

**DIVERSIDAD FILOEVOLUTIVA Y MOLECULAR DE LAS VARIANTES
ANTIGÉNICAS CPV-2a Y CPV-2b CIRCULANTES EN COLOMBIA**

SEBASTIÁN GIRALDO RAMÍREZ

Tutor:

Julián Ruíz Sáenz. MV, MSc, PhD

MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA Y BIOANÁLISIS

ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS ANIMALES – GRICA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

UNIVERSIDAD COOPERATIVA DE COLOMBIA, SEDE MEDELLÍN

2020

Agradecimientos

Quiero agradecer al Doctor Julián Ruiz Sáenz, mi tutor, por acogerme como su estudiante y guiarme en este proceso de aprendizaje, con calidez, ciencia y docencia. Agradecimientos eternos por su contribución.

A Santiago Rendón Marín, mi amigo, por su disposición, amabilidad y gentileza al acompañarme en cada paso del desarrollo de este trabajo.

A todos los compañeros del Grupo de Investigación en Ciencias Animales (GRICA) por hacer parte de mi proceso formativo, y toda la ayuda brindada para el desarrollo de mí trabajo.

A los centros veterinarios que generosamente suministraron las muestras para el desarrollo del proyecto.

A Dios, mi familia y seres queridos. Siempre de mi lado y por quienes todo esto fue posible.

CONTENIDO

1. Resumen general.....	10
2. Introducción general.....	12
3. Objetivos.....	14
3.1. General.....	14
3.2. Específicos.....	14
4. CAPÍTULO 1.....	15
Revisión de literatura.....	15
El parvovirus canino tipo 2: un virus con amplia diversidad genética y antigénica en el continente americano.....	15
Resumen.....	16
Abstract.....	17
Introducción.....	18
Origen.....	19
Estructura genética.....	23
Estructura de la cápside.....	25
Patogenia de la infección por el CPV-2.....	25
Diagnóstico.....	29

Antigenicidad del CPV-2.....	31
Parvovirus en el continente americano. Detección por métodos tradicionales y moleculares.....	36
Conclusiones.....	47
Conflicto de intereses.....	50
Referencias.....	51
5. CAPÍTULO 2.....	63
Trabajo de investigación.....	63
Phylogenetic, evolutionary and structural analysis of canine parvovirus (CPV2) antigenic variants circulating in Colombia.....	63
Abstratc.....	64
1.Introduction.....	65
2. Materials y methods.....	67
2.1. Patient selection and sampling	67
2.2. DNA extraction and quantification	67
2.3. VP2 amplification using PCR	67
2.4. Sequencing and sequence analysis	68
2.5. Phylogenetic Analysis	69

2.6. Evolutionary analysis	69
2.7. Structural analysis	70
2.8. Statistical analyses	70
3. Results	70
3.1. Sequence analysis.....	73
3.2. Phylogenetic analysis.....	74
3.3. Evolutionary analysis.....	76
3.4. Structural modelling.....	79
4. Discussion	81
5. Conclusion	87
Conflict of interests.....	88
References.....	89
Conclusiones generales	94
Recomendaciones generales	95

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO 1

Figura 1. Ciclo replicativo del parvovirus canino.....	21
Figura 2. Relación genética y rango de hospederos del CPV, FPV y otros parvovirus relacionados.....	23
Figura 3. Estructura genómica del CPV-2.....	24
Figura 4. Estructura tridimensional del Parvovirus canino.....	32
Figura 5. Modelo de la estructura de la proteína de cápside VP2 y la ubicación de algunas mutaciones.....	35
Figura 6. Distribución geográfica de los estudios de parvovirus canino en el continente americano.....	48

LISTA DE TABLAS CAPÍTULO 2

Table 1. Information on CPV-2-positive samples included in the present study.....	71
Table 2. Amino acid variations in the samples identified as CPV-2a and CPV-2b in relation to reference variants (in bold).....	73

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO 2

Figure 1. Distribution of CPV-2-positive samples by the animal's age (in months).....	72
Figure 2. Maximum likelihood tree of CPV-2.....	75
Figure 3. Phylogenetic evolutionary tree of Colombian CPV-2 variants.....	77

Figure 4. Three-dimensional reconstruction and structural analysis of the VP2 surface of the Colombian CPV-2a and CPV-2b variants.....	80
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

CPV-2: Parvovirus canino tipo 2

ESS: Tamaño efectivo de la población

FPV-FPLV: Virus de la panleucopenia felina

HPD: Mayor densidad de probabilidad

HKY: Hasegawa-Kishino-Yano

MCMC: Cadena Markoviana Monte-Carlo

NLS: Señal de localización nuclear

NS1: Proteína no estructural 1

NS2: Proteína no estructural 2

ORF: Marco abierto de lectura

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PLA2: Fosfolipasa A2

RIVEM: Interpretación radial de los mapas de densidad electrónica

TfR: Receptor de Transferrina

tMRCA: Edad del ancestro común más reciente

T92: Tamura de 3 parámetros

VP1: Proteína viral 1 (estructural)

VP2: Proteína viral 2 (estructural)

1. RESUMEN GENERAL

La parvovirus canina es una de las principales enfermedades virales que afectan a la población canina del mundo. El agente causal de esta enfermedad es el Parvovirus canino tipo 2 (CPV-2), el cual tiene como tejido blanco células con alta actividad mitótica, como lo son las del epitelio intestinal y tejido linfoide, lo que deriva en la destrucción de estos tejidos y la aparición de signos clínicos como la diarrea hemorrágica característica de la enfermedad.

Se han descrito tres variantes antigénicas de CPV-2 (CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c) con base en mutaciones puntuales en la proteína de cápside VP2. En Colombia, en el año 2016, se describió la presencia de las variantes antigénicas CPV-2a y CPV-2b por medio de la secuenciación parcial del gen que codifica para VP2. Adicionalmente el análisis filogenético de ese trabajo permitió identificar que secuencias pertenecientes a CPV-2a, presentaban una agrupación particular en un clado monofilético y las cuales presentaban la mutación Ala514Ser. Se sugirió la aparición de una posible subvariante CPV- a colombiana.

El presente trabajo para la tesis en maestría en microbiología, constituye una continuación y un análisis más a profundidad de lo realizado anteriormente en la identificación de variantes CPV-2 en Colombia. Se realizó la recolección de muestras de materia fecal de pacientes con diagnóstico presuntivo de parvovirus en el valle de Aburrá; se obtuvieron secuencias del gen VP2 completo que permitieron la identificación de las variantes CPV-2a y CPV-2b; el análisis filogenético evidenció una distribución de las variantes, en las cuales las secuencias 2a conforman un clado monofilético diferenciado y las secuencias 2b relacionadas con secuencias de Asia y Uruguay. Se realizó un análisis evolutivo que permitió identificar el origen de las variantes antigénicas halladas en el estudio; La variante 2a tiene origen suramericano perteneciendo al clado Suramérica I, la variante 2b tiene origen asiático perteneciendo al clado Asia I.

Adicionalmente se realizó un análisis estructural de VP2 con el objetivo de identificar la ubicación en la proteína de las mutaciones halladas en las variantes 2a y 2b. Se identificó que las mutaciones de CPV-2a (Ala297Asn, Tyr324Ile, y Ala514Ser) y CPV-2b (Phe267Tyr, Tyr324Ile y Thr440Ala) se encuentran en dominios de interacción con receptor celular o de interacción con anticuerpos, por lo que podrían representar mutaciones que favorecen la interacción virus-receptor y/o evasión de neutralización por anticuerpos.

2. INTRODUCCIÓN GENERAL

El parvovirus canino (CPV-2) es el agente viral de mayor importancia en la presentación de gastroenteritis hemorrágicas en perros jóvenes (Decaro and Buonavoglia, 2012). Desde que fue reportado a finales de la década de 1970, el virus se ha diseminado por todo el mundo convirtiéndose en un virus pandémico dentro de la población canina (Parrish, 1999). Dada la alta tasa de sustitución genómica que posee el virus (10^{-4} por sitio) (Zhou et al. 2017), se han originado tres variantes antigénicas, CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c, las cuales reemplazaron al CPV-2 original y son las que se encuentran circulando actualmente en todo el mundo (Miranda and Thompson, 2016). Esta alta capacidad de variación genómica ha llevado al desarrollo de características estructurales en la cápside viral (proteína de cápside VP2) que ha permitido el establecimiento de poblaciones virales divergentes en distintas áreas geográficas (Clegg et al., 2016). Adicionalmente ciertas mutaciones parecen darle ventajas a los virus que las poseen para finalmente establecerse como la población viral dominante en la zona, y reemplazar a la población viral que no posee dichos cambios (Pérez et al., 2012). Muchos de estos cambios parecen estar ubicados en zonas de VP2 relacionadas con la evasión de la respuesta inmune humoral y con el favorecimiento de la interacción virus-receptor (Voorhees et al., 2019).

El primer capítulo de este trabajo desarrolla una revisión bibliográfica en donde se contextualiza respecto al origen del virus, el surgimiento y características de cada una de las variantes antigénicas de CPV-2, las características de su genoma, la estructura de la cápside viral y una visión general de los mecanismos del ciclo reproductivo del virus. Adicionalmente se hace una revisión de la patogenia de la parvovirus canina y los métodos diagnósticos que se emplean en el ejercicio clínico para identificar el virus.

Éste mismo capítulo hace una extensiva revisión de los estudios realizados en la detección del virus por métodos convencionales como inmunocromatografía y hemaglutinación, así como por medios moleculares como la amplificación de ácidos nucleicos por PCR, y las características en los países del continente americano. La revisión generada, permite entender que la alta capacidad de mutación del parvovirus ha propiciado la aparición de sustituciones en residuos aminoacídicos en VP2, generando variantes antigénicas con características propias de los lugares geográficos donde se detectan. Este trabajo fue sometido a la *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*.

En el segundo capítulo se verá el trabajo de investigación que dio como resultado el artículo sometido y publicado en la revista *Viruses*. Dicho trabajo se enfoca en la caracterización molecular de las variantes CPV-2 encontradas en Antioquia. Adicionalmente se realiza un estudio filoevolutivo de los hallazgos y se comparan con secuencias reportadas de diferentes partes del mundo. Finalmente se describen las características estructurales de las mutaciones encontradas en las variantes CPV-2 circulantes en Colombia.

3. OBJETIVOS

3.1. GENERAL

Determinar las características moleculares, filoevolutivas y estructurales del gen VP2 de las variantes CPV-2 circulantes en Colombia.

3.2. ESPECÍFICOS

1. Describir la secuencia nucleotídica y aminoacídica del gen y la proteína de cápside VP2 de las muestras positivas a CPV-2.
2. Describir las variantes de CPV-2 halladas en la población canina en estudio y sus características filogenéticas.
3. Realizar el análisis evolutivo de las variantes CPV-2 colombianas encontradas en el estudio.
4. Determinar las implicaciones estructurales de las mutaciones halladas en el análisis de secuencias de las variantes CPV-2 colombianas.

4. CAPÍTULO 1

REVISIÓN DE LITERATURA

Sometido en: **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**

EL PARVOVIRUS CANINO TIPO 2: UN VIRUS CON AMPLIA DIVERSIDAD GENÉTICA Y ANTIGÉNICA EN EL CONTINENTE AMERICANO.

CANINE PARVOVIRUS-2: A VIRUS WITH HIGH ANTIGENIC AND GENETIC DIVERSITY IN AMERICA

Short title: **PARVOVIRUS CANINO TIPO 2 EN AMÉRICA**

Sebastian Giraldo-Ramirez^a, Lísbeth Durán-Chaparro^b, Julián Ruíz-Sáenz^{a*}

^a Grupo de Investigación en Ciencias Animales - GRICA, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Cooperativa de Colombia, sede Medellín

^b Norwegian People's Aid, Cambodia.

***Corresponding author:** Calle 30A # 33-51. Universidad Cooperativa de Colombia, Bucaramanga, Colombia. Phone +57-7-685 45 00 ext 7072, Email: julian.ruizs@campusucc.edu.co (J. Ruiz Saenz)

ORCID ID: 0000-0002-1447-1458

RESUMEN

La alta tasa de sustitución genética de los parvovirus, ha permitido la evolución del virus de la panleucopenia felina (FPV) al parvovirus canino (CPV-2), que afecta un amplio rango de carnívoros domésticos y silvestres. Desde su identificación en la década de 1970, el CPV-2 ha sufrido varias mutaciones que han dado origen a las variantes antigénicas CPV-2a y 2b, que pocos años después reemplazaron a la variante original. En el año 2001 se identificó la variante antigénica CPV-2c, dándose una distribución mundial de las tres variantes en un periodo aproximado de sólo tres décadas. En América hay registro del CPV-2 desde 1978. Actualmente las tres variantes se encuentran presentes en América, incluso en territorios alejados de la masa continental, como Cuba, Isla San Cristóbal, Isla Isabela y la Isla de Newfoundland en Canadá. En el presente trabajo, se ilustran los reportes de CPV-2 en América por país y la distribución de las variantes antigénicas en el continente haciendo especial referencia a los recientes reportes de posibles nuevas variantes y la circulación del CPV-2 aun en poblaciones vacunadas. Además, se incluyen reportes de tipo serológico, que si bien no aportan información a la evolución molecular del CPV-2 en América, ayudan a vislumbrar la distribución del virus en los países e incluso la participación de carnívoros silvestres y domésticos en la diseminación de este importante agente viral.

Palabras claves:

Parvovirus canino, variantes antigénicas, Mutación, continente americano.

ABSTRACT

The high substitution rate of “parvoviruses” has allowed the evolution of feline panleukopenia virus (FPV) to canine parvovirus (CPV-2), which affects a wide range of domestic and wild carnivores. Since its identification in the 1970s, CPV-2 has suffered several mutations that have given rise to the antigenic variants CPV-2a and 2b, which a few years later replaced the original CPV-2. In 2001, the antigenic variant CPV-2c was identified, giving a global distribution of the three variants in an approximate period of only three decades. In the American continent, CPV-2 has been recorded since 1978. Nowadays, the three antigenic variants are present in America, even in territories far from the continental land, such as Cuba, San Cristobal Island, Isabela Island and Newfoundland in Canada. In the present work, we consolidate the reports of CPV-2 in the Americas by country and the distribution of antigenic variants in the continent making special reference to the recent reports of possible new variants and the circulation of CPV-2 even in vaccinated populations. In addition, serological reports are included, which, although do not provide information on the molecular evolution of CPV-2 in the Americas, help to visualize the distribution of the virus in the countries and even the participation of wild and domestic carnivores in the dissemination of this important viral agent.

Key words: Canine Parvovirus, antigenic variants, Mutation, America continent.

INTRODUCCIÓN

La parvovirus canina, es una enfermedad de gran importancia clínica en el ejercicio de la medicina veterinaria. El parvovirus canino (CPV-2), es el principal agente causal de gastroenteritis hemorrágica en perros jóvenes. La enfermedad suele ser de curso rápido, con una alta morbilidad y mortalidad (Decaro and Buonavoglia 2012).

El CPV-2 pertenece al género *Protoparvovirus*, de la familia *parvoviridae*, con DNA de cadena sencilla, con una tasa de sustitución genómica de 10^{-4} por sitio, similar a un virus RNA (Zhou et al. 2017). Esta alta capacidad de mutación, ha posibilitado el acceso a un número amplio de hospedadores entre carnívoros domésticos y silvestres, además que ha dado origen a tres variantes antigénicas, CPV-2a, 2b y 2c. Estas características han favorecido la diseminación del CPV-2 en todo el mundo. La realización de estudios de caracterización molecular es necesaria para entender la evolución molecular y la dinámica epidemiológica del virus a nivel mundial y quizás para poder algún día predecir los cambios genéticos que darán lugar a la aparición de nuevas variantes tanto genéticas como antigénicas.

Origen

Durante la década de 1970 se reportó la emergencia del CPV-2 en poblaciones caninas, generando cuadros clínicos caracterizados por gastroenteritis y miocarditis en cachorros (Buonavoglia et al. 2001). Se denominó como CPV-2, ya que fue el segundo parvovirus descrito en perros y así diferenciarlo del CPV-1, previamente identificado a inicios de la década y que no se encuentra relacionado antigénicamente con el CPV-2 (Binn et al. 1970). Debido a que no había inmunidad preexistente en la población canina, el CPV-2 pudo diseminarse rápidamente (Pollock and Coyne 1993) y convertirse en una enfermedad pandémica que se distribuyó por Asia, Europa, Australia, Nueva Zelanda y América para 1978 (Parrish 1999).

El CPV-2 está altamente relacionado con el virus de la panleucopenia felina (FPV), con el cual comparte el 98% de su secuencia de DNA. A pesar de su similitud, las pequeñas variaciones en la secuencia nucleotídica, generan cambios aminoacídicos que le confieren distintos rangos de hospedadores y propiedades antigénicas y de hemaglutinación únicas, las cuales son determinadas por los genes de la proteína de cápside (Chang, Sgro, and Parrish 1992; Truyen et al. 1995). Se ha reconocido que el CPV-2 ha evolucionado a partir del FPV adquiriendo un cambio en la extensión de su rango de hospederos y que pudo adquirir la capacidad de infectar perros a través de su paso por carnívoros no domésticos como mapaches, zorros o visones americanos (Parrish et al. 1988; Truyen et al. 1995).

Se han reportado seis mutaciones puntuales entre FPV y CPV-2 en los residuos Lys80Arg, Lys93Asn, Val103Ala, Asp323Asn, Asn564Ser y Ala568Gly de la proteína de cápside VP2, que le han conferido la habilidad al CPV-2 de infectar caninos, perdiendo a la vez la capacidad de hacerlo en felinos. Puntualmente se ha descrito que los cambios en los residuos 93, 103 y 323 han posibilitado la infección de perros y los cambios en los residuos 80, 564 y 568 se asocian a la

pérdida de habilidad de replicarse en gatos (Chang, Sgro, and Parrish 1992; Truyen et al. 1995; Truyen, Agbandje, and Parrish 1994; Truyen et al. 1996; Truyen and Parrish 1992).

Estos cambios en la proteína VP2 favorecen la unión del CPV-2 al receptor de transferrina canino tipo I (TfR), el cual juega un papel importante en la susceptibilidad de las células para ser infectadas por el virus, ya que este receptor se expresa en una gran cantidad de células con alta actividad mitótica (Hueffer et al. 2003). El ingreso de la cápside se da por endocitosis mediada por clatrin, las cuales se encuentran asociadas a la transferrina. Cuando la cápside se une al TfR, se activa la vía endocítica y la partícula viral ingresa a citosol. La VP1, otra proteína estructural del CPV, está involucrada en la liberación de las partículas virales al citosol y la función de transporte al núcleo de las partículas virales (Suikkanen et al. 2003). Posteriormente, el DNA viral es liberado en el núcleo para la replicación y los procesos de transcripción y traducción (Figura 1) (Hueffer et al. 2003; Parker and Parrish 2000). El CPV afecta a las células hospedadoras que se encuentran en fase S del ciclo celular, para ingresar a núcleo y utilizar los componentes nucleares como la las DNA polimerasas y otros componentes celulares (Parrish and Kawaoka 2005).

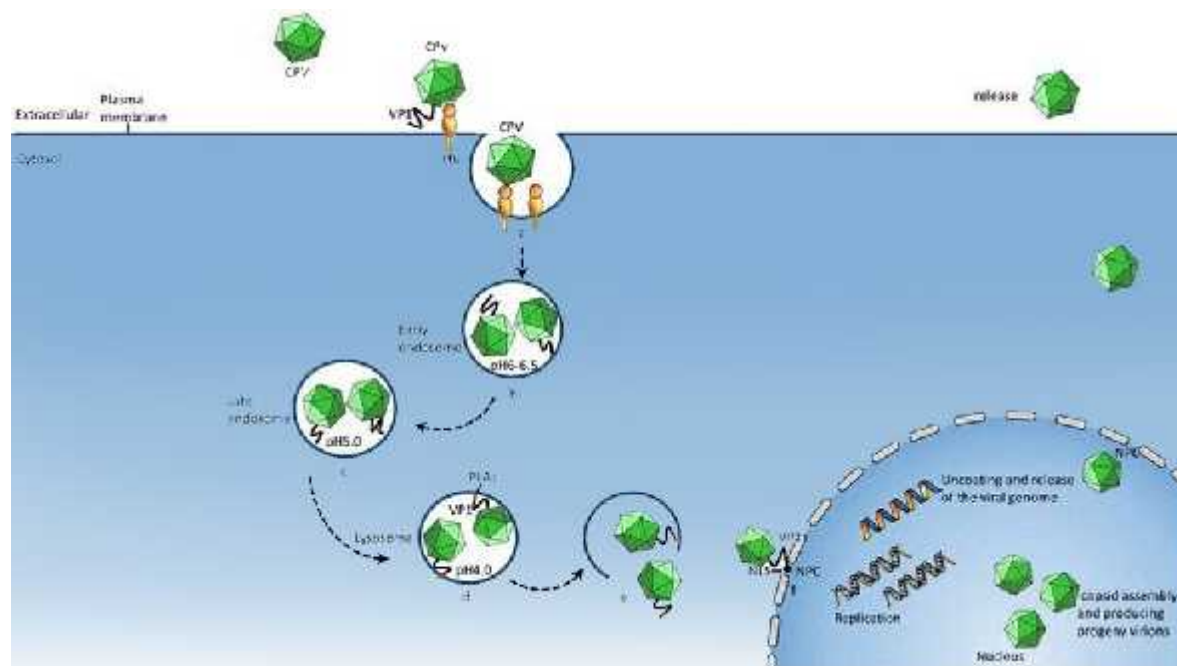


Figura 1. Ciclo replicativo del parvovirus canino. a. Interacción de la partícula viral con receptor TfR de membrana plasmática celular e ingreso a citosol por endocitosis. b. Formación del endosoma temprano. c, d. Acidificación del pH del endosoma y formación del endosoma tardío y lisosoma. Activación de la fosfolipasa A2 (PLA2), presente en el extremo amino terminal expuesto de la VP1 en pH bajo e interacción con los fosfolípidos de la membrana lisosomal. e. Salida de la partícula viral a citosol, por cambio de la permeabilidad de la membrana lisosomal. f. La señal de localización nuclear (NLS), presente en VP1, dirige la partícula viral al núcleo, para la liberación del DNA. Posteriormente se dan los procesos de replicación del genoma viral y ensamblaje de la cápside y producción de la progenie viral. Adaptado de (Mengyu et. al., 2015).

Entre los años 1979 y 1982, en países como Estados Unidos, Japón, Bélgica, Australia, Francia y Dinamarca, el CPV-2 fue reemplazado por una variante del virus, que difería genética y antigénicamente a este. Esta variante se denominó CPV-2a (Parrish et al. 1988; Parrish et al. 1991; Parrish et al. 1985) y demostró tener una ventaja epidemiológica sobre el CPV-2, dada su mayor tasa replicativa (Parrish et al. 1988). La variante antigénica CPV-2a sólo difiere de la CPV-2 en 5 o 6 aminoácidos. Los cambios están en los residuos Met87Leu, Ile101Thr, Ser297Ala, Ala300Gly,

Asp305Tyr y Val555Ile. Las variaciones en los residuos 87, 300 y 305 le confieren la capacidad de infectar gatos (Truyen et al. 1996; Parrish et al. 1991; Agbandje et al. 1993; Tsao et al. 1991).

En 1984 se detectó otra variante antigénica denominada CPV-2b que difería del tipo 2a en sólo dos residuos Asn426Asp e Ile555Val. La variación en el residuo 426 representa un cambio en la región más antigénica, el epítotope A, mientras que el cambio de 555 consiste en una regresión a la secuencia original de CPV-2 (Parrish et al. 1991).

En el año 2000 en Italia, se identificó una tercera variante antigénica denominada CPV-2c (Buonavoglia et al. 2001). Esta variante presenta una variación en el residuo 426, con respecto a la variante 2b, donde CPV-2c tiene ácido glutámico en ésta posición (Decaro and Buonavoglia 2012; Truyen 2006). Sin embargo, estudios retrospectivos han demostrado que los primeros reportes de circulación de esta variante se realizaron 4 años antes en Alemania (1996), lo que demuestra que el virus estaba circulando mucho antes de su detección en Italia (Decaro et al. 2007). La frecuencia de presentación y distribución geográfica de las variantes antigénicas sufrió una rápida variación durante los años 1995 – 2005, tiempo para el cual, la variante 2c comenzó a remplazar a la variante 2b de forma rápida (Decaro et al. 2006), siendo reportada en una gran cantidad de países y hallándose mayormente distribuida en Suramérica y Europa (Calderon et al. 2011; Decaro et al. 2011).

Las tres variantes antigénicas del CPV-2 (2a, 2b y 2c), tienen la habilidad de infectar tanto a perros como a gatos (Figura 2), debido a la capacidad que tiene su cápside de unirse tanto a TfR Canino como felino y así ingresar a la célula a cumplir su proceso de replicación viral (Palermo, Hafenstein, and Parrish 2006).

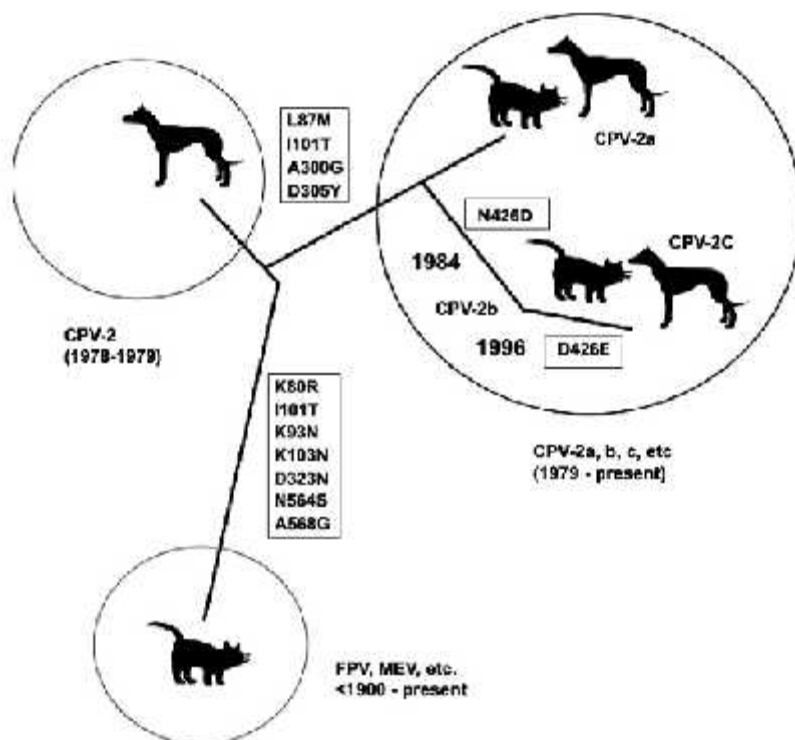


Figura 2. Relación genética y rango de hospederos del CPV, FPV y otros parvovirus relacionados. El diagrama indica la gama de huéspedes, año de aparición y relaciones genéticas. Los recuadros muestran las mutaciones puntuales que definen las cepas conocidas. Adaptado de (Hoelzer and Parrish 2010).

Estructura genética

El CPV-2 pertenece al género *Protoparvovirus* de la familia *Parvoviridae*. Es un virus de cápside icosaédrica no envuelta de pequeño tamaño (~25nm). Pertenece a la clase II de la clasificación de Baltimore, con DNA de cadena sencilla y ~ 5200 nucleótidos que contienen dos grandes marcos abiertos de lectura (ORFs), uno codifica proteínas no estructurales (Reguladoras) NS1 Y NS2 (ORF 3'), y el otro dos proteínas estructurales VP1 Y VP2 (ORF 5') (Figura 3) (Parrish 1999; Reed, Jones, and Miller 1988).

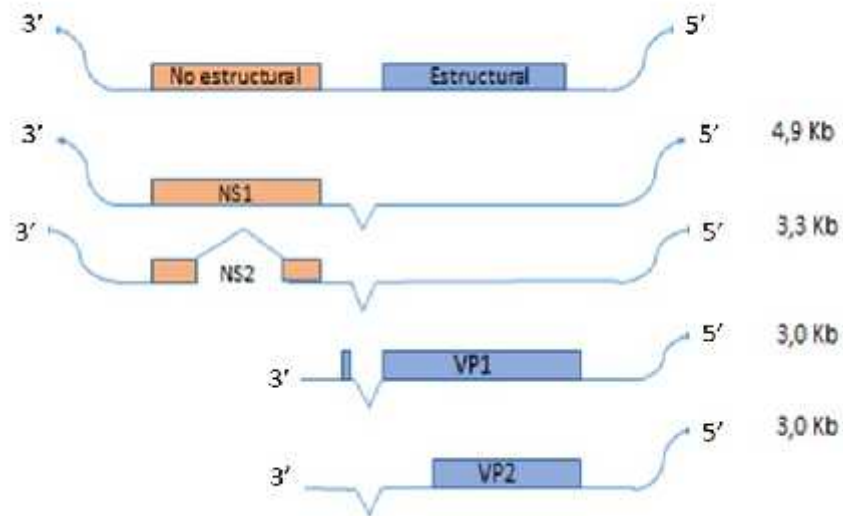


Figura 3. Estructura genómica del CPV-2. La gráfica muestra los marcos abiertos de lectura, uno codifica para proteínas no estructurales y otro para proteínas estructurales. La secuencia no estructural codifica para mRNA de NS1, igualmente puede ser usada para dar origen a un segundo mRNA que da origen a NS2, por splicing alternativo. La secuencia que codifica para proteínas estructurales, usa una estrategia similar para dar origen a mRNA de VP1 y VP2. A la derecha del diagrama se muestra el tamaño en kilo basas de los mRNA. Adaptado de (Reed, Jones, and Miller 1988).

La proteína NS1 es una proteína implicada en el control de la replicación del DNA viral, ayuda en el empaquetamiento del DNA en la cápside, tiene función de helicasa y tiene dominios de unión a diferentes proteínas celulares. La proteína NS2 tiene un papel importante en el eficiente ensamblaje de la cápside dentro de la célula y complementa el ensamblaje en un huésped específico (Parrish and Kawaoka 2005).

Estructura de la cápside

La cápside del CPV tiene un diámetro de ~ 25 nm, contiene 60 subunidades proteicas de VP1 (5-6 copias) y VP2 (54 – 55 copias). La proteína VP2 se ensambla para la formación de las cápsides virales y son las encargadas de las uniones virus – receptor TfR y tiene función en el empaquetamiento del DNA. La proteína VP1 tiene acción de fosfolipasa A2 (PLA2), la cual también juega un papel importante en la liberación de la partícula viral de la vesícula lisosomal al citosol. Esta liberación se da por la activación de la PLA2 en pH bajo (5) y la interacción con los fosfolípidos de membrana lisosomal. En su extremo amino terminal la VP1 tiene una señal de localización nuclear (NLS), que dirige la partícula viral al núcleo celular (Parrish 1999; Parker and Parrish 2000; Suikkanen et al. 2003).

Adicionalmente, sólo en partículas infecciosas, la VP2 puede ser clivada en 15 a 20 aminoácidos del extremo amino terminal, por proteasas del hospedador para formar otra proteína estructural, VP3 (Agbandje et al. 1993; Tsao et al. 1991).

Patogenia de la infección por el CPV-2

La patogénesis de la infección por CPV-2 está determinada por la replicación del DNA viral en células con alta actividad mitótica. La transmisión del virus se da de forma fecal – oral, así que para adquirir la infección por parvovirus es necesario ingerir el virus y dadas las enormes cantidades de partículas virales eliminadas por heces y la resistencia del virus en el ambiente, se puede explicar la facilidad de diseminación del virus de un individuo a otro y por qué se convirtió en una enfermedad de distribución mundial (Pollock and Coyne 1993).

Luego de ser ingerido el virus comienza su replicación en la oro faringe los primeros días de la infección, luego se disemina a través del torrente sanguíneo aproximadamente al quinto día, instaurado un proceso virémico (Pollock and Coyne 1993). El tejido blanco de replicación del virus son las criptas intestinales y el tejido linfoide, aunque éste virus puede esparcirse a todos los tejidos (Pollock 1982). El virus alcanza la mucosa intestinal más por vía sanguínea que a través del lumen intestinal. Comienza a replicarse en el tejido linfoide gastroentérico donde leucocitos infectados diseminan el virus al epitelio germinal de las criptas intestinales del intestino delgado. El CPV-2 comienza su ciclo replicativo, proceso que conlleva a la destrucción de los enterocitos, lo que ocasiona diarrea, signo característico de la infección por CPV-2. La diarrea hemorrágica y ocasionalmente mucoide, es el resultado de la pérdida de las células de epiteliales, ocasionando un aplanamiento del epitelio y disminución de las vellosidades intestinales, y como consecuencia una pérdida de la regulación osmótica (Decaro and Buonavoglia 2012; Macartney et al. 1984).

La infección de leucocitos circulantes y tejido linfoide asociado, deriva en afección de la médula ósea, lo que en conjunto genera necrosis de las células el tejido linfoide y destrucción de células mieloproliferativas, que se manifiesta como una linfopenia en el cuadro hematológico (Pollock 1982; Pollock and Coyne 1993).

El periodo de incubación del CPV-2 varía de 3 a 8 días. Sin embargo, se ha demostrado la eliminación de partículas virales vía fecal al día tres post infección, aún antes de la aparición de signos clínicos. Los signos clínicos asociados a enteritis aparecen no antes de 4 o 5 días post infección (Pollock and Coyne 1993). Debido a la lesión de la mucosa intestinal, bacterias oportunistas como *Escherichia coli*, *Streptococcus spp*, *Bacteroides fragilis*, entre otras, pueden instaurar procesos infecciosos lo cual, sumado a la afección del tejido linfoide y médula ósea, son consecuentes con la evidencia de leucograma que presenta neutrofilia y linfopenia. Cuando las

bacterias alcanzan el torrente sanguíneo, pueden migrar y diseminarse por el organismo, y originar un proceso séptico (Decaro and Buonavoglia 2012; Pollock and Coyne 1993).

La población más susceptible al CPV-2 son los cachorros entre 4 y 12 semanas de edad que no tienen títulos de anticuerpos maternos que les confieran una protección por inmunidad pasiva, en donde la tasa de mortalidad está por encima del 70% (Decaro and Buonavoglia 2012).

El CPV-2 es capaz de replicarse en células cardíacas e induce casos de miocarditis letales principalmente en cachorros neonatos, entre 3 y 8 semanas, donde la tasa de mortalidad en las camadas está entre el 20 y el 100%. El cuadro se instaura de forma rápida y se caracteriza por arritmias cardíacas, disnea y edema pulmonar. Los sobrevivientes usualmente desarrollan falla cardíaca crónica en un periodo de pocos meses luego del nacimiento (Decaro and Buonavoglia 2012; Robinson et al. 1979).

En el caso de cachorros con títulos altos de anticuerpos maternos y en perros adultos, pueden detectarse infecciones por CPV-2, de curso subclínico o sin afecciones aparentes, donde las tasas de mortalidad disminuyen y en el caso de perros adultos puede ser del 1% (Desario et al. 2005).

Las variaciones en la secuencia de aminoácidos en la proteína de cápside VP2 ha incrementado la patogenicidad de las variantes antigénicas de CPV-2 (Carmichael 2005). Se ha descrito que tanto la variante 2a como 2b se eliminan más abundantemente en heces y se encuentran títulos más altos, presentando enfermedad más severa que en el caso del tipo original del CPV-2. También requiere una menor dosis viral para instaurar un proceso infeccioso (Decaro et al. 2005).

A pesar que las tres variantes antigénicas tienen un potencial patógeno similar y la severidad de la enfermedad depende de factores como la edad, presencia de anticuerpos maternos, estado inmunológico, factores de estrés, etc., (Decaro and Buonavoglia 2012). Un estudio realizado en

2015 en Ecuador, evaluó el cuadro clínico presentado por animales infectados experimentalmente con las variantes CPV-2a y CPV-2c. El cuadro clínico se caracterizó por la presencia de leucopenia, linfopenia, deshidratación, depresión, aumento de proteínas de fase aguda, glucosa, disminución de proteínas séricas, nitrógeno ureico en sangre y los signos clínicos más comunes como diarrea, vómito y fiebre. Los resultados obtenidos, demostraron que de forma general los síntomas se presentaron con mayor severidad en los animales infectados con la variante viral CPV-2c (Aldaz Cárdenas and García-Díaz 2015). Sin embargo, en un trabajo previamente publicado en Canadá, analizando pacientes infectados naturalmente por el CPV-2 pertenecientes a diferentes regiones del país, no se encontró asociación entre la cepa de CPV y la gravedad de la enfermedad o el resultado clínico (Markovich et al. 2012)

En el caso de animales adultos, se cree que el riesgo de infección es mucho menor, debido a la edad y a la disminución de la susceptibilidad dada por la presencia de inmunidad adquirida a través de la vacunación o por infecciones previas generalmente de tipo subclínico; por lo cual la infección por el CPV-2 se ha asociado como una enfermedad de animales jóvenes (Decaro and Buonavoglia 2012).

Desde el año 2001 se han reportado casos específicos de infección por parvovirus en perros adultos con gastroenteritis severas, especialmente asociados a la variante CPV-2c. Más aún, estos reportes se han presentado en perros adultos con esquema vacunal completo, lo que puede indicar una protección cruzada no del todo efectiva para las tres variantes antigénicas, por parte de las vacunas actuales (Decaro et al. 2008; Cavalli et al. 2001). De hecho, una revisión sistemática recientemente publicada, permitió concluir que no existe suficiente evidencia científica que demuestre que las actuales vacunas comerciales existentes para el CPV-2a y 2b protejan contra un posible reto de campo con una cepa de CPV-2c (Hernandez-Blanco and Catala-Lopez 2015).

Diagnóstico

El diagnóstico de CPV-2 puede realizarse con base en los signos clínicos comúnmente asociados al desarrollo de la enfermedad. Signos como inapetencia, decaimiento, anorexia, náuseas, vómito, fiebre, diarrea, deshidratación, pueden conducir al diagnóstico de la enfermedad. Sin embargo, no es posible identificar el agente etiológico en base a estos signos clínicos, ya que otros virus como coronavirus, adenovirus, morbillivirus, rotavirus, reovirus, entre otros, pueden generar cuadros clínicos muy similares (Decaro et al. 2011). Por esta razón es importante realizar el diagnóstico preciso a través de pruebas de laboratorio (Desario et al. 2005).

Existen diferentes métodos para realizar el diagnóstico de CPV-2 en el laboratorio; los métodos tradicionales y los métodos moleculares (Pollock 1982; Pollock and Coyne 1993). Entre los métodos tradicionales se encuentra la inmunocromatografía (IC), que sirve para detectar antígenos virales al unirse con anticuerpos específicos. También se utiliza para el diagnóstico, las características físico-químicas de las partículas virales en su interacción con los eritrocitos; es el caso de las pruebas de hemoaglutinación (HA). La IC y la HA, han demostrado tener una especificidad del 100% pero sensibilidad baja (56.16% IC, 68.49% HA). El diagnóstico también puede hacerse por aislamiento viral el cual tiene una sensibilidad mayor (73.97%), pero requiere personal con experiencia para el cultivo celular y es un proceso mucho más dispendioso en cuanto a tiempo y costos (Decaro and Buonavoglia 2012; Desario et al. 2005). Todas estas técnicas de laboratorio se desarrollan a partir de muestras de materia fecal de perros presuntivos a CPV-2.

Debido a la replicación del virus en intestino y a la destrucción de las células del epitelio, se liberan gran cantidad de partículas virales a la luz intestinal y por consecuencia son eliminadas en las heces, por lo cual la utilización de materia fecal para desarrollar las pruebas diagnósticas de tipo directo es mucho más útil que el uso de pruebas serológicas (Desario et al. 2005).

La mayor desventaja de la HA y el aislamiento viral, es su baja sensibilidad, la cual se debe mayormente a la presencia de anticuerpos en la luz intestinal de los perros infectados que se unen a los viriones, lo que inhabilita la posterior HA y la capacidad de unión del virus a los receptores celulares para desarrollar el aislamiento viral en cultivos celulares (Decaro et al. 2005). Así mismo, la posible presencia de otros agentes virales como el distemper canino (CDV) (Rendon-Marin et al. 2019), que también poseen actividad hemaglutinante, resta sensibilidad a esta prueba.

También puede haber casos de presentación de falsos positivos, debido a que las vacunas vivas modificadas pueden generar liberación de partículas virales en heces entre 4 y 10 días luego de la vacunación. Estas partículas virales administradas en la vacunación, también tienen un proceso de diseminación vía sanguínea, por el cual alcanzan epitelio intestinal y se eliminan en las heces (Pollock 1982).

Las muestras en suero también son útiles para determinar títulos de anticuerpos que se relacionan fuertemente con protección e inmunidad adquirida, así como con inmunidad pasiva derivada de traspaso de anticuerpos maternos en cachorros (Decaro et al. 2005; Pollock and Coyne 1993). Sin embargo, estas pruebas serológicas carecen de impacto en el manejo de un paciente clínicamente compatible con CPV-2.

Los métodos moleculares a diferencia de los métodos tradicionales, tienen una sensibilidad mucho más alta, aunque necesitan de mayor experiencia y pericia del operario realiza la prueba. Otra ventaja que tienen los métodos moleculares sobre los tradicionales, es que no se ven afectados por la respuesta inmune del huésped, sino que está determinada por la presencia o no del agente evaluado (Decaro and Buonavoglia 2012). Métodos como la reacción en cadena de polimerasa (PCR) convencional y la PCR tiempo real son utilizados como métodos de detección de DNA viral con un altísimo grado de sensibilidad, superior al 99% y amplifican los fragmentos de DNA que

se pretenden identificar, pudiendo detectar perros que están eliminando el virus en sus heces, pero que tienen títulos muy bajos que no pueden ser detectados por los métodos tradicionales (Decaro and Buonavoglia 2012; Desario et al. 2005).

Adicionalmente, la posterior realización de la técnica de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) (Buonavoglia et al. 2001) o la secuenciación de estos fragmentos (De la Torre et al. 2018) permite la identificación molecular de variantes del CPV-2, lo cual permite entender la epidemiología molecular, evolución y mutación del virus, como se verá en la presente revisión.

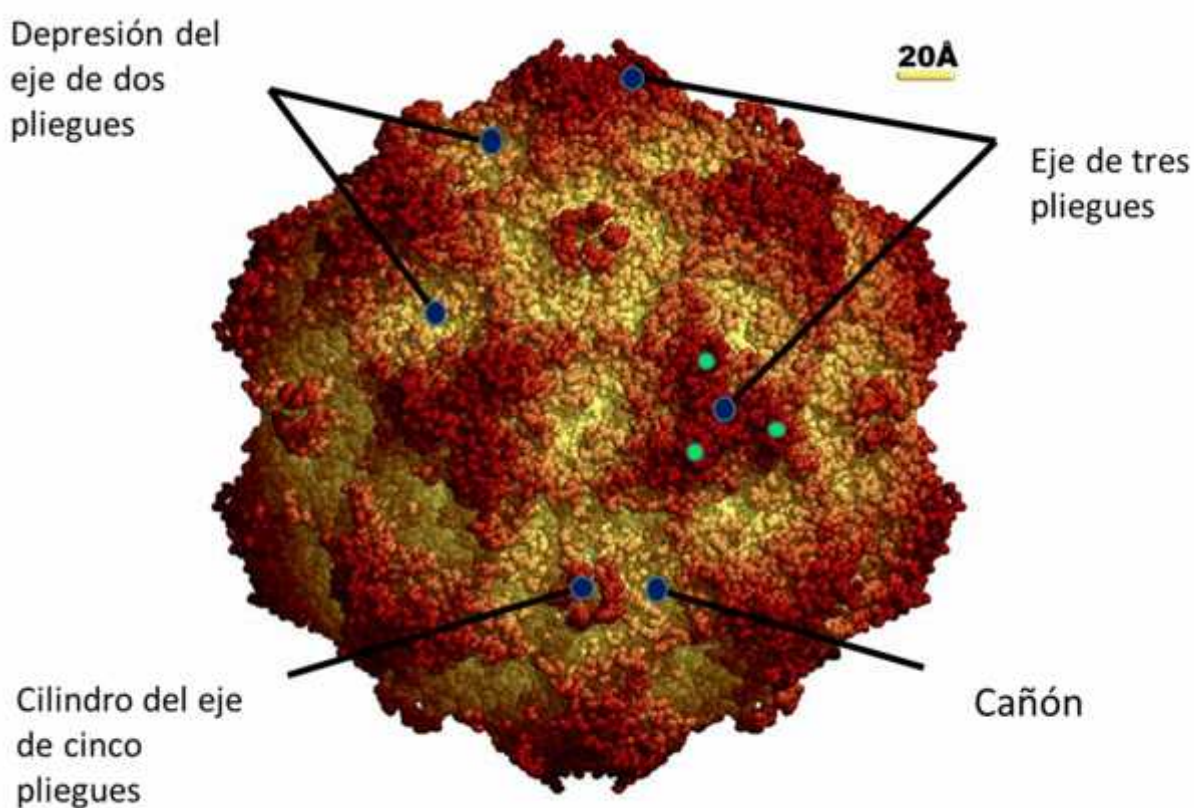
Antigenicidad del CPV-2

El CPV-2 depende necesariamente de la capacidad de infectar las células susceptibles para poder completar el ciclo de replicación viral. La partícula viral interactúa con el receptor TfR de membrana celular externa, formando el complejo virus – receptor para ingresar al espacio citoplasmático. Dicha interacción se da entre el receptor y la proteína de cápside VP2.

Las proteínas de cápside VP2 tienen un núcleo central muy conservado compuesto por un barril de ocho láminas antiparalelas, con asas flexibles entre las láminas, que interactúan para formar la mayor parte de la superficie de la cápside (Agbandje et al. 1993). La superficie de la cápside viral constituye una proyección, formada por una unidad icosaédrica asimétrica (Miranda and Thompson 2016).

La unidad está conformada por una zona denominada eje de cinco pliegues, otra llamada eje de dos pliegues, y dos ejes de tres pliegues. Estos sitios tienen una formación triangular. Entre los ejes de tres pliegues se encuentra una estructura llamada depresión del eje de dos pliegues.

Una estructura cilíndrica está formada por cinco láminas, formando una hoja alrededor del eje de cinco pliegues. Un área denominada cañón, se encuentra alrededor del eje de cinco pliegues contigua a la estructura cilíndrica, y tiene una dimensión de ~ 11 Å de amplitud. El piso del cañón está ~ 9 Å debajo de la parte superior de la estructura cilíndrica y 15 Å debajo de una cresta que divide el cañón de la depresión del eje de dos pliegues (Figura 4) (Tsao et al. 1991).



Coordinates from: PDB: www.rcsb.org/pdb/ VIPER: mmtsب.scripps.edu/viper/

Figura 4. Estructura tridimensional del Parvovirus canino. Modelo 3D obtenido con el software de gráficos moleculares Qutemol® y VMD®. La imagen fue creada a partir de las coordenadas del Protein Data Bank (PDB id: 4DPV). La cápside contiene 60 copias de la proteína VP2 unidas en una simetría icosaédrica. Datos originales de la cristalografía de rayos X (Xie and Chapman 1996). La imagen muestra la estructura completa de la cápside del parvovirus canino y sus características morfológicas externas. Los círculos en verde, representan los picos en la

estructura del eje de tres pliegues y cada uno pertenece a una subunidad diferente. Imagen cortesía de Jean-Yves Sgro, Ph.D. Institute for Molecular Virology, University of Wisconsin-Madison, USA.

El cañón y la depresión forman un sitio de anclaje para el receptor de membrana celular para la conformación del complejo virus – receptor (Agbandje et al. 1993). El receptor TfR tiene tres diferentes residuos (205, 221 y 383) en una de las caras del dominio apical del receptor que afecta la unión de la cápside. Cuando se da un cambio en estos residuos, puede inhibirse la unión de la cápside viral a la superficie celular. En el caso del FPV y el CPV-2 un cambio del residuo Leu221Ser inhibe la formación del complejo virus – receptor. Cuando se elimina Asn del residuo 205, se altera específicamente la unión del receptor con la partícula viral del CPV-2. De igual forma cuando se cambia Asn a Lys en el residuo 383 se inhibe la unión de la cápside del CPV-2 al receptor de la célula (Palermo, Hueffer, and Parrish 2003).

Cambios en la unidad asimétrica de la VP2, también representan cambios en la capacidad de unión a receptor TfR y por ende al rango de hospedadores que puede infectar la partícula viral. Para el caso del CPV-2, cambios en los residuos 93 y 323 lo diferencian del FPV, controlando el rango de hospedador canino y la unión al receptor TfR canino. Para el caso de las variantes antigénicas CPV-2a, 2b y 2c cambios en los residuos 87, 101, 297, 300 y 305, aparentemente les confiere la capacidad de replicarse en gatos pudiendo unirse al receptor TfR felino (Miranda and Thompson 2016).

El eje de tres pliegues constituye el sitio de mayor antigenicidad de la VP2, el epítotope A. Los tres residuos 426 de tres diferentes monómeros de la VP2 se encuentran en la parte más expuesta del eje de tres pliegues y están separados por $\sim 22 \text{ \AA}$ (Miranda and Thompson 2016). Este punto se

encuentra presente el bucle 4 de la estructura de la VP2. Cambios en este residuo han determinado cambios en la antigenicidad del virus que derivaron en la aparición de variantes antigénicas diferentes (Miranda and Thompson 2016; Binn et al. 1970).

El residuo 555 se encuentra cerca del eje de dos pliegues y también constituye una región de cambio entre las diferentes variantes antigénicas. El residuo 555 en el CPV-2 es Valina, en el CPV-2a es Isoleucina, en 2b es Valina y 2c Ácido glutámico (Miranda and Thompson 2016). Los cambios en los residuos 426 del eje de tres pliegues y 555, representan las variaciones más importantes en la conformación aminoacídica de la estructura de la unidad asimétrica. Los residuos de aminoácidos ubicados en los bucles, son los que mayor interacción tienen, pues son las zonas más expuestas de la VP2; es por esto que muchas de mutaciones encontradas en diversos estudios muestran cambios en residuos de estas zonas (Figura 5) (Zhou et al. 2017).

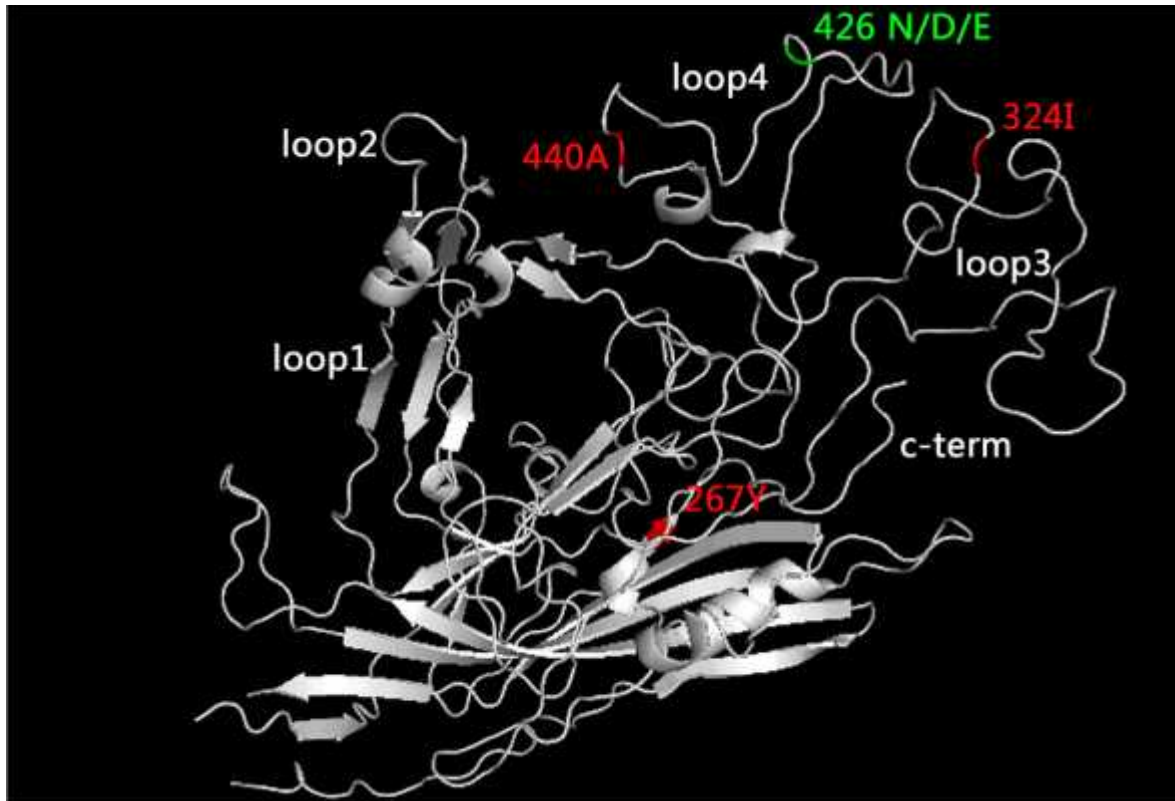


Figura 5. Modelo de la estructura de la proteína de cápside VP2 y la ubicación de algunas mutaciones. Se evidencia la ubicación del residuo 426 en el bucle 4. El residuo 440 en el bucle 4 y el 324 en el bucle 3, son sitios ubicados en las zonas más expuestas de la VP2 y que han registrado mutaciones. Adaptado de (Zhou et al. 2017).

Parvovirus en el continente americano. Detección por métodos tradicionales y moleculares

El CPV-2 se encuentra ampliamente distribuido por todo el continente americano y constituye una enfermedad de gran importancia para la población canina mundial. Los primeros reportes de CPV-2 en el continente, se dieron en Estados Unidos en 1978. La detección del virus se llevó a cabo mediante tinción por anticuerpos fluorescentes reactivos preparados contra el parvovirus canino detectado o FPV y test de hemoaglutinación (Appel, Scott, and Carmichael 1979).

Posteriormente el análisis de rutas migratorias y secuencias de nucleótidos, demuestran que el CPV-2 llegó a Suramérica desde Europa, a los países de Ecuador y Argentina, y desde el continente asiático a Uruguay. Actividades migratorias regionales, fueron de gran importancia para la diseminación del CPV-2 para otros países del continente. Una de las rutas migratorias de las que se presume se distribuyó el CPV-2, es a través de Argentina a Uruguay, Paraguay y Brasil, países con los que comparte frontera (Grecco et al. 2018). Las posteriores interacciones y rutas migratorias, no están del todo esclarecidas, pero pudieron seguir una vía similar, tomando en cuenta los reportes de la presencia de parvovirus en otros países de la región, como Chile, Colombia, Perú y Bolivia.

Brasil: Desde 1980 se ha detectado la presencia de CPV-2 en Brasil. Durante el periodo entre 1980 y 1995, estudios de carácter serológico y molecular demostraron la presencia de las variantes CPV-2, 2a y 2b. Durante la década de 1980 a 1990 la variante más prevalente fue la CPV-2a, la cual fue reemplazada por la variante CPV-2b de 1990 a 1995. El CPV-2, detectado en 1980 y tuvo una reaparición entre 1992 y 1995 (Pereira et al. 2000).

Desde 1995 hasta 2009 las variantes más predominantes fueron CPV-2a y CPV-2b, siendo CPV-2a más prevalente entre 1995 y 2003, con la aparición de una mutación en el residuo Ser297Ala, y CPV-2b entre 2006 y 2009 (Castro et al. 2010). En el año 2008 se detectó en Brasil la variante antigénica CPV-2c, en siete de nueve muestras positivas a CPV-2, siendo este el primer reporte de esta variante en presentarse en Brasil (Castro et al. 2011; Streck et al. 2009). Entre 2008 y 2011 la variante antigénica que más se reportó fue la CPV-2c, estableciéndose como la variante más predominante en la población canina de Brasil (Pinto et al. 2012). Una mutación en el residuo 428 (Asn a His) de la proteína de cápside VP2 se describió en la variante antigénica CPV-2c en una de las muestras recolectadas durante este periodo (Fontana et al. 2013).

En 2016 un estudio realizado con seis pacientes con signos clínicos asociados a parvovirus en Belém, Brasil, demostró la presencia de la variante CPV-2b en la totalidad de los casos positivos a CPV-2 (5 de 6), mostrando que en esta zona de Brasil, esta era la variante que más se presentaba. Este tipo de estudios demuestra que incluso dentro de un mismo país se pueden presentar zonas en las cuales una variante antigénica de CPV-2 es más prevalente que otra, y más en un país de las dimensiones de Brasil (Silva et al. 2017).

Recientemente, un estudio realizado en el Bosque Atlántico en Brasil, con perros que conviven con poblaciones humanas y al mismo tiempo tienen acceso a zonas boscosas, evidenció la presencia del CPV-2 como reservorio en esta población canina. El estudio se realizó durante 2014 y 2016, con 100 muestras de materia fecal de 100 individuos diferentes. Se caracterizaron los efectos citopáticos, parciales o totales, mediante la lisis de cultivos celulares. Además, se determinó mediante secuenciación parcial de la VP2 por PCR, la identidad de las variantes antigénicas presentes en los perros de las zonas en estudio. CPV-2c estuvo presente en el 50% de las muestras, mientras CPV-2a en el 10% y CPV-2b en el 7% (Vieira et al. 2017).

En 2018 una publicación de un estudio realizado en el sur de Brasil, mostró la presencia de la variante antigénica CPV-2c en el 100% de las muestras analizadas (24 muestras), de perros que presentaban enfermedad gastrointestinal. Adicionalmente el estudio analizó aspectos clínicos y patológicos de los casos de parvovirus de los individuos incluidos en el estudio. Se evidenciaron algunas características diferentes a las presentaciones clásicas de la enfermedad; variación en el color de las heces, compromiso extenso del intestino delgado, convulsiones, edema pulmonar y casos de presentación en perros adultos y vacunados (de Oliveira et al. 2018).

Chile: Los primeros casos de parvovirus reportados en Chile, se registraron en un estudio publicado en 1982. El estudio determinó que tres cepas virales aisladas en cultivos celulares, fueron tipificadas como CPV-2 mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IHA) (Abalos et al. 1982).

Entre 2005 y 2006 se realizó un estudio serológico para la detección de CDV (virus del distemper canino) y CPV en perros domésticos y zorros salvajes, por análisis serológico, en la región de Coquimbo en Chile. Los resultados evidenciaron una seroprevalencia para CPV de 77% en perros y 49% en zorros (Kim et al. 2018). Otro estudio llevado a cabo en la región de Araucanía entre 2009 y 2012, evaluó la seroprevalencia de CDV y CPV, entre perros, no vacunados, de población urbana y población rural, para determinar en cual población eran más prevalentes estos virus. Se obtuvo como resultado que para CPV la seroprevalencia fue de 78% y en general es más alta en los perros en áreas urbanas que en áreas rurales (Acosta-Jamett et al. 2015).

Uruguay: En el año 2006 en Uruguay, se realizó un análisis de muestras de materia fecal de perros sospechosos a CPV, vacunados y no vacunados. El análisis molecular de las muestras, arrojó como principal hallazgo la presencia de la variante antigénica CPV-2c. Este hallazgo supone el primer reporte en Suramérica, de la presencia de CPV-2c (Perez et al. 2007).

En 2010 un reporte de muestras analizadas entre 2007 y 2010, demostró un cambio epidemiológico poco usual en Uruguay. Las muestras analizadas entre 2007 y 2009 pertenecían principalmente a la variante CPV-2c, pero para el año 2010 apareció una nueva variante de CPV-2a, con una rápida diseminación que muestra el primer reporte del incremento de CPV-2a, en una población principalmente afectada por la variante CPV-2c. Esta nueva variante CPV-2a, presentaba mutaciones en la secuencia de aminoácidos; Tyr267, Ile324 y Ala440 (Perez et al. 2012).

En 2010 se confirmó la presencia de CPV-2a través de diagnóstico serológico (IC, HA), en cachorros caninos de diferentes razas, provenientes de diferentes zonas de Montevideo, Uruguay. El resultado confirma al CPV-2 como el principal agente infeccioso asociado con gastroenteritis hemorrágica en cachorros (Puentes et al. 2010).

A pesar de la evidencia de la creciente diseminación de la nueva variante CPV-2a en Uruguay, existe evidencia que demuestra la circulación de las variantes CPV-2a y 2c en la población de perros uruguayas. En 2011 se realizó un estudio con cultivos celulares de muestras de materia fecal de caninos, donde se aisló solamente CPV-2c (Pintos et al. 2011; Puentes et al. 2012).

Un estudio realizado en Montevideo analizó 40 muestras positivas a CPV-2a y CPV-2c para secuenciación completa del genoma viral en 2014. Se encontró que dos de estas muestras portaban tanto la variante 2a y 2c, evidenciando que en un mismo individuo puede haber casos de co-infección de diferentes variantes antigénicas de parvovirus. En el estudio se hace referencia a la

divergencia filogenética de las variantes 2a y 2c, las cuales están relacionadas con cepas asiáticas y europeas respectivamente. En el caso de las co-infecciones, la entrada de la segunda variante puede ocurrir en un corto periodo antes de la generación de la respuesta inmune por parte del individuo, como consecuencia a la infección de la primera variante. Estos casos de co-infección pueden verse favorecidos por la alta prevalencia del virus en las poblaciones caninas. Luego, una vez instauradas ambas variantes en el individuo, la recombinación es posible durante el proceso de replicación viral. Estos hallazgos aportan evidencia importante en cuanto a casos de recombinación genética de las variantes del CPV-2, e incluso cepas vacunales, y a la diversidad genética y evolución molecular que presenta el parvovirus en los diferentes países (Perez et al. 2014).

Argentina: En Argentina se encuentran presentes las tres variantes antigénicas del CPV-2 (2a, 2b y 2c) y de forma retrospectiva, se ha podido demostrar que la variante CPV-2c circuló en el cono sur del continente desde el año 2003; siendo la variante más prevalente en el país a partir del año 2008 (Calderon et al. 2009). Muestras recolectadas entre 2008 y 2010, tras análisis molecular, han demostrado la presencia de CPV-2c en el 91% de los casos en un estudio realizado con muestras provenientes de diferentes partes del país (Calderon et al. 2011).

Entre 2011 y 2013 la tendencia se mantuvo y la variante CPV-2c fue la más prevalente. Además, se presentó la reaparición de la variante CPV-2a, durante el análisis molecular de muestras recolectadas en el año 2012. Esta variante no se había reportado desde el año 2008. No se reportaron casos de CPV-2b en el estudio. El análisis del gen que codifica la proteína de cápside VP2, mostró mutaciones en el 65% de las muestras positivas a CPV-2c, en el residuo Thr440Ala (Calderon et al. 2015).

Paraguay: Sólo existe un registro de estudios moleculares que habla de la presencia de la variante CPV-2c en el territorio paraguayo. En 2009 una muestra proveniente de Paraguay se incluyó en un estudio de Argentina, de muestras recolectadas entre 2008 y 2010. Esta muestra presentó la variación Thr440Ala, reportada en otras muestras del estudio propias de Argentina (Calderon et al. 2011).

Ecuador: En Ecuador un estudio epidemiológico retrospectivo de casos de CPV-2 reportados entre 2007 y 2010, revelan que las afecciones gastrointestinales causadas por CPV-2, tienen una mayor incidencia en los meses de verano (Aldaz et al. 2012) Entre 2011 y 2012 un estudio realizado determinó la presencia de las 3 variantes antigénicas (CPV-2a, 2b y 2c) circulando en Ecuador. Donde se evidencia una mayor presencia de la variante 2c (Aldaz et al. 2013).

Sin embargo, en estudios publicados en 2017 y 2018 mediante secuenciación de la proteína de cápside VP2, se determinó la presencia de las variantes antigénicas circulantes en la ciudad de Quito (Erazo Brito 2017; De la Torre et al. 2018). Los resultados demostraron que en un periodo de 5 años se dio un cambio en cuanto a la variante antigénica de mayor presentación en el país. Se encontró que la variante más prevalente es la CPV-2a, desplazando a la variante 2c, como se había descrito previamente, además de múltiples sustituciones de aminoácidos en las variantes ecuatorianas en relación con el CPV-2 original (De la Torre et al. 2018).

Bolivia: Durante los años 2000 y 2003 se realizó un estudio con caninos salvajes en el Parque Nacional Noel Kempff Mercado de Bolivia. Donde se muestrearon cuatro Lobos de crin

(*Chrysocyon brachyurus*), para el análisis de diferentes enfermedades infecciosas y parasitarias. El estudio reveló que los cuatro animales resultaron positivos a CPV, por medio de la prueba de Inhibición de la hemoaglutinación (Deem and Emmons 2005).

Entre 2001 y 2005, se recolectaron muestras de carnívoros silvestres presentes en el Parque Nacional Kaa-iyá del gran Chaco, también con el objetivo de detectar enfermedades infecciosas en estos animales. El diagnóstico de CPV se realizó mediante serología, demostrando estar presente en 4 de 5 zorros cangrejeros (*Cerdocyon thous*) y en 5 de nueve zorros de la pampa (*Pseudalopex gymnocercus*). Estos estudios demuestran la susceptibilidad de estas especies a la infección por CPV y el hecho de que el virus circula en poblaciones de carnívoros silvestres (Fiorello et al. 2004).

En 2004 se publicó un estudio serológico realizado en tres poblaciones contiguas al Parque Nacional Madidi en Bolivia, mostró que el 90% de los perros evaluados fue positivo para CPV. La mayoría de los animales testeados no tenían esquema vacunal y participaban en actividades de la comunidad, algunas relacionadas con la caza de animales silvestres (Fiorello et al. 2007). Un estudio similar publicado en el año 2006 en comunidades de Isoso en Bolivia, las cuales delimitan con el Parque Nacional Kaa-iyá del gran Chaco. Estas comunidades también utilizan al perro doméstico en la cacería, por lo cual entran en contacto directo con otros carnívoros silvestres susceptibles a la infección por CPV. Los resultados de este estudio evidenciaron que más 95% de los perros testeados fueron positivos a CPV (Fiorello, Noss, and Deem 2006).

En la misma línea, en 2008 se publicó un estudio de seroprevalencia en 40 perros en comunidades aledañas al Parque Nacional Noel Kempff Mercado. El CPV fue positivo en más del 85% de los perros evaluados en el estudio (Bronson et al. 2008).

Perú: Un reciente estudio en 2018, representa el primer reporte de caracterización genética de CPV-2 realizado en el país. El estudio demostró la presencia de las variantes antigénicas CPV-2a y CPV-2c, mediante la amplificación de un fragmento del gen VP2. Las variantes encontradas en este estudio revelaron similitudes con las cepas uruguayas y ecuatorianas (Quino Quispe et al. 2018).

Colombia: El primer reporte de parvovirus en el país se publicó en 1984 (Mogollón Galvis et al.), cuando por prueba de inhibición de la hemoaglutinación se confirmó la presencia del CPV en las muestras analizadas de perros sospechosos a parvovirus. En el año 2001 se realizó un estudio molecular en la ciudad de Bogotá con el fin de identificar las variantes antigénicas circulantes en la ciudad. Se identificaron las variantes CPV-2, CPV-2a y CPV-2b (Castillo et al. 2001).

Recientemente en 2016, un estudio se realizó en dos regiones diferentes del territorio Colombia, Antioquia y Santander. Con el objetivo de detectar las variantes antigénicas circulantes en estas zonas, secuencio un fragmento del gen VP2. Se observó que la variante antigénica CPV-2a se encuentra en ambas regiones, mientras que las CPV-2b sólo se detectó en la región de Antioquia. No se detectó la variante antigénica CPV-2c. Un hallazgo importante en el estudio fue la sustitución de aminoácidos en la posiciones Asn428Asp y Ala514Ser en muestras positivas a CPV2a, lo que sugiere la presencia de una nueva variante de CPV-2a en Colombia (Duque-García et al. 2017).

Nicaragua: En el año 2016 se publicó un estudio de seroprevalencia en caninos de tres comunidades que viven en la Reserva de la Biosfera de Bosawás, Nicaragua. El estudio tuvo presente la participación de 77 perros de estas tres comunidades, los cuales debido al hábitat en que viven, están en contacto directo con animales salvajes y sirven como fuentes de infección a la fauna silvestre. La detección del CPV se realizó por la prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes. Los resultados mostraron un una seroprevalencia del 88.3% (68 de 77 perros testeados), para el total de las tres comunidades (Fiorello et al. 2017).

Cuba: En Cuba, un reporte publicado en 2015, muestra la caracterización de un aislamiento de parvovirus canino obtenido de un paciente con signos clínicos de parvovirus canina en el año de 1991, el cual fue atenuado y adaptado a cultivo celular. Mediante amplificación por PCR, se pudo comparar con las secuencias del CPV-2 presentes en las bases de datos, para determinar a qué variante antigénica pertenece. El estudio concluyó que la variante analizada concuerda con el CPV-2 original (Fresneda-Disotuar et al. 2015).

Isla de San Cristóbal: Durante el año 2015 al año 2016, se recolectaron muestras de materia fecal de perros con sintomatología compatible con parvovirus canino y coronavirus, para caracterización molecular. El estudio arrojó como resultados la presencia de CPV-2 en el 24% de las muestras analizadas (25/104), de las cuales, 20 muestras fueron identificadas como CPV-2a, los cinco restantes no pudieron ser plenamente identificadas. Adicionalmente se pudo ver que en las muestras identificadas como CPV-2a, todas presentaron una sustitución en el residuo 297A1a, siendo identificada como una nueva variación en CPV-2a (Navarro et al. 2017).

Isla Isabela, Galápagos: Una publicación en el año 2008, reveló que un estudio realizado durante el 2004 en el cual se testearon 95 perros, evidenció la presencia del CPV en el 100% de las muestras de los animales analizados, por medio de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (Levy et al. 2008).

México: Durante las temporadas secas y lluviosas de 1996 y 1997, se recolectaron muestras de sangre de mamíferos silvestres de mediano tamaño, así como de perros y gatos ferales, en dos reservas naturales dentro de los límites de la ciudad de México. Los resultados arrojaron la presencia de parvovirus en el 86.6% de los individuos testeados. La detección se realizó por la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (Suzan and Ceballos 2005).

En el año 2015, se publicó un estudio en el cual se obtuvieron muestras de 41 perros, recolectadas entre 2013 y 2014. De estos, 24 muestras fueron positivas a CPV-2 por PCR. Cinco de estas muestras fueron tomadas al azar para secuenciación parcial del gen de VP2. Los resultados demostraron que las cinco muestras fueron identificadas como CPV-2c, y se encontraron sustituciones nucleotídicas de algunos codones codificantes para la VP2, no reportados previamente. En el residuo 221, se presentó una modificación de Ile a Met, mientras que en los residuos 266, 270, 363, 407 y 457, las alteraciones en los codones codificantes no modificaron el aminoácido correspondiente, fueron alteraciones silentes (Pedroza-Roldan et al. 2015).

Estados Unidos: Entre 2006 y 2007, se recolectaron muestras de materia fecal de perros con sintomatología compatible con parvovirus, de diferentes estados del territorio de los Estados Unidos. El estudio realizado, obtuvo 54 muestras positivas a CPV. El diagnóstico molecular por

PCR de las variantes presentes en las muestras positivas a CPV, demostraron que 26 de las muestras correspondían a CPV-2c, 25 a CPV-2b y tres muestras a CPV-2. No se detectó la variante antigénica CPV-2a (Kapil et al. 2007). Al tiempo que se realizaba este estudio, se realizaba otro con el fin de detectar la variante CPV-2c en el territorio de los Estados Unidos. También se realizó con muestras de materia fecal provenientes de varios estados de la nación. La identificación de las variantes antigénicas se llevó a cabo por PCR convencional, secuenciando un segmento de la VP2. Se detectaron las tres variantes antigénicas (2a, 2b y 2c) en este estudio, siendo la CPV-2c la más prevalente, y la CPV-2a la de menor presentación (1 caso). Cuatro de las muestras positivas a CPV-2c mostraron tener sustituciones en el residuo 440 (Thr – Ala), lo cual difiere de las variantes CPV-2c Europeas (Hong et al. 2007).

Un estudio publicado en 2012, realizado en el suroeste de país confirmó la a la variante antigénica CPV-2c como la más prevalente en Estados Unidos. El 73.5% de las muestras positivas, resultaron pertenecer a la CPV-2c y el 26.5% a CPV-2b. No hubo muestras positivas a CPV-2a (Markovich et al. 2012).

Canadá: En 2011, una publicación de estudios serológicos realizados en dos periodos entre el año 2001 a 2003 y 2003 a 2005 en el Parque Nacional Riding Mountain, Manitoba, Canadá, reportó la presencia de CPV por prueba de inhibición de hemoaglutinación en Lobos (*Canis lupus*) de la zona. 18 muestras de sangre fueron tomadas para el estudio, el 100% de las muestras dieron positivo a CPV, demostrando que los lobos de la zona han esta expuestos al virus (Stronen et al. 2011). Un estudio realizado entre 2012 y 2015, obtuvo muestras de materia fecal de perros diagnosticados con CPV de diferentes regiones del país. La identificación de las variantes antigénicas presentes, se realizó mediante secuenciación de la VP2 por PCR. El 89.8 % de las

muestras pertenece a la variante antigénica CPV-2b, 8.2% a CPV-2a y el 2% a CPV-2c. El CPV-2b se encontró en muestras provenientes de todas las regiones que participaron en el estudio (7 regiones), estableciéndose como la variante antigénica más prevalente de Canadá (Gagnon, Allard, and Cloutier 2016).

En 2017 se publicó un estudio realizado en la isla de Newfoundland, con carnívoros silvestres de la zona, Zorros rojos (*Vulpes vulpes deletrix*), Linceos (*Lynx canadiensis subsolanus*) y coyotes (*Canis latrans*). Sólo se detectó el CPV en los coyotes y se identificaron las variantes antigénicas CPV-2a y CPV-2b (Canuti et al. 2017).

CONCLUSIONES

La alta capacidad de mutación del parvovirus, ha generado la aparición de sustituciones en residuos de aminoácidos especialmente en VP2, generando variantes antigénicas que difieren de las originales y este suceso se ha presentado múltiples países del continente (Figura 6).

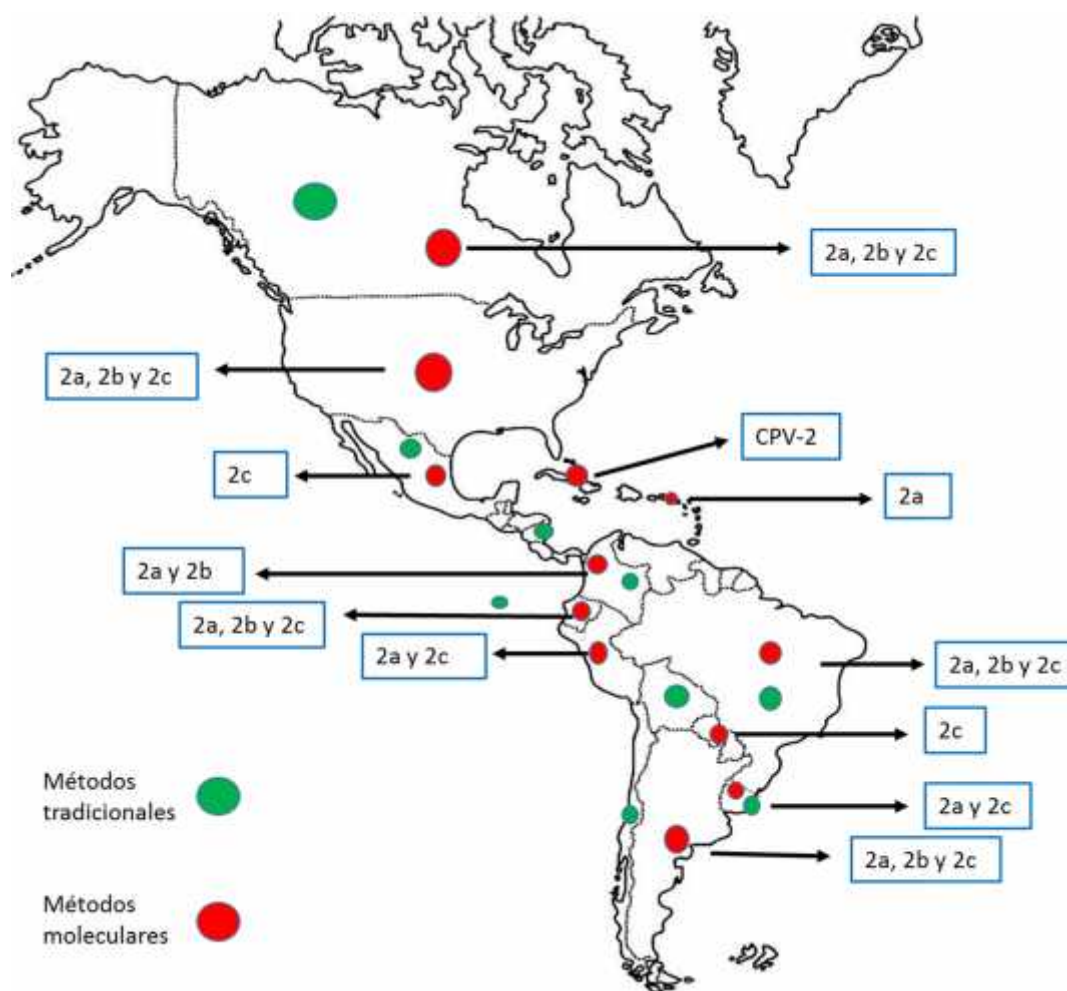


Figura 6. Distribución geográfica de los estudios de parvovirus canino en el continente americano. Los botones verdes muestran los lugares donde se realizó detección de parvovirus canino por métodos tradicionales (hemoaglutinación, inhibición de la hemoaglutinación, serología, cultivos celulares). Los botones rojos señalan los lugares donde se detectó el parvovirus canino por métodos moleculares (PCR). Adicionalmente se especifica las variantes antigénicas presentes en cada país.

Los estudios de caracterización molecular del CPV-2 mediante amplificación y secuenciación del gen VP2 y/o del genoma completo, son de vital importancia para la identificación de las diferentes variantes antigénicas que circulan en cada país. Gracias a estudios de este tipo ha sido posible

determinar la cual es la variante más prevalente de cada país que lo reporta. En general, en América la variante más prevalente es la a la fecha es la 2c. Sin embargo, la variante antigénica 2a, ha demostrado tener un aumento en su prevalencia en los últimos años en países como Ecuador y Uruguay, y ha reaparecido en Argentina. Estos hallazgos muestran la capacidad de variabilidad genética de las variantes antigénicas y abre la puerta a la posibilidad de la presentación de mutaciones producto de recombinación genética entre las diferentes variantes que circulan en una misma población. Adicionalmente, debido a la presión inmunológica producto de la vacunación, pueden darse casos de escape del rango de protección dando origen a mutaciones (Zhou et al. 2017), que favorezcan la reaparición de una variante antigénica como el caso mencionado de CPV-2a.

Además de los estudios moleculares, se han desarrollado estudios de tipo serológico, en los cuales, si bien no se identifican las variantes circulantes, demuestran la presencia del CPV en su territorio. Muchos de estos estudios se realizaron con poblaciones de caninos domésticos, algunos usados para la caza y carnívoros silvestres, que pueden entrar en contacto entre sí y transmitir el virus entre especies. Esta interacción favorece la diseminación del CPV-2 entre poblaciones tanto de animales domésticos como de silvestres, debido a la susceptibilidad de estas especies al parvovirus canino y la capacidad de actuar como reservorios del virus. De esta forma el virus se mantiene en circulación, en diferentes hospederos.

Como se ha descrito, la fauna silvestre pudo jugar un papel importante en la aparición de las diferentes variantes antigénicas y puede seguir siendo un factor que influya en la aparición de posibles variaciones futuras. Además, el contacto con perros domésticos y la transmisión del CPV, puede suponer un peligro para la población de carnívoros silvestres.

Lugares alejados de la masa continental como Cuba, isla San de Cristóbal, isla Isabela y la Isla de Newfoundland, también han reportado la presencia del CPV-2. La migración y colonización de estas tierras y la consecuente compañía canina en las poblaciones humanas, ha posibilitado que el CPV alcance lugares que de forma natural no sería posible.

A pesar de que existe registro de detección de parvovirus en muchos países del continente, muchos otros no tienen estudios relacionados. La gran mayoría de países de Centroamérica y algunos de Suramérica, no tienen reportes ni de tipo molecular ni serológico. Estos vacíos de información, imposibilitan hacer un seguimiento y diagnóstico adecuado de la realidad de la distribución y prevalencia de las variantes de CPV-2. De ahí la necesidad de continuar con estudios que permitan obtener información en cuanto a la epidemiología y evolución molecular del parvovirus.

Agradecimientos

Los autores agradecen la Financiación de la Dirección Nacional de Investigación de la Universidad Cooperativa de Colombia. Grant: V10.

Conflicto de intereses

Los autores de este trabajo no tienen ningún conflicto personal o financiero o que pueda influenciar inapropiadamente el contenido de este documento.

REFERENCIAS

- Abalos, Pedro, Patricio Berríos, Jorge Correa, and Mario Luengo. 1982. 'Aislamiento de parvovirus canino en perros con gastroenteritis', *Arch. Med. Vet*, 14: 47-49.
- Acosta-Jamett, G., D. Surot, M. Cortes, V. Marambio, C. Valenzuela, A. Vallverdu, and M. P. Ward. 2015. 'Epidemiology of canine distemper and canine parvovirus in domestic dogs in urban and rural areas of the Araucania region in Chile', *Vet Microbiol*, 178: 260-4.
- Agbandje, M., R. McKenna, M. G. Rossmann, M. L. Strassheim, and C. R. Parrish. 1993. 'Structure determination of feline panleukopenia virus empty particles', *Proteins*, 16: 155-71.
- Aldaz Cárdenas, Jaime W, and Juan R García-Díaz. 2015. 'Perfil hematológico y bioquímico de perros infectados experimentalmente con diferentes variantes de parvovirus canino tipo 2 (PVC-2) en la provincia Bolívar, Ecuador', *Revista de Salud Animal*, 37: 173-82.
- Aldaz Cárdenas, JW, JR García Díaz, and R Quiñones Ramos. 2012. 'Parvovirus canina en la provincia Bolívar, Ecuador. Utilidad de los modelos Box-Jenkins para su análisis y predicción', *Revista de Salud Animal*, 34: 165-72.
- Aldaz, J., J. Garcia-Diaz, L. Calleros, K. Sosa, G. Iraola, A. Marandino, M. Hernandez, Y. Panzera, and R. Perez. 2013. 'High local genetic diversity of canine parvovirus from Ecuador', *Vet Microbiol*, 166: 214-9.
- Appel, M. J., F. W. Scott, and L. E. Carmichael. 1979. 'Isolation and immunisation studies of a canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis', *Vet Rec*, 105: 156-9.
- Binn, L. N., E. C. Lazar, G. A. Eddy, and M. Kajima. 1970. 'Recovery and characterization of a minute virus of canines', *Infect Immun*, 1: 503-8.

- Bronson, E., L. H. Emmons, S. Murray, E. J. Dubovi, and S. L. Deem. 2008. 'Serosurvey of pathogens in domestic dogs on the border of Noel Kempff Mercado National Park, Bolivia', *J Zoo Wildl Med*, 39: 28-36.
- Buonavoglia, C., V. Martella, A. Pratelli, M. Tempesta, A. Cavalli, D. Buonavoglia, G. Bozzo, G. Elia, N. Decaro, and L. Carmichael. 2001. 'Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy', *J Gen Virol*, 82: 3021-5.
- Calderon, M. G., N. Mattion, D. Bucafusco, F. Fogel, P. Remorini, and J. La Torre. 2009. 'Molecular characterization of canine parvovirus strains in Argentina: Detection of the pathogenic variant CPV2c in vaccinated dogs', *J Virol Methods*, 159: 141-5.
- Calderon, M. G., C. Romanutti, D' Antuono A, L. Keller, N. Mattion, and J. La Torre. 2011. 'Evolution of canine parvovirus in Argentina between years 2003 and 2010: CPV2c has become the predominant variant affecting the domestic dog population', *Virus Res*, 157: 106-10.
- Calderon, M. G., C. Romanutti, M. Wilda, D' Antuono A, L. Keller, M. N. Giacomodonato, N. Mattion, and J. La Torre. 2015. 'Resurgence of canine parvovirus 2a strain in the domestic dog population from Argentina', *J Virol Methods*, 222: 145-9.
- Canuti, Marta, Bruce Rodrigues, Hugh G Whitney, and Andrew S Lang. 2017. 'Introduction of canine parvovirus 2 into wildlife on the Island of Newfoundland, Canada', *Infection, Genetics and Evolution*, 55: 205-08.
- Carmichael, L. E. 2005. 'An annotated historical account of canine parvovirus', *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 52: 303-11.

- Castillo, Ángela, Hugo Díez, Jorge Almanza, Lois Jerabek, and Orlando Torres. 2001. 'Análisis genómico de parvovirus canino por PCR-RFLP a partir de aislamientos de casos clínicos sintomáticos tomados en Bogotá-Colombia', *Universitas Scientiarum*, 6.
- Castro, T., E. Costa, J. Leite, N. Labarthe, and R. 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', *Braz J Microbiol*, 41: 1093-8.
- Castro, T. X., E. M. Costa, J. P. Leite, N. V. Labarthe, and R. C. Cubel Garcia. 2011. 'Monitoring of canine parvovirus (CPV) strains detected in vaccinated puppies in Brazil', *Res Vet Sci*, 90: 336-40.
- Cavalli, A., G. Bozzo, N. Decaro, A. Tinelli, A. Aliberti, and D. Buonavoglia. 2001. 'Characterization of a canine parvovirus strain isolated from an adult dog', *New Microbiol*, 24: 239-42.
- Chang, S. F., J. Y. Sgro, and 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', *J Virol*, 66: 6858-67.
- De la Torre, D., E. Mafla, B. Puga, L. Erazo, C. Astolfi-Ferreira, and A. P. Ferreira. 2018. 'Molecular characterization of canine parvovirus variants (CPV-2a, CPV-2b, and CPV-2c) based on the VP2 gene in affected domestic dogs in Ecuador', *Vet World*, 11: 480-87.
- de Oliveira, Pablo SB, Juliana F Cargnelutti, Eduardo K Masuda, Rafael A Figuera, Glaucia D Kommers, Marcia C da Silva, Rudi Weiblen, and Eduardo F Flores. 2018. 'Epidemiological, clinical and pathological features of canine parvovirus 2c infection in dogs from Southern Brazil', *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38: 113-18.

- Decaro, N., and C. Buonavoglia. 2012. 'Canine parvovirus--a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c', *Vet Microbiol*, 155: 1-12.
- Decaro, N., M. Campolo, C. Desario, G. Elia, V. Martella, E. Lorusso, and C. Buonavoglia. 2005. 'Maternally-derived antibodies in pups and protection from canine parvovirus infection', *Biologicals*, 33: 261-7.
- Decaro, N., C. Desario, D. D. Addie, V. Martella, M. J. Vieira, G. Elia, A. Zicola, C. Davis, G. Thompson, E. Thiry, U. Truyen, and C. Buonavoglia. 2007. 'The study molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe', *Emerg Infect Dis*, 13: 1222-4.
- Decaro, N., C. Desario, M. Billi, V. Mari, G. Elia, A. Cavalli, V. Martella, and C. Buonavoglia. 2011. 'Western European epidemiological survey for parvovirus and coronavirus infections in dogs', *Vet J*, 187: 195-9.
- Decaro, N., C. Desario, G. Elia, V. Martella, V. Mari, A. Lavazza, M. Nardi, and C. Buonavoglia. 2008. 'Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c', *New Microbiol*, 31: 125-30.
- Decaro, N., G. Elia, V. Martella, M. Campolo, C. Desario, M. Camero, F. Cirone, E. Lorusso, M. S. Lucente, D. Narcisi, P. Scalia, and C. Buonavoglia. 2006. 'Characterisation of the canine parvovirus type 2 variants using minor groove binder probe technology', *J Virol Methods*, 133: 92-9.
- Deem, S. L., and L. H. Emmons. 2005. 'Exposure of free-ranging maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) to infectious and parasitic disease agents in the Noel Kempff Mercado National Park, Bolivia', *J Zoo Wildl Med*, 36: 192-7.
- Desario, Costantina, Nicola Decaro, Marco Campolo, Alessandra Cavalli, Francesco Cirone, Gabriella Elia, Vito Martella, Eleonora Lorusso, Michele Camero, and Canio Buonavoglia.

2005. 'Canine parvovirus infection: which diagnostic test for virus?', *Journal of virological methods*, 126: 179-85.
- Duque-Garcia, Y., M. Echeverri-Zuluaga, J. Trejos-Suarez, and J. Ruiz-Saenz. 2017. 'Prevalence and molecular epidemiology of Canine parvovirus 2 in diarrheic dogs in Colombia, South America: A possible new CPV-2a is emerging?', *Vet Microbiol*, 201: 56-61.
- Erazo Brito, Linda Viviana. 2017. 'Determinación de las variables antigénicas del Parvovirus Canino tipo 2 (CPV-2) en caninos domésticos de la ciudad de Quito', Quito: UCE.
- Fiorello, C. V., A. J. Noss, and S. L. Deem. 2006. 'Demography, hunting ecology, and pathogen exposure of domestic dogs in the Isoso of Bolivia', *Conserv Biol*, 20: 762-71.
- Fiorello, C. V., A. J. Noss, S. L. Deem, L. Maffei, and E. J. Dubovi. 2007. 'Serosurvey of small carnivores in the Bolivian Chaco', *J Wildl Dis*, 43: 551-7.
- Fiorello, C. V., M. H. Straub, L. M. Schwartz, J. Liu, A. Campbell, A. K. Kownacki, and J. E. Foley. 2017. 'Multiple-host pathogens in domestic hunting dogs in Nicaragua's Bosawas Biosphere Reserve', *Acta Trop*, 167: 183-90.
- Fiorello, Christine V, Sharon L Deem, Matthew E Gompper, and Edward J Dubovi. 2004. "Seroprevalence of pathogens in domestic carnivores on the border of Madidi National Park, Bolivia." In *Animal Conservation forum*, 45-54. Cambridge University Press.
- Fontana, Danúbia S, Paulo Ricardo D Rocha, Raquel AS Cruz, Letícia L Lopes, Andréia LT Melo, Marcelo M Silveira, Daniel M Aguiar, and Caroline A Pescador. 2013. 'A phylogenetic study of canine parvovirus type 2c in midwestern Brazil', *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33: 214-18.

- Fresneda-Disotuar, Anniet, Digna Contreras-González, Mayelin Paneque-Zayas, Lianet de la Cruz-Verdura, and Carmen Veda Rueda. 2015. 'Caracterización molecular de un aislamiento cubano de parvovirus canino', *Vaccimonitor*, 24: 0-0.
- Gagnon, Carl A, Véronique Allard, and Guillaume Cloutier. 2016. 'Canine parvovirus type 2b is the most prevalent genomic variant strain found in parvovirus antigen positive diarrheic dog feces samples across Canada', *The Canadian Veterinary Journal*, 57: 29.
- Grecco, S., G. Iraola, N. Decaro, A. Alfieri, A. Alfieri, M. Gallo Calderon, A. P. da Silva, D. Name, J. Aldaz, L. Calleros, A. Marandino, G. Tomas, L. Maya, L. Francia, Y. Panzera, and R. Perez. 2018. 'Inter- and intracontinental migrations and local differentiation have shaped the contemporary epidemiological landscape of canine parvovirus in South America', *Virus Evol*, 4: vey011.
- Hernandez-Blanco, B., and F. Catala-Lopez. 2015. 'Are licensed canine parvovirus (CPV2 and CPV2b) vaccines able to elicit protection against CPV2c subtype in puppies?: A systematic review of controlled clinical trials', *Vet Microbiol*, 180: 1-9.
- Hoelzer, K, and C Parrish. 2010. 'The emergence of parvoviruses of carnivores', *Vet Res* 41: 39.
- Hong, C., N. Decaro, C. Desario, P. Tanner, M. C. Pardo, S. Sanchez, C. Buonavoglia, and J. T. Saliki. 2007. 'Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States', *J Vet Diagn Invest*, 19: 535-9.
- Hueffer, K., J. S. Parker, W. S. Weichert, R. E. Geisel, J. Y. Sgro, and 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', *J Virol*, 77: 1718-26.

- Kapil, S., E. Cooper, C. Lamm, B. Murray, G. Rezabek, L. Johnston, 3rd, G. Campbell, and B. Johnson. 2007. 'Canine parvovirus types 2c and 2b circulating in North American dogs in 2006 and 2007', *J Clin Microbiol*, 45: 4044-7.
- Kim, H. H., D. K. Yang, B. H. Seo, and I. S. Cho. 2018. 'Serosurvey of rabies virus, canine distemper virus, parvovirus, and influenza virus in military working dogs in Korea', *J Vet Med Sci*, 80: 1424-30.
- Levy, J. K., P. C. Crawford, M. R. Lappin, E. J. Dubovi, M. G. Levy, R. Alleman, S. J. Tucker, and E. L. Clifford. 2008. 'Infectious diseases of dogs and cats on Isabela Island, Galapagos', *J Vet Intern Med*, 22: 60-5.
- Macartney, L., I. A. McCandlish, H. Thompson, and H. J. Cornwell. 1984. 'Canine parvovirus enteritis 3: Scanning electron microscopical features of experimental infection', *Vet Rec*, 115: 533-7.
- Mengyu, T., Fei, L., Shun, Ch., Mingshu, W, Anchun, Ch. 2015. Role of capsid proteins in parvoviruses infection, *Virology journal.*, 12:114.
- Markovich, J. E., K. M. Stucker, A. H. Carr, C. E. Harbison, J. M. Scarlett, and C. R. Parrish. 2012. 'Effects of canine parvovirus strain variations on diagnostic test results and clinical management of enteritis in dogs', *J Am Vet Med Assoc*, 241: 66-72.
- Miranda, C., and G. Thompson. 2016. 'Canine parvovirus: the worldwide occurrence of antigenic variants', *J Gen Virol*, 97: 2043-57.
- Mogollón Galvis, JD, E Cortés Castillo, O Benavides, and P Forero. 'Parvovirus canina en Colombia. 2: Aislamiento y serología'.
- Navarro, R., R. Nair, A. Peda, M. S. Aung, G. S. Ashwinie, C. A. Gallagher, Y. S. Malik, N. Kobayashi, and S. Ghosh. 2017. 'Molecular characterization of canine parvovirus and

- canine enteric coronavirus in diarrheic dogs on the island of St. Kitts: First report from the Caribbean region', *Virus Res*, 240: 154-60.
- Palermo, L. M., S. L. Hafenstein, and C. R. Parrish. 2006. 'Purified feline and canine transferrin receptors reveal complex interactions with the capsids of canine and feline parvoviruses that correspond to their host ranges', *J Virol*, 80: 8482-92.
- Palermo, L. M., K. Hueffer, and C. R. Parrish. 2003. 'Residues in the apical domain of the feline and canine transferrin receptors control host-specific binding and cell infection of canine and feline parvoviruses', *J Virol*, 77: 8915-23.
- Parker, J. S., and C. R. Parrish. 2000. 'Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking', *J Virol*, 74: 1919-30.
- Parrish, C. R. 1999. 'Host range relationships and the evolution of canine parvovirus', *Vet Microbiol*, 69: 29-40.
- Parrish, C. R., C. F. Aquadro, M. L. Strassheim, J. F. Evermann, J. Y. Sgro, and H. O. Mohammed. 1991. 'Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus', *J Virol*, 65: 6544-52.
- Parrish, C. R., P. Have, W. J. Foreyt, J. F. Evermann, M. Senda, and L. E. Carmichael. 1988. 'The global spread and replacement of canine parvovirus strains', *J Gen Virol*, 69 (Pt 5): 1111-6.
- Parrish, C. R., and Y. Kawaoka. 2005. 'The origins of new pandemic viruses: the acquisition of new host ranges by canine parvovirus and influenza A viruses', *Annu Rev Microbiol*, 59: 553-86.

- Parrish, C. R., P. H. O'Connell, J. F. Evermann, and L. E. Carmichael. 1985. 'Natural variation of canine parvovirus', *Science*, 230: 1046-8.
- Pedroza-Roldan, C., V. Paez-Magallan, C. Charles-Nino, D. Elizondo-Quiroga, R. L. De Cervantes-Mireles, and M. A. Lopez-Amezcuca. 2015. 'Genotyping of Canine parvovirus in western Mexico', *J Vet Diagn Invest*, 27: 107-11.
- Pereira, C. A., T. A. Monezi, D. U. Mehnert, M. D'Angelo, and E. L. Durigon. 2000. 'Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay', *Vet Microbiol*, 75: 127-33.
- Perez, R., P. Bianchi, L. Calleros, L. Francia, M. Hernandez, L. Maya, Y. Panzera, K. Sosa, and S. Zoller. 2012. 'Recent spreading of a divergent canine parvovirus type 2a (CPV-2a) strain in a CPV-2c homogenous population', *Vet Microbiol*, 155: 214-9.
- Perez, R., L. Calleros, A. Marandino, N. Sarute, G. Iraola, S. Grecco, H. Blanc, M. Vignuzzi, O. Isakov, N. Shomron, L. Carrau, M. Hernandez, L. Francia, K. Sosa, G. Tomas, and Y. Panzera. 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: e111779.
- Perez, R., L. Francia, V. Romero, L. Maya, I. Lopez, and M. Hernandez. 2007. 'First detection of canine parvovirus type 2c in South America', *Vet Microbiol*, 124: 147-52.
- Pinto, L. D., A. F. Streck, K. R. Goncalves, C. K. Souza, A. O. Corbellini, L. G. Corbellini, and C. W. Canal. 2012. 'Typing of canine parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010', *Virus Res*, 165: 29-33.
- Pintos, Andrea Blanc, Cecilia Beatriz Negro Larrama, Eduardo Enrique Reolon Baratta, Mabel Beatriz Berois Barthe, and Juan Ramón Arbiza Rodonz. 2011. 'Isolation and

- characterization of canine parvovirus type 2c circulating in Uruguay', *Ciência Rural*, 41: 1436-40.
- Pollock, R. V. 1982. 'Experimental canine parvovirus infection in dogs', *Cornell Vet*, 72: 103-19.
- Pollock, R. V., and M. J. Coyne. 1993. 'Canine parvovirus', *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 23: 555-68.
- Puentes, R, N Eliopulos, P Finger, C Castro, C Nunes, A Furtado, G Franco, and S Hubner. 2010. 'Detección viral en cachorros con diagnóstico presuntivo de Parvovirus canino (CPV)', *Veterinaria (Montevideo)*, 46: 47-49.
- Puentes, R., N. Eliopulos, R. Perez, G. Franco, K. Sosa, P. Bianchi, A. Furtado, S. O. Hubner, and P. A. Esteves. 2012. 'Isolation and characterization of canine parvovirus type 2C (CPV-2C) from symptomatic puppies', *Braz J Microbiol*, 43: 1005-9.
- Quino Quispe, R., L. Luna Espinoza, R. Rimac Beltran, R. Rosadio Alcantara, and L. Maturrano Hernandez. 2018. 'Canine parvovirus types 2a and 2c detection from dogs with suspected parvoviral enteritis in Peru', *Virusdisease*, 29: 109-12.
- Reed, A. P., E. V. Jones, and T. J. Miller. 1988. 'Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus', *J Virol*, 62: 266-76.
- Rendon-Marin, S., Fontoura Budaszewski, R., Wageck, C., Ruiz-Sáenz, J. 2019. Tropism and molecular pathogenesis of canine distemper virus, *Virology journal*, 16, 30
- Robinson, WF, GE Wilcox, RLP Flower, and JR Smith. 1979. 'Evidence for a parvovirus as the aetiologic agent in myocarditis of puppies', *Australian veterinary journal*, 55: 294-95.
- Silva, S. P., Lnpp Silva, E. D. L. Rodrigues, J. F. Cardoso, F. N. Tavares, W. M. Souza, C. M. P. Santos, F. M. S. Martins, I. S. Jesus, T. C. Brito, T. P. C. Moura, M. R. T. Nunes, L. M. N.

- Casseb, E. Silva Filho, and A. R. Casseb. 2017. 'Full-length genomic and molecular characterization of Canine parvovirus in dogs from North of Brazil', *Genet Mol Res*, 16.
- Streck, A. F., C. K. de Souza, K. R. Goncalves, L. Zang, L. D. Pinto, and C. W. Canal. 2009. 'First detection of canine parvovirus type 2c in Brazil', *Braz J Microbiol*, 40: 465-9.
- Stronen, A. V., T. Sallows, G. J. Forbes, B. Wagner, and P. C. Paquet. 2011. 'Diseases and parasites in wolves of the Riding Mountain National Park region, Manitoba, Canada', *J Wildl Dis*, 47: 222-7.
- Suikkanen, S., M. Antila, A. Jaatinen, M. Vihinen-Ranta, and M. Vuento. 2003. 'Release of canine parvovirus from endocytic vesicles', *Virology*, 316: 267-80.
- Suzan, G., and G. Ceballos. 2005. 'The role of feral mammals on wildlife infectious disease prevalence in two nature reserves within Mexico City limits', *J Zoo Wildl Med*, 36: 479-84.
- Truyen, U. 2006. 'Evolution of canine parvovirus--a need for new vaccines?', *Vet Microbiol*, 117: 9-13.
- Truyen, U., M. Agbandje, and C. R. Parrish. 1994. 'Characterization of the feline host range and a specific epitope of feline panleukopenia virus', *Virology*, 200: 494-503.
- Truyen, U., J. F. Evermann, E. Vieler, and C. R. Parrish. 1996. 'Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range', *Virology*, 215: 186-9.
- Truyen, U., A. Gruenberg, S. F. Chang, B. Obermaier, P. Veijalainen, and C. R. Parrish. 1995. 'Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range in vivo', *J Virol*, 69: 4702-10.

- Truyen, U., and C. R. Parrish. 1992. 'Canine and feline host ranges of canine parvovirus and feline panleukopenia virus: distinct host cell tropisms of each virus in vitro and in vivo', *J Virol*, 66: 5399-408.
- Tsao, J., M. S. Chapman, M. Agbandje, W. Keller, K. Smith, H. Wu, M. Luo, T. J. Smith, M. G. Rossmann, R. W. Compans, and et al. 1991. 'The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications', *Science*, 251: 1456-64.
- Vieira, Flávia V, Daniel J Hoffmann, Carolina UF Fabri, Katia DS Bresciani, Roberto Gameiro, Eduardo F Flores, and Tereza C Cardoso. 2017. 'Circulation of canine parvovirus among dogs living in human-wildlife interface in the Atlantic forest biome, Brazil', *Heliyon*, 3: e00491.
- Xie, Q, and M S Chapman. 1996. 'Canine parvovirus capsid structure, analyzed at 2.9 Å resolution', *J Mol Biol*; 264(3): 497-520.
- Zhou, P., W. Zeng, X. Zhang, and S. Li. 2017. 'The genetic evolution of canine parvovirus - A new perspective', *PLoS One*, 12: e0175035.

5. CAPÍTULO 2

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Sometido en: Viruses

PHYLOGENETIC, EVOLUTIONARY AND STRUCTURAL ANALYSIS OF CANINE PARVOVIRUS (CPV2) ANTIGENIC VARIANTS CIRCULATING IN COLOMBIA

Sebastián Giraldo-Ramirez, Santiago Rendón-Marín, Julián Ruíz-Saenz*

Grupo de Investigación en Ciencias Animales - GRICA, Facultad de Medicina Veterinaria y
Zootecnia, Universidad Cooperativa de Colombia, sede Medellín

* Corresponding author: Calle 30A # 33-51. Universidad Cooperativa of Colombia.
Bucaramanga, Colombia. Phone/Fax: +57-6356624, *E-mail address*:
julianruizsaenz@gmail.com; julian.ruizs@campusucc.edu.co (J. Ruiz-Saenz)

Abstract

Canine parvovirus (CPV-2) is the main causative agent of haemorrhagic gastroenteritis in canids. Three antigenic variants—CPV-2a, CPV-2b and CPV-2c—have been described, which are determined by variations at residue 426 of the VP2 capsid protein. In Colombia, the CPV-2a and CPV-2b antigenic variants have previously been reported through partial VP2 sequencing. Mutations at residues Asn428Asp and Ala514Ser of variant CPV-2a were detected, implying the appearance of a possible new CPV-2a variant in Colombia. The purpose of the present study was to characterise the VP2 capsid protein coding region of the circulating canine parvovirus variants in Antioquia, Colombia. We conducted a cross-sectional study with 56 samples of faecal matter collected from dogs manifesting clinical symptoms of parvovirus disease in veterinary clinics of the Metropolitan Area of the Aburrá Valley. Following DNA extraction from the samples, VP2 amplification was performed using PCR and the resulting amplicons of the positive samples were sequenced. Sequence and phylogenetic analyses were performed by comparison with the VP2 gene sequences of the different CPV-2 variants from different countries. VP2 was amplified in 51.8% of the analysed samples. Animals under 3 months constituted 51.7% of the positive cases, whereas animals aged 7–12 months constituted 24.1%. Sequencing and sequence alignment showed that 93.1% of the amplified samples belonged to the CPV-2a antigenic variant and 6.9% belonged to the CPV-2b variant. Analysing the amino acid sequences revealed that all CPV-2a variants in the study contain Ala297Asn mutations, which are related to the South America I clade, and the Ala514Ser mutation, which allows the virus to be characterised as a new CPV-2a sub-variant. The Colombian CPV-2b variant presents mutations at Phe267Tyr, Tyr324Ile and Thr440Ala, which are related to the Asia I clade variants. The most prevalent antigenic variant CPV-2c in South America was not detected. These results provided the conclusion that two antigenic CPV-2

variants of two geographically distant origins are circulating in Antioquia. It is crucial to continue characterising CPV-2 in the Colombian canine population to elucidate the molecular dynamics of the virus in this country.

Keywords: *antigenicity, sequencing, virus*

1. Introduction

One of the main infectious agents that affect the canine population is the canine parvovirus type 2 (CPV-2), which causes acute haemorrhagic diarrhoea, primarily in puppies (Desario et al., 2005). CPV-2 is a single-stranded DNA virus that belongs to the genus *Protoparvovirus* (Cotmore et al., 2014), with a genome of approximately 5200 nucleotides that contain two open reading frames (ORFs). The ORF 3 encodes for non-structural proteins NS1 and NS2, which are important in controlling viral replication and assembly. The ORF 5 encodes for structural proteins termed viral protein 1 (VP1) and 2 (VP2). VP2 is the major component of the viral capsid, which has an icosahedral structure of 60 subunits with a T = 1 symmetry, comprising approximately 4-5 copies of VP1 and 54-55 copies of VP2 (Reed et al., 1988).

VP2 subunits interact with transferrin receptors (TfRs) present on the outer surface of the cell membrane (Hueffer et al., 2003). Subsequently, the absorption to the host cell is facilitated by clathrin-mediated endocytosis (Parker and Parrish., 2000). The VP2 capsid protein plays a crucial role because its mutations determine the antigenic changes that originate the different antigenic CPV-2 variants (Hueffer et al., 2003).

It is believed that CPV-2 is derived from the feline panleukopenia virus (FPLV) (Miranda and Thompson., 2016), where specific mutations at Lys80Arg, Lys93Asn, Val103Ala, Asp323Asn,

Asn564Ser and Ala568Gly capsid protein VP2 residues facilitated a change of host, thereby allowing the virus to infect canines and losing the ability to infect felines (Truyen et al., 1996; Chang et al., 1992). These mutations originated in the CPV-2 variant, firstly reported in the 1970s, and had spread to countries in Europe, America, Asia and Oceania by 1978. (Miranda and Thompson., 2016)

By 1982, CPV-2 was replaced by a variant of the virus that genetically and antigenically differed (Parrish et al., 1988). This variant was called CPV-2a and differs from CPV-2 in 6 amino acids: Met87Leu, Ile101Thr, Ser297Ala, Ala300Gly, Asp305Tyr and Val555Ile residues (Parrish et al., 1991).

Residue 426 of VP2 is located in the outermost part of the threefold axis, where 3 VP2 subunits converge. It is the site of greatest antigenicity of the virus (Parrish et al., 1991); therefore, the amino acid variation causing the antigenic changes that led to the origin of the CPV-2b antigenic variants (Asn426Asp) was reported in 1984 (Parrish et al., 1991) and that for CPV-2c (Asp426Glu) was reported in Italy in 2001 (Buonavoglia et al., 2001). Unlike CPV-2, which cannot infect cats, CPV-2a, CPV-2b and CPV-2c variants infect canines as well as regained the ability to infect felines and other wild carnivores (Truyen., 2006).

In 2017, the antigenic CPV-2a and CPV-2b variants were reported via the study of a partial region of VP2 in Colombia (Duque-García et al., 2017). The CPV-2c variant was not detected in Colombia, despite being the most prevalent antigenic variant in South America (Zhou et al., 2017) and despite Colombia sharing borders with countries, such as Peru, Ecuador and Brazil, where the variant has previously been reported (Grecco et al., 2018). Additionally, two mutations were

observed in the Colombian CPV-2a variants (Asn428Asp and Ala514Ser) that suggest the emergence of a new CPV-2a variant unique to Colombia (Duque-García et al., 2017).

The aim of the present study was to characterise the encoding region of the entire VP2 capsid protein of the circulating parvovirus variants in Antioquia (north-western Colombia) for determining the total amino acid variations in VP2 and to obtain information regarding the molecular evolution of the CPV-2 in Colombia.

2. Materials and methods

2.1. Patient selection and sampling: A cross-sectional study was conducted with a convenience sampling of canine patients attending different veterinary clinics and manifesting clinical symptoms compatible with canine parvovirus, such as haemorrhagic diarrhoea, dehydration, vomiting, loss of appetite and weakness. In the present study, animals of any age, race and sex presenting the described symptoms were included. Faecal samples of each animal were collected (approximately 5 g) and stored under freezing conditions (-80°C) until further use; prior authorisation was obtained from the owner of the animals that met the inclusion criteria. This study was approved by the Bioethics Committee of the Universidad Cooperativa de Colombia. An informed consent was obtained from all owners.

2.2. DNA extraction and quantification. Viral DNA extraction from the collected stool samples was performed using QIAamp DNA fast stool mini kit (Qiagen[®], Hilden, Germany), in accordance with the manufacturer's instructions. DNA obtained was quantified using 1 μL of the product with NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific[®], Waltham, MA, USA).

2.3. VP2 amplification using PCR. To identify CPV-2-positive samples, PCR amplification of

VP2 was conducted using the conventional method. For each PCR reaction, 25 μL of DreamTaq™ PCR Master Mix (2 \times) (Thermo Fisher Scientific®) was used, with 4 μL of the Forward Ext1F primer (5'-ATGAGTGATGGAGCAGTTCA-3') and 4 μL of the Ext3R Reverse primer (5'-AGGTGCTAGTTGAGATTTTTCATATAC-3') described by (Faz et al., 2018) and 17 μL of a mixture of DNA and molecular grade water, reaching an amount of 500 ng DNA for each reaction. Molecular grade water was used as a negative control for amplifications. PCR protocol used was as follows: an initial denaturation cycle at 94°C for 5 min, 35 denaturation cycles at 94°C for 30 s, alignment at 50°C for 45 s, extension at 72°C for 1 min and a final extension cycle at 72°C for 5 min.

PCR amplification results were visualised using 1.5% horizontal agarose gel electrophoresis. Gels were stained with the Invitrogen™ SYBR® Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific®). In each well, 4.2 μL of each sample obtained after amplification and 0.8 μL of the 6 \times DNA loading buffer were used, and the GeneRuler™ 100-bp DNA Plus Ladder (Thermo Fisher Scientific®) was used as a molecular weight marker. Gels were developed in the ultraviolet light Gel Doc™ XR+ imaging system (Bio-Rad, Molecular imager®, USA) and were visualised using ImageLab™ software.

2.4. Sequencing and sequence analysis. Samples positive for VP2 amplification after electrophoresis visualisation were purified and sequenced at Macrogen Inc. (Seoul, Korea) using Forward Ext1F and Reverse Ext 3R primers, along with a set of internal primers—F1: 5'-AGATAGTAATAATACTATGCCATTT-3', F2: 5'-ACAGGAGAAACACCTGAGAGATTTA-3', R1: 5'-TGGTTGGTTTCCATGGATA-3', and R2: 5'-TTTTGAATCCAATCTCCTTCTGGAT-3' (Ikeda et al., 2000)—to amplify the entire VP2.

The resulting electropherograms from the sequencing were analysed using the Chormas™ v. 2.6

software. Contig generation, resulting from the overlapping of the sequences amplified by the primers, was performed on the SeqMan Pro platform with Lasergene™. After constructing the complete nucleotide sequences for each sample, alignment was performed using the ClustalW method, following which these sequences were compared with the DNA sequences of CPV-2a, CPV-2b and CPV-2c obtained from GenBank. All analyses were performed in the MEGA™ 7.0 software for Windows®.

2.5. Phylogenetic Analysis. For the phylogenetic analysis, we calculated the best nucleotide substitution model for the dataset generated with the sequences of FPLV, CPV-2, CPV-2a, CPV-2b and CPV-2c obtained from GenBank. The nucleotide replacement model selected was Tamura-3 parameter and the maximum likelihood tree was performed with a bootstrap value of 1000. These analyses were performed in MEGA™ 7.0 software for Windows®.

2.6. Evolutionary analysis. The construction of the phylogenetic evolutionary tree required the generation of dataset containing the sequences obtained from GenBank and the Colombian CPV-2a and CPV-2b samples. The evolutionary rates, time to the most recent common ancestor (tMRCA) and geographic movements of CPV-2 were performed using the BEAST v1.8.4 software package. The phylogenetic evolutionary tree was generated according to the Hasegawa, Kishino and Yano nucleotide substitution model + gamma distribution + invariable sites (HKY + G + I) and a strict molecular clock. The Bayesian stochastic search variable selection was used to determine links between sequences. The length of the Markov chain Monte Carlo chain was 15 million. All parameters generated in the analysis were confirmed by verifying the effective sample size of >200 using the TRACER v1.7.1 software. With the TreeAnnotator v1.8.4 software, 10% of the steps (1.5 million burn-in) were eliminated to obtain the tree with the most credible clades. The FigTree v1.4.3 software was used to display the generated tree.

2.7. Structural analysis. The VP2 tertiary structure construction and surface analysis was performed using the sequences of sample 1 (CPV-2a) and sample 50 (CPV-2b) as references. Initially, a crystallographic structure downloaded from the Protein Data Bank (PDB: 1C8D) was obtained as a base, and homology models of the CPV-2a and CPV-2b sequences under study were generated using the MODELLER software. After generating these models, the three-dimensional models of the VP2 tertiary structure were generated for each sequence using the PyMOL™ software. VP2 surface analysis was performed using the RIVEM (Radial Interpretation of Viral Electron density Maps) bioinformatics software that facilitates the generation of a ‘road map’ of the viral surface and determination of the locations of the amino acids that constitute the analysed structure (Xiao and Rossmann., 2006). Additionally, a projection of TfR on the road map was generated to visualise the area of interaction with VP2 (Hafenstein et al., 2007).

2.8. Statistical analyses. A descriptive analysis of the collected data was performed representing the qualitative and quantitative variables in tables and graphs.

3. Results

For this study, a total of 56 faecal matter samples were collected from dogs that presented clinical symptoms compatible with canine parvovirus, from different veterinary centres located in the department of Antioquia, Colombia.

PCR amplification of VP2 showed that a total of 29 samples (51.8%) were CPV-2-positive. Of these samples, a total of 41.4% (n = 12) belonged to females and 58.6% (n = 17) to males. Approximately 55.1% of the positive samples belonged to mixed-breed animals. According to the data provided at the time of sample collection, when visiting the veterinary centres with symptoms

compatible with those of parvovirus infection, 20.7% (n = 6) of the animals had undergone a complete vaccination schedule as required by age, whereas 44.8% (n = 13) did not comply with the vaccination schedule. The remaining 34.5% (n = 10) of the animals presented incomplete vaccination schedules (Table 1).

Table 1. Information on CPV-2-positive samples included in the present study

Sample	Variant	Age	Sex	Race	Vaccination
1	CPV-2a	4 months	Male	Mixed-breed	Without vaccination
5	CPV-2a	3 months	Female	French Bull Dog	Incomplete
7	CPV-2a	1 month	Female	Mixed-breed	Without vaccination
17	CPV-2a	3 months	Female	Golden Retriever	Complete
19	CPV-2a	2 months	Female	French Bulldog	Complete
20	CPV-2a	2 months	Female	French Bulldog	Complete
21	CPV-2a	2 months	Male	French Bulldog	Complete
24	CPV-2a	2 months	Female	Beagle	Without vaccination
26	CPV-2a	3 months	Female	Mixed-breed	Without vaccination
29	CPV-2a	2 months	Male	Mixed-breed	Without vaccination
32	CPV-2a	9 months	Female	Pinscher	Without vaccination
33	CPV-2a	2 months	Male	Cocker Spaniel	Incomplete
36	CPV-2a	2 months	Male	Siberian Husky	Without vaccination
37	CPV-2a	7 months	Male	Mixed-breed	Incomplete
38	CPV-2a	6 months	Male	Cocker Spaniel	Complete
40	CPV-2a	4 months	Female	Mixed-breed	Incomplete
41	CPV-2a	4 months	Female	Mixed-breed	Incomplete
43	CPV-2a	9 months	Male	Mixed-breed	Incomplete
44	CPV-2a	3 months	Male	French Bulldog	Incomplete
45	CPV-2a	12 months	Female	Mixed-breed	Without vaccination
47	CPV-2a	7 months	Male	Mixed-breed	Without vaccination
48	CPV-2a	6 months	Male	Mixed-breed	Complete
50	CPV-2b	9 months	Male	Mixed-breed	Incomplete

51	CPV-2a	2 months	Male	Mixed-breed	Without vaccination
52	CPV-2a	2 months	Female	Mixed-breed	Incomplete
53	CPV-2a	4 months	Male	Mixed-breed	Without vaccination
54	CPV-2a	24 months	Male	Mixed-breed	Without vaccination
55	CPV-2b	3 months	Male	German Shepherd	Without vaccination
56	CPV-2a	7 months	Male	Shih Tzu	Incomplete

According to age distribution, 15 samples (51.7%) from the positive, belonged to animals aged 1–3 months, which the most prevalent age group for the virus, whereas only 1 sample (3.4%) belonged to an animal aged >1 year (Figure 1).

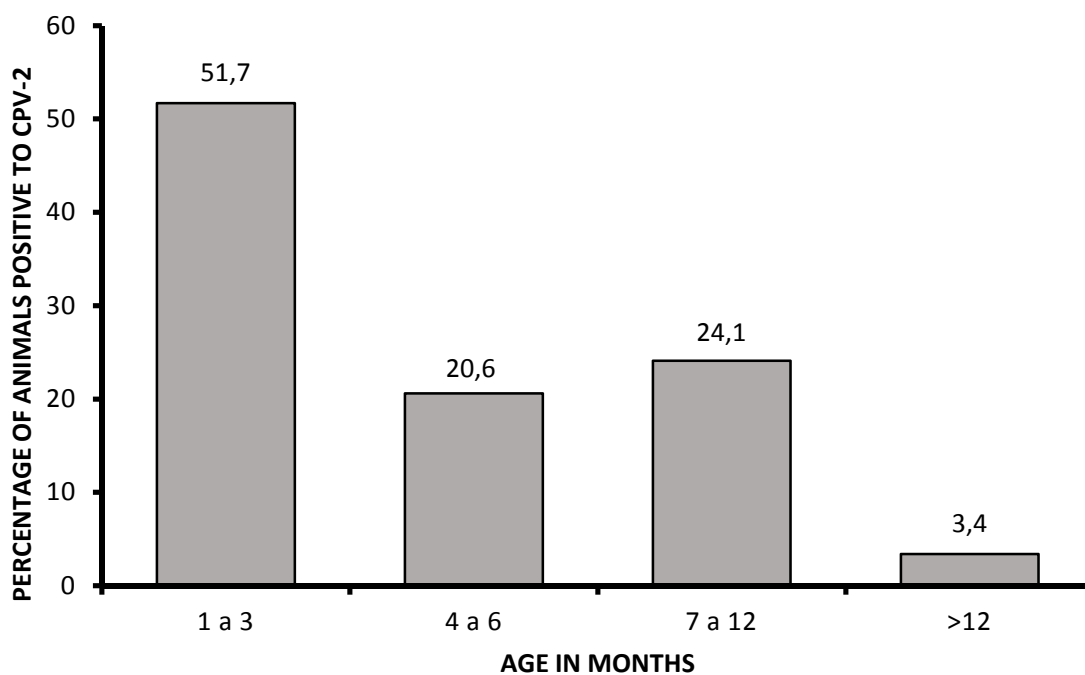


Figure 1. Distribution of CPV-2-positive samples by the animal's age (in months)

3.1. Sequence analysis

An almost full sequence of 1,711 nucleotides of the VP2 gene was achieved. Sequencing analysis showed that the antigenic variants present in the study are CPV-2a and CPV-2b. The CPV-2a variant (Asn426) was present in 27 from the positive samples (93.1%) and was the most prevalent variant in the study, whereas the CPV-2b variant (Asp426) was detected in two samples (6.9%). No evidence was obtained regarding the presence of the CPV-2c variant (Glu426) in any sample (Table 1).

Sequence analysis revealed specific mutations with respect to the reference sequences of CPV-2a, CPV-2b and CPV-2c obtained from GenBank. The Colombian CPV-2a variants showed mutations at the amino acid residues Ala297Asn, Tyr324Ile and Ala514Ser, with the latter being reported for the first time in Colombia in 2017 (Duque-García et al., 2017). Regarding the CPV-2b variants of the present study, the amino acid variations detected were Phe267Tyr and Thr440Ala. Similar to the CPV-2a variants, the CPV-2b sequenced from the sampling showed the Tyr324Ile mutation; however, a single Ala514Ser mutation was not detected in these samples (Table 2).

Table 2. Amino acid variations in the samples identified as CPV-2a and CPV-2b in relation to reference variants (in bold)

Sample	Variant	Amino acid position					
		267	297	324	426	440	514
MF177231	CPV-2a	F	A	Y	N	T	A
EU659119	CPV-2b	F	A	Y	D	T	A
MF177238	CPV-2c	F	A	Y	E	T	A
1	CPV-2a	F	N	I	N	T	S
5	CPV-2a	F	N	I	N	T	S
7	CPV-2a	F	N	I	N	T	S

17	CPV-2a	F	N	I	N	T	S
19	CPV-2a	F	N	I	N	T	S
20	CPV-2a	F	N	I	N	T	S
21	CPV-2a	F	N	I	N	T	S
24	CPV-2a	F	N	I	N	T	S
26	CPV-2a	F	N	I	N	T	S
29	CPV-2a	F	N	I	N	T	S
32	CPV-2a	F	N	I	N	T	S
33	CPV-2a	F	N	I	N	T	S
36	CPV-2a	F	N	I	N	T	S
37	CPV-2a	F	N	I	N	T	S
38	CPV-2a	F	N	I	N	T	S
40	CPV-2a	F	N	I	N	T	S
41	CPV-2a	F	N	I	N	T	S
43	CPV-2a	F	N	I	N	T	S
44	CPV-2a	F	N	I	N	T	S
45	CPV-2a	F	N	I	N	T	S
47	CPV-2a	F	N	I	N	T	S
48	CPV-2a	F	N	I	N	T	S
50	CPV-2b	Y	A	I	D	A	A
51	CPV-2a	F	N	I	N	T	S
52	CPV-2a	F	N	I	N	T	S
53	CPV-2a	F	N	I	N	T	S
54	CPV-2a	F	N	I	N	T	S
55	CPV-2b	Y	A	I	D	A	A
56	CPV-2a	F	N	I	N	T	S

3.2. Phylogenetic analysis

For the construction of the maximum likelihood tree, we used the CPV-2 positive samples representing the antigenic variants detected in the study (CPV-2a and CPV-2b). Additionally, these samples exhibited differences in the pairwise distances. Representative samples of FLPV, CPV-2, CPV2a, CPV-2b and CPV-2c from different countries reported in GenBank were used for phylogenetic evolutionary tree construction. The Colombian CPV-2a antigenic variant constituted a monophyletic clade that substantially differs from the European CPV-2a antigenic variants as well as from Uruguayan variants and only shared distribution with a Ecuadorian CPV-2a variant

(MG264075). The two samples of the study from the antigenic CPV-2b variant were located within a clade that includes the Uruguayan CPV-2a variants and Asian CPV-2b variants (Figure 2).

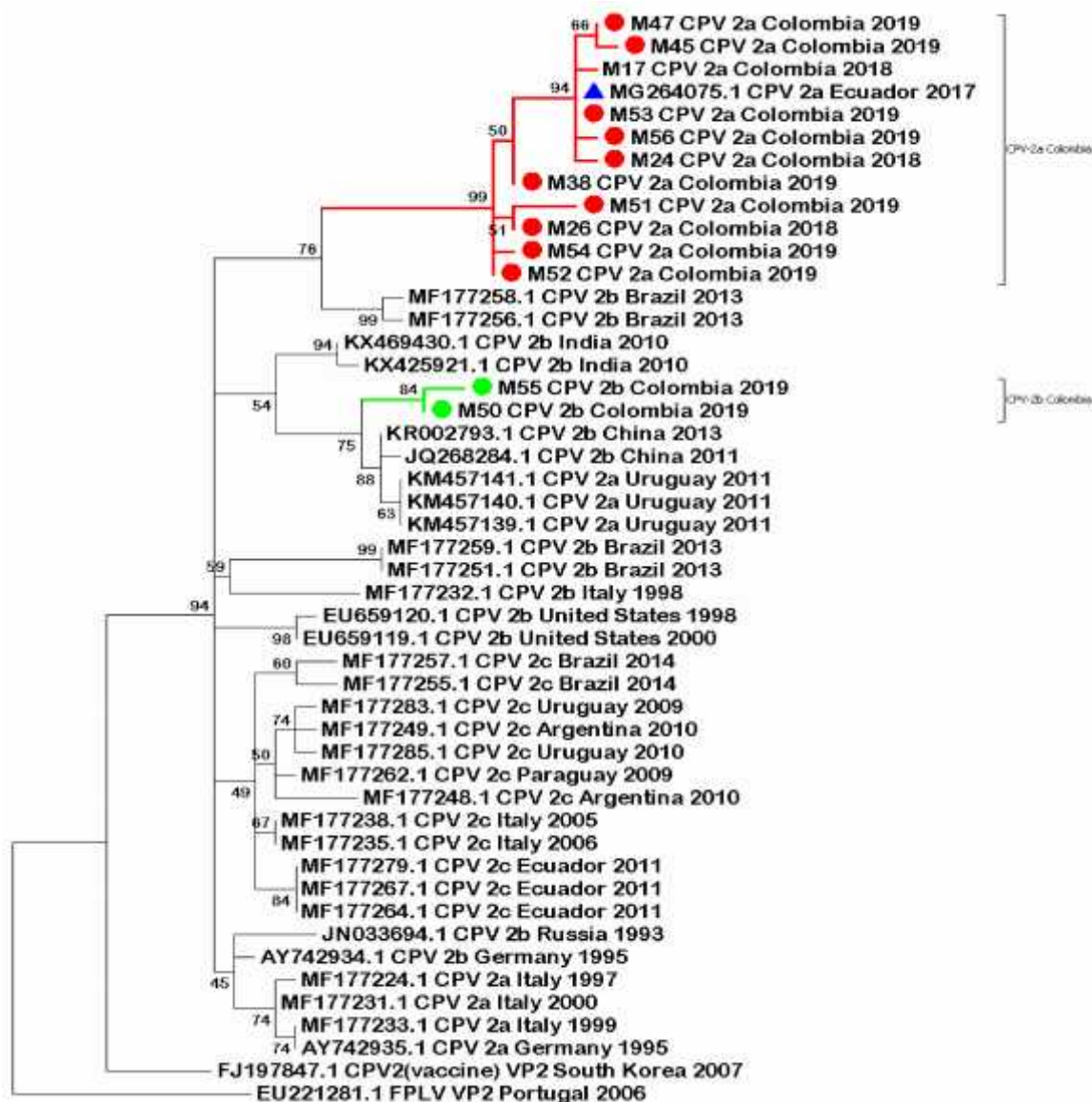


Figure 2. Maximum likelihood tree of CPV-2. The phylogenetic analysis was performed using the nucleotide sequences of VP2 of the Colombian CPV-2a and CPV-2b variants and other sequences belonging to the three antigenic CPV-2a, CPV-2b and CPV-2c variants from different countries as well as FPLV and original CPV-2 variants. The sequences are identified with the accession number, country and date of collection. The tree was rooted with the sequence of FPLV

(EU221281.1). Red circles indicate the sequences belonging to the Colombian CPV-2a variant and the blue triangle indicate those belonging to the Ecuadorian CPV-2a variant related to Colombian samples. Green circles indicate the Colombian CPV-2b variant.

3.3. Evolutionary analysis

For the evolutionary analysis, the same sequences of the samples used in the phylogenetic analysis and a dataset of the sequences of CPV-2a, CPV-2b and CPV-2c variants from different countries were used. The estimated tMRCA for the phylogenetic evolutionary tree generated was 40 years ago (1979), based on the most recent analysed sequence (2019), with a 95% highest probability density and a range of 38–44 years. The analysis revealed that the Colombian CPV-2a and CPV-2b variants have their common ancestor in sequences in Italy (Figure 3), from which a branch was identified that originated a clade with South American sequences (Uruguay, Argentina and Brazil) derived ca.1990; the Colombian CPV-2a variant is located in this clade. Another branch deriving from the sequences from Italy originated a clade with sequences from Asia (China and India) and Uruguay around 1994, and the CPV-2b variant is located in this clade.

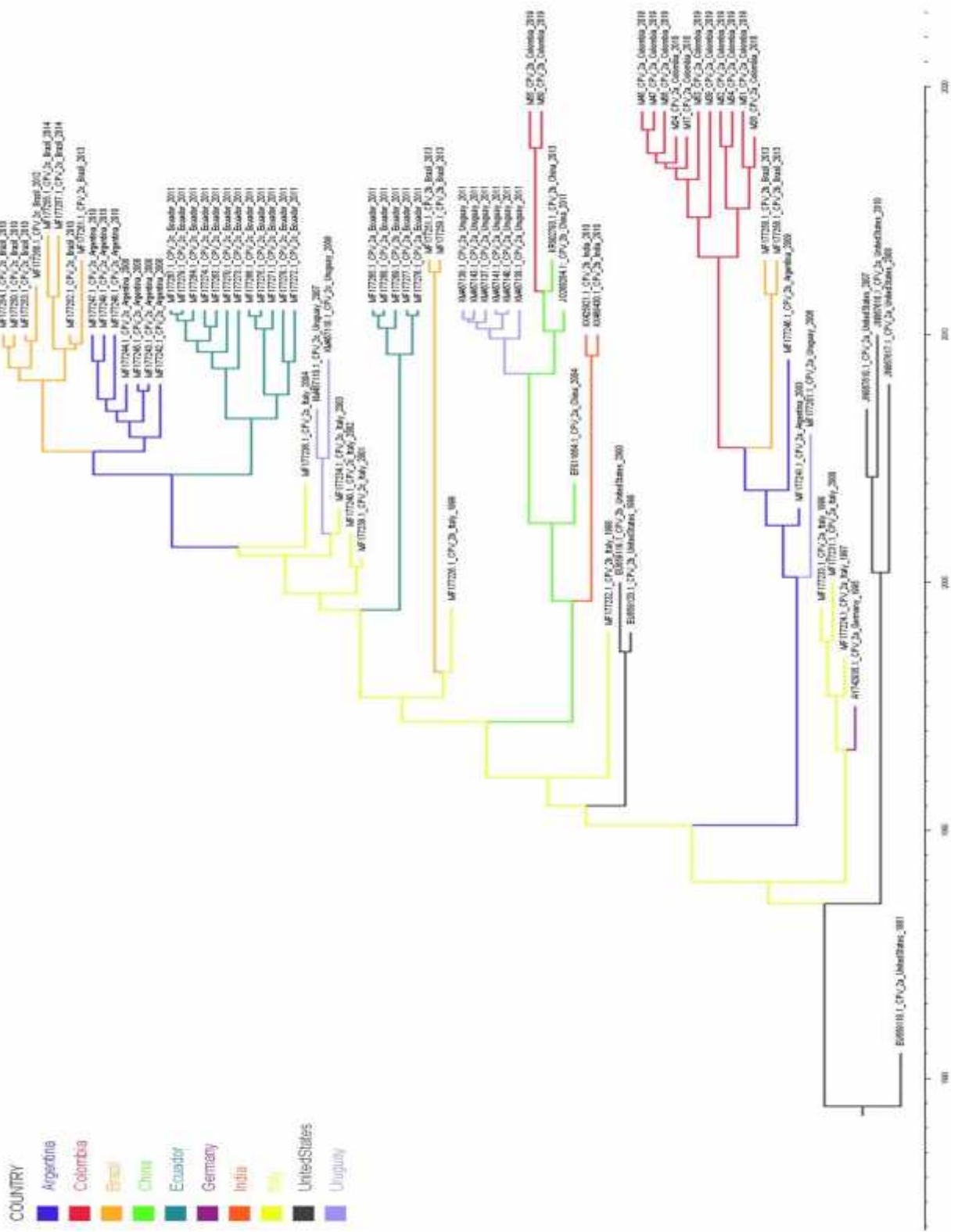


Figure 3. Phylogenetic evolutionary tree of Colombian CPV-2 variants. The tree was generated using CPV-2a, CPV-2b and CPV-2c variants from different countries. The sequences are identified with the accession number, country and date of collection. The timeline shows the moment of evolutionary divergence of the sequences of each country. The common ancestor for both the Colombian CPV-2a and CPV-2b variants, in red, are sequences of Italian origin, represented in yellow. The Italian variants originated a clade with South American variants in 1990. In 2006, there is a divergence in the Argentine variants that originated the Brazilian variants and the Colombian CPV-2a variant. In 1994, a divergent branch appears that originated the Asian variants. In this clade, there are Chinese and Indian variants. Additionally, Uruguayan sequences related to the Chinese variants are found. In 2012, there is a divergence from the Chinese origin variants that originated the Colombian CPV-2b variant.

3.4. Structural modelling

The three-dimensional reconstruction of the VP2 tertiary structure reveals the spatial location of the mutations detected by sequencing for the Colombian CPV-2a and CPV-2b variants. The CPV-2a variant exhibited the Ala297Asn, Tyr324Ile and Ala514Ser mutations, with all mutations being detected in the exposed VP2 regions. The amino acids 297Asn and 324Ile were located in the loop 3, whereas 514Ser was located in a less prominent region (Figure 4a). To determine the spatial location on the VP2 surface of these mutations, a surface image of VP2 was generated indicating the exact location of amino acid variations. The mutations found in the Colombian CPV-2a sequences are located at the region that divides the barrel and the depression of the 2-fold axis, an important site for the interaction between VP2 and the TfR receptor. (Figure 4b).

The CPV-2b variant exhibited the Phe267Tyr, Tyr324Ile and Thr440Ala mutations. In the three-dimensional VP2 reconstruction, 267Tyr has been found to be located in an unexposed area in the internal structure of the protein. By contrast, 324Ile and 440Ala were detected in more prominent regions of the protein. The amino acid 324Ile is in a medium exposure region, i.e., the loop 3, whereas 440Ala was found in the most prominent region of VP2 and the viral capsid, i.e., the loop 4; furthermore, the amino acid 426, which is the main antigenic determinant of the virus, is found in the loop 4 (Figure 4c). The surface representation of VP2 revealed the location of the mutations. The 267Tyr mutation was not visible because it was located on the inner side of the protein. The 324Ile mutation, as observed in the CPV-2a samples of the present study, was located in a region that divides the barrel and the depression of the 2-fold axis, where the TfR coupling occurs. The image shows the proximity between 440Ala and 426 in a region of great antigenic importance (Figure 4d).

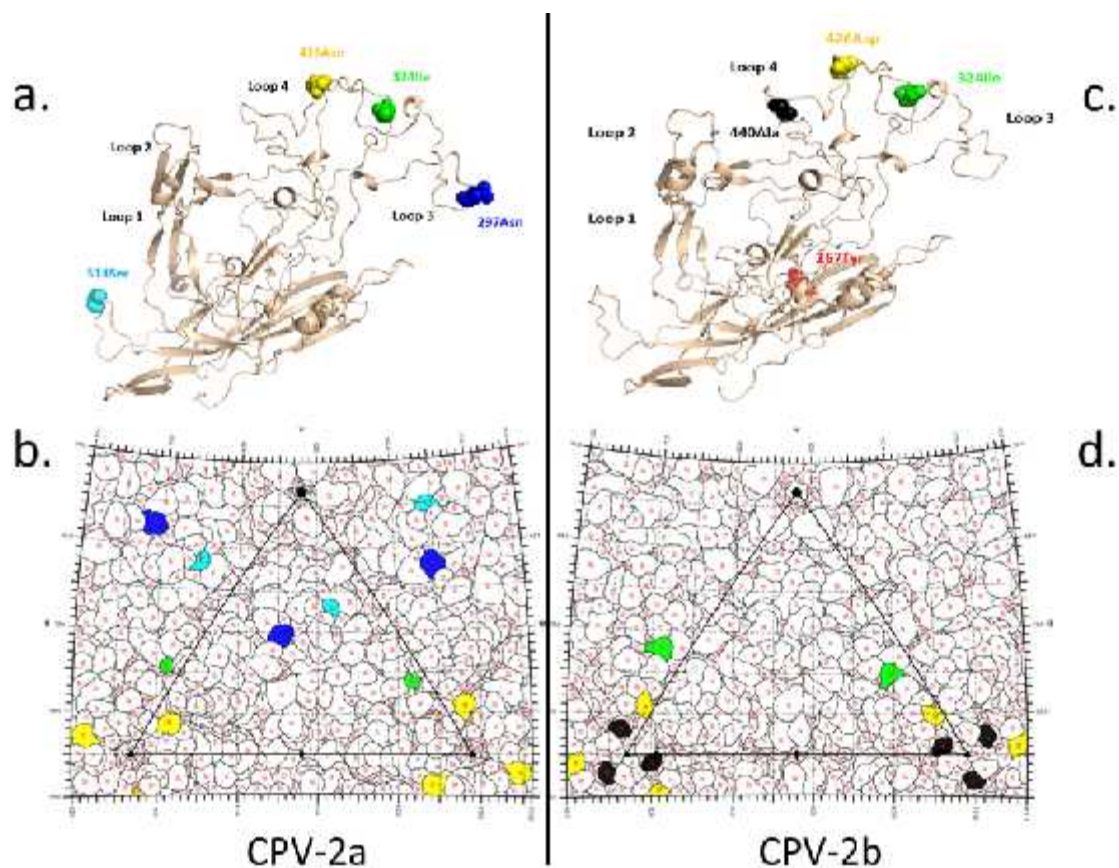


Figure 4. Three-dimensional reconstruction and structural analysis of the VP2 surface of the Colombian CPV-2a and CPV-2b variants. (a) VP2 tertiary structure model of CPV-2a. The image shows the mutations detected in the sequence analysis; 297Asn (blue) and 324Ile (green) are located in the loop 3, an exposed area of the VP2 structure. The amino acid 514Ser (light blue) is located in an area of less exposure. (b) Surface representation of VP2. The superficial location of the amino acids indicated in the previous image with the same colours is demonstrated. The 297Asn, 324Ile and 514Ser mutations are within the VP2 region that is involved with the interaction with the TfR receptor and antibody neutralization zones (Voorhees et al., 2019). (c) Model of the VP2 tertiary structure of CPV-2b. The mutations observed in the sequence analysis are illustrated; 267Tyr (red) is located in the inner face of the VP2 protein. The amino acid 324Ile (green) is observed in the loop 3, similar to that in the CPV-2a variant, whereas 440Ala (black) is detected in the loop 4, the most prominent region of the structure. (d) Representation of the VP2 surface of CPV-2b. The topological location of the mutations indicated in the previous image is

shown. Because 267Tyr is observed on the inner side of the protein, it is not represented in the image. The representation reveals the proximity between 440Ala and 426. This threefold axis is the site of greatest antigenic importance of the virus, and 426 is the main antigenic determinant of the virus. In all the images, the amino acid 426 (yellow) is represented as the reference of the structure.

4. Discussion

Despite the wide distribution of vaccination strategies for CPV-2 and the knowledge obtained from its evolution, CPV-2 remains a viral pathogen that has the greatest impact on animal health (Mylonakis et al., 2016). In our study, 51.7% (n = 29) of the samples were CPV-2-positive as detected by PCR amplification of VP2. The presence of CPV-2 in most collected samples demonstrated that canine parvovirus is the causative agent for most cases of haemorrhagic gastroenteritis in canines (Desario et al., 2005). The CPV-2a variant was detected in 93.1% (n = 27) of the samples, whereas the CPV-2b variant was detected in 6.9% (n = 2). In contrast to the previously reported results by Duque-García et al., (2017) the present study reveals that the new CPV-2a variant has gradually become the most prevalent virus in Colombia.

Although our data analysis showed that mixed-breed animals are the ones that most commonly present with CPV-2 infections, assertively linking race and susceptibility to parvovirus infection is not feasible. Additionally, mixed-breed animals comprise the largest canine population in the present study. Regarding age distribution, the youngest animals—aged between 1 and 3 months—represent the population most affected by CPV-2 infection, consistent with the usual presentation of this infection (Desario et al., 2005). However, interestingly, the animal population aged between 7 and 12 months showed a high rate of CPV-2-positive cases.

However, all animals belonging to the group of mature puppies (aged 7–12 months) presented with

an incomplete vaccination schedule or with the absence of any vaccination history (Table 1), rendering them susceptible to CPV-2 because they lack acquired immunity. Only one animal in the sample was aged >12 months; however, this animal had no vaccination history. Despite this unconventional finding, it serves as a starting point to demonstrate the importance and infectious potential of CPV-2 in immunologically mature animals, even in animals that have received a complete vaccination schedule, indicating that the mutational ability of the virus can result in immune response evasion (Decaro et al., 2008).

Amino acid sequence analysis revealed important changes in the Colombian CPV-2b (Asp426) antigenic variant with respect to the reference variants (Table 2). The Phe267Tyr change has been reported since the early 2000s in Asian CPV-2b variants (Nakamura et al., 2004) and in the Uruguayan CPV-2a antigenic variant (Pérez et al., 2012). Since its detection, this mutation has consistently appeared in the sequences reported in different studies and become predominant in the CPV-2 population since 2014, suggesting that this mutation has a positive selection. Although this amino acid was not detected in an exposed area of antigenic change site, the fixation of this mutation reflects an evolutionary advantage for CPV-2 that has not yet been elucidated (Zhou et al., 2017; Miranda and Thompson., 2016; Agbandje et al., 1995).

The Tyr324Ile mutation observed in our CPV-2b variant (Table 2) could be related to the ability of the virus to infect different hosts. The residue 324 is adjacent to the residue 323, and in combination with the amino acid residue 93 of VP2, these residues reportedly exert effects on the host change of the CPV-2 because they are involved in the binding of the virus with TfR (Hueffer et al., 2003; Palermo et al., 2003; Palermo et al., 2006). This amino acid is found in the loop 3 (Zhou et al., 2017), a moderately exposed VP2 region, which is a part of the 'shoulder' of the structure that forms the threefold axis, a site of greater antigenic importance (Tsao et al., 1991).

This mutation was first reported in Asia (Jeoung et al., 2008; Zhang et al., 2010), and similar to residue 267, there exists a relationship with Uruguayan variants (Pérez et al., 2012), where this mutation has been reported.

Another mutation observed in our samples regarding the reference variants was Thr440Ala (Table 2). Similar to the aforementioned mutations (Phe267Tyr and Tyr324Ile), 440 was reported in the Uruguayan CPV-2a variant. This residue is found in the loop 4 in the most prominent region of the viral capsid—the threefold axis (Hong et al., 2007). Therefore, mutations in this region could greatly impact antigenic changes that have implications on the host immune response (Pérez et al., 2012). Considering that this mutation has undergone a strong positive selection, identifying this mutation in different populations is possible as they underwent an independent evolution (Decaro et al., 2007). The mutation was first reported in 1993, and it has consistently occurred in the viral populations of CPV-2 since 2005. (Zhou et al., 2017).

It is evident that our findings in the Colombian CPV-2b variant are related to the Uruguayan CPV-2a variant. In both cases, these mutations are observed in the same amino acid residues (267, 324 and 440), although they differ in 426, which is the major antigenic determinant (Asp426 for CPV-2b variant and Asn426 for CPV-2a variant). According to the phylogenetic analysis, both the Colombian CPV-2b and Uruguayan CPV-2a variants are present in the same clade as the Asian CPV-2b variants (Figure 2). Based on the study by Grecco et al. (2018), the Uruguayan CPV-2a variant originated from the Asian variants, and they named this group the Asia I clade. This clade originated in Asia in the late 80s and arrived in South America between 2009 and 2010, when the dissemination of a divergent CPV-2a variant was reported in Uruguay, where the predominant population at that time was CPV-2c (Pérez et al., 2012).

According to the results of the phylogenetic evolutionary analysis (Figure 3), the Colombian CPV-

2b variant, although present in the same clade as the Uruguayan CPV-2a variant, has a direct relationship with the Chinese variants rather than with the Uruguayan ones. This is possibly attributable to the Uruguayan variants being CPV-2a, whereas in Asia, CPV-2b variants have been reported to have the same mutations as the Colombian CPV-2b sequences (Wang et al., 2015). Structural analysis of CPV-2b has shown that the 440Ala mutation is located in a zone of antibody neutralization, similarly it is contiguous to the capsid interaction domain with the TfR cell receptor (Voorhees et al., 2019). Given the location of 440, it is possible that changes in this amino acid have strong impact on both, evasion of the neutralizing response by antibodies as well as favoring the virus-receptor interaction affecting pathogenesis.

Regarding the CPV-2a variant detected in the present study, it was demonstrated that this variant shows mutations in contrast to the reference variants (Table 2), indicating the high molecular divergence of CPV-2 according to geographical location. An Ala → Asn mutation was present at the amino acid residue 297. This mutation has been reported in South American countries, such as Brazil, Uruguay and Argentina, the latter being the most recent ancestral location (Grecco et al., 2018). Residue 297 is located in a medium exposure zone in the structure of the viral capsid (Tsao et al., 1991) at a site of lower antigenicity and is not located in the most prominent place in the structure (Miranda and Thompson., 2016). The Colombian CPV-2a-positive and CPV-2b samples contain the Tyr324Ile mutation in the present study, indicating that equivalent changes can occur in different antigenic variants.

The amino acid residue 514 showed the Ala → Ser mutation, which was first reported in Colombia (Duque-García et al., 2017) in CPV-2a variants and occurred in 66% of the samples evaluated in that study. However, in our study, 100% of the samples belonging to the antigenic CPV-2a variant, reported this 514 Ala → Ser mutation. Surface structure analysis of the virus revealed the spatial

position of these mutations (Figure 4b). Amino acids 297, 324 and 514 are located in a central region of VP2 (between the depression of the two-fold axis and the canyon). This area is critical for the interaction between the virus and the TfR receptor. The mutations in 297 and 324 are immediately adjacent to the region determined for the coupling of the receptor on the surface of the virus (Lee et al., 2019).

The mutation in 514 is distant from virus-receptor interaction zone (Figure 4); however, it is located at the antibody neutralization areas (Voorhees et al., 2019). It is possible that these mutations favors the union between the virus with TfR receptor (297Asn, 324Ile) or may represent a change in the structure of VP2 that allows to avoid neutralization by antibodies (514Ser). Thereby explaining the reason for this mutation being subjected to a strong selection and being predominant in the CPV-2a population in Antioquia by replacing the viruses that lack these mutations. Furthermore, these mutations have been reported in Ecuador (De la torre et al., 2018) in a sample belonging to the CPV-2a antigenic variant, which is closely related to the Colombian CPV-2a variant.

In agreement with these amino acid variations in the CPV-2a variants of the present study and based on phylogenetic analysis results, it is possible that both the Colombian and Ecuadorian CPV-2a samples belong to the clade called South America I. This clade has the peculiarity of containing both South American CPV-2a and CPV-2b variants with the Ala297Asn mutation (Grecco et al., 2018). The phylogenetic evolutionary tree presented in Figure 2 shows a well differentiated large clade where all our CPV-2a samples are grouped along with the Ecuadorian CPV-2a. These samples share an identical amino acid sequence, although they differ in some nucleotide level changes that are synonymous variations.

Similarly, in our phylogenetic evolutionary tree construction, Brazilian CPV-2b variants,

containing the Ala297Asn mutation and which is present within the clade known as South America I, are most closely related to CPV-2a variants. Although the mutation in 297 groups our CPV-2a variants with variants belonging to the South America I clade, the unique mutations in 324 and 514 differentiate our samples from the others belonging to this clade. This suggests that the Colombian CPV-2 sequences configure a Colombian CPV-2a sub-variant within the CPV-2a variants belonging to the South American clade I, as postulated by Duque-García et al. (2017). The higher prevalence of the CPV-2a variant in Colombia, in relation to the findings in 2017, indicate that this new CPV-2a sub-variant (Ala514Ser) has undergone a positive selection in Antioquia, establishing itself as the antigenic variant of greater circulation in this region.

According to the phylogenetic analyses performed in the present study, it can be inferred that there are two antigenic variants (CPV-2a and CPV-2b) with different origins currently circulating in Antioquia, Colombia. However, the Colombian CPV-2a variants contain the Tyr324Ile mutation, which is characteristic of the variants belonging to the Asia I clade.

To clarify the origin of the two variants found in Antioquia, a phylogenetic evolutionary analysis was performed. This analysis can reveal whether the two variants have different origins or they present specific differential mutations while sharing a common origin.

The phylogenetic evolutionary analysis revealed that the Colombian CPV-2b variant shows a direct relationship with Asian variants that comprise the Asia I clade. This clade arrives in South America, initially in Uruguay in 2009, followed by Colombia in 2012. According to these results, the CPV-2b variant in Antioquia arrived in Colombia in a manner similar to that in Uruguay, i.e., it arrived directly from Asia and not as a migratory process within the continent from Uruguay to Colombia (Figure 3). In contrast, the Colombian CPV-2a variant was related to variants of the South American clade I, which originated from the European variants that subsequently underwent

evolutionary and migratory processes into the interior of the continent to finally configure a clade with characteristics of variants present only in South America (Grecco et al., 2018). According to the evolutionary analysis, the CPV-2a variant arrived in Colombia between 2005 and 2006.

Both the CPV-2a and the CPV-2b variant found in our study present the 324Ile mutation (Table 2 - Figure 4). This change has been previously reported in cats infected with CPV-2a (Mukhopadhyay et al., 2016), evidencing that it is an important amino acid in determining host range. Additionally, it has been recently shown that this amino acid residue is close to the virus-receptor interaction domain and that few structural changes are required in CPV-2 to be able to adapt and interact with TfR receptors from different species (Voorhees et al., 2019). This result supports the fact that this mutation has a strong positive selection and is present in all our samples (CPV-2a and CPV-2b). It is possible that other carnivorous species different to canines could be involved in determining the changes in VP2 supporting the adaptation of the virus to carry out an efficient replicative cycle.

5. Conclusion

The antigenic variants, CPV-2a and CPV-2b, circulating in Antioquia, Colombia, originated in the South America I clade and Asia I clade, respectively. The mutations detected in CPV-2a variant have gradually undergone positive selection that appears to favour the virus-receptor interaction, rendering this Colombian CPV-2a sub-variant the most predominant in the region. The antigenic implications of the 440Ala mutation in CPV-2b and those related to the virus-receptor interaction should be elucidated in future investigations, with special emphasis on the proximity to sites of virus-receptor and virus-antibody interactions.

Conflict of interests

The authors of this work do not have any personal or financial conflict or that may improperly influence the content of this document.

REFERENCES

- Agbandje, M., Parrish, C.R., Rossmann, M.G., 1995. The structure of parvoviruses. *Semin. Virol.* 6 (5), 299–309.
- Buonavoglia, C., Martella, V., Pratelli, A., Tempesta, M., Cavalli, A., Buonavoglia, D., Bozzo, G., Elia, G., Decaro, N., Carmichael, L., 2001. Evidence for evolution of Canine parvovirus type 2 in Italy. *J. Gen. Virol.* 82, 3021–3025.
- Chang, S.F., Sgro, J.Y., Parrish, C.R., 1992. Multiple amino acids in the capsid structure of canine parvovirus coordinately determine the canine host range and specific antigenic and hemagglutination properties. *J Virol.* 66(12):6858–67.
- Cotmore, S. F., Agbandje-McKenna, M., Chiorini, J. A., Mukha, D. V., Pintel, D. J., Qiu, J., Davison, A. J. 2013. The family Parvoviridae. *Archives of Virology*, 159(5), 1239–1247.
- De la Torre, D., Mafla, E., Puga, B., Erazo, L., Astolfi-Ferreira, C., Piantino Ferreira, A., 2018. Molecular characterization of canine parvovirus variants (CPV-2a, CPV-2b, and CPV-2c) based on the VP2 gene in affected domestic dogs in Ecuador. *Vet World.* 11: 2231-0916
- Decaro, N., Desario, C., Addie, D.D., Martella, V., Vieira, M.J., Elia, G., Zicola, A., Davis, C., Thompson, G., Thiry, E., Truyen, U., Buonavoglia, C., 2007. The study molecular epidemiology of canine parvovirus. *Europe. Emerg. Infect. Dis.* 13 (8), 1222–1224.
- Decaro, N., Desario, C., Elia, G., Martella, V., Mari, V., Lavazza, A., Nardi, M., Buonavoglia C., 2008. Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. *New Microbiol.* 2008 Jan;31(1):125-130.

- Desario, C., Decaro C., Campolo, M., Cavalli, A., Cirone, F., Elia, G., Martella, V., Lorusso, E., Camero, M., Buonavoglia, C., 2005. Canine parvovirus infection: Which diagnostic test for virus?. *J. Virol.*, 126: 179-185.
- Duque-García, Y., Echeverri-Zuluaga, M., Trejos-Suarez, J. and Ruiz-Saenz, J. (2017) Prevalence and molecular epidemiology of Canine parvovirus 2 in diarrheic dogs in Colombia, South America: A possible new CPV-2a is emerging? *Vet. Microbiol.*, 201: 56-61.
- Faz, M., Martínez, J., Bautista, L., Quijano-Hernández, I., Fajardo, R., Del Ángel-Caraza, J., 2018. Origin and genetic diversity of canine parvovirus 2c circulating in Mexico. *Arch. Virol.*
- Grecco, S., Iraola, G., Decaro, N., Alfieri, A., Gallo Calderon, M., da Silva AP., Name, D., Aldaz, J., Calleros, L., Marandino, A., Tomás, G., Maya, L., Francia, L., Panzera, Y., Perez, R., (2018) Inter-and intracontinental migrations and local differentiation have shaped the contemporary epidemiological landscape of canine parvovirus in South America. *Virus Evol* 4: vey 011
- Hong, C., Decaro, N., Desario, C., Tanner, P., Pardo, M. C., Sanchez, S., Buonavoglia, C. & Saliki, J. T., (2007). Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. *J Vet Diagn Invest* 19, 535–539.
- Hueffer, K., Parker, J.S.L., Weichert, W.S., Geisel, R.E., Sgro, J.Y., Parrish, C.R., 2003. The natural host range shift and subsequent evolution of canine parvovirus resulted from virus-specific binding to the canine transferrin receptor. *J. Virol.* 77 (3), 1718–1726.
- Ikeda, Y., Mochizuki, M., Naito, R., Nakamura, K., Miyazawa, T., Mikami, T., Takahashi, E., 2000. Predominance of Canine Parvovirus (CPV) in Unvaccinated Cat Populations and Emergence of New Antigenic Types of CPVs in Cats., *Virology.* 278, 13-19.

- Jeoung, S.Y., Ahn, S.J., Kim, D., 2008. Genetic analysis of VP2 gene of canine parvovirus isolates in Korea. *J. Vet. Med. Sci.* 70 (7), 719–722.
- Lee, H., Callaway, H., Cifuentes, J., Bator, C., Parrish, C., Hafenstein, S., 2019. Transferrin receptor binds virus capsid with dynamic motion. *pnas.* 116 (41), 20462-20471.
- Mylonakis, M., Kalli, I., Rallis, T., (2016). Canine parvoviral enteritis: an update on the clinical diagnosis, treatment, and prevention. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, Volume 7, 91–100.
- Miranda, C., and Thompson, G. (2016) ‘Canine Parvovirus: The Worldwide Occurrence of Antigenic Variants’, *Journal of General Virology*, 97: 2043–57.
- Mukhopadhyay, H., Nookala, M., Thangamani, N., Sivaprakasam, A., Antony, P., Thanislass, J., Srinivas, M., Pillai, R., 2016. Molecular characterisation of parvoviruses from domestic cats reveals emergence of newer variants in India. *Journal of Feline Medicine and Surgery.* 19(8) 846 –852
- Nakamura, M., Tohya, Y., Miyazawa, T., Mochizuki, M., Phung, H.T., Nguyen, N.H., Huynh, L.M., Nguyen, L.T., Nguyen, P.N., Nguyen, P.V., Nguyen, N.P., Akashi, H., 2004. A novel antigenic variant of Canine parvovirus from a Vietnamese dog. *Arch. Virol.* 149, 2261–2269.
- Palermo, L., Hafenstein, S., Parrish, C., 2006. Purified Feline and Canine Transferrin Receptors Reveal Complex Interactions with the Capsids of Canine and Feline Parvoviruses That Correspond to Their Host Ranges. *J. Virol.* 80 (17) 8482–8492

- Palermo, L., Hueffer, K., Parrish, C., 2003. Residues in the Apical Domain of the Feline and Canine Transferrin Receptors Control Host-Specific Binding and Cell Infection of Canine and Feline Parvoviruses. *J. Virol.* 77 (16), 8915–8923
- Parker, J. S., and C. R. Parrish. 2000. Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking. *J. Virol.* 74:1919–1930.
- Parrish, C., 1999. Host range relationships and the evolution of canine parvovirus. *Vet Microbiol.*, 69(1–2):29–40.
- Parrish, C., Aquadro, C., Strassheim, M., Evermann, J., Sgro, J., Mohammed, H., 1991. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *J Virol* [Internet]. 65(12):6544–52.
- Parrish, CR., Have, P., Foreyt, WJ., Evermann, JF., Senda, M., Carmichael, LE., 1988. The global spread and replacement of canine parvovirus strains. *J Gen Virol.* 69(5):1111–6.
- Pérez, R., Bianchi, P., Calleros, L., Francia, L., Hernández, M., Maya, L., Panzera, Y., Sosa, K., Zoller, S., 2012. Recent spreading of a divergent Canine parvovirus type 2a (CPV-2a) strain in a CPV-2c homogenous population. *Vet. Microbiol.* 155, 214–219.
- Reed, A., Jones, E V., Miller, TJ., 1988. Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. *J Virol* [Internet]. 62(1):266–76.
- Truyen, U., 2006. Evolution of canine parvovirus-A need for new vaccines? *Vet Microbiol.* 117(1):9–13.

- Truyen, U., Evermann, JF., Vieler, E., Parrish, CR., 1996. Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range. *Virology*. 215(2):186–9.
- Tsao, J., Chapman, M.S., Agbandje, M., Keller, W., Smith, K., Luo, M., Smith, T.J., Rossmann, M.G., Compans, R.W., Parrish, C.R., 1991. The threedimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science* 251 (5000), 1456–1464.
- Voorhees, I., Lee, H., Allison, A., Lopez-Astacio, R., Goodman, L., Oyesola, O., Omobowale, O., Fagbohun, O., Dubovi, E., Hafenstein, S., Holmes, E., Parrish, C., 2019. Limited intra-host diversity and background evolution accompany 40 years of canine parvovirus host adaptation and spread. *J. Virol.*
- Wang, H., Jin, H., Li, Q., Zhao, G., Cheng, N., Feng, N., Zheng, X., Wang, J., Zhao, Y., Li, L., Cao, Z., Yan, F., Wang, L., Wang, T., Gao, Y., Yang, S., Xia, X., 2015. Isolation and sequence analysis of the complete NS1 and VP2 genes of canine parvovirus from domestic dogs in 2013 and 2014 in China. *Arch Virol*. 161: 385–93.
- Xiao, C., Rossmann, MG., 2006. Interpretation of Electron Density with Stereographic Roadmap Projections. *J Struct Biol*, 10.1016/j.jsb.2006.10.013.
- Zhang, R., Yang, S., Zhang, W., Zhang, T., Xie, Z., Feng, H., Wang, S., Xia, X., 2010. Phylogenetic analysis of the VP2 gene of canine parvoviruses circulating in China. *Virus Genes* 40 (3), 397–402.
- Zhou, P., Zeng, W., Zhang X., Li, S., 2017 ‘The Genetic Evolution of Canine Parvovirus – a New Perspective’. *PLoS One*, 12: e0175035.

CONCLUSIONES GENERALES

1. Se realizó la secuenciación del gen que codifica para la proteína de cápside VP2, pudiendo identificar las variantes antigénicas del parvovirus canino circulantes en Colombia.
2. El análisis de la secuencia aminoacídica de las variantes halladas en el estudio, permite identificar que en Colombia circulan las variantes antigénicas CPV-2a (426Asn) y CPV-2b (426Asp), correlacionándose con los hallazgos hechos en 2017 por Duque-García et al., (2017)
3. El análisis filogenético permitió identificar que las dos variantes circulantes en Colombia tienen características diferentes respecto a su secuencia aminoacídica y por tanto la distribución filogenética las ubica en clados distintos.
4. El análisis evolutivo demuestra que la variante antigénica CPV-2a se relaciona con secuencias de origen suramericano y la variante CPV-2b se relaciona con variantes asiáticas, pero comparten una raíz común en Europa.
5. El análisis estructural determina que las mutaciones encontradas en la variante CPV-2a colombiana se encuentra en una zona de interacción virus-receptor, lo cual podría favorecer el fitness viral y explicar por qué es la variante predominante en Colombia.

RECOMENDACIONES GENERALES

1. Realizar secuenciación del CPV-2 en más regiones de Colombia, incluyendo regiones que compartan límite fronterizo con países como Ecuador, Venezuela, Brasil y Perú, con el fin de obtener más información sobre la evolución molecular del CPV-2 en el país y la posibilidad de encontrar otras variantes del virus.
2. Determinar las implicaciones funcionales que tienen las mutaciones encontradas en las variantes CPV-2 en este estudio, respecto a la incidencia en la unión virus-receptor y el posible impacto en la evasión de la neutralización por anticuerpos.
3. Determinar la eficiencia de la protección respecto a la respuesta a inmunidad cruzada generada por las vacunas comerciales contra las variantes del virus.
4. Continuar realizando estudios de caracterización molecular y filoevolutivos para observar los cambios a través del tiempo y determinar posibles variantes que estén expuestas a selección positiva por un posible escape por presión inmunológica, dada la alta capacidad del virus para mutar y adaptarse a diferentes hospederos carnívoros.