

# Primer reporte de parvovirus canino subtipo 2c (CPV-2c) en Cuba



## First report of canine parvovirus subtype 2c (CPV-2c) in Cuba

<https://cu-id.com/2248/v44e11>

<sup>✉</sup>Abdulahi Alfonso-Morales\*, <sup>✉</sup>Itamys C. García Villar, <sup>✉</sup>Moraima Pérez Gómez, <sup>✉</sup>Teresa Figueroa Barrios

Grupo de Investigación - Desarrollo, Dirección de Biotecnología, Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), Calle 3ra, No. 40759, entre 6ta y carretera de Tirabeque, Reparto La Unión, Boyeros, La Habana, Cuba.

**RESUMEN:** El parvovirus canino 2 (CPV-2) se reconoce a nivel mundial como el agente causal de una enfermedad contagiosa y altamente mortal en perros. Desde la primera aparición del CPV-2, seis variantes antigénicas (2, 2a, New 2a, 2b, New 2b y 2c) se han encontrado distribuidas en diferentes países. El presente estudio aporta datos sobre los subtipos de CPV-2 que circulan en Cuba, sus características moleculares y las relaciones genéticas y evolutivas. Se analizaron cincuenta y siete muestras de heces de perros con signos clínicos de parvovirus mediante hemaglutinación (HA), ELISA y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se detectó por hemaglutinación parvovirus canino (CPV) en 63,13 % y por ELISA el 66,67 % de las muestras. La caracterización de VP2 identificó el ácido glutámico en el residuo aminoacídico 426, característico del subtipo CPV-2c, en cinco muestras PCR positivas. El análisis filogenético evidenció que las cepas cubanas de CPV-2c mostraban una estrecha relación con la mayoría de las cepas de CPV-2c notificadas en el mundo. Las cepas de este subtipo 2c exhibieron una alta variabilidad, formando dos subgrupos: CPV-2c GI y CPV-2c GII. La filogenia demostró que todos los aislados de CPV-2c del presente estudio en Cuba formaron un grupo monofilético distante de las cepas prototípicas de CPV-2c de otros países (CPV-2c GII), estrechamente relacionadas con seis cepas de México y Estados Unidos de América exhibiendo la sustitución Thr440Ala. Este informe describe la primera detección de parvovirus canino subtipo 2c (CPV-2c) en Cuba.

**Palabras clave:** Caracterización molecular, CPV-2c, secuenciación, parvovirus canino, PCR, Cuba.

**ABSTRACT:** Canine parvovirus 2 (CPV-2) has been recognized worldwide as the causal agent of a contagious and highly fatal disease in dogs. Since the first appearance of CPV-2, six antigenic variants (2, 2a, New 2a, 2b, New 2b and 2c) have been distributed in different countries. The current study was conducted to provide data on CPV-2 subtypes circulating in Cuba, their molecular characterization and determine the evolutionary genetic relationships. Fifty-seven stool samples from dogs with clinical signs of parvovirus were tested using hemagglutination (HA), ELISA and a polymerase chain reaction (PCR). Canine parvovirus (CPV) was detected by hemagglutination in 63.13 % and by ELISA in 66.67 % of the samples. Based on VP2 analysis of five PCR-positive samples, glutamic acid at 426 amino acid residue, characteristic of CPV-2c subtype, were detected. Phylogenetic analysis showed that Cuban CPV-2c strains were closely related to most CPV-2c strains reported worldwide. This subtype 2c strains exhibited high variability, forming two subgroups: CPV-2c GI and CPV-2c GII. The phylogenetic analysis of VP2 amino acid sequence showed that all CPV-2c isolates from Cuba formed a monophyletic group distant from the prototypical CPV-2c strains from other countries (CPV-2c GII), closely related to six strains from Mexico and the United States of America, exhibiting Thr440Ala substitution. This report describes the first detection of canine parvovirus subtype 2c (CPV-2c) in Cuba.

**Key words:** Molecular characterization, CPV-2c, sequencing, canine parvovirus, PCR, Cuba.

### INTRODUCCIÓN

Durante la década de los años 70s una nueva enfermedad fue observada en los cachorros caninos en todo el mundo, caracterizada por gastroenteritis y miocarditis. Un virus pequeño y no envuelto fue evidenciado por microscopía electrónica en los tejidos de los animales afectados. Consecuentemente un nuevo parvovirus fue aislado en el cultivo de células caninas y felinas y denominado parvovirus canino tipo 2 (CPV-2), antigénicamente no relacionado al parvovirus canino tipo 1 o virus minuto canino (CMV o CPV-1) (1, 2). Este último ha sido reclasificado como *Carnivore bocaparvovirus 1* (género *Bocaparvovirus*), y está asociado con la mortalidad neonatal (3).

El CPV-2 es miembro de la familia *Parvoviridae* con un genoma ADN de simple cadena y polaridad negativa. Es un virus pequeño de 26 nm, icosaédrico. El ADN está compuesto por 5.2 kb con dos marcos abiertos de lectura, uno que codifica las proteínas no estructurales NS1 y NS2 y el otro las proteínas estructurales VP1 y VP2. La otra proteína estructural, denominada VP3, se forma por procesamiento proteolítico de la VP2. Estas tres proteínas estructurales forman la cápside viral, sin embargo la VP2 es la proteína mayor y es la que determina las variaciones antigénicas y el rango de hospedero (4). Este virus es capaz de infestar a los gatos y ocasionar una enfermedad indistinguible de la panleucopenia felina (5, 6).

\*Correspondencia a: Abdulahi Alfonso-Morales. E-mail: [abdulahi.alfonso@cenpalab.cu](mailto:abdulahi.alfonso@cenpalab.cu)

Recibido: 23/08/2022

Aceptado: 11/10/2022

Entre 1979 y 1980 fue detectada una nueva variante antigénica de CPV con el uso de anticuerpos monoclonales (AcM). Esta variante fue denominada parvovirus canino subtipo 2a (CPV-2a) (7, 8). En 1984 emerge otra nueva variante antigénica de CPV, la cual es nombrada como CPV-2b y se encuentra co-circulando con la variante CPV-2a en todo el mundo (8). Un nuevo mutante de CPV fue detectado por primera vez en Italia en el año 2000 (9) y denominado como CPV-2c. Después de la emergencia del CPV-2 en la década de los 70 y debido a su rápida evolución, las nuevas variantes antigénicas CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c han reemplazado completamente al CPV-2 original. Actualmente el CPV-2 no se encuentra en las poblaciones de perros y solamente está presente en formulaciones vacunales (10,11, 12). Estudios posteriores han demostrado que las tres variantes antigénicas están circulando en Europa, en todo el continente americano y en países asiáticos (8, 13). Adicionalmente se han identificado otras variantes denominadas New CPV-2a y New CPV-2b (14, 15, 16).

En 1981 se hizo el primer reporte de la enfermedad en Cuba, cuya introducción estuvo relacionada con la importación de caninos (17). Fresneda-Disotuar *et al.* (18) hicieron la primera caracterización molecular de un aislado cubano de 1991 de CPV, lo que demostró que el mismo correspondió a la variante CPV-2. En este estudio no se evidenció la presencia de las variantes CPV-2a y CPV-2b que circulaban en el mundo. Posterior a 1991 existe un desconocimiento de las variantes antigénicas virales de CPV que han circulado y circulan actualmente en Cuba. El monitoreo de las cepas de campo es fundamental para el conocimiento de la epidemiología del virus y el establecimiento de medidas de prevención (15). El Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) es la única empresa productora de vacunas preventivas contra la parvovirus canina en el país. Es una vacuna de subunidades proteicas (ALYb® PVCAN) basada en la cepa 3302, aislada en 1991 por el Laboratorio Central de Diagnóstico Veterinario del Instituto de Medicina Veterinaria, procedente de un perro joven con síntomas clínicos de parvovirus canina (19).

Para Cuba se hace necesario estudiar las características moleculares de las cepas circulantes actualmente, determinar los subtipos o variantes antigénicas y sus relaciones filogenéticas, evolutivas y epidemiológicas. La caracterización molecular de las cepas permitirá en un futuro su certificación para su uso en vacunas, así como la fabricación de sueros terapéuticos con la utilización de las cepas actuales y la obtención de métodos diagnósticos que reconozcan y diferencien entre las variantes virales. Por tales motivos el objetivo de este trabajo es determinar las características moleculares y filogenéticas de cepas de campo de CPV que actualmente circulan en el país.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colección de muestras y controles de cepas

Se colectaron muestras de heces fecales en perros con síntomas de gastroenteritis hemorrágica, sospechosos de padecer la parvovirus canina. Las muestras se colectaron en municipios de las provincias La Habana, Artemisa y Mayabeque en el año 2021. Las muestras se conservaron por congelación a -80°C para su análisis posterior. Se estudiaron un total de 57 muestras de campo sospechosas de contener CPV. Además se incluyó la cepa vacunal de referencia Cornell (ATCC, VR-2017™).

### Hemoaglutinación y confirmación antigénica

A partir de las muestras de heces fecales se realizó la prueba de hemoaglutinación (HA) en placas Costar® de fondo cóncavo (20). Brevemente, se utilizó sangre con anticoagulante de monos *Macaca rhesus*, lavada y ajustada al 1% en PBS 1X pH 6.1. Se hicieron diluciones de las muestras en base 2 hasta 8192 en 50 µL. El título fue definido como el recíproco de la última dilución con efecto hemoaglutinante. Se asume un título HA 1:64 como el valor mínimo hemoaglutinante para considerar una muestra positiva a CPV de acuerdo al procedimiento normalizado en nuestra institución. La confirmación antigénica se realizó por medio de un ELISA comercial de captura de antígeno de doble AcM desarrollado por el CENPALAB, PARVOtrap®, No. Reg. 779 del 13/12/2019 en la Oficina de Registro Sanitario de Productos de Uso Veterinario. Brevemente, tiras de placas Greiner Bio-One® de cuatro pozos se recubren con 1 µg/mL del AcM (3A42G9). Al pozo C (control positivo) se les fija el antígeno (cepa Cornell de CPV-2). Se adicionan de 0.5 a 1 g de muestra de heces al frasco diluyente, se agita y se vierten tres gotas de la muestra a los pozos A y B (duplicado). Se incuba 10 minutos a temperatura ambiente, se lava dos veces con el frasco de lavado y se adiciona a todos los pozos tres gotas del frasco que contiene el conjugado (AcM 2HF101-peroxidasa). Se incuba otros 10 minutos a temperatura ambiente y se lava tres veces con el frasco de lavado. Se añaden tres gotas del frasco sustrato a cada pozo y se incuba por 5 minutos. Si las muestras visualmente presentan una coloración con una intensidad mayor que el control negativo la misma se considera positiva a CPV-2. El pozo D representa el control negativo.

### Extracción de ADN y PCR

Para la extracción de ADN a CPV se seleccionaron muestras de heces con los títulos HA más elevados y con las reacciones más intensas por PARVOtrap®. La extracción de ADN se realizó con el empleo del estuche comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabri-

cante. Para el PCR diagnóstico a CPV se utilizaron los cebadores C4A (5' - CAAATAGAGCATTGGGCT-TACC - 3') y C4B (5'- CAATCTCCTTCTGGGATATCTTC - 3') descritos por Sharma *et al.* (21) que amplifica una región de 400 pb del gen de la VP2. Las condiciones de amplificación se adaptaron a las recomendaciones del estuche comercial GoTaq® Green Master Mix (Promega). Se diseñó una pareja de cebadores CPV-F1 (5'- ACATGGCAAACAAATA-GAGC-3') y CPV-R1 (5'- ATGAAGTCTTGGTTT-TAAGTCAG - 3') que amplifica otra región del gen de la VP2 con 618 pb que comprende cinco de los siete marcadores moleculares que definen los subtipos de CPV (13,15). La PCR de cada fragmento se realizó en 25 µL de volumen conteniendo 1X de GoTaq® Green Master Mix, 1 µM de cada cebador y 5 µL de ADN de la extracción. Las condiciones de termoperfil de ambos ensayos se ajustaron en 5 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos con 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto a 72°C, finalizando con 10 minutos a 72°C. Los productos de PCR fueron revelados por electroforesis en agarosa al 2% con tampón tris-borato-EDTA (TBE, siglas del inglés, tris-borate-EDTA) 0,5 X pH 8,4) teñidos con bromuro de etidio (0,5 g/mL) y visualizados en un transiluminador bajo luz ultravioleta. Se usó un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega).

#### **Purificación de los productos de PCR, secuenciación y análisis de similitud/identidad de secuencias por alineamiento por pares**

Los fragmentos amplificados se purificaron a partir del producto de PCR. Para esto se empleó el estuche comercial Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega) según las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN se midió en un NanoDrop 3300 (ThermoScientific). Para incrementar la calidad de la secuenciación se diseñó una pareja de cebadores internos del amplicón: CPV-F2 (5-TTTTGAGGCGTCTACACAAG-3') y CPV-R2 (5-TAAATCTCTCAGGTGTTTCTC-3') que contribuyen a que una misma región puede ser leída tres o cuatro veces. El servicio de secuenciación se contrató al Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil (CICDC) en San José de las Lajas, Mayabeque. Cada una de las reacciones de secuenciación se evaluó por triplicado. Las secuencias sentido y antisentido obtenidas de los amplicones se depuraron con el programa Chromas versión 2.6.6 (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>) y se ensamblaron con el programa BioEdit versión 7.2.5 (22). Las secuencias de los cebadores se eliminaron. La identidad de cada fragmento obtenido se verificó con un análisis de similitud/identidad de secuencias por alineamiento por pares a través de la herramienta BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

#### **Alineamiento múltiple de secuencias para caracterización molecular e inferencia filogenética**

Las secuencias de las cepas cubanas obtenidas se alinearon frente a 59 cepas referenciadas y otras obtenidas del Genbank de diferentes orígenes geográficos y clasificación. Para la caracterización molecular las secuencias obtenidas en Cuba se compararon frente a 20 cepas referenciadas que se corresponden con los subtipos de CPV-2 (M23255; M19296; FJ197846), CPV-2a (M24003; MN451669), New CPV-2a (AY742935; FJ197835), CPV-2b (DQ340409; M74849), New CPV-2b (AY742947; FJ222822) y CPV-2c (AY742942; FJ222821; KY818889; MT448705; MH705117; MN451684; JX475272; FJ005236). Se adicionó la cepa cubana de referencia 3302, aislada en 1991 y caracterizada molecularmente por Fresneda-Disotuar *et al.* (18) como CPV-2.

Para la inferencia filogenética además de las anteriores se adicionaron 39 cepas de los subtipos CPV-2 (GQ169552; FJ197847; M38245; GU392236; MN451695; MN451664), CPV-2a (EU659118; GU569948; M24000; DQ340405; MN451667), New CPV-2a (DQ340434; JX660690; MF177231; GQ379043; MW653256; LC621966; MK433554; KX268115), CPV-2b (AY742941; M74852; OK546060; MF177226; KU662350; MN451663), New CPV-2b (EU659121; EU659119; MF177280; KP682525; KX525921; LC621996; MK433551; KX268107) y CPV-2c (MF177257; MF177279; KP682528; GQ865519; MF177238; MF177262). Se empleó la cepa CU4 del Virus de la Panleucopenia Felina (FPV) (M24004) como cepa *outgroup*. El alineamiento múltiple se realizó con el uso de la herramienta Clustal W (23) implementada en el BioEdit versión 7.2.5 (22). En todos los casos se buscó la existencia de cambios de aminoácidos (aa) en las cepas aisladas en Cuba y en los marcadores moleculares referidos en la literatura relacionada con la subtipificación. Además se realizó el cálculo de la matriz de similitud de secuencia. Se empleó el programa Análisis de Genética Evolutiva Molecular (MEGA, siglas de inglés, Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 11 (24) para determinar la matriz de similitud de secuencia nucleotídicas y aminoacídicas. Se utilizó el programa jModelTest (25) para determinar el modelo de sustitución que mejor se ajusta al conjunto de datos para el marcador filogenético de 575 pb que se corresponde con un fragmento del gen VP2 que codifica para la proteína mayor de la cápside viral, la VP2. El mejor modelo de sustitución para el análisis de inferencia filogenética se seleccionó de acuerdo al Criterio de Información Bayesiano (BIC, siglas de inglés, Bayesian Information Criterion) (26).

## Inferencia filogenética

Las relaciones filogenéticas entre cepas de CPV basado en el fragmento de 575 pb del gen VP2 se analizaron por la metodología de máxima verosimilitud (ML, siglas del inglés, Maximum Likelihood). El análisis de ML se realizó con el empleo del programa MEGA versión 11 (24). Como entrada al programa se emplearon los datos generados por el mejor modelo de sustitución del programa jModelTest (25). Se ejecutaron los comandos para indicar el tipo de distribución de los datos, según el modelo de sustitución seleccionado para los mismos y los valores de frecuencia de sustitución para cada base y para la distribución de sitios variables e invariables del modelo de sustitución indicado por el BIC (26). Los niveles de confianza se estimaron en 1000 repeticiones de *bootstrap* (anglicismo sin traducción literal que por definición significa remuestreo con selección estadística).

## RESULTADOS Y DISCUSION

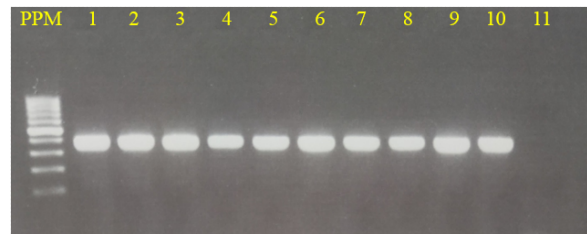
### Hemoaglutinación y confirmación antigénica

De las 57 muestras de campo de heces fecales colectadas en el 2021 en perros sospechosos de padecer la parvovirus canina al tener un cuadro compatible con gastroenteritis hemorrágica (vómitos, diarreas fétidas en ocasiones sanguinolentas, inapetencia, decaimiento y fiebre) (27), 36 resultaron positivas por HA (63,16 %). En 25 muestras el título hemoaglutinante fue igual o superior a 1:4096 (69,44 % de las muestras positivas y el 43,86 % del total de muestras), lo que demuestra una alta excreción de CPV en las heces fecales en el momento de la colecta. El resto de las muestras presentaron títulos HA entre 1:64 y 1:2048. La confirmación antigénica por ELISA de captura de antígeno (PARVOtrap®), detectó 38 muestras positivas a CPV (66,67 %), dos muestras más que las detectadas por HA, lo que demuestra la mayor sensibilidad del ELISA con doble AcM en la detección de los antígenos de CPV, su mayor rapidez y superior especificidad por el uso de monoclonales anti-CPV (28).

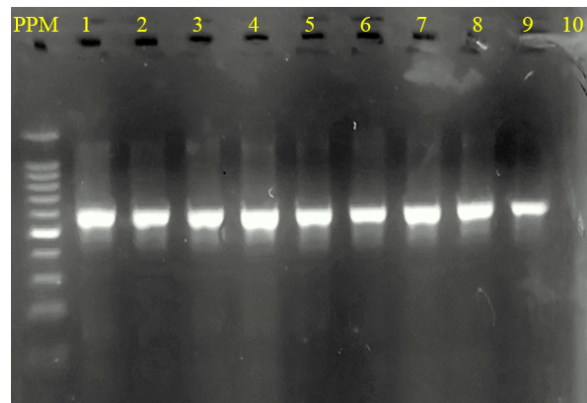
### Detección de CPV por PCR diagnóstico y secuenciación

A partir de las 36 muestras positivas a ambos ensayos, HA y PARVOtrap®, se seleccionaron las nueve más reactivas para el diagnóstico molecular por PCR, dando un 100 % de positividad a CPV con la presencia de bandas específicas de 400 pb tal como describe Sharma *et al.* (21) (Figura 1).

De las nueve muestras positivas a CPV se seleccionaron ocho para el PCR de secuenciación dando igualmente 100 % de positividad a CPV. En la figura 2 se aprecia las bandas específicas para un fragmento de 618 pb de acuerdo al diseño de los cebadores con el propósito de abarcar una región donde se concentren



**Figura 1.** Electroforesis de PCR diagnóstico Sharma *et al.* (21). PPM: Patrón de Peso Molecular de 100 pb (Promega). Línea 1: HF-1Cuba2021. Línea 2: HF-4Cuba2021. Línea 3: HF-6Cuba2021. Línea 4: HF-10Cuba2021. Línea 5: HF-22Cuba2021. Línea 6: HF-44Cuba2021. Línea 7: HF-47Cuba2021. Línea 8: HF-59Cuba2021. Línea 9: HF-62Cuba2021. Línea 10: Control positivo (Cepa Cornell). Línea 11: Control negativo. / *Diagnostic PCR electrophoresis Sharma et al. (21). Line PPM: Molecular weight marker 100 bp (Promega). Line 1: HF-1Cuba2021. Line 2: HF-4Cuba2021. Line 3: HF-6Cuba2021. Line 4: HF-10Cuba2021. Line 5: HF-22Cuba2021. Line 6: HF-44Cuba2021. Line 7: HF-47Cuba2021. Line 8: HF-59Cuba2021. Line 9: HF-62Cuba2021. Line 10: Positive control (Cornell strain). Line 11: Negative control.*



**Figura 2.** Electroforesis de PCR para secuenciación. PPM: Patrón de Peso Molecular de 100 pb (Promega). Línea 1: HF-4Cuba2021. Línea 2: HF-6Cuba2021. Línea 3: HF-10Cuba2021. Línea 4: HF-22Cuba2021. Línea 5: HF-44Cuba2021. Línea 6: HF-47Cuba2021. Línea 7: HF-59Cuba2021. Línea 8: HF-62Cuba2021. Línea 9: Control positivo (Cepa Cornell). Línea 10: Control negativo. / *Sequencing PCR electrophoresis. Line PPM: Molecular weight marker 100 bp (Promega). Line 1: HF-4Cuba2021. Line 2: HF-6Cuba2021. Line 3: HF-10Cuba2021. Line 4: HF-22Cuba2021. Line 5: HF-44Cuba2021. Line 6: HF-47Cuba2021. Line 7: HF-59Cuba2021. Line 8: HF-62Cuba2021. Line 9: Positive control (Cornell strain). Line 10: Negative control.*

la mayoría de los marcadores moleculares para la subtipificación de CPV (aminoácidos específicos).

De las ocho muestras positivas para el PCR de secuenciación se obtuvo el 62.5 % de las secuencias (cinco en total) con un tamaño de 575 pb después de ser eliminadas las regiones de los cebadores. El BLAST nucleotídico (BLASTn) contra el GenBank verificó la identidad de cada una de las secuencias para la región amplificada del gen VP2 de CPV. Los cromatogramas de las muestras restantes no tenían la calidad suficiente para la obtención de las secuencias



consenso. Todas las secuencias obtenidas se depositaron en la base de datos GenBank (Tabla 1) y en ninguna de las cepas se encontraron ni inserciones, ni deleciones, ni recombinaciones.

### Caracterización molecular de CPV.

En la tabla 1 se muestran los cambios aminoácidos de las cinco secuencias cubanas de CPV con respecto a cepas referenciadas depositadas en el Genbank en los marcadores moleculares descritos para esta entidad viral.

Como se puede apreciar el alineamiento demuestra que las cinco cepas cubanas pertenecen al subtipo CPV-2c, al poseer como aminoácido el ácido glutámico en la posición 426 de la proteína VP2. Esta sustitución N426E es un marcador molecular característico de todas las cepas del subtipo CPV-2c que han sido estudiadas a nivel mundial (5, 9, 29). El resto del patrón aminoácido A297, G300, Y305 y D375 se corresponde con los marcadores moleculares comunes en casi todas las cepas CPV-2c, New CPV-2a y New

CPV-2b (2, 30, 31, 32), por lo que el único marcador molecular distintivo de las cepas CPV-2c se encuentra en la posición 426 de la proteína VP2, la que se corresponde con la hemoaglutinina de CPV (33). La presencia de los residuos G300 y Y305 es la evidencia evolutiva de la adaptación del virus al huésped canino (30). El residuo 426 se ubica en el mayor sitio antigénico localizado en el cuarto lazo de la VP2 resultando en un cambio en antigenicidad permitiendo diferenciar los subtipos CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c con AcM (28).

El marcador molecular N426E define la presencia de cepas CPV-2c en Cuba, por lo que este constituye el primer reporte de la presencia de este subtipo viral en el país. Es de notar que la vacuna cubana (ALYb® PVCCan, CENPALAB) que se utiliza actualmente en el país, cepa 3302 aislada en 1991, corresponde al subtipo CPV-2 y presenta seis residuos aminoácidos completamente diferentes con respecto a la cepas circulantes CPV-2c identificadas en el 2021. Esta situación pudiera estar o no relacionada con posibles fallos vacunales (11,12). Sin embargo, hasta el momento

**Tabla 1.** Alineamiento de secuencia de aminoácidos deducidos del gen parcial VP2. / *Alignment of deduced amino acid sequences of the partial VP2 gene.*

Número de acceso Genbank	Cepa	Subtipo	Posición aminoácídica					
			297	300	305	375	426	440
			Posición nucleotídica					
			3675-3677	3684-3686	3699-3701	3909-3911	4062-4064	4104-4106
M24004	CU4 del FPV	-	S	A	D	D	N	T
M23255	Vacunal Cornell	2	S	A	D	N	N	T
No submitida	Vacunal ALYb® PVCCan 3302	2	S	A	D	N	N	T
JF197846	Vacunal Nobivac-Intervet	2	S	A	D	N	N	T
M19296	CPV-N	2	S	A	D	D	N	T
M24003	CPV-15	2a	S	G	Y	D	N	T
MN451669	CPV81	2a	S	G	Y	D	N	T
AY742935	CPV-U6	New 2a	A	G	Y	D	N	T
JF197835	CPVK13	New 2a	A	G	Y	D	N	T
M74849	39	2b	S	G	Y	D	D	T
DQ340409	BR183-85	2b	S	G	Y	D	D	T
AY742947	CPV-412	New 2b	A	G	Y	D	D	T
FJ222822	Vacunal Duramure Fort Dodge	New 2b	A	G	Y	D	D	T
FJ222821	56/00	2c	A	G	Y	D	E	T
AY742942	CPV-U51	2c	A	G	Y	D	E	T
KY818889	MX-SON1	2c	A	G	Y	D	E	A
MT448705	MX-ZAP C 2017	2c	A	G	Y	D	E	A
MH705117	MX-ZAP/149/2/17	2c	A	G	Y	D	E	A
MN451684	CPV611	2c	A	G	Y	D	E	A
JX475272	AL/362/12	2c	A	G	Y	D	E	A
FJ005236	110/07-27	2c	A	G	Y	D	E	A
ON260807	HF-4Cuba2021	2c	A	G	Y	D	E	A
ON260808	HF-6Cuba2021	2c	A	G	Y	D	E	A
ON260809	HF-47Cuba2021	2c	A	G	Y	D	E	A
ON260810	HF-59Cuba2021	2c	A	G	Y	D	E	A
ON260811	HF-62Cuba2021	2c	A	G	Y	D	E	A

**Tabla 2.** Similitud de secuencias de nucleótidos y aminoácidos deducidos entre cepas de CPV-2c de Cuba y otras cepas de CPV-2c basado en secuencias parciales de VP2. / *Nucleotide and deduced amino acid sequence similarity between CPV-2c strains from Cuba and other CPV-2c strains based on partial VP2 sequencing.*

Similitud nucleotídica								
	CPV-2c	CVP-2c G-I	CPV-2c G-II	HF-4Cuba2021	HF-6Cuba2021	HF-47Cuba2021	HF-59Cuba2021	HF-62Cuba2021
<b>CPV-2c</b>	99,14-100	-	-	99,28-100	99,28-100	99,28-100	99,28-100	99,14-99,86
<b>CPV-2c G-I</b>	-	<b>99,71-100</b>	99,14-99,71	99,28-99,71	99,28-99,71	99,28-99,71	99,28-99,71	99,14-99,57
<b>CPV-2c G-II</b>	-	99,14-99,71	<b>99,86-100</b>	99,86-100	99,86-100	99,86-100	99,86-100	99,71-99,86
Similitud aminoacídica								
<b>CPV-2c</b>	98,42-100	-	-	98,95-100	98,95-100	98,95-100	98,95-100	98,42-99,48
<b>CPV-2c G-I</b>	-	<b>99,48-100</b>	98,42-99,48	98,95-99,48	98,95-99,48	98,95-99,48	98,95-99,48	98,42-98,95
<b>CPV-2c G-II</b>	-	98,42-99,48	<b>99,48-100</b>	100	100	100	100	99,48

no tenemos evidencias de fallos con la vacuna de subunidades proteicas (ALYb® PVCAn). Existe mucha controversia en la comunidad científica internacional sobre la capacidad de las vacunas basadas en cepas del subtipo CPV-2 en proteger contra el resto de los subtipos antigénicos (12, 34, 35, 36, 37, 38).

Son pocos los estudios moleculares en la región del Caribe sobre la circulación de los subtipos virales de CPV. Gainor *et al.* (39) recientemente reportan en las islas Saint Kitts y Nevis la circulación del subtipo New CPV-2a, muy diferente al subtipo CPV-2c encontrado en Cuba. Los datos experimentales de algunos autores y las observaciones de campo han indicado un curso clínico más grave y altas tasas de mortalidad asociadas con la infección por CPV-2c, así como mayor capacidad para infectar y causar enfermedades en perros adultos a pesar de la vacunación frecuente (2, 12), sin embargo en Cuba no tenemos datos de campo que apoyen o no esta afirmación. En otros estudios no se evidencian asociaciones de CPV-2c con un curso más grave de la enfermedad (40, 41). El subtipo CPV-2c prevalece en algunos países como Italia, México, Argentina y Uruguay (2, 9, 40,42) siendo la única variante detectada en Uruguay hasta el 2006 (42). Sin embargo la prevalencia de un subtipo puede cambiar en un tiempo relativamente breve, el subtipo CPV-2c prevalecía en Uruguay en el 2006, sin embargo en el 2010 el subtipo CPV-2a emergió como variante predominante (43). Este país ha experimentado dos incursiones sucesivas, de los subtipos CPV-2c y CPV-2a de origen europeo y asiático, respectivamente. Estos resultados de procesos de aparición rápida respaldan la hipótesis de que los eventos de invasión de CPV no son raros en ciertas regiones geográficas e indican que algunas cepas actuales pueden exhibir una capacidad de invasión y reemplazo inesperadamente alta (43). En Cuba se requieren futuras investigaciones en otras regiones para confirmar si el subtipo CPV-2c es el único que circula actualmente en el país.

Es curioso observar como las cinco cepas cubanas del 2021 tiene una mutación característica con la presencia de alanina en la posición 440 de la VP2.

Esta particularidad de la mutación T440A solamente ha sido comprobada en las cepas CPV-2c cubanas y en seis cepas de CPV-2c de todo el mundo y se corresponde con tres cepas mexicanas (KY818889; MT448705; MH705117) (40) y tres cepas estadounidenses (MN451684; JX475272; FJ005236) (44,45) lo que presupone algún tipo de relación filogenética entre ellas, a pesar que en Estados Unidos predomina la circulación de las cepas CPV-2b (2). Igualmente el residuo 440 se ubica en el mayor sitio antigénico de la VP2, en el cuarto lazo de la proteína mayor de la cápside y resulta en otro cambio importante de antigenicidad de las cepas que pudiera ser significativo, lo cual debe ser demostrado experimentalmente (44). Esto está causado por una transición en la primera posición del codón (ACA → GCA) (14, 15, 16). A estas cepas con esta particularidad genética en este estudio se les considerará como Grupo II (GII) y así diferenciarlas del resto de las cepas que no lo poseen. Comúnmente las cepas CPV-2c y la mayoría de las cepas de los otros subtipos poseen treonina en la posición 440 (15, 16). Las cepas CPV-2c con treonina en la posición 440 se agruparán en el Grupo I (GI). Por lo que esta sustitución por alanina en las cinco cepas cubanas en dicha posición representa un posible marcador molecular evolutivo que pudiera estar relacionado o no a un comportamiento fenotípico. Sin embargo actualmente no tenemos evidencias con secuencias de cepas de años previos que relacionen los mismos con un cambio con el comportamiento de la enfermedad.

En la tabla 2 se puede observar la alta similitud nucleotídica y aminoacídica entre todas las cepas del subtipo CPV-2c. La similitud de secuencia nucleotídica y aminoacídica entre ellas estuvo entre un 99,86 y 100% y un 98,42 y un 100 % respectivamente. Faz *et al.* (40) encontraron valores similares entre el 98,4 y el 99,9 % cuando compararon las cepas mexicanas con otras del subtipo 2c.

Desde el punto de vista nucleotídico, en cuatro de las cinco cepas cubanas (HF-4Cuba2021, HF-6Cuba2021, HF-47Cuba2021 y HF-59Cuba2021) se aprecia un 100 % de similitud de secuencia con

las tres cepas mexicanas (KY818889, MT448705, MH705117). La primera de estas del año 2015 y las dos últimas del año 2017. También tuvo 100 % de similitud de secuencia con la cepa estadounidense (FJ005236) la cual fue coleccionada en el año 2007. Si analizamos la similitud aminoacídica se aprecia que igualmente esas cuatro cepas cubanas tienen un 100 % de similitud con las tres cepas mexicanas y con las tres cepas estadounidenses, todas ellas integrantes del GII. Sólo la cepa HF-62Cuba2021 se diferencia muy ligeramente del resto del GII por la presencia de una valina en la posición 418 de la secuencia aminoacídica de la proteína VP2. Esta mutación I418V es exclusiva hasta ahora de la cepa cubana HF-62Cuba2021 en todo el mundo.

### Inferencia filogenética

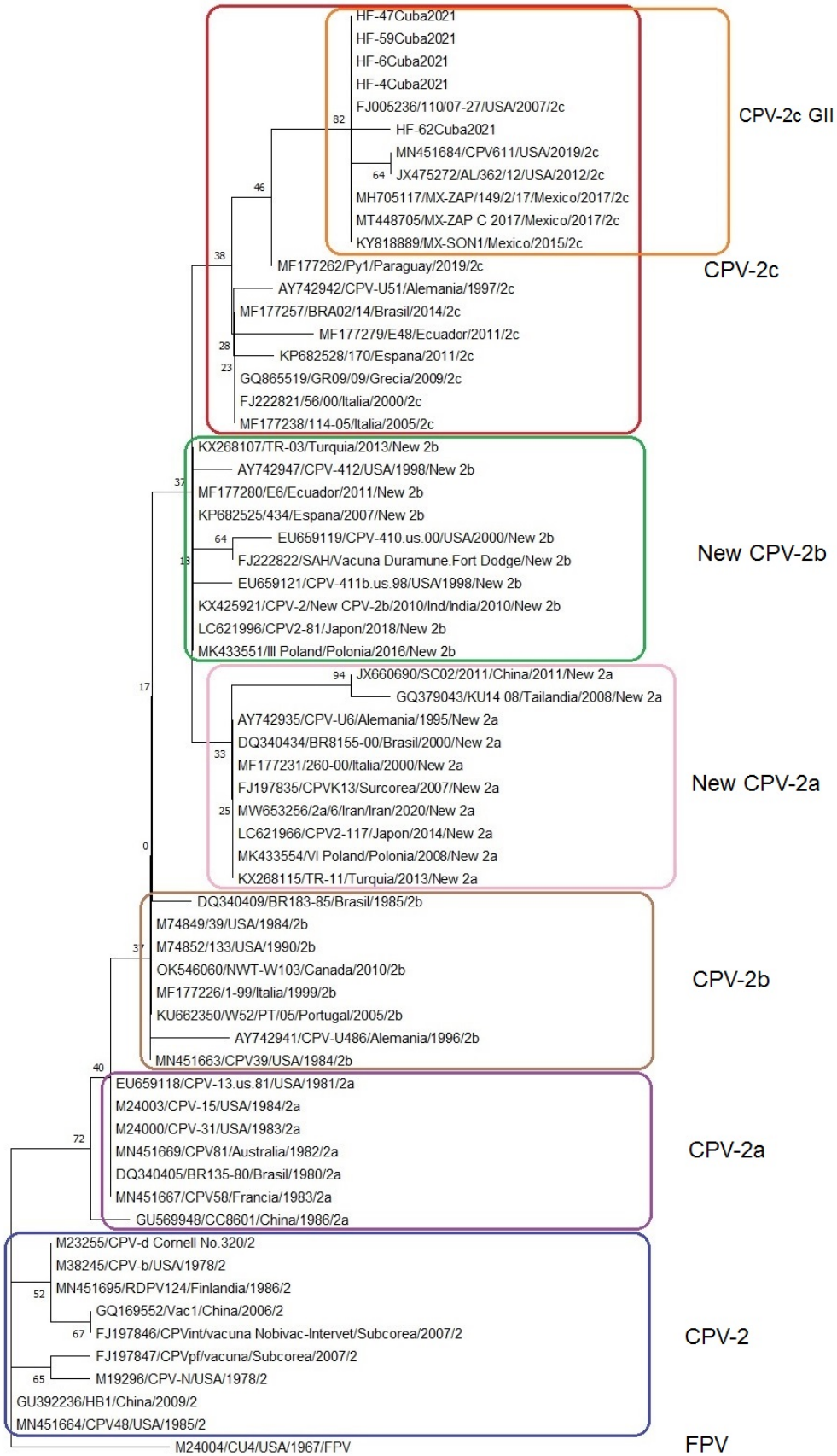
A pesar de que, para conseguir una inferencia más precisa de los subtipos de CPV algunos estudios han incluido el gen completo VP2 de la cápside viral (33), las secuencias parciales de VP2 se han usado ampliamente en los estudios filogenéticos (2, 44). Las relaciones filogenéticas entre las cepas de CPV se construyeron por ML con el empleo de las secuencias de una región de 575 pb del gen de la VP2 y que agrupa los cinco marcadores moleculares previamente descritos. El algoritmo dio resultados congruentes soportados por valores de confianza de moderados a altos dado por el porcentaje de *bootstrap* utilizando el modelo de sustitución *Tamura 3-parameter* propuesto por el BIC (26) con tasas uniformes (sin sitios invariantes y en ausencia de una distribución gamma).

El árbol de ML que muestra las relaciones filogenéticas entre las secuencias cubanas de CPV y secuencias de CPV de otras regiones geográficas del mundo se muestra en la figura 3. El mismo agrupó las cepas de los subtipos CPV-2, CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c, así como de los subtipos más recientemente descritos New CPV-2a y New CPV-2b y al FPV en grupos filogenéticos claramente diferenciados, demostrando que el marcador molecular de 575 pb seleccionado es capaz de construir la historia filogenética de las cepas de CPV sin necesidad de la secuencia completa del gen VP2 (46, 47, 48). El poder construir la historia filogenética con secuencias parciales permite ahorrar recursos, optimizar el tiempo y obtener más datos para un mayor número de muestras (2, 44). Las cepas cubanas de CPV analizadas en el presente trabajo se agruparon en el grupo que define a todas las cepas del subtipo CPV-2c, corroborando los hallazgos moleculares que las clasificaban como cepas CPV-2c. Este resultado se corresponde con lo descrito anteriormente donde se demuestra la alta similitud nucleotídica y aminoacídica entre estas cepas cubanas y las cepas

referenciadas de la variante CPV-2c. Sin embargo, la presencia de alanina en la posición 440 de la proteína VP2 generó una clara división filogenética del subtipo CPV-2c en dos grupos como previamente se denotó, el CPV-2c grupo I (CPV-2c GI) y CPV-2c grupo II (CPV-2c GII) (Figura 3). Así, las cepas cubanas de CPV-2c: HF-4Cuba2021, HF-6Cuba2021, HF-47Cuba2021, HF-59Cuba2021 y HF-62Cuba2021 que se colectaron en el año 2021 se ubicaron dentro de CPV-2c GII junto a tres cepas mexicanas (40) y tres cepas estadounidenses (44, 45) que previamente se describieron durante el proceso de caracterización molecular. El resto de las cepas internacionales que carecen de esta mutación se agruparon en el CPV-2c GI.

Es de notar como las cepas cubanas pertenecientes al GII, que son precisamente las que tienen la treonina 440 mutada por alanina, se agruparon en un linaje independiente dentro de las del subtipo CPV-2c y estas se relacionan filogenéticamente con cepas mexicanas y estadounidenses (40, 44, 45). La posición 440 está ubicada en la parte superior del sitio antigénico principal del virus (lazo 4 junto a la posición 426) y estos son uno de los pocos sitios de la VP2 que experimentan presión de selección positiva (32, 49). Su ubicación en un importante dominio de la VP2 y su ocurrencia en variantes filogenéticamente diferentes sugieren que A440 tiene un papel relevante en la evolución divergente y el surgimiento de nuevas cepas (41). Sin embargo, aún se desconocen las implicaciones de la mutación T440A que se observa más comúnmente en los subtipos CPV-2a y CPV-2b (40, 50).

Al ser este un descubrimiento muy reciente aportado por este estudio y sólo presente hasta ahora en seis cepas CPV-2c internacionales (40, 44, 45) y en las cinco cepas cubanas no existen trabajos previos que puedan sustentar este marcador molecular (T440A) con esta relación filogenética particular. Es curioso detallar que este agrupamiento de las cepas cubanas con cepas mexicanas y estadounidenses es precisamente con países con los cuales existe una estrecha relación geográfica y un movimiento importante de personas, muchas de ellas con sus mascotas, lo que puede sustentar esta relación filogenética y el posible movimiento de cepas de CPV entre estos países. Según Grecco *et al.* (33) es muy probable que CPV se propague entre países muy próximos geográficamente a través del movimiento de animales infectados o vectores mecánicos. Los subtipos CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c se están extendiendo actualmente a nivel mundial, y sus frecuencias relativas pueden estar relacionadas con la región geográfica y el momento de la recolección de las muestras, así como con los diferentes flujos comerciales de perros importados de países extranjeros (2, 8).



**Figura 3.** Inferencia filogenética del gen parcial VP2 de CPV. Árbol filogenético construido usando el método de máxima verosimilitud y el modelo Tamura 3-parameter con 1000 repeticiones de bootstrap. / Phylogenetic analysis based on the partial VP2 gene of CPV. Phylogenetic tree constructed using the maximum likelihood method and Tamura 3-parameter model with 1000 bootstrap replicates.



## CONCLUSIONES

Con este estudio de caracterización molecular e inferencia filogenética se logra el primer reporte de la circulación del subtipo 2c de parvovirus canino en Cuba (CPV-2c). Las mutaciones particulares de las cepas cubanas las agrupa en un nuevo linaje del subtipo 2c hasta el momento no descrito y relacionado con cepas mexicanas y norteamericanas.

## REFERENCIAS

1. Kelly WR. An enteric disease of dogs resembling feline panleucopaenia. *Aust Vet J.* 1978;54(12):593.
2. Qi S, Zhao J, Guo D, Sun D. A Mini-Review on the Epidemiology of Canine Parvovirus in China. *Front Vet Sci.* 2020;7:5.
3. González-Hein G, Huaracán B, Aguirre I. First report of molecular detection of Carnivore bocaparvovirus 1 (former CnMV: Canine Minute Virus) in Chilean domestic dogs. *Aus J Vet Sci.* 2020;52(2):63-65.
4. Reed AP, Jones EV, Miller TJ. Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. *J Virol.* 1988;62(1):266-76.
5. Charoenkul K, Tangwangvivat R, Janetanakit T, Boonyapisitsopa S, Bunpapong N, Chaiyawong S, et al. Emergence of canine parvovirus type 2c in domestic dogs and cats from Thailand. *Transbound Emerg Dis.* 2019;66(4):1518-1528.
6. Carrai M, Decaro N, Van Brussel K, Dall'Ara P, Desario C, Fracasso M, et al. Canine parvovirus is shed infrequently by cats without diarrhoea in multi-cat environments. *Vet Microb.* 2021;261:109204.
7. Parrish CR, O'Connell PH, Evermann JF, Carmichael LE. Natural variation of canine parvovirus. *Science.* 1985;230(4729):1046-1048.
8. Voorhees IEH, Lee H, Allison AB, Lopez-Astacio R, Goodman LB, Oyesola OO, et al. Limited Intrahost Diversity and Background Evolution Accompany 40 Years of Canine Parvovirus Host Adaptation and Spread. *J Virol.* 2019;94(1):e01162-19.
9. Buonavoglia C, Martella V, Pratelli A, et al. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *J Gen Virol.* 2001;82(12):3021-3025.
10. Parrish CR, Aquadro CF, Strassheim ML, Evermann JF, Sgro JY, Mohammed HO. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *J Virol.* 1991;65(12):6544-6552.
11. Decaro N, Buonavoglia C. Canine parvovirus post-vaccination shedding: Interference with diagnostic assays and correlation with host immune status. *Vet J.* 2017;221:23-24.
12. Decaro N, Buonavoglia C, Barrs VR. Canine parvovirus vaccination and immunisation failures: Are we far from disease eradication?. *Vet Microbiol.* 2020;247:108760.
13. Luna-Espinoza LR, Carhuaricra Huamán D, Quino Quispe R, Rosadio Alcántara RH, Maturrano Hernández AL. Carnivore protoparvovirus 1 in Peruvian dogs: Temporal/geographical and evolutionary dynamics of virus. *Infect Genet Evol.* 2022;99:105255.
14. Geng Y, Guo D, Li C, et al. Co-Circulation of the Rare CPV-2c with Unique Gln370Arg Substitution, New CPV-2b with Unique Thr440Ala Substitution, and New CPV-2a with High Prevalence and Variation in Heilongjiang Province, Northeast China. *PLoS One.* 2015;10(9):e0137288.
15. Inthong N, Kaewmongkol S, Meekhanon N, Sirinarumitr K, Sirinarumitr T. Dynamic evolution of canine parvovirus in Thailand. *Vet World.* 2020;13(2):245-255.
16. Chen Y, Wang J, Bi Z, Tan Y, Lv L, Zhao H, et al. Molecular epidemiology and genetic evolution of canine parvovirus in East China, during 2018-2020. *Infect Genet Evol.* 2021;90:104780.
17. Merino N, Rodríguez J, Joa R, Achon I, Cabo JL. Reporte de un brote de gastroenteritis hemorrágica canina. *Rev Cub Cienc Ve.* 1982;13(2):223-224.
18. Fresneda-Disotuar A, Contreras-González D, Paneque-Zayas M, de la Cruz-Verdura L, Veda Rueda C. Caracterización molecular de un aislamiento cubano de parvovirus canino. *VacciMonitor.* 2015;24(3):113-119.
19. Barrios M, Luya M, Reyna A, Lorenzo M, Achon I. Aislamiento de parvovirus de un perro con gastroenteritis hemorrágica. *Rev Cub Cienc Vet.* 1989;20(4):297-304.
20. Cavalli A, Martella V, Desario C, et al. Modified haemagglutination inhibition assay for the detection of canine parvovirus type 2 antibodies in dog sera. *Vet J.* 2021;274:105709.
21. Sharma P, Rastogi A, Kukreti K, Singh Narwal P. Sensitivity assay of polymerase chain reaction for detection of Canine Parvo Virus infection in dogs. *Open J Clin Diag.* 2012;2:45-47.
22. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series.* 1999;41:95-98.
23. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(24):4876-4882.

24. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol.* 2021;38(7):3022-3027.
25. Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol.* 2008;25(7):1253-1256.
26. Nei M. and Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics.* Oxford University Press, New York. 2000.
27. Ramos CP, Diniz AN, Ribeiro MG, de Paula CL, Costa ÉA, Sonne L, et al. Enteric Organisms Detected in Feces of Dogs With Bloody Diarrhea: 45 Cases. *Top Companion Anim Med.* 2021;45:100549.
28. Wang X, Zhang J, Huo S, Zhang Y, Wu F, Cui D, et al. Development of a monoclonal antibody against canine parvovirus NS1 protein and investigation of NS1 dynamics and localization in CPV-infected cells. *Protein Expr Purif.* 2020;174:105682.
29. Doan HTT, Le XTK, Do RT, Nguyen KT, Le TH. Canine parvovirus type 2c in Vietnam continues to produce distinct descendants with new mutations restricted to Vietnamese variants. *Arch Virol.* 2021;166(6):1741-1749.
30. de Oliveira PSB, Cargnelutti JF, Masuda EK, Weiblen R, Flores EF. New variants of canine parvovirus in dogs in southern Brazil. *Arch Virol.* 2019;164(5):1361-1369.
31. Ndiana LA, Odaibo GN, Olaleye DO. Molecular characterization of canine parvovirus from domestic dogs in Nigeria: Introduction and spread of a CPV-2c mutant and replacement of older CPV-2a by the "new CPV-2a" strain. *Virusdisease.* 2021;32(2):361-368.
32. Véliz-Ahumada Alexis A, Vidal S, Siel D, Guzmán M, Hardman T, Farias V, et al. Molecular Analysis of Full-Length VP2 of Canine Parvovirus Reveals Antigenic Drift in CPV-2b and CPV-2c Variants in Central Chile. *Animals (Basel).* 2021;11(8):2387.
33. Grecco S, Iraola G, Decaro N, Alfieri A, Alfieri A, Gallo Calderón M, et al. Inter- and intracontinental migrations and local differentiation have shaped the contemporary epidemiological landscape of canine parvovirus in South America. *Virus Evol.* 2018;4(1):vey011
34. de Oliveira Santana W, Silveira VP, Wolf JM, Kipper D, Echeverrigaray S, Canal CW, et al. Molecular phylogenetic assessment of the canine parvovirus 2 worldwide and analysis of the genetic diversity and temporal spreading in Brazil. *Infect Genet Evol.* 2022;98:105225.
35. Yip HYE, Peaston A, Woolford L, Khuu SJ, Wallace G, Kumar RS, et al. Diagnostic Challenges in Canine Parvovirus 2c in Vaccine Failure Cases. *Viruses.* 2020;12(9):980.
36. Woolford L, Crocker P, Bobrowski H, Baker T, Hemmatzadeh F. Detection of the Canine Parvovirus 2c Subtype in Australian Dogs. *Viral Immunol.* 2017;30(5):371-376.
37. Altman Kelman M, Barrs VR, Norris JM, Ward MP. Canine parvovirus prevention and prevalence: Veterinarian perceptions and behaviors. *Prev Vet Med.* 2020;174:104817.
38. Ford RB, Larson LJ, McClure KD, Schultz RD, Welborn LV. 2017 AAHA Canine Vaccination Guidelines. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2017;53(5):243-251.
39. Gainor K, Bowen A, Bolfa P, Peda A, Malik YS, Ghosh S. Molecular Investigation of Canine Parvovirus-2 (CPV-2) Outbreak in Nevis Island: Analysis of the Nearly Complete Genomes of CPV-2 Strains from the Caribbean Region. *Viruses.* 2021;13(6):1083.
40. Faz M, Martínez JS, Gómez LB, Quijano-Hernández I, Fajardo R, Del Ángel-Caraza J. Origin and genetic diversity of canine parvovirus 2c circulating in Mexico. *Arch Virol.* 2019;164(2):371-379.
41. Aldaz J, García-Díaz J, Calleros L, Sosa K, Iraola G, Marandino A, et al. High local genetic diversity of canine parvovirus from Ecuador. *Vet Microbiol.* 2013;166(1-2):214-219.
42. Pérez R, Francia L, Romero V, Maya L, López I, Hernández M. First detection of canine parvovirus type 2c in South America. *Vet Microbiol.* 2007;124(1-2):147-152.
43. Maya L, Calleros L, Francia L, Hernández M, Iraola G, Panzera Y, et al. Phylodynamics analysis of canine parvovirus in Uruguay: evidence of two successive invasions by different variants. *Arch Virol.* 2013;158(6):1133-1141.
44. Hong C, Decaro N, Desario C, Tanner P, Pardo MC, Sanchez S, et al. Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. *J Vet Diagn Invest.* 2007;19(5):535-539.
45. Decaro N, Desario C, Parisi A, Martella V, Lorusso A, Miccolupo A, Mari V, Colaianni ML, Cavalli A, Di Trani L, Buonavoglia C. Genetic analysis of canine parvovirus type 2c. *Virology.* 2009;385(1):5-10.
46. Ahmed N, Riaz A, Zubair Z, Saqib M, Ijaz S, Nawaz-Ul-Rehman MS, et al. Molecular analysis of partial VP-2 gene amplified from rectal swab samples of diarrheic dogs in Pakistan confirms the circulation of canine parvovirus genetic variant CPV-2a and detects sequences of feline panleukopenia virus (FPV). *Virology.* 2018;15(1):45.
47. Zienius D, Lelešius R, Kavaliauskis H, Stankevičius A, Šalomska A. Phylogenetic characterization of Canine Parvovirus VP2 partial sequences from symptomatic dogs samples. *Pol J Vet Sci.* 2016;19(1):187-196.

48. Ukwueze CS, Nwosuh CI, Obishakin EF, Anene BM, Ezeokonkwo RC, Owoludun OA, Chima NC, Luka PD. Genetic analysis and emergence of canine parvovirus type 2c in South Eastern Nigeria. *Iran J Vet Res.* 2020 Spring;21(2):141-145.
49. Liu C, Gao J, Li H, Sun F, Liang H, Liu H, Yi J. Phylogenetic Characteristics of Canine Parvovirus Type 2c Variant Endemic in Shanghai, China. *Viruses.* 2021;13(11):2257.
50. Mira F, Dowgier G, Purpari G, Vicari D, Di Bella S, Macaluso G, et al. Molecular typing of a novel canine parvovirus type 2a mutant circulating in Italy. *Infect Genet Evol.* 2018;61:67-73.

**Declaración de conflicto de intereses:** Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

**Contribución de los autores:** **Conceptualización, Curación de datos, Análisis formal, Investigación, Metodología, Supervisión, Visualización, Redacción-Borrador Original, Redacción-Revisión y Edición:** Abdulahi Alfonso Morales. **Conceptualización, Investigación y Revisión:** Itamys García Villar y Teresa Figueroa Barrios. **Investigación:** Moraima Pérez Gómez.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)