

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS

***“ANÁLISIS DE VARIANTES GENÉTICAS DE PARVOVIRUS
CANINO EN URUGUAY”***

Stephanie Zoller

Orientador

Dr. Ruben Pérez, Sección Genética Evolutiva

Octubre, 2016

Índice

1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Familia Parvoviridae.....	4
1.2. Parvovirus canina, aspectos clínicos.....	5
1.3. Control, diagnóstico y tratamiento.....	6
1.4. Estructura viral – Genoma.....	7
1.5. Proteínas virales.....	9
1.6. Estructura de la cápside.....	11
1.7. Ciclo replicativo.....	12
1.8. Origen y evolución.....	14
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo general.....	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
3. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS	20
4.1 Obtención de la muestra.....	20
4.2 Extracción del DNA genómico.....	26
4.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	26
4.4. Genotipificación de las muestras por RFLP.....	28
4.5. Secuenciación y análisis de secuencias.....	29
4.5.1. Secuenciación.....	29
4.5.2. Análisis bioinformáticos comparativos y filogenéticos.....	30
5. RESULTADOS	32
5.1. Detección del virus mediante PCR.....	32
5.2. Genotipificación de las muestras por RFLP.....	32
5.3. Secuenciación análisis bio-informáticos comparativos y filogenéticos.....	33
6. DISCUSIÓN	37
7. CONCLUSIONES	40
8. AGRADECIMIENTOS	41
9. BIBLIOGRAFÍA	42
ANEXO I: Publicaciones	49

RESUMEN

El Parvovirus canino de tipo 2 (CPV-2), es un virus autónomo de DNA simple hebra lineal de polaridad negativa y de pequeño tamaño (5.2 kb), cuyo genoma codifica para proteínas no-estructurales (NS1 y NS2) y estructurales (VP1 y VP2). Es el principal agente infeccioso de la gastroenteritis hemorrágica, común en perros de todas las edades, siendo menos virulento en perros adultos. CPV-2 emergió alrededor de 1978, como un nuevo patógeno que rápidamente se esparció por todo el mundo. Se presume que proviene del virus de la panleukopenia felina (FPLV) o de un virus cercano que infecta carnívoros. Desde entonces CPV-2 se extendió rápidamente y pocos años después, evolucionó en tres nuevas variantes antigénicas que circulan alrededor del mundo hasta nuestros días: CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c. La distinción entre estas tres variantes se basa en la presencia de los residuos aminoacídicos Asn, Asp y Glu respectivamente, en la posición 426 de la proteína mayoritaria de la cápside VP2. Durante el transcurso de la presente pasantía fueron procesadas 69 muestras fecales de perros con síntomas presuntivos de CPV-2 mediante el uso de técnicas moleculares (PCR, RFLP y secuenciación), 58 resultaron positivas para dicho virus, siendo 26 genotipadas como CPV-2c y 32 como CPV-2a. La detección de esta última variante en el año 2010 representó un cambio epidemiológico en la población homogénea de CPV-2c que circulaba en nuestro país entre los años 2007 y 2009. Estas cepas CPV-2a, además de presentar el aminoácido característico 426Asn, presentan tres sustituciones aminoacídicas (267Tyr, 324Ile y 440Ala), las cuales no se observan en las CPV-2c uruguayas. La secuenciación de las variantes CPV-2a reveló que son 100% idénticas, lo que sugiere que son de naturaleza clonal y de origen reciente. Estudios filogenéticos sugieren que esta variante probablemente haya sido importada a nuestro territorio y sea de origen asiático.

1.INTRODUCCIÓN

1.1. Familia *Parvoviridae*

La familia *Parvoviridae* agrupa virus de tamaño pequeño y con genomas de DNA simple hebra lineal de aproximadamente 5kb. Los genomas virales de esta familia son en su mayoría, de polaridad negativa y codifican para proteínas no estructurales (NS o rep) y proteínas estructurales (VP o cap) (Reed et al.1988).

Esta familia está dividida en dos subfamilias definidas según el huésped al cual se asocian: *Parvovirinae*, que infecta a vertebrados, y *Densovirinae*, que infecta a artrópodos. La subfamilia *Parvovirinae* está compuesta por 8 géneros, mientras que la subfamilia *Densovirinae* está compuesta por 5 géneros (Figura 1) (ICTV 2015).

FAMILIA PARVOVIRIDAE

Subfamilia *Parvovirinae*

Huéspedes vertebrados

Genero	Especies	Virus o variante
Amdoparvovirus	2	2
Aveparvovirus	1	2
Bocaparvovirus	12	22
Copiparvovirus	2	2
Dependoparvovirus	7	23
Erythroparvovirus	6	12
Protoparvovirus	5	25
Tetraparvovirus	6	10

Subfamilia *Densovirinae*

Huéspedes artrópodos

Genero	Especies	Virus o variantes
Ambidensovirus	6	11
Brevidensovirus	2	8
Hepandensovirus	1	7
Iterodensovirus	5	6
Penstyldensovirus	1	4

Figura 1. Familia *Parvoviridae*, subfamilias clasificadas según el huésped al cual se asocian. Taxonomía propuesta por ICTV 2013. En azul *negrita*, nombre agregado al género, en rojo nuevos géneros incluidos.

Los virus de la familia *Parvoviridae* pueden ser autónomos, tal como los *Protoparvovirus*, replicándose por sí mismos dentro del núcleo de la célula huésped, o dependientes (*Dependoparvovirus*), necesitando de la co-infección de un virus *helper*, herpesvirus o adenovirus, para una replicación exitosa (Knipe & Howley 2001, Vihinen-Ranta et al. 2004). Aunque los virus dependientes pueden infectar las células huésped, su genoma sufre una replicación incompleta. En ausencia de un adenovirus o herpesvirus co-infectante, este genoma defectivo puede integrarse con alta eficacia

dentro del genoma huésped donde permanece en estado de latencia (Cotmore & Tattersall 1996).

Para una replicación efectiva, los virus de la familia *Parvoviridae* requieren ciertos factores del huésped que se expresan durante la fase S del ciclo celular, lo que restringe su infección productiva a células proliferativas del huésped adulto o en vías de desarrollo. Esta dependencia puede significar un factor importante de evolución, si ocurre una selección de estos virus como consecuencia del tropismo que presentan por tejidos proliferativos (López-Bueno et al. 2006).

Dentro del género *Protoparvovirus* de la subfamilia *Parvovirinae* encontramos al parvovirus canino de tipo 2 o CPV-2. Este virus se define como una variante de la especie *Carnivore protoparvovirus 1*, la cual incluye al virus de la panleukopenia felina (FPLV), el virus de la enteritis de visión (MEV) y el parvovirus de mapache (RPV) (Parrish et al. 1988a).

1.2. Parvovirus canina, aspectos clínicos

CPV-2 produce la parvovirus canina, una de las enfermedades infecciosas más relevantes en canes jóvenes (Desario et al. 2005). CPV-2 emergió alrededor de 1978 y rápidamente se esparció por todo el mundo, causando una enfermedad entérica y del miocardio (Robinson et al. 1980, Parrish et al. 1988b), con tasas de mortalidad tan altas como el 91% en canes sin tratamiento (Prittie 2004). Todas las razas de perros son susceptibles al CPV-2, siendo más afectadas las razas puras, particularmente Rottweilers, Doberman, Pinchers, Pastor Inglés y Alemán (Nandi et al. 2013). La infección de los cachorros recién nacidos puede producir la muerte por miocarditis, generalmente entre las 3 y las 8 semanas de edad (Truyen 2000), y cuadros de enteritis con vómitos y diarrea en perros de todas las edades (Nandi et al. 2013), siendo menos virulenta en perros adultos (Berns 1990). La miocarditis ocurre solamente si los neonatos son afectados durante el período de rápida proliferación celular del miocardio (comenzando en el útero y completándose entre las primeras dos semanas de vida). Esta última forma de infección es rara hoy en día, dada la inmunidad de la población canina y la protección por anticuerpos maternos (Prittie 2004). La sintomatología del cuadro de gastroenteritis hemorrágica está marcada por pérdida de apetito, depresión, fiebre alta, vómitos, diarrea y leucopenia o linfopenia, con deshidratación severa y pérdida de peso (Decaro et al. 2005a).

La transmisión del virus se realiza por vía oral-fecal. Durante los primeros dos días luego de su ingreso al huésped, la replicación viral se produce en la orofaringe y tejido linfoide local (Prittie 2004). El virus se replica y disemina sistémicamente y después de 1 a 3 días se encuentra en las amígdalas, los nódulos linfáticos retrofaríngeos, el timo y en los nódulos linfáticos mesentéricos. A los tres días post-

infección, el virus se puede recuperar del tejido linfático asociado al intestino (placas de Peyer). El CPV-2 infecta a las células epiteliales de las criptas de las vellosidades intestinales del íleon y del yeyuno, que se encuentran en división rápida, entre los días 3 a 5 post-infección. El grado y la severidad de la infección están en parte determinados por el ritmo de recuperación de las células epiteliales del intestino. La severidad del cuadro clínico refleja probablemente la extensión del daño producido en las células epiteliales del intestino delgado. Durante la fase intestinal de la infección, el virus es excretado en grandes cantidades en las heces (Truyen 2000). También infecta las células en división de la médula ósea y es responsable de la destrucción de las células jóvenes del sistema inmune, afectando este mecanismo de defensa fundamental del huésped (Nandi & Kumar 2010).

El virus es eliminado de 8 a 12 días post-infección (Desario et al. 2005). El hecho de que CPV-2 sea un virus no envuelto, lo hace altamente resistente a agentes químicos y físicos. Por su alta resistencia al ambiente y a desinfectantes comunes, puede permanecer en la materia fecal o en superficies alrededor de 5 meses, facilitando su dispersión y capacidad de infección (Nandi et al. 2013). La enfermedad que causa es frecuentemente asintomática en perros viejos o en cachorros que reciben bajas dosis del virus. Dado que la severidad de la infección está altamente relacionada con la dosis (Truyen 2000), animales aparentemente sanos pueden esparcir el virus a través de las heces, aumentando la posibilidad de contagio a otros animales.

1.3. Control, diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico clínico primario de CPV-2 lo realiza el médico veterinario mediante la observación de los signos clínicos. Sin embargo, dado que estos síntomas pueden deberse a otros patógenos, el diagnóstico certero requiere de ensayos específicos. Entre los ensayos de laboratorio, encontramos la identificación de las partículas de CPV-2 por microscopía electrónica (ME). Este método es relativamente lento y costoso, teniendo además bajo grado de sensibilidad y una gran dependencia de personal altamente calificado (Schunck et al. 1995). Otros métodos que se utilizan incluyen el enzimo-inmuno ensayo (ELISA), Inmunocartografía (IC) o Hemaglutinación (HA), lo cuales tienen una sensibilidad relativamente baja (Desario et al. 2005). Una sensibilidad considerablemente mayor, se logra utilizando métodos moleculares basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Truyen 2000). Asimismo, se ha desarrollado un test de detección y cuantificación de CPV-2 por PCR en Tiempo Real. Dicho test se basa en tecnología TaqMan y ha resultado ser altamente específico, sensible, de fácil reproducción y consume menos tiempo que un PCR convencional (Prittie 2004). La principal desventaja de la técnica de PCR Tiempo Real, es que los costos de equipamiento y reactivos son muy elevados en comparación a otras metodologías moleculares (Decaro et al. 2005b). En tal sentido, el diagnóstico por PCR

convencional y la caracterización por secuenciación automática continúan siendo una de las alternativas más extendidas, ya que, al disponer de la secuencia de los amplicones, permite un análisis más detallado de la variabilidad del genoma viral.

En relación al tratamiento adecuado de los perros, el principal objetivo es la restauración de electrolitos y el balance de los líquidos corporales (Truyen 2000, Nandi & Kumar 2010). Los tratamientos estándar incluyen la administración de fluidos y restricción en la dieta. Toda la comida y el agua deben ser retiradas por al menos 12 a 24 horas para permitir descansar el tracto gastrointestinal inflamado (Prittie 2004).

La vacunación es el método más eficiente y efectivo, para el control de las infecciones por CPV-2 en perros (Nandi et al. 2013). Existen vacunas efectivas para inmunizar a los cachorros susceptibles (seronegativos), tanto de virus atenuados modificados como vacunas inactivadas (Nandi et al. 2013). Las cepas atenuadas de CPV-2 provienen de pasajes repetidos de los virus en cultivo celular. No se conoce el mecanismo que produce la mutación y la atenuación del virus, pero los virus vacunales se eliminan en títulos bajos por las heces, lo que sugiere que la ausencia de enteritis se debe a la disminución de la replicación viral en el intestino (Nandi et al. 2013, Truyen 2000). En ensayos experimentales, las vacunas de virus vivos protegieron al menos por tres años (Truyen 2000), mientras que las vacunas inactivadas parecen inducir una inmunidad de corto tiempo (Truyen 2000, Decaro & Buonavoglia 2012). La interferencia por anticuerpos maternos, es una de las principales causas de falla en la inmunización, aunque una vacunación efectiva depende tanto del título de anticuerpos maternos como del tipo de vacuna administrada (Prittie 2004). Según la Asociación Veterinaria Mundial de Pequeños Animales (WSAVA por sus siglas en inglés) la vacunación debe iniciarse a las 8 o 9 semanas de edad, y se debe continuar vacunando cada 3 o 4 semanas, hasta que el cachorro tenga entre 14 a 16 semanas de edad. Para un plan completo de vacunación, se deberían administrar 3 o 4 dosis, y se recomienda revacunar al año y posteriormente cada 3 años (Day et al. 2010).

1.4. Estructura viral – Genoma

El genoma de CPV-2 tiene aproximadamente 5000 nt, y posee una estructura lineal de DNA mono hebra con polaridad negativa. Presenta dos marcos abiertos de lectura (ORF), que codifican para proteínas no estructurales (NS1 y NS2) en su extremo 3', y proteínas estructurales (VP1 y VP2) en su extremo 5' (Reed, et al. 1988, Berns 1990) (Figura 2). Posee también secuencias palindrómicas no codificantes en sus extremos 3' y 5' (Rhode 1985). Estas secuencias forman estructuras secundarias que funcionan como cebadores para la replicación del DNA y el mantenimiento de la integridad de las secuencias terminales (Berns 1990).

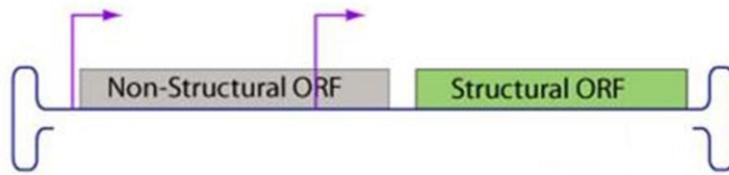


Figura 2. – Esquemización del genoma de parvovirus canino. Se indican las estructuras tipo horquilla sobre los extremos del genoma, ambos ORFs y el sitio de inicio de la transcripción a partir de los promotores p4 y p38 (flechas). Tomado y adaptado de: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/199.html, Swiss Institute of Bioinformatics.

Cabe destacar la presencia de dos grupos de repetidos directos ubicados hacia el extremo 5' del genoma viral (Reed, et al. 1988) (Figura 3). El primer grupo de repetidos está compuesto por dos monómeros de alrededor de 60 nucleótidos (posición 4514-4636), uno que flanquea el codón stop del gen *vp1/vp2*, y otro posterior que presenta una inserción en la posición 4593, y una transición C→T en la posición 4603. El segundo grupo de repetidos está compuesto por tres monómeros de 62 nucleótidos cada uno (posición 4701- 4886), siendo los dos primeros idénticos en secuencia, mientras que el tercer monómero presenta una trasversión G→T en la novena base del repetido (Reed et al. 1988) (Figura 3). Estos repetidos se encuentran presentes también en otros virus de la subfamilia *Parvovirinae* como FPLV, MEV y RPV.

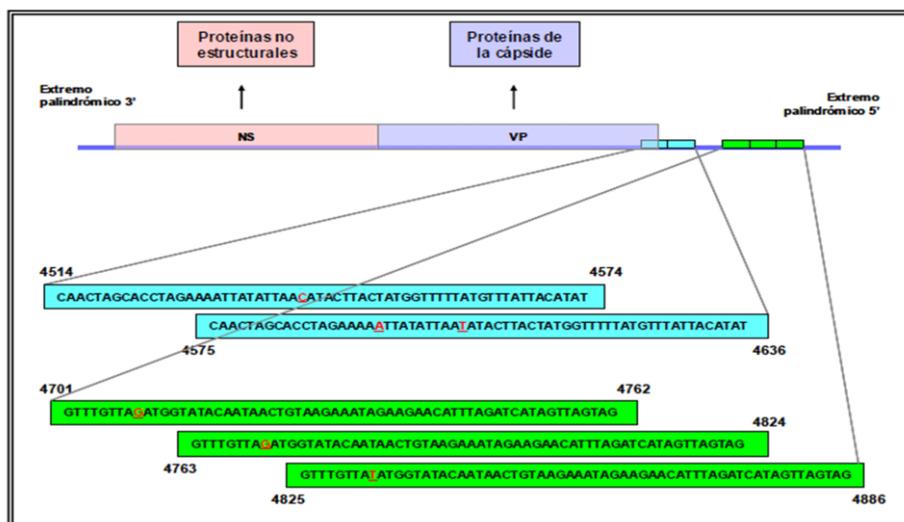


Figura 3.: Esquemización de la región 5' del genoma de CPV-2. Se puede observar la presencia de los dos grupos de repetidos directos y su posición en el genoma de referencia de la cepa M19296 (imagen tomada de Sosa 2009, tesina de grado).

1.5. Proteínas virales

El pequeño genoma de los parvovirus posee la complejidad necesaria para garantizar un ciclo viral altamente efectivo gracias a la expresión de proteínas con múltiples funciones. El primer ORF de 668 aminoácidos (a la izquierda del genoma o extremo 3'), codifica para las proteínas no estructurales NS1 y NS2, mientras que el segundo ORF de 727 aminoácidos (a la derecha del genoma o extremo 5'), codifica para las proteínas de la cápside VP1 y VP2 (Reed, et al. 1988) (Figura 4). Los extremos N-terminales de NS1 y NS2 se superponen y son idénticos en secuencia, mientras el dominio C-terminal de NS2 deriva de un corrimiento en el marco de lectura, resultante de la remoción de un intrón (Hoelzer, et al. 2008a).

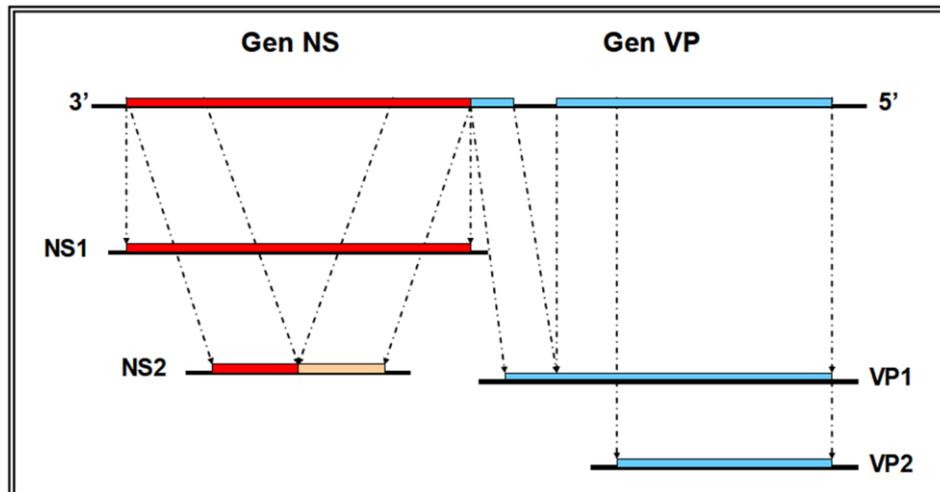


Figura 4: Esquema del corte y empalme alternativo que ocurre en ambas unidades transcricionales del genoma de CPV-2.

La proteína multifuncional NS1 es una fosfoproteína dependiente de ATP y la principal iniciadora de la replicación (Parrish & Kawaoka 2005, Niskanen et al. 2010). Además de su rol central en la replicación del DNA, también cumple funciones adicionales, principalmente transactivando la expresión de los genes, uniéndose específicamente al promotor transcripcional P38 (promotor de las VPs) (Niskanen et al. 2010, Cotmore & Tattersall 2014). NS1 también es responsable del efecto citopático de parvovirus y se ha propuesto que asiste en el empaquetado del DNA dentro de la cápside recién formada (Parrish & Kawaoka 2005, Niskanen et al. 2010).

Si bien el rol de la proteína NS2 no es tan bien comprendido como el de NS1, se sabe que es necesaria para una replicación viral efectiva, que participa en el ensamblaje de la cápside viral, y parece jugar un rol importante en el control del rango de huésped (Wang et al. 1998, Parrish & Kawaoka 2005).

El ORF derecho codifica para las proteínas VP1, VP2 (Figura 4). VP1 y VP2 son generadas por *splicing* alternativo utilizando dos donadores de empalme diferentes y un aceptor de empalme común. La proteína VP1 (727 aa) es codificada por el transcrito que utilizó el primer donador de empalme y el aceptor de empalme común, y emplea el codón de inicio (AUG) que se encuentra entre los dos sitios donadores de empalme. VP2 (584 aa) es traducida de transcritos que usan un fuerte sitio de empalme corriente arriba 5' y el aceptor de empalme común. VP1 y VP2 se producen en proporciones de alrededor 1:5, y difieren solamente por la presencia en VP1 de 143 aminoácidos en el extremo N-terminal. Una tercera proteína de la cápside VP3, con su extremo N-terminal truncado, es generada por clivaje proteolítico de las moléculas de VP2 en partículas completas después de la liberación de la progenie del virus (Kerr, et al. 2013)

La proteína VP1 es el componente minoritario de la cápside viral, mientras que VP2 y VP3 representan una mayor proporción de los 60 monómeros que forman la estructura de la misma. La región única de VP1 despliega una fosfolipasa A2 (PLA2), requerida para el escape de los endosomas tardíos luego de la entrada a través del receptor (Vihinen-ranta et al. 2002, Kerr, et al. 2013). VP1 también presenta secuencias de locación nuclear (NLSs), necesarias para el transporte de las partículas virales al núcleo celular (Vihinen-ranta et al. 2004). A su vez se cree que esta región exclusiva de VP1 ayudaría a estabilizar el DNA viral (Tsao et al. 1991).

VP2 es la proteína mayoritaria de la cápside y contiene los principales determinantes antigénicos virales, cumpliendo un importante rol en determinar la patogenicidad del virus, así como el rango de huésped. Cuenta con la habilidad de auto ensamblarse, formando las partículas tipo virales (VLPs) (López de Turiso et al. 1992). En VP2 se encuentran los residuos (93, 299 o 300, y 323) que controlan la unión con el receptor de las células huésped, que para el caso de CPV-2 es el receptor celular de la transferrina (TfR)(Parker & Parrish 2000, Goodman et al. 2010). Esta proteína también ha sido implicada en la interacción con ácido siálico (SA) de algunas células huésped, principalmente eritrocitos, por lo que sus sitios antigénicos son el principal blanco de los anticuerpos del huésped.

1.6. Estructura de la cápside

La cápside de CPV-2 se compone por 60 copias de las VPs, y presenta una simetría icosaédrica T=1 (Tsao et al. 1991). Las proteínas de la cápside poseen un motivo de β -barril de ocho láminas antiparalelas. Dicha estructura se encuentra mayoritariamente debajo de la superficie de la cápside y está formada por un tercio de la secuencia aminoácídica de las proteínas. Los otros dos tercios consisten en estructuras muy largas en forma de lazo (bucle) que se insertan entre las láminas- β . Hay 36 residuos entre las láminas B y C formando el bucle 1, 74 residuos entre las láminas E y F que forman el bucle 2, y 223 residuos entre las láminas G y H que forman los bucles 3 y 4 (Agbandje et al. 1995) (Figura 5).

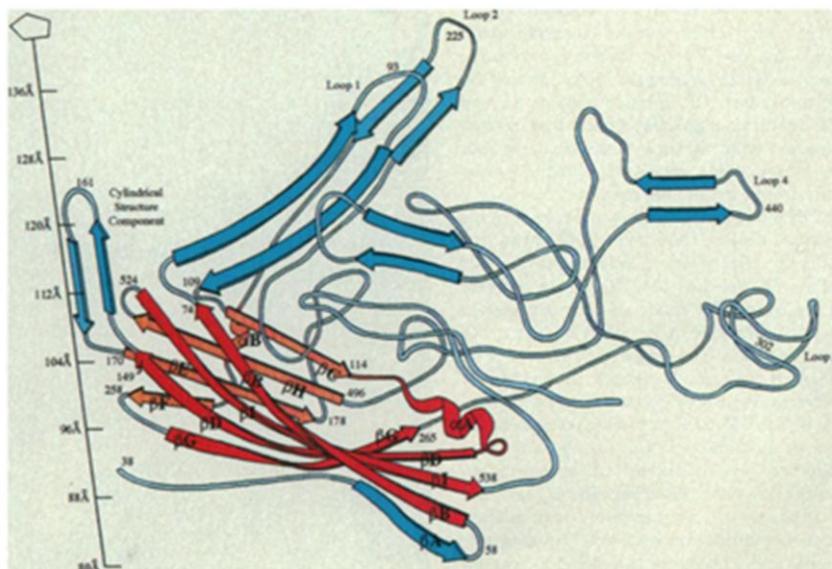


Figura 5. Representación esquemática de la topología de la proteína VP2. Se pueden observar las láminas β anti-paralelas. En rojo la estructura tipo barril, en azul los bucles que las conectan. Tomado de Tsao et al. 1991.

La superficie de la cápside del virus incluye un cilindro en el quinto eje de simetría, rodeado por un cañón o depresión circular, y una estructura en forma de hoyuelo en el segundo eje de simetría. Otra estructura notoria es una región prominente alrededor del tercer eje de simetría - la espícula del tercer eje - implicada en varias funciones del virus, incluyendo la determinación del rango de huésped y contiene algunos epitopes de anticuerpos neutralizantes (Strassheim et al. 1994) (Figura 6).

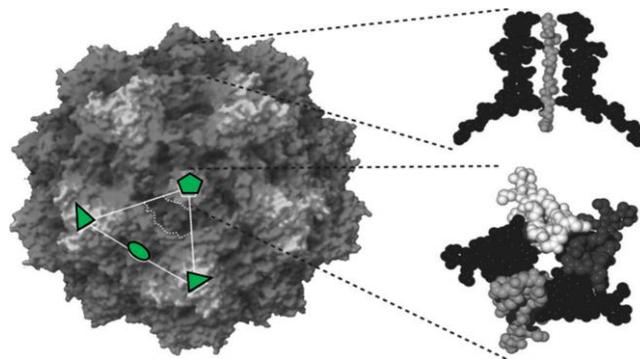


Figura 6: Imagen de la cápside de parvovirus. Se indica con el triángulo la unidad que forma al icosaedro, el óvalo señala el segundo eje de simetría, los triángulos señalan el tercer eje y el quinto eje se señala con el pentágono. A la derecha se muestra la estructura de cilindro del quinto eje visto desde distintos ángulos. Tomado de Cotmore et al. 2007.

1.7. Ciclo replicativo

El ciclo replicativo de CPV-2 comienza con la interacción entre la cápside viral y el receptor de la célula huésped. CPV-2 ingresa a las células a través de receptores transferrina (TfR). La entrada de los viriones se produce por endocitosis a través de membranas revestidas de clatrina (Kerr et al. 2013). Posteriormente el virus se localiza en los endosomas (Vihinen-Ranta et al. 2004, Kerr, et al. 2013). Luego de la liberación endosomal, a través de mecanismos aún desconocidos, CPV-2 se encuentra alrededor del núcleo, lugar donde ocurriría la exposición de los extremos N-terminales de las proteínas VP1 y VP2, y del extremo 3' del genoma viral. La cápside es alterada en el citosol por la actividad del proteosoma celular, probablemente generando la formación intracelular de la proteína VP3 (Vihinen-Ranta et al. 2004). Mecanismos de transporte activo mueven los viriones a través del citoplasma, habiéndose demostrado que los microtúbulos y las dineínas desempeñan un rol importante en el tráfico de CPV-2 (Kerr, et al 2013), facilitando su transporte al núcleo (Vihinen-Ranta et al. 2004). El transporte de la cápside y/o el DNA viral dentro del núcleo es un paso importante en la infección celular y ocurre principalmente a través del complejo del poro nuclear (NCP), donde son necesarias secuencias de localización nuclear (NLSs) codificadas en la región exclusiva de VP1. La modificación de las proteínas de la cápside por el proteosoma celular parece exponer las NLSs. El ingreso del virión al núcleo es un fenómeno específico y activo, implicando la utilización de ATP y factores citosólicos solubles (Vihinen-Ranta et al. 2004) (Figura 7).

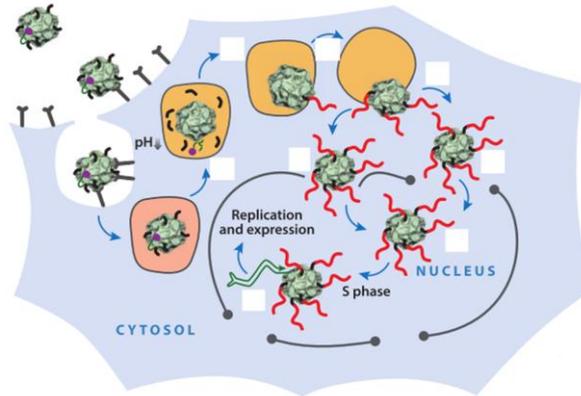


Figura 7: Vía de entrada a la célula para el virus diminuto del ratón (MVM). Las formas Y extendidas representan los receptores de la superficie celular. Las líneas de color asociadas con partículas de virus representan VP2 N-terminal (negro), región específica de VP1 (rojo), y el genoma viral (verde). Los puntos violetas representan a NS1. Seis VP1N-terminales se muestran en la superficie de las cápsides, pero el número real no se conoce y puede variar entre uno y diez. Las líneas negras con puntos en sus extremos representan el espacio nuclear, los espacios entre ellas indican los poros nucleares. Tomado y adaptado de Cotmore & Tattersall 2014.

El modelo para la replicación del DNA de los parvovirus autónomos se propuso a partir de los estudios realizados en el virus diminuto de ratón (MVM) (Figura 8) (Knipe & Howley 2013). Durante la fase S, los genomas virales se amplificarían a través de un mecanismo llamado replicación de la horquilla rodante (RHR) que asegura la duplicación de ambos extremos terminales (Cotmore & Tattersall 2014). En esta primera etapa la maquinaria celular reconoce la secuencia palindrómica en el extremo 3' y se sintetiza la hebra complementaria por extensión, generándose una molécula de DNA doble cadena, intermediario replicativo (dsRF). Este dúplex actuará como molde para la síntesis de las proteínas NS1 y NS2 (Kerr, et al. 2013). Cuando la síntesis alcanza el extremo 5' (derecho), que también se ha plegado sobre sí mismo, se cree que ocurre una ligación entre la hebra complementaria recientemente sintetizada y la hebra parental, resultando en una molécula doble hebra covalentemente cerrada en ambos extremos (cRF). La proteína viral NS1 corta la hebra complementaria a unos 18-26 nt del extremo 5' parental plegado, y se produce una unión covalente entre dicha proteína y el extremo 5' libre generado (Berns 1990). Este hecho origina un extremo 3'OH que se utiliza para reparar el extremo derecho generando una forma dúplex extendida del mismo. Luego, el extremo derecho extendido forma un intermediario doblemente plegado (configuración denominada orejas de conejo) que provee un nuevo 3'OH libre para la reiniciación de la síntesis por desplazamiento de la hebra genómica. Esto conduce a la formación de concatémeros (dímeros de dsRF), los cuales posteriormente son resueltos en un dsRF con el extremo izquierdo covalentemente cerrado, y otro con ambos extremos abiertos. El primero volverá a sufrir replicación, y el segundo dará lugar a otro molde de replicación (hebra sentido 5'-3'), y al genoma viral (hebra sin sentido 3'-5') que será encapsidada (Figura 8), (Knipe & Howley 2013).

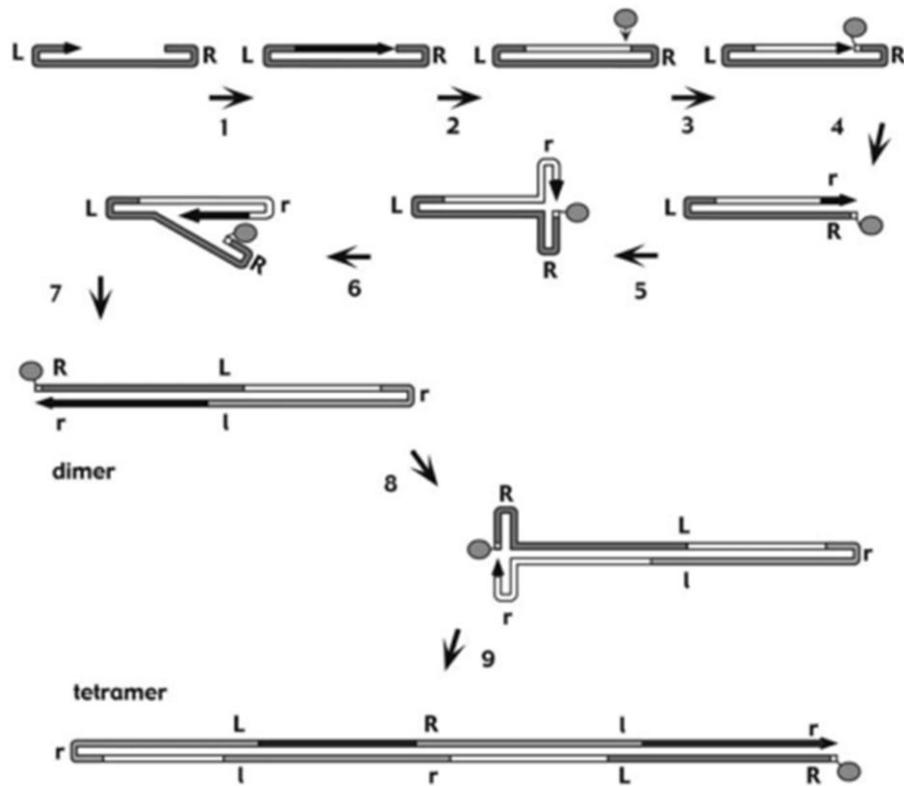


Figura 8: Modelo de replicación del genoma de MVM tipo horquilla rodante. La esfera representa la proteína iniciadora de la replicación NS1, L y R hacen referencia a los extremos palindrómicos izquierdo y derecho respectivamente, l y r corresponden a los extremos izquierdos y derechos de las hebras complementarias recientemente sintetizadas. Tomado de Kerr et al. 2013.

1.8. Origen y evolución

CPV-2 es uno de los pocos ejemplos donde el proceso de transmisión viral entre especies se observó en “tiempo real” (Hoelzer et al. 2008b). CPV-2 fue por primera vez reconocido alrededor de 1978 como un nuevo patógeno que rápidamente se esparció por todo el mundo, generando una pandemia (Parrish, et al. 1988b). Estudios filogenéticos y el análisis de muestras históricas, muestran que CPV-2 emergió al comienzo de la década del 70 (Hoelzer & Parrish 2010). Se presume que proviene de un virus similar a FPLV, que evolucionó vía mutaciones genéticas en la cápside viral (Hong et al. 2007). Fue nombrado como CPV-2 para diferenciarlo del CPV-1 (Parvovirus canino tipo 1) previamente descrito, con el cual a pesar de compartir ciertas características clínicas, no se encuentra evolutivamente relacionado (Truyen 2000). El análisis filogenético de varias cepas de virus relacionados a FPLV, colectados durante las décadas del 60, 70 y 80, revelaron que una cepa del zorro polar (*Alopex lagopus*) de Finlandia podría ser el ancestro más cercano de CPV-2, mientras que secuencias parciales de parvovirus de un

zorro rojo (*Vulpes vulpes*) de origen alemán indicaron que éste sería el intermediario entre FPLV y CPV-2 (Truyen et al. 1995, Truyen et al. 1998, Hoelzer & Parrish 2010). Estudios filogenéticos 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).

CVP-2 obtuvo la habilidad de infectar perros a través de la adquisición en las proteínas VPs de mutaciones que alteran la interacción del virus con el receptor viral TfR (Stucker et al. 2012). Estas mutaciones dieron como resultado seis cambios aminoacídicos de la proteína de la cápside VP2 entre FLVP y CPV-2 (Hoelzer & Parrish 2010) (Tabla 1). Las mutaciones de Lys93Asn y de Asp323Asn de la proteína VP2, determinarían juntas la adquisición del huésped canino. Estos residuos, junto con el aminoácido 299, estarían involucrados en la unión al receptor celular (Hueffer et al. 2003).

CPV-2 siguió evolucionado y fue completamente reemplazado por la variante CVP-2a a mediados de los 80 (Parrish et al. 1991a). CVP-2a difiere de la variante 2 original en 4 cambios aminoácidos de la proteína estructural VP2 (Tabla 1). La evidencia indica que esos cambios aminoacídicos son responsables de las propiedades antigénicas y del rango de huésped (Parrish 1991b; Truyen et al. 1995), incrementando su capacidad de infección en los perros y brindándole la habilidad para infectar gatos (Allison et al. 2012). En 1984, otra variante antigénica emergió como un nuevo tipo de CPV, denominado CPV-2b, el cual está circulando junto con la variante CPV-2a entre las poblaciones de perros alrededor del mundo. Las diferencias antigénicas observadas en CPV-2b, son la consecuencia de una sola sustitución aminoacídica Asn426Asp, situada en un importante sitio antigénico de la cápside (epítipo A) (Parrish et al. 1991a). En 1990, comenzó a detectarse en las variantes CPV-2b el cambio Ser297Ala, dicho cambio no parecería afectar la antigenicidad del virus, aunque se encuentra próximo a los aminoácidos 299 y 300, los cuales controlan la unión al receptor TfR (Hoelzer, et al. 2008a).

En el año 2001 se detectaron en Italia cepas con el cambio Asp426Glu que afecta una importante región antigénica de CVP-2 (Buonavoglia et al. 2001). Esta nueva variante, nombrada CPV-2c, fue detectada posteriormente en Vietnam (Nakamura et al. 2004), España (Decaro et al. 2006), USA (Hong et al. 2007), Portugal, Alemania, y el Reino Unido (Decaro et al. 2007), Argentina (Calderón et al. 2011), Brasil (Castro et al. 2010) y Uruguay (Pérez et al. 2007).

Tabla 1: Mutaciones asociadas a la proteína estructural VP2 de CPV-2, la variante a la cual se asocian y el año de aparición. Tomado y adaptado de Hoelzer, et al. 2010.

RESIDUO Y POSICIÓN EN VP2	VIRUS O VARIANTE IMPLICADO	AÑO
80 Arg>Lys 93 Lys>Asn 103 Val>Ala 323 Asp>Asn 564 Asn>Ser 568 Ala>Gly	FPLV a CPV-2	Previo a 1978
87 Met>Leu 101 Ile>Thr 300 Ala>Gly 305 Asp>Tyr	CPV-2a	1979
426 Asn>Asp 297 Ser>Ala	CPV-2b	1984 1990
426 Asp>Glu 440 Thr>Ala	CPV-2c	2001 2005

Es un hecho que los virus RNA presentan tasas de evolución mucho más elevadas que los virus DNA, dado que estos últimos replican su genoma utilizando la polimerasa de la célula huésped que tiene mayor fidelidad de copia. Sin embargo, este no es el caso para los virus con genoma de DNA simple hebra como CPV-2, ya que presenta tasas de mutación y sustitución muy similares a las observadas para virus con genomas RNA, situándose alrededor de 2×10^{-4} sustituciones por sitio por año (Shackelton et al. 2005). En Uruguay se reportó una tasa de sustitución estimada de 5.77×10^{-4} sustituciones por sitio por año, calculada para la variante CPV-2c, representando aproximadamente un cambio nucleotídico por año en el gen de *vp2* (Maya et al. 2013).

La población canina en Uruguay, es caracterizada por un interesante cambio de las variantes de CPV-2. Al comienzo CPV-2c circuló junto a otras variantes, particularmente CPV-2a (colectada en nuestro país durante 2006). En el año 2007 se describió la detección de CPV-2c por primera vez en Sudamérica, la cual circuló de manera exclusiva durante 2007- 2009 en el territorio nacional (Pérez et al. 2007). En abril del año 2010 detectamos una nueva variante, CPV-2a, que determinó un cambio epidemiológico de la población homogénea de cepas CPV-2c, que circulaba en Uruguay

hasta ese entonces (Pérez et al. 2012). La caracterización de las cepas circulantes en cierto territorio es de gran importancia para entender su epidemiología y virulencia. En tal sentido, continuar analizando las variantes circulantes en nuestro país, así como investigando los cambios existentes entre ellas, es imprescindible para el estudio evolutivo del virus.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

- Caracterizar genéticamente cepas de parvovirus canino aisladas de muestras uruguayas colectadas durante 2010-2011.

2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1. Identificar CPV-2 en animales con síntomas presuntivos de parvovirus.
- 2.2.2. Establecer las variantes (CPV-2/2a/2b/2c) que circulan en Uruguay.
- 2.2.3. Comparar la variabilidad genética de las variantes detectadas con cepas circulantes en Uruguay y en el resto del mundo.

3. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

Se analizaron muestras fecales de canes presuntamente infectados por CPV-2. Para realizar el diagnóstico, se amplificó por PCR una región del gen *vp2*. La caracterización de las muestras positivas se realizó mediante el análisis de polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción (RFLP), que diferencia las variantes de tipo CPV-2c del resto. También se obtuvo la secuencia parcial de *vp2* de algunas muestras y se las comparó filogenéticamente con aquellas previamente obtenidas en Uruguay y el resto del mundo (Figura 9).

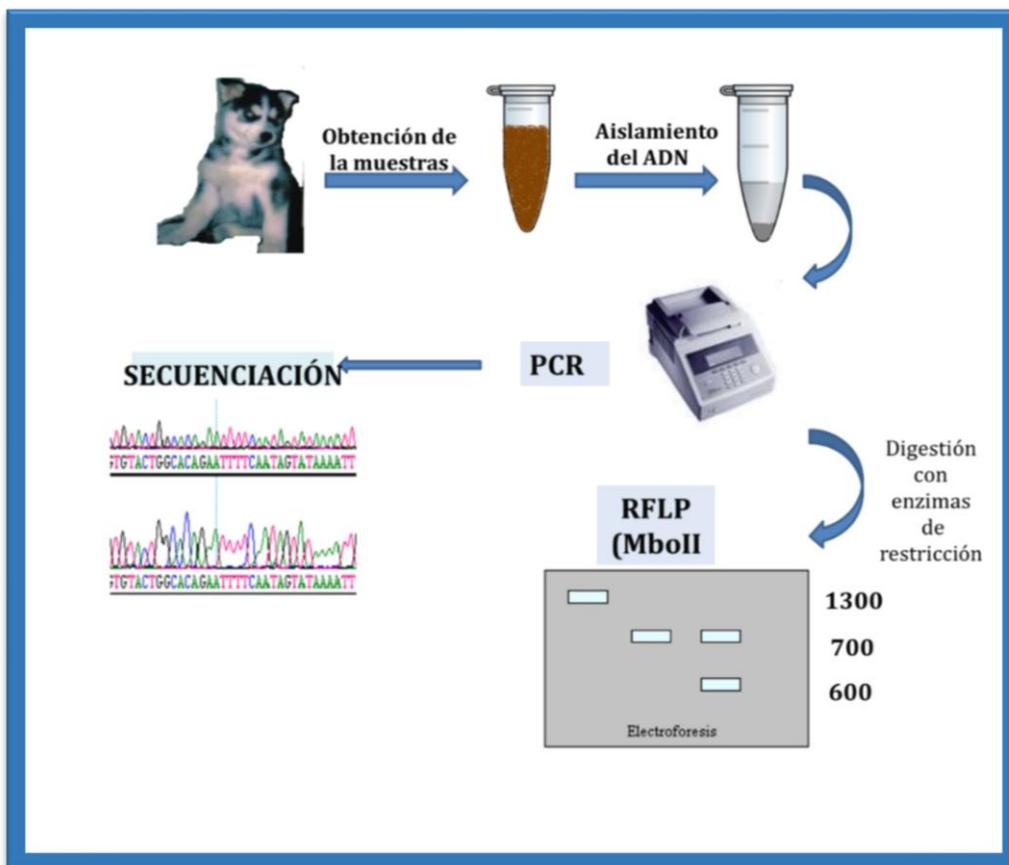


Figura 9: Representación esquemática de la metodología empleada

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Obtención de la muestra

Se obtuvieron 69 muestras fecales de perros con síntomas presuntivos de CPV-2, principalmente gastroenteritis hemorrágica y vómitos (Tabla 2). Las muestras se colectaron en distintas partes de nuestro país durante el período comprendido entre mayo 2010 y mayo 2011, de las cuales cincuenta y dos (n=52) fueron recogidas durante el 2010 y diecisiete (n=17) durante el 2011. La recolección de muestras fue realizada por profesionales veterinarios con los que mantenemos colaboración científica.

Tabla 2: Muestras fecales de perros con síntomas presuntivos de CPV-2. Se puede observar el año de la muestra, el número de la muestra, la sintomatología del animal, la raza del animal, el sexo del animal (M: macho, H: hembra), el origen del animal (C: capital, P: periferia, I: interior del país) y por último el plan de vacunación aplicado al animal. Las muestras negativas para CPV-2 se encuentran sombreadas en celeste.

AÑO	Nº DE MUESTRA	EDAD	SINTOMATOLOGÍA	RAZA	SEXO	ORIGEN	VACUNACIÓN
2010	M245	5 meses	Vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea con sangre, depresión.	Cruza (Yordi)	M	C	3 dosis
2010	M246	2 meses	Vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea con sangre, depresión.	Beagle	M	C	3 dosis
2010	M247	6 meses	Vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea con sangre, depresión.	Schnauzer mediano	H	I	1 dosis
2010	M248	1 mes	Fiebre, vómitos, anorexia, diarrea, depresión.	Caniche	M	I	3 dosis
2010	M249	3 meses	Diarrea hemorrágica	Rottweiler	Sin datos	P	1 dosis
2010	M250	6 meses	Vómitos, gastroenteritis, diarrea con sangre, depresión.	Labrador	H	C	2 dosis
2010	M251	6 meses	Vómitos, diarrea hemorrágica, depresión.	Caniche	M	C	3 dosis
2010	M252	3 meses	Fiebre, vómitos, diarrea con sangre, depresión,	Labrador	M	C	1 dosis
2010	M253	3 meses	Fiebre, vómitos, diarrea con sangre, depresión, convulsiones al tomar la muestra.	Labrador	H	C	2 dosis
2010	M254	4 meses	Fiebre, vómitos, anorexia, diarrea, depresión.	Pitbull	M	C	2 dosis
2010	M255	3 meses	Anorexia, diarrea con sangre, depresión.	Galgo	3H Y 1M	C	2 dosis

2010	M256	4 meses	Vómitos, gastroenteritis, diarrea con sangre.	Pitbull	H	C	Sin Vacunas
2010	M257	2 meses	Vómitos.	Pitbull	M	C	3 dosis
2010	M258	6 meses	Sin datos.	Caniche	M	C	1 dosis
2010	M259	2 meses	Depresión, deshidratación, vómitos, diarrea con sangre.	Mestizo	M	P	3 dosis
2010	M260	Sin datos	Sin datos	Cruza	H	C	Sin Vacunas
2010	M261	3 meses	Sin datos	Caniche	H	C	2 dosis
2010	M262	4 meses	Sin datos	Pitbull	Sin datos	C	2 dosis
2010	M263	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	C	Sin datos
2010	M264	3 meses	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos
2010	M265	1 mes	Sin datos	Sin datos	Sin datos	C	Sin datos
2010	M266	2 meses	Sin datos	Labrador	H	I	1 dosis
2010	M267	2 meses	Sin datos	Cruza	M	C	1 dosis
2010	M268	1 mes	Vómitos, diarrea con sangre.	Ovejero Alemán	Sin datos	C	1 dosis
2010	M269	4 meses	Fiebre, vómitos, gastroenteritis hemorrágica, depresión.	Caniche	H	I	1 dosis
2010	M270	5 meses	Vómitos, diarrea con sangre	Mastín Napolitano	H	C	1 dosis
2010	M271	3 meses	Sin datos	Sin datos	Sin datos	C	4 dosis
2010	M272	2 meses	Vómitos y diarreas	Cruza	H	P	Sin datos

2010	M273	4 meses	Materia fecal blanda y decaimiento.	Cimarrón	M	P	Sin datos
2010	M274	8 meses	Vómitos y diarreas con un poco de sangre.	Golden Retriever	H	P	Sin datos
2010	M275	3 meses	Diarrea hemorrágica, dolor abdominal.	Sin datos	Sin datos	C	3 dosis
2010	M276	3 meses	Gastroenteritis con coágulos de sangre y áscaris.	Cruza	H	C	3 dosis
2010	M277	3 meses	Sin datos	Ovejero Alemán	H	I	Sin Vacunas
2010	M278	2 meses	Vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea con sangre y deshidratación	Caniche	H	C	2 dosis
2010	M279	Sin datos	Sin datos	Canino	M	C	2 dosis
2010	M280	3 meses	Fiebre, vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea con fuerte olor, líquida y con sangre.	Sin datos	M	I	4 dosis
2010	M281	1 mes	Sin datos	Sin datos	Sin datos	I	3 dosis
2010	M282	4 meses	Gastroenteritis, muy líquido, sangre, feo olor.	Chow-Chow	Sin datos	I	Sin datos
2010	M283	Sin datos	Sin datos	Ovejero Alemán	M	C	3 dosis
2010	M284	3 meses	Sin datos	Sin datos	M	C	Sin Vacunas
2010	M285	3 meses	Sin datos	Sin datos	M	C	Sin Vacunas
2010	M286	1 mes	Sin datos	Ovejero Alemán	Sin datos	C	Sin datos
2010	M287	6 meses	Sin datos	Cruza	M	P	1 dosis
2010	M288	7 meses	Sin datos	Cruza	H	P	1 dosis
2010	M289	3 meses	Sin datos	Rottweiler	M	C	1 dosis

2010	M290	7 meses	Sin datos	Doberman	H	C	3 dosis
2010	M291	4 meses	Sin datos	Sin datos	Sin datos	C	3 dosis
2011	M293	Sin datos	Sin datos	Labrador	H	C	Sin datos
2011	M294	Sin datos	Vómitos, anorexia, diarrea oscura con sangre, deshidratado, decaimiento.	Labrador	M	C	4 dosis
2011	M295	Sin datos	Diarrea con sangre, gastroenteritis.	Caniche	H	C	3 dosis
2010	M296	Sin datos	Fiebre, gastroenteritis, diarrea y depresión.	Sin datos	Sin datos	C	1 dosis
2010	M297	Sin datos	Fiebre, vómitos, anorexia, diarrea pocas deposiciones con sangre entera, depresión y decaimiento.	Labrador	M	C	1 dosis
2011	M298	Sin datos	Vómitos, diarrea.	Pitbull	H	P	2 dosis
2011	M299	Sin datos	Fiebre.	Labrador	M	P	2 dosis
2010	M300	Sin datos	Fiebre, vómitos, anorexia, gastroenteritis hemorrágica y depresión.	Caniche	M	C	1 dosis
2010	M301	6 meses	Sin datos	Cruza	M	C	1 dosis
2011	M302	Sin datos	Sin datos	Labrador	M	C	3 dosis
2010	M303	Sin datos	Sin datos	American Stanford	H	C	3 dosis
2011	M304	Sin datos	Sin datos	Cruza	M	C	Sin datos
2011	M305	Sin datos	Vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea roja, abundante sangrado al puncionar la vena,	Cruza	H	C	Sin datos

			decaimiento.				
2011	M306	Sin datos	Vómitos.	Rottweiler	M	C	1 dosis
2011	M307	Sin datos	Sin datos	Caniche	M	I	3 dosis
2011	M308	2 meses	Sin datos	Cruza Shitzu	H	P	3 dosis
2011	M309	8 meses	Vómitos, convulsiones diarrea con sangre al segundo día.	Ovejero Alemán	M	P	1 dosis
2011	M310	Sin datos	Vómitos, por 3 días, gastroenteritis, diarrea al final	Cruza	M	C	4 dosis
2011	M311	Sin datos	Diarrea con sangre	Ovejero Alemán	M	P	3 dosis
2011	M312	Sin datos	Diarreas	Sin datos	M	P	2 dosis
2011	M313	Sin datos	Fiebre, vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea y depresión.	Labrador	M	P	1 dosis
2011	M314	Sin datos	Diarrea maloliente y hemorrágica.	Pitbull	M	C	2 dosis

4.2 Extracción del DNA genómico

Para la extracción del DNA viral se utilizó una variante de la técnica *fast-boiling* propuesta por Schunck *et al.* (1995) y puesta a punto en nuestro Laboratorio (Maya, 2011 Tesis de Maestría). El método se basa en homogeneizar la muestra en buffer fosfato salino (1XPBS, pH: 7.5), en relación 1:10, y posteriormente hervir el homogeneizado durante 10 minutos, para liberar los componentes celulares. A continuación se lo pasa inmediatamente a hielo durante cinco minutos, para inhibir la actividad enzimática que afecta la integridad del DNA. Por último, se centrifuga a 3000 rpm durante 20 minutos y se recupera el sobrenadante, donde se encuentra el material genético que es utilizado directamente como molde para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este material puede ser almacenado a -20°C por varios meses.

4.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El DNA genómico obtenido previamente, se lo somete a un análisis de PCR. La detección del virus en las muestras, se realizó amplificando una región de 1316 pb del gen de la proteína estructural VP2. El sobrenadante de la extracción se utilizó diluido (1:5 y 1:10) para realizar la PCR. Se utilizaron los cebadores F1 y R3 diseñados por Ikeda 2000 (Tabla 3).

Tabla 3: Cebadores utilizados para la amplificación del fragmento de 1316 pb. Se puede observar el nombre, la secuencia en sentido 5' a 3' y la posición donde hibrida cada uno de ellos en el genoma de referencia CPV-2, N° de acceso M38245.

PRIMER	SECUENCIA	POSICIÓN
F1Forward	AGATAGTAATAATACTATGCCATTT	3316 - 3340
R3Reverse	CCTATATCAAATACAAGTACAATA	4609 - 4632

Los reactivos utilizados en la mezcla de reacción de 20 µl se detallan en la Tabla 4, la PCR se realizó en un termociclador Perkin Elmer modelo 2400 utilizando el programa de ciclado detallado en la Tabla 5.

Tabla 4: Reactivos utilizados de la mezcla de PCR con su determinada concentración inicial y final y el volumen a utilizar en la reacción. Csp: cantidad suficiente para.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN UTILIZADO
Buffer de la Taq pol. (MgCl ₂)	10x	1x	2μL
Mezcla de DNTPs	10mM	2mM	0.4 μL
Cebador Directo F1	10 μM	1 μM	2 μL
Cebador reverso R3	10 μM	1 μM	2μL
Taq pol Fermentas	5 U/ μL	0.3 U/ μL	0.12μL
DNA (dilución 1:5 y 1:10)	-	-	2μL
Agua bidestilada estéril	-	-	Csp 20μL

Tabla 5: Ciclado utilizado para la amplificación del fragmento de 1316pb, se puede observar cada etapa con su respectiva temperatura, duración y la cantidad de ciclos.

	ETAPA	TEMPERATURA	DURACIÓN
	Desnaturalización inicial	94°C	10 minutos
30 CICLOS	Desnaturalización	94°C	30 segundos
	Hibridación	42°C	1 minuto
	Elongación	72°C	1 minuto
	Elongación Final	72°C	10 minutos

Para visualizar los productos de PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (90 V) con buffer 1×TAE. Se corrieron 5 μL de producto de amplificación y se tiñó el gel con el agente intercalante 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.

4.4. Genotipificación de las muestras por RFLP

Para la caracterización de las muestras positivas se realizó un análisis de polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción (RFLP) utilizando la enzima MboII, la cual reconoce la secuencia específica GAAGA (Buonavoglia et al. 2001). Esta técnica permite discriminar las variantes CPV-2c de las variantes CPV-2/2a/2b. Todas las variantes presentan un sitio de restricción en la posición 4006-4010; la variante CPV-2c posee un sitio de restricción adicional debido a la presencia del codón GAA que codifica para Glu en la posición 426 de la proteína VP2 (posición 4062-4066). En las cepas vacunales de CPV-2 se produce un amplicón mayor debido a la presencia de una secuencia extra repetida en el extremo izquierdo del genoma; las cepas de campo tienen un único monómero de aproximadamente 60 nt, mientras que las cepas vacunales poseen dos. De esta manera, gracias a la diferencia en los patrones de restricción, las muestras pueden clasificarse en: vacunales del tipo CPV-2, cepas de campo CPV-2c y no-CPV-2c (2a/2b).

Los reactivos utilizados en la mezcla de reacción (volumen final de 30 μ L), para la digestión enzimática se detallan en la Tabla 6. La misma se incubó durante dos horas a 37°C.

Tabla 6: Reactivos y volúmenes utilizados para la reacción de digestión.

REACTIVO	VOLUMEN (μ L)
Producto de PCR	15.0
Buffer de la enzima (B)(Fermentas)	1.5
MboII (Fermentas)	0.6
Agua (Gibco)	12.9
Volumen total	30.0

Los fragmentos de restricción obtenidos de la digestión enzimática se observaron en un gel de agarosa al 1.5% en las mismas condiciones descritas anteriormente.

4.5. Secuenciación y análisis de secuencias

4.5.1. Secuenciación

Con el fin de determinar a qué variantes pertenecían algunas de las muestras no-CPV-2c, y para confirmar las cepas CPV-2c, se realizó la secuenciación parcial de cinco muestras no-CPV-2c y cinco CPV-2c del amplicón de 1316 pb. Los productos de PCR fueron purificados con el *kit* Axi Prep™ PCR Clean-up de AXYGEN, siguiendo el protocolo del fabricante. La secuenciación fue realizada por el servicio de secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo, mediante la técnica de secuenciación automática en el secuenciador automático ABI prism 377- Perkin Elmer utilizando los cebadores F1 y R3 (Tabla 7).

Tabla 7: Muestras seleccionadas para secuenciar, con su respectivo año de recolección, el tipo de variante determinada por RFLP, y origen de la muestra (C; Capital, I; Interior).

MUESTRA/ AÑO	CPV-2	ORIGEN
M245/2010	no-CPV-2c	C
M250/2010	no- CPV-2c	C
M252/2010	no- CPV-2c	C
M280/2010	no- CPV-2c	I
M306/2011	no- CPV-2c	C
M247/2010	CPV-2c	I
M258/2010	CPV-2c	C
M260/2010	CPV-2c	C
M261/2010	CPV-2c	C
M307/2011	CPV-2c	I

4.5.2. Análisis bioinformáticos comparativos y filogenéticos

Para la realización de los análisis bioinformáticos comparativos y filogenéticos, las secuencias de las 10 muestras fueron editadas y comparadas utilizando el programa SeqMan del paquete Lasergene (DNAS^tar). Algunas de estas secuencias se compararon con aquellas obtenidas durante 2007-09 por otros investigadores del laboratorio, y con secuencias de distintas regiones del mundo adquiridas de la base de datos del GenBank (Tabla 8). De dichas secuencias, se utilizó una región parcial del gen *vp2*, la cual abarca la secuencia codificante del lazo GH, que es el sitio de mayor variabilidad del genoma de parvovirus (Agbandje et al. 1995). El mismo es codificado por los nucleótidos localizados entre las posiciones 3585 y 4280, y abarca desde el aminoácido 267 al 498 (232 residuos), lo que corresponde a 696 pb dentro del amplicón de 1316 pb amplificado por los cebadores F1 y R3.

Tabla 8: Muestras seleccionadas para analizar, con su respectivo número (N^o) de muestra y/o año de recolección, el tipo de variante, el origen de la muestra y su número de acceso. Muestras señaladas con * fueron secuenciadas en la presente pasantía.

MUESTRA/ AÑO	TIPO	PAÍS	Nº DE ACCESO
2012	CPV-2a	Argentina	KM236573
2008	CPV-2c	Bélgica	FJ005247
2008	CPV-2a	Brasil	FJ998161
2008	CPV-2a	China	GQ857612
2009	CPV-2a	China	GU380301
2009	CPV-2a	China	GU452715
2009	CPV-2a	China	JF681986
2006-8	CPV-2a	China	JQ169539
2009	CPV-2a	China	JU380298
2011	CPV-2a	China	KF676668
2007	CPV-2a	Corea	FJ197824
1980	CPV-2	EE.UU.	EU659117
2008	CPV-2c	España	FJ005246
2009	CPV-2c	Grecia	GO865519
2008	CPV-2c	Italia	FJ005245
2008	CPV-2a	Italia	FJ005256
2009	CPV-2a	Tailandia	JQ379048
2009	CPV-2a	Tailandia	JQ379045
2008	CPV-2a	Tailandia	FJ869126
M69/2007	CPV-2c	Uruguay	JF906815
M143/2008	CPV-2c	Uruguay	JF906809

M189/2009	CPV-2c	Uruguay	JF906811
M261/2010	CPV-2c	Uruguay	JF906814*
M190/2009	CPV-2c	Uruguay	JF906812
M243/2010	CPV-2a	Uruguay	JF906788
M244/2010	CPV-2a	Uruguay	JF906789
M245/2010	CPV-2a	Uruguay	JF906790*
M246/2010	CPV-2a	Uruguay	JF906791
M250/2010	CPV-2a	Uruguay	JF906792*
M251/2010	CPV-2a	Uruguay	JF906793
M252/2010	CPV-2a	Uruguay	JF906794*
M253/2010	CPV-2a	Uruguay	JF906795
M259/2010	CPV-2a	Uruguay	JF906796
M268/2010	CPV-2a	Uruguay	JF906797
M270/2010	CPV-2a	Uruguay	JF906798
M272/2010	CPV-2a	Uruguay	JF906799
M279/2010	CPV-2a	Uruguay	JF906800
M280/2010	CPV-2a	Uruguay	JF906801*
M281/2010	CPV-2a	Uruguay	JF906802
M282/2010	CPV-2a	Uruguay	JF906803
M286/2010	CPV-2a	Uruguay	JF906804
M289/2010	CPV-2a	Uruguay	JF906805
M290/2010	CPV-2a	Uruguay	JF906806
M291/2010	CPV-2a	Uruguay	JF906807
M306/2011	CPV-2a	Uruguay	KM457135*

Se realizó un alineamiento nucleotídico utilizando el algoritmo Muscle del software MEGA versión 6. Se eligió el modelo de sustitución nucleotídica T92, que es el que mejor describe la evolución de las secuencias según los criterios de información determinados en el software MEGA versión 6 (Tamura et al. 2013). El árbol filogenético de máxima verosimilitud fue construido utilizando el software MEGA versión 6 con un análisis de *bootstrap* basado en 500 pseudoréplicas, para dar soporte estadístico a los nodos internos del árbol. Se utilizó la secuencia de referencia CPV-2 (EU659117) como grupo externo del árbol.

5. RESULTADOS

5.1. Detección del virus mediante PCR

Los resultados de la PCR evidenciaron la presencia del genoma viral en 58 de las 69 muestras de materia fecal de canes con síntomas presuntivos de CPV-2 analizadas (Tabla 2), de las cuales 46 corresponden a 2010 (n= 52) y 12 corresponden a 2011 (n=17). En las muestras positivas se obtuvo un amplicón de tamaño esperado (1316 pb) (Figura 10).

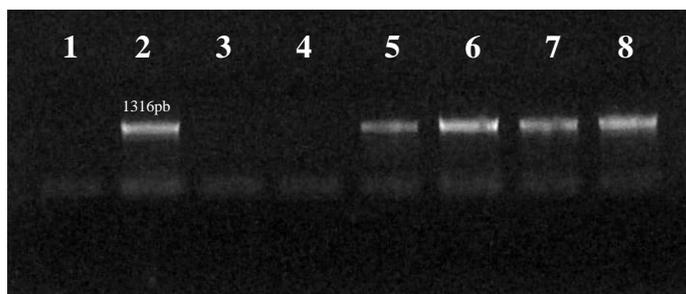


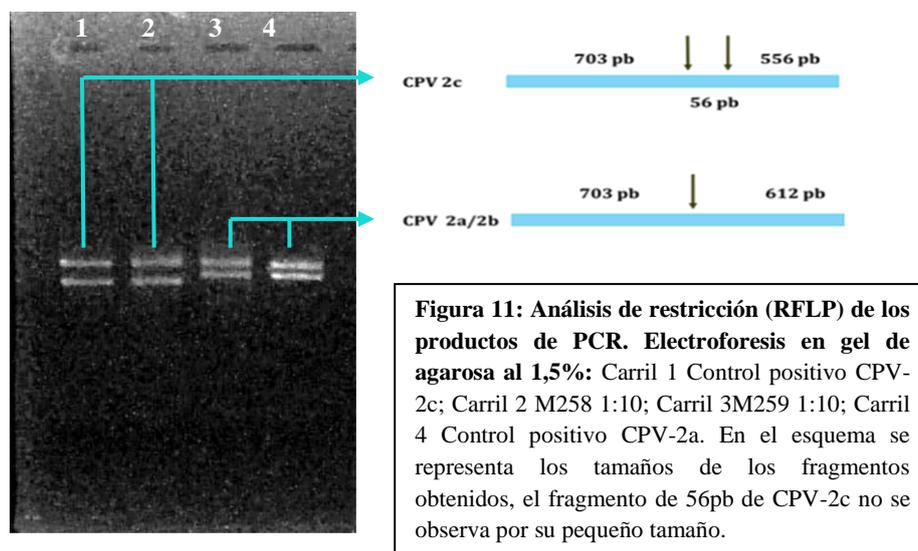
Figura 10: Gel de agarosa 0.8% con buffer 1xTAE: Carril 1- Blanco; Carril 2 Control positivo CPV; Carril 3 M256 dil. 1:5; Carril 4 M256 dil.1:10; Carril 5 M257 dil.1:5; Carril 6 M257 dil. 1:10; Carril 7 M259 dil. 1:5; Carril 8 M259 dil. 1:10.

5.2. Genotipificación de las muestras por RFLP

El RFLP de las 58 muestras positivas para CPV-2, mostró dos patrones de restricción claramente diferentes, identificando la variante 2c, las cuales presentaron dos bandas de 703 y 556 pb en la electroforesis en gel de agarosa (ya que el fragmento de 56 pb no se observa en la electroforesis), y la variante no-2c que presentaron bandas de 703 y 612 pb (Figura 11). En base a esto, 26 muestras fueron clasificadas como 2c, de las cuales 24 eran del año 2010 y 2 del año 2011. Las restantes 32 se clasificaron como no-CPV-2c, siendo 22 (47%) de 2010 y 10 (83%) de 2011.

Cinco de estas últimas fueron enviadas a secuenciar para su caracterización precisa (Tabla 7). El resto de las muestras que no fueron secuenciadas durante mi trabajo, fueron caracterizadas posteriormente mediante secuenciación para publicar en Pérez et al. 2012, publicación de la cual soy co-autora, o en el marco de otros trabajos

del grupo de investigación (Maya 2011, Tesis de maestría). A su vez se enviaron a secuenciar cinco muestras caracterizadas como CPV-2c (Tabla 7).



5.3. Secuenciación, análisis bio-informáticos comparativos y filogenéticos

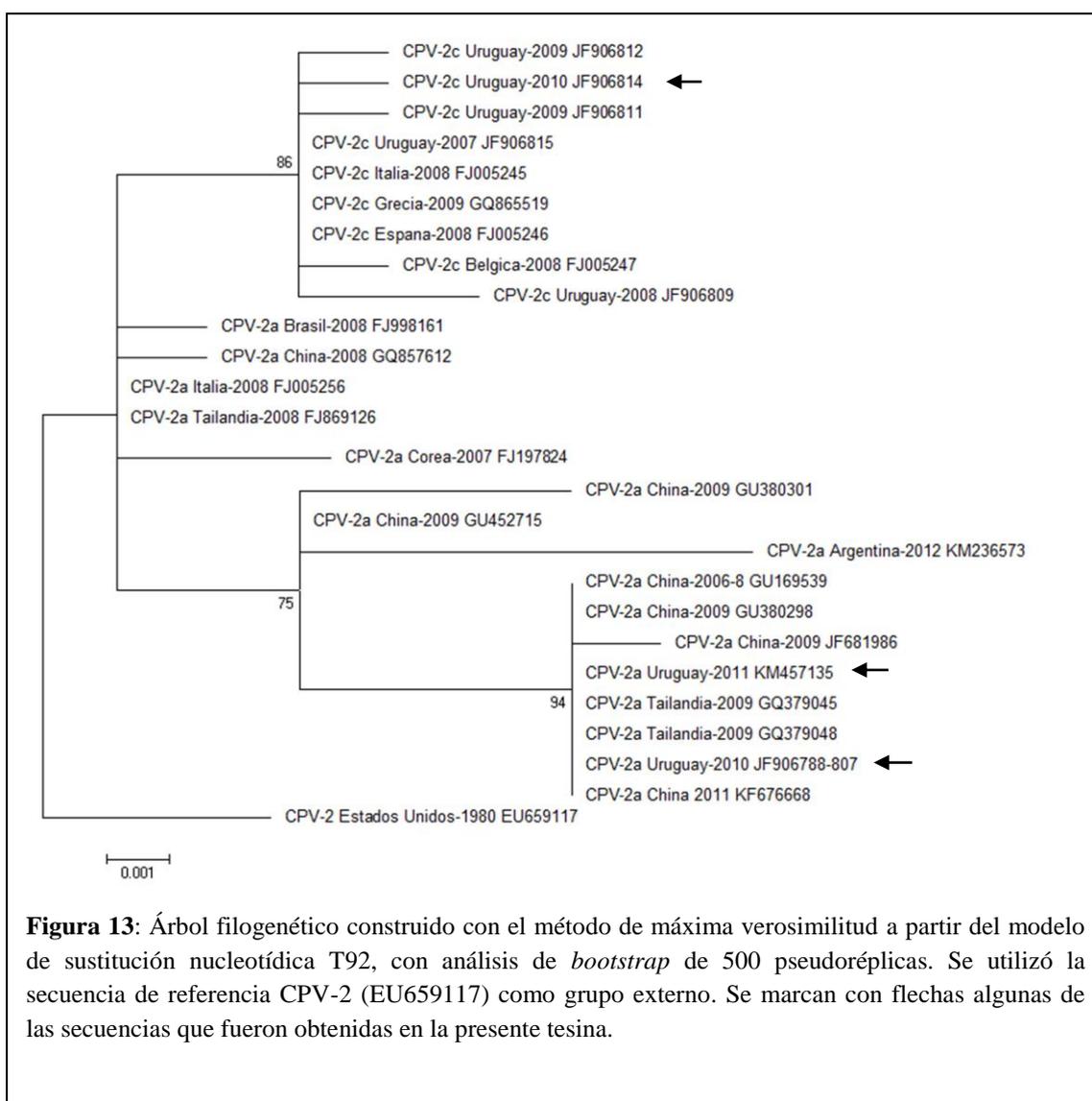
Los amplicones de 1316 pb de las 10 muestras fueron secuenciados directamente con los cebadores F1 y R3 (Tabla 3), y se obtuvieron secuencias de buena calidad que se editaron y alinearon para su comparación con secuencias de referencia obtenidas por otros integrantes del laboratorio (Tabla 7 y 8). Para dicho análisis comparativo, se utilizaron 696 pb de la secuencia codificante del lazo GH, sitio de mayor variabilidad del genoma de parvovirus, que abarca los aminoácidos 267 al 498 (Agbandje et al. 1995). En la posición 426 de las cinco muestras no-CPV-2c, se observó el codón para la Asn, característico de las variantes CPV-2/2a. Basados en la presencia de este y otros codones característicos, tales como 300Gly y 305Tyr (Figura 12), se determinó que las cinco muestras correspondían a cepas CPV-2a. Cabe destacar que las secuencias aquí obtenidas fueron 100% idénticas entre sí. Asimismo, se confirmó que las cinco muestras clasificadas como CPV-2c, poseen el aminoácido Glu en la posición 426 de la proteína VP2 (Figura 12).

Mediante el análisis comparativo de las secuencias de las variantes CPV-2c y CPV-2a obtenidas durante 2010-2011 (Tabla 7), se identificaron cambios sinónimos y no-sinónimos que diferencian las variantes CPV-2c de las CPV-2a. Los cambios aminoacídicos se encuentran ubicados en las posiciones 267, 324, 426 y 440 de la secuencia aminoacídica de VP2. El triplete que genera el cambio en la posición 267 es el resultado de un cambio en segunda posición, TTT (CPV-2c) a TAT (CPV-2a). En las posiciones 324 y 426, los codones cambian en dos posiciones, de TAT (CPV-2c) a ATT (CPV-2a), y de GAA (CPV-2c) a AAT (CPV-2a), respectivamente. Finalmente, en la posición 440, el cambio ocurre en la primera posición, de ACA (CPV-2c) a GCA (CPV-2a) (Tabla 9). Los cambios sinónimos ocurren en la tercera posición del codón 277 y 430, donde se mantienen los aminoácidos His y Leu respectivamente. En la posición 277 el triplete CAC (CPV-2a) cambia por CAT (CPV-2c) y en la posición 430 cambia el triplete TTA por TTG. En este caso, el cambio TTG aparece en todas las muestras CPV-2a y en las muestras CPV-2c M247 y M260, mientras que las muestras CPV-2c M258, M261 y M307 se observa el triplete TTA.

Tabla 9: Comparación de los residuos aminoacídicos del lazo GH de la proteína VP2 de las cepas CPV-2c y CPV-2a uruguayas.

CEPA	RESIDUO			
	267	324	426	440
CPV-2c Uy.	Phe (TTT)	Tyr (TAT)	Glu (GAA)	Thr (ACA)
CPV-2a Uy.	Tyr (TAT)	Ile (ATT)	Asn (AAT)	Ala (GCA)

El análisis filogenético de los 696 pb del lazo GH de las secuencias reveló dos clados con un buen soporte estadístico, uno que agrupa las variantes CPV-2c uruguayas y europeas, y el otro que contiene las variantes CPV-2a uruguayas, chinas y tailandesas obtenidas entre 2006 y 2011(Figura 13).



6. DISCUSIÓN

Desde que se detectó por primera vez en 1978, el parvovirus canino se ha propagado a través de perros domésticos y en la fauna silvestre por medio de lobos grises, coyotes, gatos monteses, pumas, zorros, pandas rojos y mapaches (Miller et al. 2000, Qin et al. 2007, Hoelzer & Parrish 2010, Allison et al. 2013). La intrínseca alta tasa de mutación y sustitución del genoma de CPV-2 permite su diversidad y favorece su propagación a través de la población canina (Shackelton et al. 2005).

La variabilidad de la secuencia parcial del gen *vp2* nos ha permitido realizar una primera aproximación a la epidemiología molecular de estos virus en Uruguay. Los resultados aquí obtenidos indican que la metodología utilizada (PCR, RFLP y secuenciación) es efectiva a la hora de analizar muestras de canes con síntomas presuntivos de CPV-2, tales como, fiebre, decaimiento, diarrea sanguinolenta y vómitos. El diagnóstico de 69 muestras con dichos síntomas, determinó que CPV-2 es uno de los principales responsables de causar gastroenteritis hemorrágica en canes de joven edad, con un 84% de muestras positivas durante mayo 2010 y mayo 2011, por lo que CPV-2 debe ser vigilado con atención, por dueños, criadores y veterinarios, requiriéndose además un estricto esquema de vacunación para su control.

La población canina en nuestro país se caracteriza por un interesante cambio en las variantes de CPV-2. En el año 2006 se detectó una única cepa del tipo o variante CPV-2a, sin embargo, desde el 2007, CPV-2c se convirtió en la única variante prevalente y permaneció así durante tres años más (Pérez et al. 2007; Pérez et al. 2012, Maya et al. 2013). En 2010 presenciamos la emergencia de una nueva variante divergente del tipo CPV-2a, alcanzando valores de frecuencia del 38 % durante ese año (Pérez et al. 2012). En 2011, la frecuencia de CPV-2a continuó aumentando de enero a mayo de ese año, alcanzando frecuencias del 83 %.

Las secuencias de CPV-2a uruguayas de 2010-11 obtenidas en la presente tesina y en el marco de otros trabajos del Laboratorio, fueron 100 % idénticas en secuencia en todos los virus de campo, lo que sugiere que son de naturaleza clonal y origen reciente. A su vez, se detectó que adicionalmente al residuo característico 426Asn, las CPV-2a presentan sustituciones aminoacídicas en posiciones claves de VP2 (Tabla 9). Todas ellas tienen la substitución aminoacídica Thr440Ala. Este cambio aminoacídico ha sido descrito en variantes CPV-2a y CPV-2b de Italia, India, Corea, China y Brasil (Battilani et al. 2002; Chinchkar et al. 2006; Pereira et al. 2007, Kang et al. 2008), y en las variantes de CPV-2c de USA (Kapil et al. 2007) y Argentina (Calderón et al. 2015). Estudios recientes en Argentina han mostrado que las variantes de CPV-2c colectadas durante 2009-2010 muestran una alta frecuencia del cambio Thr440Ala. Esto no se observa en nuestras variantes CPV-2c, sugiriendo diferencia poblacional con Argentina (Calderón et al. 2011). Este residuo se encuentra bajo selección positiva y evoluciona independientemente en diferentes poblaciones, lo cual explica la presencia de

poblaciones no relacionadas de CPV-2 distribuidas en distintas regiones del planeta (Decaro & Buonavoglia 2012). Un tercer aminoácido ha sido descrito para esta posición, el aminoácido Ser440, causado por una transversión en la primera posición del codón (ACA...TCA), en las variantes antigénicas (2a/2b y 2c) que co-circulan en Ecuador (Aldaz et al. 2013). El aminoácido 440 es un importante residuo, debido a que se encuentra localizado sobre el tercer eje de simetría, el principal sitio antigénico del virus (Tsao et al. 1991).

Las CPV-2a uruguayas cuentan también con dos sustituciones aminoacídicas: 324Ile y 267Tyr. El residuo 324Ile es generado por dos cambios nucleotídicos (TAT→ATT), y fue reportado por primera vez en 2004 en variantes de CPV-2a de China y Corea (Jeoung et al. 2008; Zhang et al. 2010) y recientemente en Taiwán (Lin et al. 2014) y Argentina (Calderón et al. 2015). Es interesante que la frecuencia de las variantes que portan este residuo se ha incrementado y ha alcanzado una alta prevalencia en la población de CPV-2 asiática (Zhang et al. 2010, Lin et al. 2014; WU et al. 2015) . Estudios previos han mostrado que el residuo 324 se encuentra bajo fuerte selección positiva en parvovirus de todos los carnívoros (Hoelzer et al. 2008, Lin et al. 2014). Este residuo es adyacente al residuo 323, el cual afecta la unión al receptor canino de la TfR (Hueffer et al. 2003). Los residuos 323 y 93 cooperan para favorecer la infección del huésped canino (Hueffer et al. 2003).

En relación al cambio localizado en la posición 267, también se ha descrito en CPV-2b asiáticos de Vietnam (Nakamura et al. 2004) y CPV-2a de Tailandia (Phromnoi et al. 2010) y de China (Zhang et al., 2010, Yi et al. 2014). Dado que el residuo 267 no se encuentra expuesto a la superficie de la cápside (Agbandje et al. 1995), la sustitución en esta posición parecería no afectar la antigenicidad. La presencia del residuo 267Tyr en CPV-2a, que no ha sido descrita en ninguna cepa de CPV-2c alrededor del mundo, incluyendo las variantes colectadas durante 2010 en el continente americano, resalta la alta divergencia entre los virus CPV-2a y CPV-2c uruguayos (Tabla 9, Figura 13). Hasta el momento ha sido reportado un solo caso en Argentina de una muestra que presenta dos de los cambios observados en las muestras CPV- 2a uruguayas (el 324 y el 440). Sin embargo, estudios filogenéticos demuestran que las variantes que circulan en ambos países siguen vías evolutivas diferentes, a pesar de la proximidad geográfica y el intenso intercambio de animales entre ambos países. Por lo tanto, nuevos estudios epidemiológicos activos y cuidadosos, son necesarios para entender la dinámica de la evolución de CPV-2 en la región y el mundo (Calderón et al. 2015).

Durante el período comprendido entre 2007-09, CPV-2c mostró cambios nucleotídicos esporádicos, sin que se haya fijado ningún cambio aminoacídico nuevo en la población uruguaya. Estos resultados coinciden con otros hallazgos, que indican que CPV-2c presenta un nivel de variabilidad relativamente bajo (Decaro et al. 2009, Maya et al. 2013). Las secuencias parciales del gen *vp2* de CPV-2c uruguayas están muy relacionadas a las secuencias europeas, como se puede observar en la Figura 13, sugiriendo que CPV-2c comparte un ancestro común con las cepas europeas, pudiendo

incluso haber sido importado desde Europa a nuestro país. Un origen europeo para las cepas CPV-2c es factible porque la primera cepa CPV-2c se recogió en Alemania en 1996 (Decaro et al. 2007) mientras en América del Sur el primer informe fue para Argentina en 2003 (Calderón et al. 2011). Estudios filodinámicos posteriores indican que CPV-2c invadió Uruguay alrededor de 2004-2005 y comenzó el proceso de reemplazo que culminó con el completo reemplazo de variantes anteriores (Pérez et al. 2007, Maya et al. 2013). Uruguay fue el primer país de América en el cual la frecuencia de CPV-2c se incrementó y reemplazó completamente a otra variante, un hecho que puede ser explicado en parte, por una población canina y extensión geográfica pequeña (Pérez et al. 2007). Otros países americanos que han descrito variantes de CPV-2 en los últimos años (Argentina, Brasil, y Estados Unidos), han mostrado una tendencia similar con incremento significativo de CPV-2c (Calderón et al. 2012; Hong et al. 2007; Kapil et al. 2007; Pinto et al. 2012). Los análisis filogenéticos indican que las cepas CPV-2a uruguayas se encuentran estrechamente relacionadas con las cepas CPV-2a asiáticas (Figuras 12 y 13). Las CPV-2a uruguayas, son idénticas a las cepas chinas colectadas durante 2006-2009 (Zhang et al. 2010). Este resultado indica claramente que las cepas CPV-2a uruguayas tienen un origen extranjero, probablemente de un país asiático.

El comportamiento de la variante divergente CPV-2a que invadió nuestro país durante 2010, parece presentar un comportamiento similar de reemplazo de CPV-2c, dado que ha aumentado su frecuencia significativamente hasta casi desplazar a CPV-2c (resultados del grupo de investigación aún no publicados) (Tabla 10). Cabe destacar, que es la primera vez que se registra a nivel mundial, una tendencia de reemplazo de CPV-2c por CPV- 2a. Lo que revela que ciertas poblaciones caninas pueden sufrir eventos de invasión y reemplazo por un nuevo virus, probablemente por variantes oportunistas. La convergencia de poblaciones de diferente origen también da lugar a que ocurran eventos de co-infección y recombinación que colaboran con la generación de variabilidad a nivel local (Pérez et al. 2014).

Tabla 10: Muestras CPV- 2a y CPV- 2c diagnosticadas y caracterizadas por la sección entre los años 2010 – 2013.

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

Los resultados obtenidos durante esta pasantía y el análisis de más secuencias y muestras analizadas en el marco de otros trabajos realizados por el grupo de investigación, apoyan la teoría de que CPV-2 presenta en Uruguay un modelo evolutivo de “invasión y remplazo”, el cual no concuerda con las hipótesis evolutivas del virus que se describen en otros países. Esto resalta la extrema variabilidad de CPV-2, por lo que debe seguir siendo estudiado para entender su epidemiología, que parece más compleja de lo que se suponía.

7. CONCLUSIONES

El diagnóstico y la genotificación molecular de parvovirus canino en Uruguay mediante PCR y RFLP confirma una vez más la eficacia y sensibilidad del método desarrollado en nuestro laboratorio. Por medio de éste, se logra determinar que una de las principales causas de gastroenteritis hemorrágica en perros, es la infección por CPV-2, detectándose el mismo en el 84% de las muestras con síntomas clínicos analizadas entre mayo 2010 y mayo 2011

La caracterización indirecta (mediante RFLP) y directa (mediante secuenciación de la región codificante del lazo GH, la región más variable de VP2), permitió clasificar a las variantes circulantes, observándose co-circulación de las variantes CPV-2a y CPV-2c en la población canina uruguaya.

La secuenciación de las variantes CPV-2a reveló que son 100% idénticas lo que sugiere que son de naturaleza clonal y de origen reciente. Esta variante es divergente con respecto a la CPV-2c que circulaba en nuestro país, ya que difieren en al menos tres aminoácidos (Tabla 9). Nuestros resultados sugieren que esta variante probablemente haya sido importada a nuestro territorio y sea de origen asiático.

8. AGRADECIMIENTOS

A mi compañero de vida, Martín Dutra, por acompañarme por todo este proceso tan largo y tan intermitente que fue mi vida como estudiante. A mi familia, principalmente a mis padres, por su apoyo incondicional en la decisión de mi carrera y luego la interrupción de la misma. A mis amigas y amigos, que durante el proceso llamaban en cada parcial, examen, etc. A todos ellos y a todo mi entorno que nunca dejaron de insistir para que terminara la tesina que al fin terminé.

A Rubén Pérez, que primero me dio la oportunidad de ingresar a su equipo, al cual también agradezco todo el apoyo y la enseñanza, y luego me dio esta oportunidad de terminar mi carrera a pesar del tiempo transcurrido. Así como a la CCD, que aprobó la presentación de mi proyecto.

A la Facultad de Ciencias que me acogió durante mis años de estudiante y a todos mis compañeros, simplemente gracias.

9. 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, & R. Pérez. 2013. "High Local Genetic Diversity of Canine Parvovirus from Ecuador." *Veterinary Microbiology* 166 (1-2): 214–19.
- Allison, A. B., C. E. Harbison, I. Pagan, K. M. Stucker, J. T. Kaelber, J. D. Brown, M. G. Ruder, M. K. Keel, E. J. Dubovi, E. C. Holmes, & C. R. Parrish, 2012. "Role of Multiple Hosts in the Cross-Species Transmission and Emergence of a Pandemic Parvovirus." *Journal of Virology* 86(2): 865–72.
- Allison, A. B., D. J. Kohler, K. A. Fox, J. D. Brown, R. W. Gerhold, V. I. Shearn-bochsler, E. J. Dubovi, C. R. Parrish, C. Holmes, & C. South 2013. "Frequent Cross-Species Transmission of Parvoviruses among Diverse Carnivore Hosts" *Journal of Virology* 87 (4): 2342-2347.
- 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., 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.
- Calderón, M. G., 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.

- Calderón, M. G., C. Romanutti, M. Wilda, A. D' Antuono, L. Keller, M. N. Giacomodonato, N. Mattion, J. La Torre. 2015. "Resurgence of Canine Parvovirus 2a Strain in the Domestic Dog Population from Argentina." *Journal of Virological Methods* 222: 145–49.
- 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.
- Chinchkar, S R, B. Mohana Subramanian, N. Hanumantha Rao, P. N. Rangarajan, D. Thiagarajan, V. A. Srinivasan. 2006. "Analysis of VP2 Gene Sequences of Canine Parvovirus Isolates in India Brief Report." *Archives of Virology* 151: (9) 1881–87.
- Comité Internacional de Taxonomía de Viruses ICTV. 2013. "Rationalization and Extension of the Taxonomy of the Family Parvoviridae." (May): 5 of 65.
- Comité Internacional de Taxonomía de Viruses (ICTV) 2015. Virus Taxonomy: 2015 Release. Disponible: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> Acceso 23 de agosto de 2016.
- Cotmore, S. F., & P. Tattersall. 1996. "Parvovirus DNA Replication." *Cold Spring Harbor Monograph Archive* 31: 799–813.
- Cotmore, S. F., & P. Tattersall. 2007. "Parvoviral Host Range and Cell Entry Mechanisms." *Advances in Virus Research* 70 (07): 183–232.
- Cotmore, S. F., & P. Tattersall. 2014. "Parvoviruses: Small Does Not Mean Simple." *Annual Review of Virology* 1(1): 517–37.
- 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, M. Campolo, G. Elia, V. Martella, D. Ricci, E. Lorusso, & C. Buonavoglia. 2005a. "Clinical and Virological Findings in Pups Naturally Infected by Canine Parvovirus Type 2 Glu-426 Mutant." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc 17 (2): 133–38
- Decaro N, G. Elia, V. Martella , C. Descario, M. Campolo, L. Di Trani, E. Tarsitano, M. Tempesta & C. Buonavoglia et al. 2005b. "A Real-Time PCR Assay for Rapid Detection and Quantitation of Canine Parvovirus Type 2 in the Feces of Dogs." *Veterinary Microbiology* 105(1): 19–28.
- 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, A. Parisi, V. Martella, A. Lorusso, A. Miccolupo, V. Mari, et al. 2009. "Genetic Analysis of Canine Parvovirus Type 2c." *Virology* 385: 5–10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2008.12.016>.
- Decaro, N., & C. Buonavoglia. 2012. "Canine parvovirus—A Review of Epidemiological and Diagnostic Aspects, with Emphasis on Type 2c." *Veterinary microbiology* 155(1): 1–12.
- 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.
- Goodman L, S. Lyi, N. Johnson, J. Cifuentes, S. Hafenstein & C. R. Parrish 2010. "Binding Site on the Transferrin Receptor for the Parvovirus Capsid and Effects of Altered Affinity on Cell Uptake and Infection." *Journal of virology* 84(10): 4969–78.
- 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. 2008a. "Phylogenetic Analysis Reveals the Emergence, Evolution and Dispersal of Carnivore Parvoviruses." : 2280–89.
- Hoelzer, K., L. A. Shackelton, E. C. Holmes, & C. R. Parrish. 2008b. "Within-Host Genetic Diversity of Endemic and Emerging Parvoviruses of Dogs and Cats." *Journal of virology* 82(22): 11096–105.
- Hong C., N. Decaro, C. Desario, P. Tanner, M. C. Pardo, S. Sanchez, C. Buonavoglia, J. T. Saliki. 2007. "Occurrence of Canine Parvovirus Type 2c in the United States." *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 19(5): 535–39.
- Hueffer, K., L. Govindasamy, M. Agbandje-McKenna, & C. R. Parrish. 2003. "Combinations of Two Capsid Regions Controlling Canine Host Range Determine Canine Transferrin Receptor Binding by Canine and Feline Parvoviruses." *J Virol* 77(18): 10099–105.
- Hurtado A., P. Rueda, J. Nowicky, et al. 1996. "Identification of domains in canine parvovirus VP2 essential for the assembly of virus-like particles". *Journal of Virology* 70: 5422–9.

- 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.
- Kang, B. K., Song, D. S., Lee, C. S., Jung, K. Il, Park, S. J., Kim, E. M., & Park, B. K. 2008. "Prevalence and genetic characterization of canine parvoviruses in Korea." *Virus Genes*, 36(1), 127–133.
- 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. 2013. "Parvoviruses." *Journal of Chemical Information and Modeling* 53(9): 1689–99.
- Knipe, D M, & P M Howley. 2013. *Fields Virology Fields Virology , 6th Edition.*
- Knipe, D M, & P M Howley. 2001. "Fields Virology." (August).
- 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: 39.
- López-Bueno, A, L P Villarreal, & J M Almendral. 2006. "Parvovirus Variation for Disease: A Difference with RNA Viruses?" *Current topics in microbiology and immunology* 299: 349–70.
- Lopez de Turiso J.A., E. Cortes, C. Martinez, R. Ruiz de Ybanez, I. Simarro, C. Vela, I. Casal, 1992 "Recombinant Vaccine for Canine Parvovirus in Dogs" *Journal of Virology*. 66, 2748–2753
- 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.
- Miller, D.S., D. F. Covell, R. G. Mclean, W. J. Adrian, M. Niezgod, J. M. Gustafson, O. J. Rongstad, R. D. Schultz, L. Kirk, & T. J. Quan. 2000 "Serologic Survey for Selected Infectious Disease Agents in Swift and Kit Foxes from the Western United States" *Journal of Wildlife Diseases*, 36(4): 798–805
- 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* 21(1): 31–44.

- Nandi, S., M. Kumar, T. Kumar Mohapatra, & C. Ravishankar. 2013. "Emergence of Canine Parvovirus - 2 Variants and Its Impact on Vaccination." *World Applied Sciences Journal* 23(10): 1366–76.
- Niskanen, E. A., I. Teemu O Kalliolinna, O. Häkkinen, M. M. Vihinen-Ranta, 2010. "Effect of ATP Binding and Hydrolysis on Dynamics of Canine Parvovirus NS1." *Journal of virology* 84(10): 5391–5403.
- Parker, J. S. L., & C. R. Parrish. 2000." Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endo- cytosis, followed by slower intracellular trafficking". *Journal of Virology*. 74:1919–1930.
- Parrish C.R., C.F Aquadro., L.E. Carmichael 1988a "Canine host range and a specific epitope map along with variant sequences in the capsid protein gene of canine parvovirus and related feline, mink, and raccoon parvoviruses". *Virology* 166, 293-307 (1988a).
- Parrish, C. R., P. Have, W. J. Foreyt, J. F. Evermann, M. Senda & L. E. Carmichael., 1988b "The global spread and replacement of canine parvovirus strains" *Journal of General Virology* 69: 1111-1116
- Parrish, C. R., C. F. Aquadro, M. L. Strassheim, J. F. Evermann, J. Y. Sgro, & H. O. Mohammed. 1991 a. "Rapid Antigenic-Type Replacement and DNA Sequence Evolution of Canine Parvovirus." *Journal of virology* 65(12): 6544-52.
- Parrish, C R. 1991b. "Mapping Specific Functions in the Capsid Structure of Canine Parvovirus and Feline Panleukopenia Virus Using Infectious Plasmid Clones." *Virology* 183(1): 195–205.
- 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(1): 553–86.
- Pereira, C. a D, Elcio S. Leal, & É. 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* 7(3): 399–409.
- Pérez, R., L. Francia, V. Romero, L. Maya, I. López, & M. Hernández. "First Detection of Canine Parvovirus Type 2c in South America." *Veterinary Microbiology* 124(1-2): 147–52.
- 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.” *PLoS ONE* 9(11): e111779.
- Phromnoi, S., K. Sirinarumitr, & T. Sirinarumitr. 2010. “Sequence Analysis of VP2 Gene of Canine Parvovirus Isolates in Thailand.” *Virus Genes* 41: 23–29.
- 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.
- Prittie, J. 2004. “Canine Parvoviral Enteritis: A Review of Diagnosis, Management, and Prevention.” *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 14(3): 167–76.
- Qin, Q., I. K. Loeffler, M. Li, K. Tian, & F. Wei. 2007. “Sequence analysis of a canine parvovirus isolated from a red panda (*Ailurus fulgens*) in China.” *Virus Genes*, 34(3), 299–302.
- Reed, Ap, E. V. Jones, & T. J. Miller. 1988. “Nucleotide Sequence and Genome Organization of Canine Parvovirus.” *Journal of virology* 62(1): 266–76.
- Rhode, S L. 1985. “Nucleotide Sequence of the Coat Protein Gene of Canine Parvovirus.” *Journal of virology* 54(2): 630–33.
- Robinson, W. F., G. E. Wilcox, & R. L. P. Flower. 1980. “Canine Parvoviral Disease: Experimental Reproduction of the Enteric Form with a Parvovirus Isolated from a Case of Myocarditis.” *Veterinary Pathology* 17(5): 589–99.
- Schunck, B, W. Kraft, & U. Truyen. 1995. “A Simple Touch-down Polymerase Chain Reaction for the Detection of Canine Parvovirus and Feline Panleukopenia Virus in Feces.” *Journal of virological methods* 55(3): 427–33.
- 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(September): 379–84.
- Strassheim, M. L., A. Gruenberg, P. Veijalainen, J. Y. Sgro, C. R. Parrish. 1994. “Two Dominant Neutralizing Antigenic Determinants of Canine Parvovirus Are Found on the Threefold Spike of the Virus Capsid.” *Virology* 198(1): 175–84.
- Stucker, K. M, I. Pagan, J. O. Cifuentes, J. T. Kaelber, T. D. Lillie, S. Hafenstein, E. C. Holmes & C. R. Parrish et al. 2012. “The Role of Evolutionary Intermediates in the Host Adaptation of Canine Parvovirus.” *Journal of virology* 86(3): 1514–21.
- Swiss Institute of Bioinformatics (2015). Viral Zone: Protoparvovirus. Disponible: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/199.html.

- Tamura K, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipinski & S. Kumar. 2013. "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0." *Molecular biology and evolution* 30(12): 2725–29.
- Truyen, A. Gruenberg, S. F.Chang, B. Obermaier, P. Veijalainen, C. R. Parrish, 1995. "Evolution of the Feline-Subgroup Parvoviruses and the Control of Canine Host Range in Vivo." *Journal of virology* 69(8): 4702–10.
- Truyen, U., T. Müller, R. Heidrich, K. Tackmann, L. E. Carmichael, 1998. "Survey on Viral Pathogens in Wild Red Foxes (*Vulpes Vulpes*) in Germany with Emphasis on Parvoviruses and Analysis of a DNA Sequence from a Red Fox Parvovirus." *Epidemiology and infection* 121(2): 433–40.
- Truyen, U. 2000. "Canine Parvovirus." *Veterinary Microbiology* In: Carmic (Recent Advances in Canine Infectious Diseases. Ithaca: International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
- 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." *Science (New York, N.Y.)* 251(5000): 1456–64.
- Vihinen-Ranta, M., S. Suikkanen, C. R. Parrish, & Fin- Jyva. 2004. "Pathways of Cell Infection by Parvoviruses and Adeno-Associated Viruses." *J Virol* 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, and C R Parrish. 1998. "Nonstructural Protein-2 and the Replication of Canine Parvovirus." *Virology* 240: 273–81.
- Wu J., X.T. Gao,S.H. Hou, X.Y. Guo, X.S. Yang, W. F. Yuan, T. Xin, H.F. Zhu, H. Jia 2015. "Molecular Epidemiological and Phylogenetic Analyses of Canine Parvovirus in Domestic Dogs and Cats in Beijing, 2010–2013." *Journal of Veterinary Medical Science* 77(10): 1305–10.
- Yi, L., Tong, M., Cheng, Y., Song, W., & Cheng, S. (2016). Phylogenetic Analysis of Canine Parvovirus VP2 Gene in China. *Transboundary and Emerging Diseases*, 63(2), e262–e269
- 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.

ANEXO I: Publicaciones

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.

Abstract

Canine parvovirus type 2 (CPV-2), which causes acute hemorrhagic enteritis in dogs, is comprised of three antigenic variants (2a, 2b, and 2c) that are distributed worldwide with different frequencies. Variant prevalence was analyzed in 150 CPV-2-positive samples collected from the Uruguayan dog population in 2007–2010. Samples were analyzed with polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism, and sequencing of the coding region for the largest and most variable loop of the VP2 capsid protein. CPV-2c was the only strain detected from 2007 to 2009. Uruguayan CPV-2c showed high homogeneity in both nucleotide and amino acid sequences, indicating a low level of genetic variability. In 2010, an unexpected epidemiological change occurred in Uruguay as a consequence of the appearance of a novel CPV-2a strain. This variant rapidly spread through the Uruguayan dog population and was detected in 20 of the 52 cases (38%) analyzed in 2010. CPV-2a sequences were identical in all field viruses analyzed, and in addition to the characteristic 426Asn residue, the sequences showed amino acid substitutions (267Tyr, 324Ile, and 440Ala) not observed in the Uruguayan CPV-2c. These data and the first detection in April 2010 suggest that the CPV-2a variant recently emerged in Uruguay and underwent clonal expansion. This observation is the first case in which a CPV-2a variant increased its frequency in a dog population where CPV-2c was prevalent. Our results emphasize the dynamic changes in CPV variants and highlight the importance of ongoing surveillance programs to provide a better understanding of virus epidemiology.