A	T	G	A	T	A	A	T	G	T	A	T	T	G	C		
CPV2a-UY459.13 (1>718) →	C	T	T	C	C	T	G	T	A	A	C	A	A	A	T	G	A	T	A	A	T	G	T	A	T	T	G	C		
CPV2a-UY470.13 (1>718) →	C	T	T	C	C	T	G	T	A	A	C	A	A	A	T	G	A	T	A	A	T	G	T	A	T	T	G	C		
CPV2a-UY476.13 (1>718) →	C	T	T	C	C	T	G	T	A	A	C	A	A	A	T	G	A	T	A	A	T	G	T	A	T	T	G	C		
CPV2c-UY408.12 (1>718) →	C	T	T	C	C	T	G	T	A	A	C	A	G	A	A	G	A	T	A	A	T	G	T	A	T	T	G	C		
CPV2c-UY467.13 (1>718) →	C	T	T	C	C	T	G	T	A	A	C	A	G	A	A	G	A	T	A	A	T	G	T	A	T	T	A	C		
																Glu 426														

Figura 12. Parte de la secuencia nucleotídica del lazo GH. Aparecen 9 muestras CPV-2a y 2 muestras CPV-2c obtenidas en el presente trabajo, además de 5 secuencias de referencia caracterizadas como CPV-2a.

Se realizó un análisis comparativo de las secuencias de las variantes 2a y 2c obtenidas durante 2012-2013 (Tabla 10). Se observaron cambios sinónimos y no-sinónimos que diferencian la variante 2c de la 2a. Estos cambios se encuentran ubicados en las posiciones 267, 277, 324, 426 y 440 de la secuencia aminoacídica. En la posición 277 el cambio es sinónimo, se mantiene el aminoácido histidina y cambia el triplete CAC (2a) por CAT (2c). El triplete que genera el cambio en la posición 267 es un cambio no-sinónimo en segunda posición, TTT (2c) a TAT (2a). En la posición 324, el codón cambia en dos posiciones, de TAT (2c) a ATT (2a). En la posición 426, cambia también en dos posiciones, de GAA (2c) a AAT (2a). Finalmente en la posición 440, el cambio ocurre en la primera posición, de ACA (2c) a GCA (2a) (Tabla 10).

Tabla 10. Diferencias aminoacídicas y nucleotídicas en el lazo GH entre las variantes 2a y 2c circulantes en Uruguay entre los años 2012 y 2013.

Posiciones y secuencias aminoacídicas de VP2					
Posiciones y secuencias nucleotídicas en el genoma					
	267	277	324	426	440
	3585-3587	3615-3617	3756-3758	4062-4064	4104-4106
CPV-2a	Tyr	His	Ile	Asn	Ala
	TAT	CAC	ATT	AAT	GCA
CPV-2c	Phe	His	Tyr	Glu	Thr
	TTT	CAT	TAT	GAA	ACA

Se observaron también cuatro cambios sinónimos que varían entre las cepas, pero no diferencian entre las variantes 2c y 2a (Tabla 11).

Tabla 11. Posición de los cambios nucleotídicos sinónimos exclusivos de las muestras analizadas de 2012 y 2013.

Nº de muestra y variante	Posición nucleotídica	Transición observada
M408 (2c)	4271	T→C
M467 (2c)	3668	G→A
M467 (2c)	4076	G→A
M445 (2a)	4046	T→C

6.3. Análisis filogenéticos

El análisis filogenético realizado con la región del lazo GH de la proteína VP2, a partir de las secuencias de las cepas locales y globales de CPV (Tablas 7 a 9), muestra distintos clados, agrupando secuencias de varios orígenes geográficos (Figura 13). Se observa un clado con buen apoyo estadístico formado por las cepas 2a colectadas en Uruguay durante 2010-13, y por cepas 2a de origen asiático, específicamente de China y Tailandia obtenidas entre 2006 y 2011. El clado es muy homogéneo, observándose sólo la muestra M445 como la más distante con respecto al resto. Este clado se diferencia del formado por cepas 2a colectadas en Ecuador durante el año 2011. Aparece un tercer grupo de cepas 2a que incluye dos secuencias de Argentina de 2003 y de Brasil de 1995 con la secuencia 2a uruguaya colectada en 2006. Otro clado agrupa cepas 2c encontradas en el país desde 2006 a la fecha con cepas 2c de origen europeo de España, Grecia e Italia y de origen sudamericano de Argentina, Brasil y Ecuador. Este grupo se encuentra relacionado filogenéticamente con un clado de cepas 2b europeas y norteamericana.

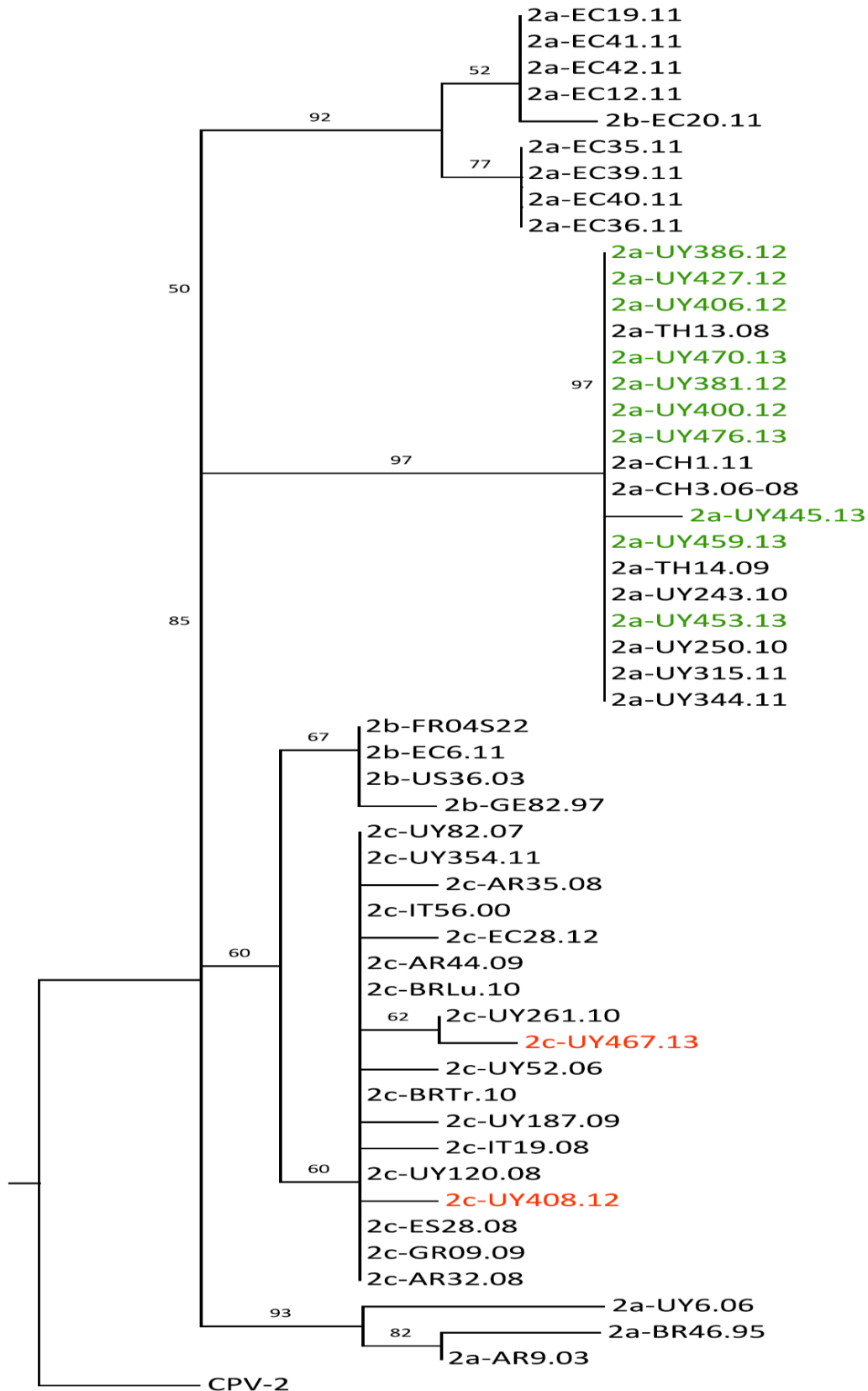


Figura 13. Árbol filogenético realizado por máxima verosimilitud construido con secuencias que codifican para el fragmento más variable de VP2 de CPV de varios años y regiones del mundo. Se resaltan las secuencias obtenidas durante este trabajo, en verde las 2a y en rojo las 2c.

6.4. Datos epidemiológicos y su relación con la variante CPV

En la Tabla 12 se detallan los resultados de los cálculos realizados para analizar la posible correlación entre las variantes de CPV y los datos clínicos y epidemiológicos de las muestras. Se consideró que la asociación era significativa para valores de $p \leq 0,05$.

Tabla 12. Análisis de la correlación entre la variante de CPV y las variables (síntomas, mortalidad, procedencia, vacunación, estación y año) mediante la prueba de χ^2 de Pearson, usando un grado de libertad y calculando el p -valor.

	Variable	Variante de CPV		χ^2	p -valor
		2a % (n/70)	2c % (n/18)		
Síntomas	Fiebre	40 (28)	44,4 (8)	0,005	0,9416
	Vómitos	97,1 (68)	83,3 (15)	2,844	0,0917
	Anorexia	57,1 (40)	38,9 (7)	1,254	0,2628
	Diarrea	92,9 (65)	94,4 (17)	0,057	0,8117
	Gastroenteritis	82,9 (58)	72,2 (13)	0,469	0,4936
	Depresión y decaimiento	62,9 (44)	33,3 (6)	3,955	0,0467*
Mortalidad		41,4 (29)	61,1 (11)	1,514	0,2186
Procedencia	Montevideo	60 (42)	22,2 (4)	6,746	0,0094*
	Interior	40 (28)	77,8 (14)		
Estación	Verano	35,7 (25)	16,7 (3)	1,597	0,2063
	Otoño	27,1 (19)	27,8 (5)	0,003	0,9570
	Invierno	25,7 (18)	27,8 (5)	0,032	0,8590
	Primavera	11,4 (8)	27,8 (5)	1,880	0,1703
Vacunación	1 dosis	18,6 (13)	22,2 (4)	0	0,9879
	2 dosis	27,1 (19)	16,7 (3)	0,372	0,5417
	3 dosis	30 (21)	16,7 (3)	0,699	0,4031
	4 dosis	7,1 (5)	0 (0)	0,356	0,5507
	Sin	17,1 (12)	44,4 (8)	4,622	0,0316*
	Con	82,9 (58)	55,6 (10)		
Año	2012	55,7 (39)	94,4 (17)	7,683	0,0056*
	2013	44,3 (31)	5,6 (1)		

* p -valor $\leq 0,05$

De las muestras obtenidas durante 2012, 17 poseen el genotipo correspondiente a la variante 2c y 39 a la variante 2a, mientras que durante el año 2013 únicamente una muestra registrada fue variante 2c y 31 muestras variante 2a (Figura 14). La diferencia en la frecuencia de las variantes para los dos años analizados es muy significativa ($p = 0,0056$) (Tabla 12).

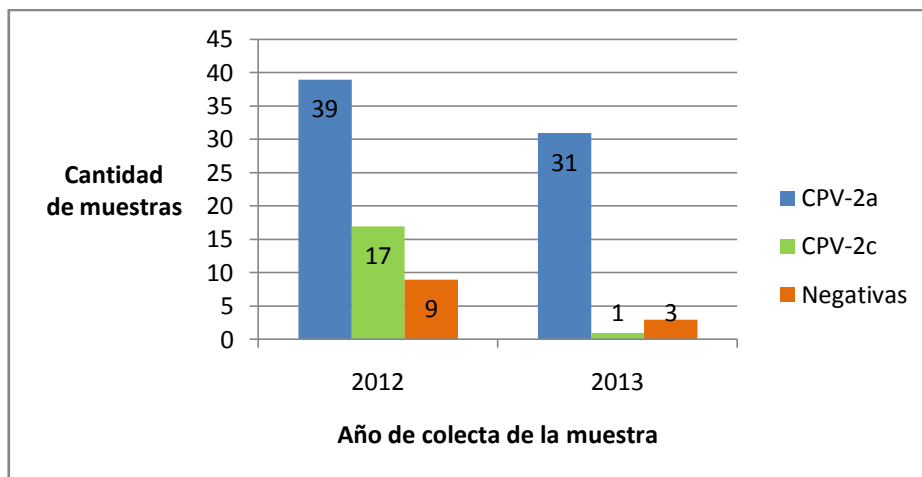


Figura 14. Gráfico de barras donde se representan las frecuencias de las variantes de CPV durante los años 2012 y 2013.

Analizando la información proporcionada por los veterinarios sobre cada uno de los 100 casos ingresados de presunta parvovirus, se observa un mayor porcentaje de mortalidad para el total de los casos de perros infectados con variante 2c con respecto a los que se registran para las variantes caracterizadas como 2a (Figura 15). Sin embargo esta asociación no fue estadísticamente significativa (Tabla 12). En cuanto a los síntomas clínicos observados y reportados por los veterinarios, todos tuvieron una distribución independiente en relación a la variante encontrada en la muestra, excepto para la depresión y decaimiento. Este síntoma fue el único con diferencia significativa entre las variantes 2c (33,3%) y 2a (62,9%), con un valor $p = 0,0467$ (Tabla 12).

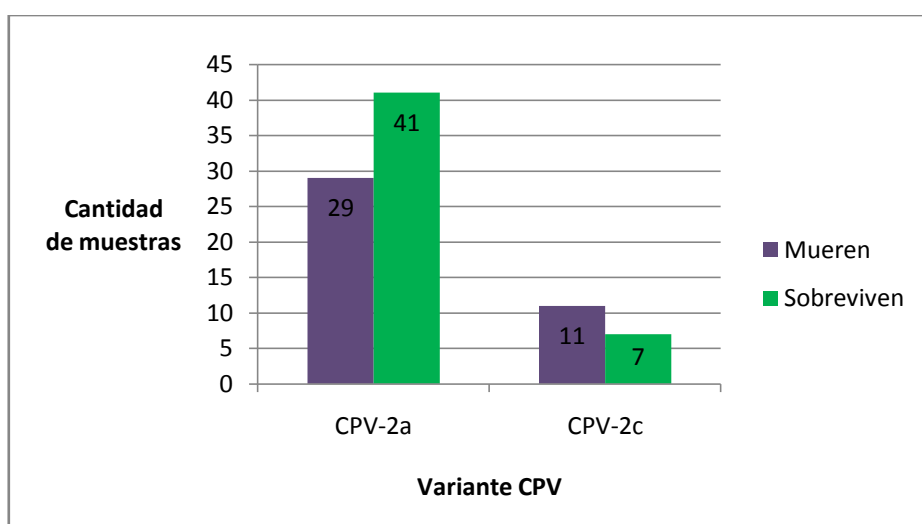


Figura 15. Gráfico de barras donde se representan las frecuencias de supervivencia y mortalidad respecto a las variantes CPV.

Con respecto a variables geográficas vemos ciertas diferencias en la distribución de las frecuencias de las variantes de parvovirus. La frecuencia de casos de variante 2c registrados en el interior del país (77,8%) es significativamente más alta que la de casos detectados de 2a (40 %). En Montevideo la frecuencia de casos de infección por variante 2a (60%) fue mayor a la de 2c (22,2%). La asociación de estas variantes fue muy significativa ($p = 0,0094$) (Figura 16) (Tabla 12).

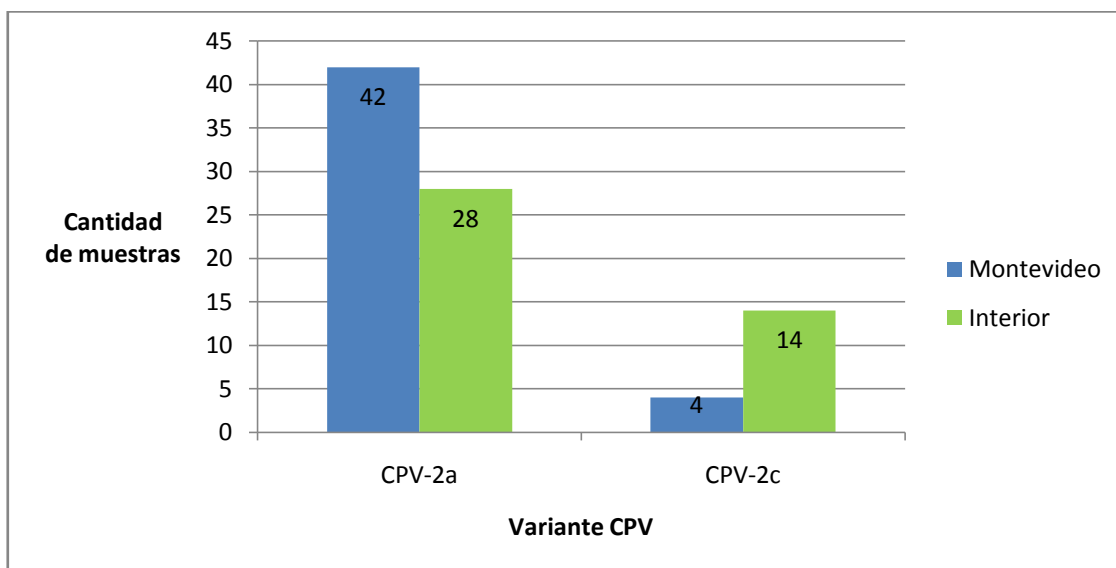


Figura 16. Distribución de las variantes de CPV según la zona de procedencia del perro infectado.

En cuanto a la época del año, se consideró la fecha de colecta y se agruparon las muestras dividiéndolas por estaciones del año. En total el registro de los casos de infección por parvovirus están distribuidas de manera independiente entre las cuatro estaciones, sin observar reportes de una u otra variante en ninguna estación en particular (Figura 17) (Tabla 12).

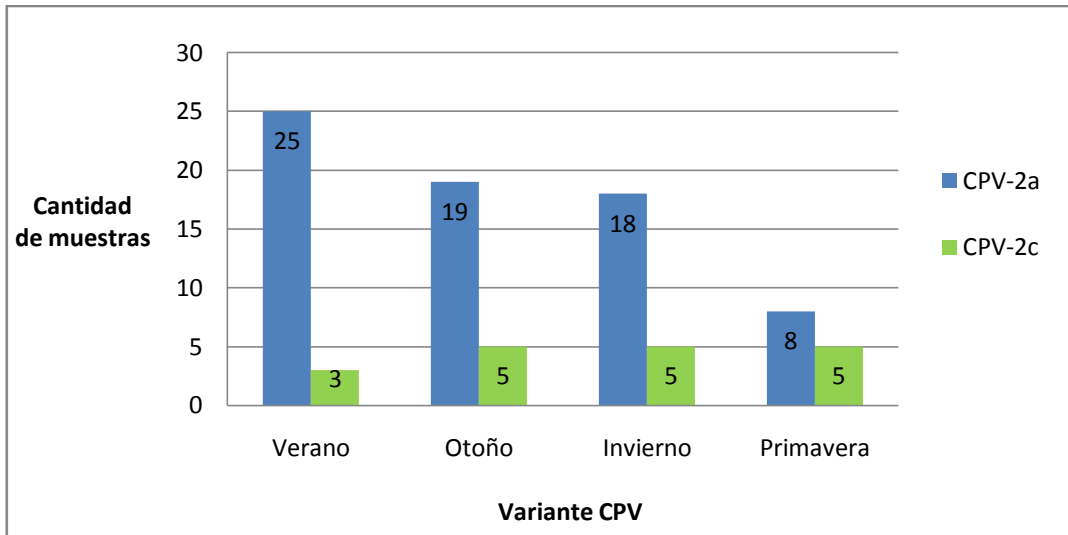


Figura 17. Distribución de las variantes de CPV según la estación del año en la cual se recolectó la muestra.

Observando la distribución de las variantes en función de la vacunación, no se encontró relación entre la cantidad de dosis de vacunas administradas y la variante de CPV detectada en la muestra. Se podría destacar que no hay perros infectados con la variante 2c que hayan recibido las 4 dosis (Figura 18). Existe diferencia significativa ($p = 0,00316$) entre los casos reportados de perros vacunados y sin vacunación (Tabla 12).

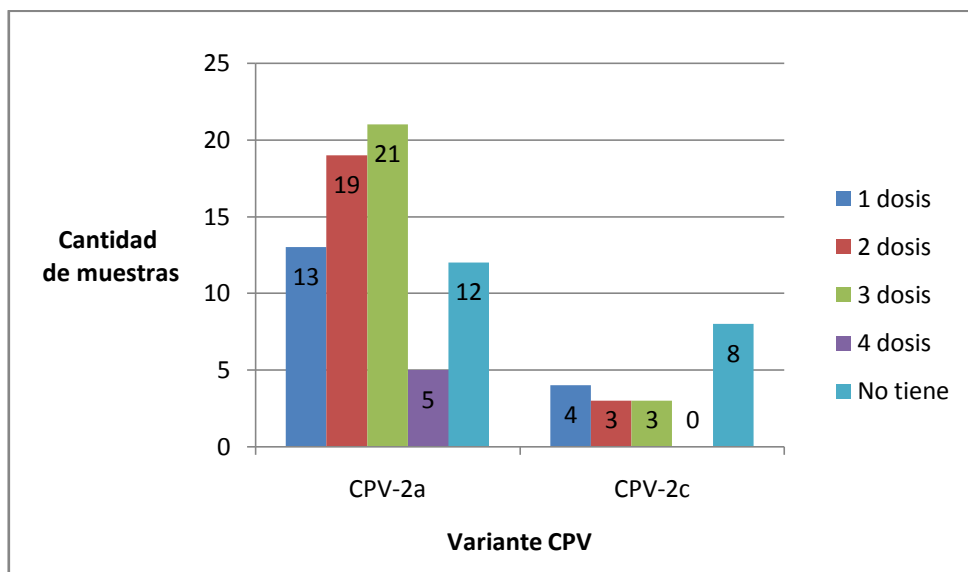


Figura 18. Distribución de las variantes de CPV según la cantidad de dosis vacunal que recibieron.

7. DISCUSIÓN

Cuando los síntomas que definen una enfermedad son comunes a numerosas afecciones, el diagnóstico clínico no siempre es certero. Muchos agentes etiológicos, como coronavirus, paramixovirus, rotavirus, bacterias y parásitos intestinales, y problemáticas relacionadas a la dieta y cuidados del perro, pueden causar gastroenteritis hemorrágica, síntoma característico de la parvovirus (Pollock et al. 1979; Squires 2003). Por esto es de suma importancia contar con métodos alternativos de detección que permitan a los médicos veterinarios planificar el tratamiento adecuado y evitar la dispersión del virus. Existen numerosas metodologías con las que es posible detectar a CPV en muestras de animales infectados (Nandi et al. 2010). Las técnicas moleculares basadas en detección de ácidos nucleicos, suelen ser rápidas y efectivas, además de brindar información sobre las características de las variantes virales y realizar estudios evolutivos a nivel local, regional y mundial (Shackelton et al. 2005).

En esta tesina, utilizamos una técnica de diagnóstico basada en PCR para estudiar a CPV en Uruguay. Posteriormente se realizó su caracterización por RFLP para discriminar las variantes 2c de las variantes no-2c (2a y 2b) (Buonavoglia et al. 2001). La metodología desarrollada en el laboratorio por el grupo (Pérez et al. 2012), aquí implementada, también diferencia las cepas de campo circulantes de las vacunales (CPV-2), lo que permite establecer el origen (campo o vacunal) de la cepa asociada a una infección que se produce pocos días después de la vacunación (Figura 10). Además, debido a que en algunos casos la vacuna se excreta hasta 45 días después de la infección, esta metodología evita el diagnóstico de falsos positivos causados por la cepa vacunal (Decaro et al. 2005; Lin et al. 2014).

La metodología implementada se aplicó al diagnóstico de 100 muestras de canes uruguayos con síntomas clínicos de parvovirus, principalmente diarreas con sangre. Del total de muestras, 88 (88%) fueron positivas, indicando que CPV es la principal causa de gastroenteritis hemorrágica en cachorros en nuestro país. Con respecto a la caracterización por RFLP, se encontraron 17 cepas de variante 2c durante 2012, y tan sólo una en el 2013. Las restantes 70 cepas (39 en 2012 y 31 durante 2013) se clasificaron como no-2c. En esta tesina se incluyó la secuenciación de algunas cepas no-2c, lo que permitió su caracterización como variantes 2a (Tabla 7), habiendo sido el resto de las cepas caracterizadas como 2a en el marco de otras investigaciones realizadas en el laboratorio.

La comparación de las cepas uruguayas 2a y 2c evidenció 5 cambios aminoacídicos, cuatro cambios no-sinónimos y uno sinónimo, ubicados en las posiciones 267, 324, 426, 440 y 277 de VP2 (Tabla 10). De éstos, el más relevante es el de la posición 426,

localizado en la espícula del tercer eje de simetría, que determina las diferencias antigénicas entre las variantes (Shackelton et al. 2005).

El cambio 267, generado por una sustitución en la segunda posición del codón, genera una tirosina que no afectaría la antigenicidad del virus por hallarse en una región no expuesta de la cápside (Agbandje et al. 1995).

El cambio del aminoácido tirosina por una isoleucina en la posición 324 implica dos sustituciones, en primera y segunda posición, del codón correspondiente (TAT...ATT). Este cambio se describió previamente solo en países asiáticos (China, Corea, India, Japón, Tailandia y Taiwán), donde alcanzó alta prevalencia en poblaciones actuales (Zhang et al. 2010; Lin et al. 2014). Se cree que el cambio surgió hace algunos años y está en rápido proceso de expansión, ya que se detectó en todas las cepas 2a reportadas en Taiwán (Lin et al. 2014). El residuo 324 es adyacente al aminoácido 323 que, junto al residuo en la posición 93, afectan el rango de huésped y el tropismo del virus por unión al receptor de la transferrina (Hueffer et al. 2003). Además este aminoácido estaría evolucionando bajo selección positiva en todos los parvovirus de carnívoros (Hoelzer et al. 2008).

El cambio en la posición 440 es también relevante debido a su ubicación en el sitio antigénico de la espícula del tercer eje de simetría (Tsao et al. 1991), y a que se encuentra bajo selección positiva (Decaro et al. 2009). Se han descrito tres residuos para esta posición; i) el aminoácido treonina original, observado en las dos cepas 2c aquí estudiadas, ii) el aminoácido alanina, generado por una transición en el primer nucleótido del codón (ACA...GCA), que se observa en las cepas 2a uruguayas y en otras poblaciones (Battilani et al. 2002; Kapil et al. 2007; Pereira et al. 2007; Gallo Calderón et al. 2012; Maya et al. 2013), y iii) el aminoácido serina, causado por una transversión en la primera posición del codón (ACA...TCA), que se observa en Ecuador (Aldaz et al. 2013), y en una única cepa del virus de la panleucopenia felina en Italia (Decaro et al. 2008). La posición 440 habría evolucionado de forma independiente en diferentes poblaciones, lo que explica su presencia en poblaciones de CPV no relacionadas evolutivamente (Decaro et al. 2007).

En el árbol filogenético de máxima verosimilitud construido a partir de las secuencias uruguayas y de distintas partes del mundo (Tablas 7 a 9) se observan varios clados o linajes formados por cepas de diferentes orígenes (Figura 13). El clado formado por las cepas 2a asiáticas y uruguayas de los años 2010 a 2013 tiene buen apoyo estadístico y es muy homogéneo; observándose sólo la muestra M445 con un cambio sinónimo con respecto a las demás. Dentro de este grupo no aparecen otras secuencias 2a de América o Europa, por lo que las cepas 2a que circulan en Uruguay no se encuentran relacionadas filogenéticamente con cepas americanas o europeas, ni con las 2c co-circulantes. Es notorio también que estas cepas 2a son muy divergentes con respecto a

la cepa 2a reportada en 2006 en Uruguay, o a las 2a/2b descritas para Argentina y Brasil (Maya et al. 2013).

Por otro lado se observa la formación de un clado donde se agrupan secuencias 2a ecuatorianas, constituyendo un único linaje que comparte ancestro común con una cepa CPV-2b también ecuatoriana. En otro linaje, aparece otra secuencia CPV-2b de Ecuador que se agrupa con secuencias CPV-2b de origen europeo y norteamericano.

Las cepas 2c forman un clado que es más heterogéneo en secuencias e incluye virus uruguayos y de otros países sudamericanos como Argentina, Brasil y Ecuador, así como aislados de origen europeo: italianos, griegos y españoles. Todas ellas forman un grupo monofilético, definido como linaje CPV-2c Europa/Sudamérica. Se cree que este linaje se puede haber originado en Europa y luego invadió Sudamérica durante la pasada década (Maya et al. 2013). La variabilidad observada dentro de este linaje sería consecuencia de su origen más antiguo.

A pesar de que la muestra es relativamente pequeña ($N = 100$), se realizó una primera aproximación al análisis estadístico de la correlación de las variantes de CPV con la información clínica. La información proporcionada por los veterinarios y su estudio en un contexto estadístico, es de suma importancia para establecer el estado sanitario actual de la población canina.

En cuanto a los síntomas que afectaban a los canes, la depresión y el decaimiento se observaron con mayor frecuencia en los infectados por la cepa 2a ($p = 0,0467$). Reportes recientes en Ecuador (Aldaz et al. 2013) indican que la depresión podría estar relacionada con la variante que infecta al animal. Sin embargo, el valor de significancia está cercano al límite del 5%, por lo que debería ser corroborado en estudios futuros. En el resto de los síntomas analizados (fiebre, vómitos, anorexia, diarrea y gastroenteritis hemorrágica) no se observó correlación con ninguna de las variantes (Tabla 12). Con respecto a la mortalidad, no encontramos diferencias entre las variantes (Figura 15), a pesar de que existen reportes que indican que la infección causada por la variante 2c está asociada a casos más severos de gastroenteritis hemorrágica y a la mortalidad (Buonavoglia et al. 2001; Decaro et al. 2008).

Se destaca la alta supervivencia registrada para los casos negativos para parvovirus, tal vez debido a que las infecciones causadas por otros patógenos que generan sintomatologías similares a las de CPV, son menos nocivas para el animal.

En relación a la vacunación, en 68 animales vacunados se detectó infección por alguna de las cepas de CPV en las muestras. Por esto, es importante destacar que el análisis por RFLP confirmó que la causante de la enfermedad era siempre una cepa de campo, ya que no se detectó en ningún caso el patrón de restricción que corresponde a una cepa vacunal de tipo 2 (Figura 11). Esta información es importante ya que cuando la infección se manifiesta pocos días después de la administración de una dosis de

vacuna, los propietarios de los animales suelen sospechar que la enfermedad se generó por la vacunación, tal vez como consecuencia de una reversión al estado patogénico de la cepa vacunal (Decaro et al. 2007).

Para que el animal esté protegido es necesario contar con un plan de vacunación completo. Las recomendaciones sugieren que con 3 o 4 dosis, el perro estaría protegido, pero éstas deben estar administradas a intervalos correctos para permitir que se desarrolle la inmunidad (Day et al. 2010). Los animales con planes incompletos pueden ser susceptibles a la infección, particularmente si no se completó el plan, las vacunas no se administraron correctamente o hubo problemas en la conservación de la vacuna (por ejemplo no respetando la cadena de frío).

Cinco canes que presentaron las 4 dosis (plan completo) se infectaron, todos ellos con la variante 2a. Varios trabajos han demostrado que las vacunas de tipo 2 protegerían contra las tres variantes antigénicas circulantes (Larson et al. 1997; Larson et al. 2008). Si el plan de vacunación fue correcto y se administró adecuadamente, la infección podría deberse a diferencias en la protección de la vacunación contra cepas de campo. Puede influir también la epidemiología local de la enfermedad, ya que para que el animal desarrolle cierto nivel de inmunidad natural ante las variantes circulantes se requiere determinado tiempo de contacto entre la variante y los canes (Doki et al. 2006).

Para la distribución temporal de las variantes detectadas en las muestras a lo largo del año, no hay una correlación significativa ya que se observa una distribución independiente de ambas variantes en las cuatro estaciones (Figura 17).

Existe una diferencia significativa entre las variantes detectadas en ambos años (Figura 14), revelando un cambio en la prevalencia de las variantes 2a respecto a la 2c. Esto está indicando una tendencia al reemplazo de una variante por la otra en nuestro país, cambio que comenzó a observarse poco después de la emergencia de la variante 2a en el año 2010 (Pérez et al. 2012). La propagación de la variante 2a llevó a un aumento en su frecuencia hasta casi desplazar completamente a la cepa 2c (un solo caso detectado durante 2013) en nuestro territorio en apenas 4 años (Figura 19). El reemplazo de la variante 2c por la variante 2a es un cambio epidemiológico que se ha descrito únicamente en nuestro país, no observándose hasta el momento un comportamiento similar en los países vecinos. Es posible que este cambio haya comenzado en Uruguay y se haya extendido en la población canina, comenzando una expansión que tiene como centro a Montevideo. Esto está sustentado por la distribución geográfica de las variantes dentro del territorio uruguayo. Hay una diferencia significativa en la prevalencia de la variante 2c en el interior del país (14/18) en comparación a los registros para la capital (Figura 16), mientras que los casos de infección por la variante 2a se detectan en su mayoría en Montevideo (60/70).

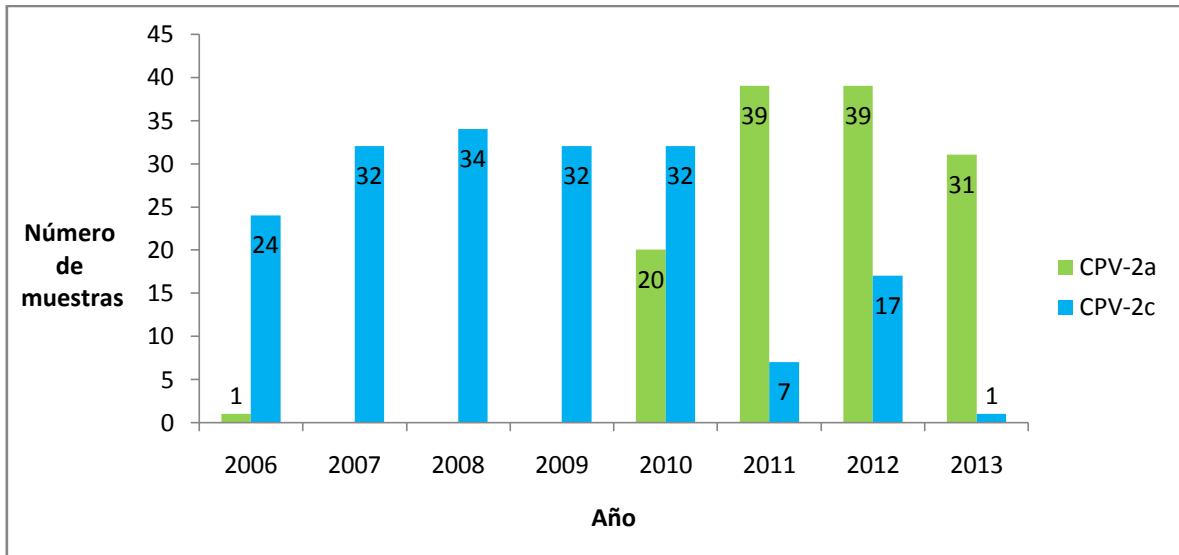


Figura 19. Frecuencias de las variantes de CPV reportados por nuestro laboratorio desde 2006 a 2013.

Es importante señalar que un proceso similar de reemplazo de una variante por otra se describió para la variante 2c en varios países en los últimos 15 años (Decaro et al. 2009). En nuestro país ocurrió alrededor del 2005, cuando la variante 2c reemplazó a variantes de otro tipo que circulaban previo a su emergencia (Pérez et al. 2007; Pérez et al. 2012; Maya et al. 2013). En Brasil, la variante 2c era desconocida hace algunos años (Pereira et al. 2000; Costa et al. 2005) y luego comenzó a expandirse y continúa circulando en la actualidad (Pinto et al. 2012), extendiéndose a zonas del medio oeste de Brasil, donde alcanza una alta prevalencia (Fontana et al. 2013). La misma situación se observa en Argentina, ya que desde los primeros reportes que indicaban la detección de esta variante (Calderon et al. 2009), 2c se convirtió en la cepa prevalente (Calderón et al. 2011).

CPV-2c se describió por primera vez en Uruguay en el 2006 (Pérez et al. 2007) y no hay registros de las variantes que circulaban, con la excepción de una cepa 2a que se detectó durante 2006 (Maya et al. 2013). En Brasil, la variante 2c se detectó en 2008, y en Argentina, en 2003, alcanzando pocos años después una frecuencia de 80% y 100%, respectivamente (Calderon et al. 2009; Castro et al. 2011; Calderón et al. 2011; Strcek et al. 2009; Pinto et al. 2012). Antes del surgimiento de 2c, las variantes que circulaban en ambos países eran 2a y 2b (Calderon et al. 2009; Pereira et al. 2007), las cuales en el estudio filogenético realizado en el presente trabajo se agrupan con la secuencia de la cepa 2a colectada en 2006 en Uruguay. Por estas razones se plantea la hipótesis de que en Uruguay, antes del surgimiento de la variante 2c, circulaba una población 2a/2b de cepas “antiguas” (Maya et al. 2013), con un comportamiento y variabilidad genética similar a las poblaciones virales de los países vecinos.

Las diferencias entre las secuencias de las cepas 2a y 2c descritas en este trabajo, junto con las evidencias de trabajos recientes con los genomas completos de cepas de CPV uruguayas reportadas hasta el 2011 (Pérez et al. 2014), indican que existe una alta divergencia entre las dos variantes circulantes en la población canina uruguaya. Esta variación apoya la hipótesis de que las dos cepas se originaron y evolucionan de manera independiente, formando dos grupos filogenéticos divergentes, uno de origen europeo (2c) y el otro asiático (2a) (Pérez et al. 2012; Maya et al. 2013).

Hasta hace unos años, se consideraba que la evolución de CPV a escala global presentaba un alto nivel de diferenciación local, originando poblaciones virales estructuradas con escasa migración entre regiones geográficas (Hoelzer et al. 2008; Clegg et al. 2011). Sin embargo, nuestros hallazgos en Uruguay permiten concluir que la epidemiología de CPV en las últimas dos décadas estuvo caracterizada por eventos de invasión y reemplazo completo de cepas, primero por 2c y luego por 2a. Estos eventos fueron intercontinentales y de diferente origen, y evidencian que eventos de invasión y reemplazo son comunes en épocas actuales.

En el continente sudamericano se observa que existe alta variabilidad en la población de CPV. Tanto en Brasil como en Argentina se han reportado las tres variantes circulantes en distinta proporción, siendo la cepa 2c la predominante desde su surgimiento (Pinto et al. 2012; Calderón et al. 2011). Esto demuestra que la cepa 2c ha tenido una expansión sorprendente en Sudamérica, alcanzando diferentes territorios, y confirma la importancia de los eventos de invasión, expansión y reemplazo en el continente. En Ecuador (Aldaz et al. 2013) se observó una notable diversidad genética local, donde en una ciudad relativamente pequeña se detectaron las tres variantes de CPV, con cepas de distintos orígenes. Además la presencia en la posición 440 de VP2 del residuo serina, sugiere un papel importante de esta posición en la evolución y surgimiento de nuevas variantes, ya que este cambio no es común en ninguna otra población de CPV.

En base a lo expuesto anteriormente, podemos plantear una hipótesis sobre la evolución de CPV en Sudamérica, en la que eventos de invasión y reemplazo transcontinentales recientes explicarían parte de la variabilidad observada en el continente. Además, es claro también que han ocurrido eventos de diferenciación locales, asociados a la adquisición de cambios particulares en VP2. La convergencia de poblaciones de diferente origen favorece también la ocurrencia de eventos de co-infección y recombinación que colaboran con la generación de variabilidad a nivel local (Pérez et al. 2014).

Continuar con los estudios de la variabilidad genética de las cepas de CPV, extendiéndolos a más países sudamericanos, nos permitirá detectar la emergencia y dispersión de las cepas virales, y analizar la dinámica de este virus en el continente.

CPV es sin dudas un interesante modelo de estudio por su relevancia sanitaria y su particular evolución.

8. CONCLUSIONES

Se realizó el diagnóstico molecular de parvovirus canino en Uruguay mediante PCR y RFLP, confirmando la eficacia y sensibilidad del método desarrollado en nuestro laboratorio. Se logró determinar que la principal causa de gastroenteritis hemorrágica en canes es la infección por CPV, detectándose el mismo en el 88% de las muestras con síntomas clínicos.

La caracterización genética mediante RFLP para las cepas 2c y mediante secuenciación de la región codificante del lazo GH, la región más variable de VP2, permitió clasificar a las variantes circulantes observando co-existencia de las variantes 2a y 2c en la población canina uruguaya.

La comparación de las secuencias parciales de las muestras uruguayas colectadas durante 2012 y 2013, y su análisis filogenético, confirman un cambio epidemiológico importante en nuestro territorio. Este cambio se caracteriza por la aparición de variantes 2a de origen asiático que invadieron y desplazaron a la población homogénea de cepas 2c circulante hasta el momento. En Sudamérica la evolución de CPV se podría explicar por la ocurrencia de eventos de invasión de una variante con fuerte capacidad de reemplazo, además de eventos de diferenciación que pueden generar divergencia genética local.

Las particularidades de parvovirus canino en Uruguay lo convierten en un modelo interesante para estudiar la evolución viral a escala local.

9. PERSPECTIVAS

Es de suma importancia continuar con el relevamiento del parvovirus canino en Uruguay, buscando incluir muestras de diferentes puntos del territorio para tener un panorama más amplio de la dinámica viral. Asimismo ampliar el rango de huésped, realizando relevamiento tanto en animales domésticos como en fauna silvestre.

Si bien la detección de CPV a nivel del territorio uruguayo es fundamental, los virus no conocen fronteras a la hora de infectar huéspedes y diseminar una enfermedad. Por esto es que también debemos considerar lo que sucede en zonas fronterizas, ya sea tanto del norte, oeste y este del país como también fuera de fronteras geográficas, en zonas limítrofes de Argentina y Brasil. Por lo tanto, se continuará trabajando con este modelo viral realizando estudios evolutivos y filogeográficos para analizar su dinámica y epidemiología a nivel regional.

Además, sería de gran interés poder analizar la dinámica evolutiva de cada una de las tres variantes para cada país de Sudamérica, para poder determinar qué eventos promueven el surgimiento de las mismas en cada territorio, ya sea que estén surgiendo *de novo* o que sean exclusivamente eventos migratorios provenientes de otros continentes. Esta información sería útil para dar apoyo a una de las hipótesis acerca del comportamiento observado en Uruguay y Sudamérica, de invasión y reemplazo propuesto para este modelo viral.

Con el fin de obtener la mayor cantidad de información genética y así lograr que los análisis comparativos sean más profundos, se planea obtener secuencias de genomas completos de muestras locales y regionales ya que es importante poder conocer qué es lo que está sucediendo evolutivamente a nivel de las proteínas no estructurales NS.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Agbandje, M., C. R. Parrish, & M. G. Rossmann. 1995. "The Structure of Parvoviruses." *Seminars in Virology* 6: 299–309.
- Aldaz, J., J. García-Díaz, L. Calleros, K. Sosa, G. Iraola, A. Marandino, M. Hernández, Y. Panzera, and R. Pérez. 2013. "High Local Genetic Diversity of Canine Parvovirus from Ecuador." *Veterinary Microbiology* 166 (1-2): 214–19.
- Allison, A. B., D. J. Kohler, A. Ortega, E. a Hoover, D. M. Grove, E. C. Holmes, & C. R. Parrish. 2014. "Host-Specific Parvovirus Evolution in Nature Is Recapitulated by in Vitro Adaptation to Different Carnivore Species." *PLoS Pathogens* 10 (11): e1004475.
- Battilani, M., S. Ciulli, E. Tisato, & S. Prosperi. 2002. "Genetic Analysis of Canine Parvovirus Isolates (CPV-2) from Dogs in Italy." *Virus Research* 83 (1-2): 149–57.
- Berns, K. I. 1990. "Parvovirus Replication." *Microbiological Reviews* 54 (3): 316–29.
- Buonavoglia, C., V. Martella, A. Pratelli, M. Tempesta, A. Cavalli, D. Buonavoglia, G. Bozzo, G. Elia, N. Decaro, & L. Carmichael. 2001. "Evidence for Evolution of Canine Parvovirus Type 2 in Italy." *The Journal of General Virology* 82 (Pt 12): 3021–25.
- Calderón, M. G., N. Mattion, D. Bucafusco, F. Fogel, P. Remorini, & J. La Torre. 2009. "Molecular Characterization of Canine Parvovirus Strains in Argentina: Detection of the Pathogenic Variant CPV2c in Vaccinated Dogs." *Journal of Virological Methods* 159 (2): 141–45.
- Calderón, M. G., C. Romanutti, A. D' Antuono, L. Keller, N. Mattion, & J. La Torre. 2011. "Evolution of Canine Parvovirus in Argentina between Years 2003 & 2010: CPV2c Has Become the Predominant Variant Affecting the Domestic Dog Population." *Virus Research* 157 (1): 106–10.
- Carmichael, L. E. 2005. "An Annotated Historical Account of Canine Parvovirus." *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 52 (7-8): 303–11.
- Castro, T. X., E. M. Costa, J. P. G. Leite, N. V. Labarthe, & R. C. N. Cubel Garcia. 2010. "Partial VP2 Sequencing of Canine Parvovirus (CPV) Strains Circulating in the State of Rio de Janeiro, Brazil: Detection of the New Variant CPV-2c." *Brazilian Journal of Microbiology* 41: 1093–98.
- Castro, T. X., E. M. Costa, J. P. Leite, N. V. Labarthe, & R. C. N. Cubel Garcia. 2011. "Monitoring of Canine Parvovirus (CPV) Strains Detected in Vaccinated Puppies in Brazil." *Research in Veterinary Science* 90 (2). Elsevier Ltd: 336–40.

- Chang, S. F., J. Y. Sgro, & C. R. Parrish. 1992. "Multiple Amino Acids in the Capsid Structure of Canine Parvovirus Coordinately Determine the Canine Host Range and Specific Antigenic and Hemagglutination Properties." *Journal of Virology* 66 (12): 6858–67.
- Chapman, M. S., & M. G. Rossmann. 1993. "Structure, Sequence, and Function Correlations among Parvoviruses." *Virology* 194: 491–508.
- Clegg, S. R., K. P. Coyne, J. Parker, S. Dawson, S. a Godsall, G. Pinchbeck, P. J. Cripps, R. M. Gaskell, & a D. Radford. 2011. "Molecular Epidemiology and Phylogeny Reveal Complex Spatial Dynamics in Areas Where Canine Parvovirus Is Endemic." *Journal of Virology* 85 (15): 7892–99.
- Costa, a P., J. P. G. Leite, N. V. Labarthe, & R. C. N. Cubel Garcia. 2005. "Genomic Typing of Canine Parvovirus Circulating in the State of Rio de Janeiro, Brazil from 1995 to 2001 Using Polymerase Chain Reaction Assay." *Veterinary Research Communications* 29 (8): 735–43.
- Cotmore, S. F., & P. Tattersall. 2007. "Parvoviral Host Range and Cell Entry Mechanisms." *Advances in Virus Research* 70 (07): 183–232.
- Daeffler, L., R. Horlein, J. Rommelaere, & J. P. F. Nuesch. 2003. "Modulation of Minute Virus of Mice Cytotoxic Activities through Site-Directed Mutagenesis within the NS Coding Region." *Journal of Virology* 77 (23): 12466–78.
- Day, M.J., M.C. Horzinek, & R.D. Schultz. 2010. "WSAVA Guidelines for the Vaccination of Dogs and Cats." *Journal of Small Animal Practice* 51 (6): 1–32.
- Decaro, N., C. Desario, A. Miccolupo, M. Campolo, A. Parisi, V. Martella, F. Amorisco, M. S. Lucente, A. Lavazza, & C. Buonavoglia. 2008. "Genetic Analysis of Feline Panleukopenia Viruses from Cats with Gastroenteritis." *The Journal of General Virology* 89 (Pt 9): 2290–98.
- Decaro, N., V. Martella, C. Desario, a L. Bellacicco, M. Camero, L. Manna, D. D'Aloja, & C. Buonavoglia. 2006. "First Detection of Canine Parvovirus Type 2c in Pups with Haemorrhagic Enteritis in Spain." *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 53 (10): 468–72.
- Decaro, N., C. Desario, D. D. Addie, V. Martella, M. J. Vieira, G. Elia, A. Zicola, et al. 2007. "The Study Molecular Epidemiology of Canine Parvovirus, Europe." *Emerging Infectious Diseases* 13 (8): 1222–24.
- Decaro, N., C. Desario, M. Campolo, G. Elia, V. Martella, D. Ricci, E. Lorusso, & C. Buonavoglia. 2005. "Clinical and Virological Findings in Pups Naturally Infected by Canine Parvovirus Type 2 Glu-426 Mutant." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 17 (2): 133–38.

- Decaro, N., C. Desario, G. Elia, M. Campolo, A. Lorusso, V. Mari, V. Martella, & C. Buonavoglia. 2007. "Occurrence of Severe Gastroenteritis in Pups after Canine Parvovirus Vaccine Administration: A Clinical and Laboratory Diagnostic Dilemma." *Vaccine* 25 (7): 1161–66.
- Decaro, N., C. Desario, G. Elia, V. Martella, V. Mari, A. Lavazza, M. Nardi, & C. Buonavoglia. 2008. "Evidence for Immunisation Failure in Vaccinated Adult Dogs Infected with Canine Parvovirus Type 2c." *The New Microbiologica* 31 (1): 125–30.
- Decaro, N., C. Desario, A. Parisi, V. Martella, A. Lorusso, A. Miccolupo, V. Mari, et al. 2009. "Genetic Analysis of Canine Parvovirus Type 2c." *Virology* 385 (1). Elsevier Inc.: 5–10.
- Desario, C., N. Decaro, M. Campolo, A. Cavalli, F. Cirone, G. Elia, V. Martella, E. Lorusso, M. Camero, & C. Buonavoglia. 2005. "Canine Parvovirus Infection: Which Diagnostic Test for Virus?" *Journal of Virological Methods* 126 (1-2): 179–85.
- Doki, M., K. Fujita, R. Miura, M. Yoneda, Y. Ishikawa, A. Taneno, & C. Kai. 2006. "Sequence Analysis of VP2 Gene of Canine Parvovirus Isolated from Domestic Dogs in Japan in 1999 and 2000." *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 29 (4): 199–206.
- Duffy, S., L. a Shackelton, & E. C. Holmes. 2008. "Rates of Evolutionary Change in Viruses: Patterns and Determinants." *Nature Reviews. Genetics* 9 (4): 267–76.
- Fontana, D. S., P. R. D. Rocha, R. A. S. Cruz, L. L. Lopes, A. L.T. Melo, M. M. Silveira, D. M. Aguiar, & C. A. Pescador. 2013. "A Phylogenetic Study of Canine Parvovirus Type 2c in Midwestern Brazil." *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33 (2). Colégio Brasileiro de Patologia Animal: 214–18.
- Gallo Calderón, M., M. Wilda, L. Boado, L. Keller, V. Malirat, M. Iglesias, N. Mattion, & J. La Torre. 2012. "Study of Canine Parvovirus Evolution: Comparative Analysis of Full-Length VP2 Gene Sequences from Argentina and International Field Strains." *Virus Genes* 44 (1): 32–39.
- Guindon, S., & O. Gascuel. 2003. "A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood." *Systematic Biology* 52 (5): 696–704.
- Hanson, N. D., & S. L. Rhode. 1991. "Parvovirus NS1 Stimulates P4 Expression by Interaction with the Terminal Repeats and through DNA Amplification." *Journal of Virology* 65 (8): 4325–33.
- Harbison, C. E., S. M. Lyi, W. S. Weichert, & C. R. Parrish. 2009. "Early Steps in Cell Infection by Parvoviruses: Host-Specific Differences in Cell Receptor Binding but Similar Endosomal Trafficking." *Journal of Virology* 83 (20): 10504–14.
- Hoelzer, K., & C. R. Parrish. 2010. "The Emergence of Parvoviruses of Carnivores." *Veterinary Research* 41 (6): 39.

- Hoelzer, K., L. a Shackelton, C. R. Parrish, & E. C. Holmes. 2008. "Phylogenetic Analysis Reveals the Emergence, Evolution and Dispersal of Carnivore Parvoviruses." *The Journal of General Virology* 89 (Pt 9): 2280–89.
- Horiuchi, M., Y. Yamaguchi, T. Gojobori, M. Mochizuki, H. Nagasawa, Y. Toyoda, N. Ishiguro, & M. Shinagawa. 1998. "Differences in the Evolutionary Pattern of Feline Panleukopenia Virus and Canine Parvovirus." *Virology* 249 (2): 440–52.
- Hueffer, K., J. S. L. Parker, W. S. Weichert, R. E. Geisel, J. Sgro, & C. R. Parrish. 2003. "The Natural Host Range Shift and Subsequent Evolution of Canine Parvovirus Resulted from Virus-Specific Binding to the Canine Transferrin Receptor." *Journal of Virology* 77 (3): 1718–26.
- Ikeda, Y., M. Mochizuki, R. Naito, K. Nakamura, T. Miyazawa, T. Mikami, & E. Takahashi. 2000. "Predominance of Canine Parvovirus (CPV) in Unvaccinated Cat Populations and Emergence of New Antigenic Types of CPVs in Cats." *Virology* 278 (1): 13–19.
- Kapil, S., E. Cooper, C. Lamm, B. Murray, G. Rezabek, L. Johnston, G. Campbell, & B. Johnson. 2007. "Canine Parvovirus Types 2c and 2b Circulating in North American Dogs in 2006 and 2007." *Journal of Clinical Microbiology* 45 (12): 4044–47.
- Kerr, J. R., S. F. Cotmore, M. E. Bloom, R. M. Linden, & C. R. Parrish. 2006. *Parvoviruses*. Edited by J R Kerr, S F Cotmore, M E Bloom, R M Linden, & C R Parrish.
- Larson, L. J., & R. D. Schultz. 1997. "Comparison of Selected Canine Vaccines for Their Ability to Induce Protective Immunity against Canine Parvovirus Infection." *American Journal of Veterinary Research* 58 (4): 360–63.
- Larson, L. J., & R. D. Schultz. 2008. "Do Two Current Canine Parvovirus Type 2 and 2b Vaccines Provide Protection against the New Type 2c Variant?" *Veterinary Therapeutics : Research in Applied Veterinary Medicine* 9 (2): 94–101.
- Lin, C., C. Chien, M. Chiou, L. Chueh, M. Hung, & H. Hsu. 2014. "Genetic Characterization of Type 2a Canine Parvoviruses from Taiwan Reveals the Emergence of an Ile324 Mutation in VP2." *Virology Journal* 11 (1). *Virology Journal*: 39.
- Lin, C., C. Chien, M. Chiou, J. Wang, Y. Lin, & Y. Xu. 2014. "DEVELOPMENT OF SYBR GREEN-BASED REAL-TIME PCR FOR THE DETECTION OF CANINE, FELINE AND PORCINE PARVOVIRUSES." *Taiwan Veterinary Journal* 40 (01): 1–9.
- Lukashov, V. V., & J. Goudsmit. 2001. "Evolutionary Relationships among Parvoviruses : Virus-Host Coevolution among Autonomous Primate Parvoviruses and Links between Adeno-Associated and Avian Parvoviruses." *Journal of Virology* 75 (6): 2729–40.

- Maya, L., L. Calleros, L. Francia, M. Hernández, G. Iraola, Y. Panzera, K. Sosa, & R. Pérez. 2013. "Phylogenetics Analysis of Canine Parvovirus in Uruguay: Evidence of Two Successive Invasions by Different Variants." *Archives of Virology* 158 (6): 1133–41.
- Nakamura, M., Y. Tohya, T. Miyazawa, M. Mochizuki, H. T. T. Phung, N. H. Nguyen, L. M. T. Huynh, et al. 2004. "A Novel Antigenic Variant of Canine Parvovirus from a Vietnamese Dog." *Archives of Virology* 149 (11): 2261–69.
- Nandi, S., & M. Kumar. 2010. "Canine Parvovirus: Current Perspective." *Indian Journal of Virology : An Official Organ of Indian Virological Society* 21 (1): 31–44.
- Nüesch, J. P. F., S. Dettwiler, R. Corbau, & J. Rommelaere. 1998. "Replicative Functions of Minute Virus of Mice NS1 Protein Are Regulated In Vitro by Phosphorylation through Protein Kinase C Replicative Functions of Minute Virus of Mice NS1 Protein Are Regulated In Vitro by Phosphorylation through Protein Kinase C." *J. Virol.* 72 (12): 9966–77.
- Nuesch, J. P. F., R. Corbau, P. Tattersall, & J. Rommelaere. 1998. "Biochemical Activities of Minute Virus of Mice Nonstructural Protein NS1 Are Modulated In Vitro by the Phosphorylation State of the Polypeptide." *J. Virol.* 72 (10): 8002–12.
- Parrish, C. R., C. F. Aquadro, M. L. Strassheim, J. F. Evermann, J. Y. Sgro, & H. O. Mohammed. 1991. "Rapid Antigenic-Type Replacement and DNA Sequence Evolution of Canine Parvovirus." *Journal of Virology* 65 (12): 6544–52.
- Parrish, C., P. O'Connell, J. Evermann, & L. Carmichael. 1985. "Natural Variation of Canine Parvovirus." *Science* 230 (4729): 1046–48.
- Parrish, C. R., & Y. Kawaoka. 2005. "The Origins of New Pandemic Viruses: The Acquisition of New Host Ranges by Canine Parvovirus and Influenza A Viruses." *Annual Review of Microbiology* 59 (January): 553–86.
- Pereira, C. a D., E. S. Leal, & E. L. Durigon. 2007. "Selective Regimen Shift and Demographic Growth Increase Associated with the Emergence of High-Fitness Variants of Canine Parvovirus." *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 7 (3): 399–409.
- Pereira, C. a D, T. A. Monezi, D. U. Mehnert, M. D'Angelo, & E. L. Durigon. 2000. "Molecular Characterization of Canine Parvovirus in Brazil by Polymerase Chain Reaction Assay." *Veterinary Microbiology* 75 (2): 127–33.
- Pérez, R., P. Bianchi, L. Calleros, L. Francia, M. Hernández, L. Maya, Y. Panzera, K. Sosa, & S. Zoller. 2012. "Recent Spreading of a Divergent Canine Parvovirus Type 2a (CPV-2a) Strain in a CPV-2c Homogenous Population." *Veterinary Microbiology* 155 (2-4): 214–19.

- Pérez, R., L. Calleros, A. Marandino, N. Sarute, G. Iraola, S. Grecco, H. Blanc, et al. 2014. "Phylogenetic and Genome-Wide Deep-Sequencing Analyses of Canine Parvovirus Reveal Co-Infection with Field Variants and Emergence of a Recent Recombinant Strain." Edited by Eduard Ayuso. *PLoS ONE* 9 (11): e111779.
- Pérez, R., L. Francia, V. Romero, L. Maya, I. López, & M. Hernández. 2007. "First Detection of Canine Parvovirus Type 2c in South America." *Veterinary Microbiology* 124 (1-2): 147–52.
- Pinto, L. D., A. F. Streck, K. R. Gonçalves, C. K. Souza, Â. O. Corbellini, L. G. Corbellini, & C. Wageck Canal. 2012. "Typing of Canine Parvovirus Strains Circulating in Brazil between 2008 and 2010." *Virus Research* 165 (1): 29–33.
- Pollock, R. V., & L. Carmichael. 1979. "Canine Viral Enteritis. Recent Developments." *Modern Veterinary Practice* 60 (5): 375–80.
- Posada, D. 2008. "jModelTest: Phylogenetic Model Averaging." *Molecular Biology and Evolution* 25 (7): 1253–56.
- Pratelli, A., A. Cavalli, V. Martella, M. Tempesta, N. Decaro, L. E. Carmichael, & C. Buonavoglia. 2001. "Canine Parvovirus (CPV) Vaccination : Comparison of Neutralizing Antibody Responses in Pups after Inoculation with CPV2 or CPV2b Modified Live Virus Vaccine" 8 (3): 612–15.
- Prittie, J. 2004. "Canine Parvoviral Enteritis : A Review of Diagnosis , Management , and Prevention." *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 14 (3): 167–76.
- Reed, a P., E. V. Jones, & T. J. Miller. 1988. "Nucleotide Sequence and Genome Organization of Canine Parvovirus." *Journal of Virology* 62 (1): 266–76.
- Sánchez, R., F. Serra, J. Tárraga, I. Medina, J. Carbonell, L. Pulido, A. de María, et al. 2011. "PhyloMon 2.0: A Suite of Web-Tools for Molecular Evolution, Phylogenetics, Phylogenomics and Hypotheses Testing." *Nucleic Acids Research* 39 (Web Server issue): W470–74.
- Schunck, B., W. Kraft, & U. Truyen. 1995. "Short Communication A Simple Touch-down Polymerase Chain Reaction for the Detection of Canine Parvovirus and Feline Panleukopenia Virus in Feces." *Journal of Virological Methods* 55: 427–33.
- Shackelton, L. a, C. R. Parrish, U. Truyen, & E. C. Holmes. 2005. "High Rate of Viral Evolution Associated with the Emergence of Carnivore Parvovirus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (2): 379–84.
- Spitzer, a L., C. R. Parrish, & I. H. Maxwell. 1997. "Tropic Determinant for Canine Parvovirus and Feline Panleukopenia Virus Functions through the Capsid Protein VP2." *The Journal of General Virology* 78 (Pt 4) (April): 925–28.

- Squires, R. A. 2003. "An Update on Aspects of Viral Gastrointestinal Diseases of Dogs and Cats." *New Zealand Veterinary Journal* 51 (6). Taylor & Francis: 252–61.
- Stöver, B. C., & K. F. Müller. 2010. "TreeGraph 2: Combining and Visualizing Evidence from Different Phylogenetic Analyses." *BMC Bioinformatics* 11 (January): 7.
- Strcek, A. F., C. K. de Souza, K. Gonçalves, L. Zang, L. Pinto, & C. Canal. 2009. "First Detection of Canine Parvovirus Type 2c in Brazil." *Brazilian Journal of Microbiology* 40: 465–69.
- Truyen, U. 2002. "Parvovirus Canino."
- Truyen, U. W. E., J. F. Evermann, E. Vieler, & C. R. Parrish. 1996. "Evolution of Canine Parvovirus Involved Loss and Gain of Feline Host Range." *Virology* 215 (0021): 186–89.
- Truyen, U. 2006. "Evolution of Canine Parvovirus--a Need for New Vaccines?" *Veterinary Microbiology* 117 (1): 9–13.
- Tsao, J., M. S. Chapman, M. Agbandje, W. Keller, K. Smith, H. Wu, M. Luo, et al. 1991. "The Three-Dimensional Structure of Canine Parvovirus and Its Functional Implications." *American Association for the Advancement of Science Stable* 251 (5000): 1456–64.
- Vihinen-Ranta, M., S. Suikkanen, & C. R. Parrish. 2004. "MINIREVIEW Pathways of Cell Infection by Parvoviruses and Adeno-Associated Viruses." *Journal of Virology* 78 (13): 6709–14.
- Vihinen-Ranta, M., D. Wang, W. S. Weichert, & C. R. Parrish. 2002. "The VP1 N-Terminal Sequence of Canine Parvovirus Affects Nuclear Transport of Capsids and Efficient Cell Infection." *Journal of Virology* 76 (4): 1884–91.
- Wang, D., W. Yuan, I. Davis, & C. R. Parrish. 1998. "Nonstructural Protein-2 and the Replication of Canine Parvovirus." *Virology* 240 (2): 273–81.
- Wang, H., W. Chen, S. Lin, J. Chan, & M. Wong. 2005. "Phylogenetic Analysis of Canine Parvovirus VP2 Gene in Taiwan." *Virus Genes* 31 (2): 171–74.
- Xie, Q., & M. S. Chapman. 1996. "Canine Parvovirus Capsid Structure , Analyzed at." *Journal of Molecular Biology* 264: 497–520.
- Zhang, R., S. Yang, W. Zhang, T. Zhang, Z. Xie, H. Feng, S. Wang, & X. Xia. 2010. "Phylogenetic Analysis of the VP2 Gene of Canine Parvoviruses Circulating in China." *Virus Genes* 40 (3): 397–402.

11. AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su apoyo y ánimo en todo momento. Por siempre alentarme a seguir adelante.

A mis amigas de la vida, “las cotas”, por bancarme y estar en las buenas y en las malas.

A Ruben Pérez y Lucía Calleros, por permitirme formar parte de la sección Genética Evolutiva. Por sus enseñanzas, apoyo y paciencia.

A todos los que formaron y forman parte de la sección, en especial a los amigos, con los que comparto a diario.

A los amigos y compañeros que han sido parte del camino transitado en la Facultad de Ciencias durante estos años.