

Aspectos moleculares del virus de la parvovirusis canina y sus implicaciones en la enfermedad¹

César A. Díaz R.* / Jairo Jaime Correa**
Víctor Julio Vera A.***

RESUMEN

El parvovirus canino tipo 2 (CPV-2) es el agente causal de una enfermedad infecto-contagiosa que produce una gastroenteritis aguda hemorrágica que afecta a caninos jóvenes. El CPV-2 se adaptó a la especie canina por mutación del virus de la Panleucopenia felina (FPV) luego de su paso por animales silvestres como el hurón y los zorros. La alta variabilidad de la proteína viral 2 (VP2) es la causa principal del amplio rango de hospedadores y de las reacciones cruzadas entre las variantes. En la actualidad, la secuenciación de esta proteína ha permitido identificar tres variantes del virus conocidas como 2a, 2b y 2c que conviven en el mundo con diferencias en tropismo celular, infecciosidad y patogenicidad. El virus ssADN ha presentado una gran variación génica en cortos períodos de tiempo lo que indica un alto grado de selección por evolución sólo comparable con virus RN, esta alta variabilidad no se ha aclarado totalmente. El empleo de las técnicas moleculares permitirá diferenciar entre cepas vacunales y de campo, tanto como contar con técnicas diagnósticas confiables y específicas.

Palabras clave: parvovirus, caninos, gastroenteritis canina, variantes virales.

MOLECULAR ASPECTS OF CANINE PARVOVIROSIS AND ITS CONSEQUENCES IN THE DISEASE

ABSTRACT

Parvovirus canine type 2 is the causal agent of an infected - contagious disease that produces a hemorrhagic and acute gastroenteritis that affects young canines. The CPV-2 adapted to the canine species by mutation of the virus of the feline Panleucopenia (FPV) through their passage by wild animals like the ferret and the foxes. The great variability of the viral protein VP2 is the main cause of the wide host range, and crossed reactions among variants. The VP2 sequence has allowed identifying three variants of the virus like 2a, 2b and 2c which coexist in the world with differences in cellular tropism, pathogenesis and infection. The high genetic variation of a virus ssDNA in short periods of time indicates a high degree of selection by evolution just compared to RN virus. This high variation has not been completely clarified. The molecular techniques will allow differencing between vaccine strain and field strain as well as to have reliable and specific diagnosis techniques.

Key words: Parvovirus, Canine, Hemorrhagic Gastroenteritis, Viral variants

¹ Grupo Microbiología y Epidemiología Veterinaria Universidad Nacional de Colombia.

* Médico Veterinario de la Universidad de La Salle M.Sc. en Reproducción Animal de la Universidad Nacional de Colombia. Docente de la Universidad de La Salle. Correo electrónico: cdiaz@lasalle.edu.co

** Médico Veterinario de la Universidad Nacional de Colombia. MSc. PhD. en Virología Veterinaria. Docente Asociado de la Universidad Nacional de Colombia. Correo electrónico: jjaimec@unal.edu.co

*** Médico Veterinario Zootecnista de la Universidad Nacional de Colombia. MSc. PhD. en Virología Veterinaria. Docente Asociado Universidad Nacional de Colombia. Correo electrónico vveraa@unal.edu.co

INTRODUCCIÓN

El virus de la Parvovirus canina (CPV) pertenece a la familia *Parvoviridae*, los cuales son virus eicosáedricos, sin envoltura lipídica, con un genoma compuesto por una hebra de DNA en sentido negativo (ssDNA -), esta familia está dividida en dos subfamilias basadas en su rango de hospederos: *Parvovirinae* que infecta a vertebrados y *Densovirinae* que afecta a insectos y artrópodos (Cotmore & Tattersall, 2007). La subfamilia *Parvovirinae* presenta los géneros *amovirus*, *bocavirus*, *dependovirus*, *erythrovirus* y *parvovirus* (Cotmore & Tattersall, 2007). El virus de la parvovirus canina se comenzó a describir en los años 70 como una variante del virus de la Panleucopenia felina (Goff, 2001, Ariza y col., 2005), desencadenando una gran pandemia. La enfermedad está caracterizada por gastroenteritis aguda de tipo mucoide que en 24 a 48 horas se transforma en sanguinolenta, vómito abundante, pérdida del apetito, fiebre, deshidratación marcada y leucopenia (Decaro *et al.*, 2006). En cachorros puede presentar muerte súbita por miocarditis aguda (Url & Schmidt, 2005) y puede alcanzar hasta un 100% de morbilidad y 75% de mortalidad (Simpson *et al.*, 2002). Al comienzo de la pandemia el virus se identificó como la variante CPV-2, para distinguirlo del virus no relacionado con problemas entéricos CPV-1 conocido como el virus del minuto canino (Goff, 2001; Decaro, 2006). En un lapso menor de un año el virus mutó (Carmichael, 1999) y se transformó en la variante CPV-2a, lo cual ocasionó una rápida pandemia en menos de dos años (Ros, 2006). De esta variante se conocen los subtipos CPV-2a y CPV-2b que han sido identificados por anticuerpos monoclonales y presentan pequeñas variaciones en las secuencias de aminoácidos de las proteínas virales. Actualmente se ha identificado una tercera variante (CPV-2c) en Italia, Reino Unido, Alemania, Indonesia, Malasia, Uruguay y Argentina (Pereira, 2007). En Colombia la enfermedad fue identificada por primera vez en 1982 con una alta

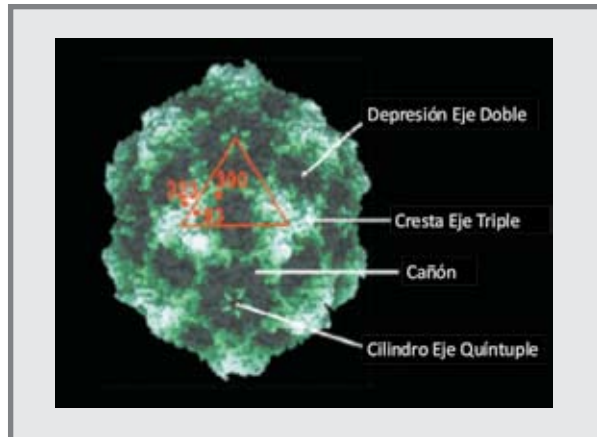
morbilidad y mortalidad en cachorros (Ariza, 2005). El diagnóstico de la enfermedad se puede realizar por histopatología (Langelveld, 1993), pruebas de aglutinación en látex a partir de muestras de heces (Ariza, 2005), ELISA (Url, 2005), pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (Nakamura, 2004; Decaro, 2006), hibridación del DNA o el aislamiento en líneas celulares caninas (Patial, 2007).

ORIGEN Y VARIABILIDAD DEL VIRUS DE LA PARVOVIROSIS CANINA CPV-2

Se han postulado varias hipótesis acerca del origen del CPV-2, una incluye la mutación directa del virus de la Panleucopenia felina (FPV) (Appel, 1979), otros por mutación a partir de cepas vacunales del FPV o por adaptación a nuevos hospedadores a partir de carnívoros no domésticos como tejones y zorros (Truyen, 1992). Otra teoría incluye el mantenimiento del virus del FPV en granjas de producción de minks con alta densidad poblacional (Truyen, 2006). La homología del DNA del CPV-2 y del FPV es cercana la 99% (Goff, 2001; Ros, 2006) los dos virus se diferencian por la capacidad de infectar cultivos de células, mientras el CPV-2 es capaz de replicarse eficientemente en líneas celulares de felinos y caninos, el FPV solo es capaz de hacerlo en líneas celulares felinas (Hueffer, 2003), además, muestran diferencias al inocularse en animales, es así como el FPV puede infectar células tímicas de canino después de una inoculación oral mientras el CPV-2 no es capaz de replicarse eficientemente en gatos (Hueffer, 2003; Pérez, 2007).

La evolución del CPV-2 ha requerido de cambios consecutivos en tres aminoácidos esenciales en la región correspondiente a la depresión de la cápside que está asociada con el receptor celular a la transferrina (TfR Figura 1) que actúa como receptor al virus (Simpson, 2002).

FIGURA 1. MODELO DE LA ESTRUCTURA DE LA CÁPSIDE DEL CPV. LAS ÁREAS EN ROJO ENTRE LA CRESTA DEL EJE TRIPLE CORRESPONDE A LAS REGIONES ACTIVAS DEL TROPISMO CELULAR Y ACTÚAN COMO RECEPTORES PARA LA CÉLULA HOSPEDADORA.



Fuente: adaptado de Hueffer K. and Parrish C., 2003.

Estudios moleculares retrospectivos han determinado que la primera gran variación del CPV se presentó en la posición 564 donde se reemplazó una Ser por un Asn y en la posición 568 una Gly por una Ala, lo que amplificó la capacidad infecciosa del virus de la FPV a tejones y zorros; posteriores mutaciones en las posiciones 93 (Lys por Asn) y 323 (Asp por Asn) permitieron, en 1978, la aparición del CPV-2. En 1979 se reportan otras dos mutaciones en las posiciones

87 (Leu por Met) y 300 (Ala por Gly) que dan origen a las variantes CPV-2a y CPV-2b. En 1998 ocurre una nueva mutación importante donde se sustituye una Ser por una Ala en la posición 295 que le permite una rápida difusión en las poblaciones y una mayor patogenicidad que se conoce como la variante CPV-2c (Luengo, 1999; Truyen, 2006; Martella, 2007, Pereira, 2007) (Ver Tabla 1). En la actualidad la variante CPV-2c está ampliamente distribuida en Italia donde circula en compañía de las variantes 2a y 2b (Martella, 2007). Análisis antigénicos y genéticos de aislamientos han demostrado que el CPV-2c está progresivamente reemplazando a las otras dos variantes en perros de Italia (Martella, 2007; Pereira, 2007) Vietnam (Nakamura, 2004), España, Alemania y Reino Unido (Cotmore, 2007).

En el CPV-2 los cambios en los residuos 93, 300 y 323 de la proteína viral 2 (VP2) han sido asociados con el control del rango de hospedadores tanto caninos como felinos (Hueffer, 2003), lo anterior se ha manifestado como cambios en la estructura de la cápside que permiten una mayor o menor avidez por el receptor TfR de las células (Simpson, 2002). El FPV presenta cambios principalmente a nivel del residuo 300 que sólo permite una unión estrecha con el receptor de las células felinas y no caninas.

TABLA 1. SUSTITUCIONES DE AMINOÁCIDOS RELEVANTES DE LA PROTEÍNA VIRAL 2 VP2 EN LA EVOLUCIÓN DEL FVP Y CPV.

Virus	80	87	93	297	300	305	323	426	555	564
FVP	K	M	K	S	A	D	D	N	V	N
CPV2	R	M	N	S	A	D	N	N	V	S
CPV2a	R	L	N	S	G	Y	N	N	I	S
CPV2b	R	L	N	S	G	Y	N	D	V	S
CPV2c(a)	R	M	N	A	D	Y	N	N	V	S
CPV2c(b)	R	L	N	A	D	Y	N	D	I	S

A: Alanina D: A. aspártico G: Glicina I: Isoleucina K: Lisina L: Leucina M: Metionina N: Asparragina V: Valina R: Arginina S: Serina

Fuente: modificado de Truyen, 2006.

El TfR se considera el receptor celular para el ingreso del CPV (Simpson, 2002), se ha estudiado en detalle y se expresa con una alta densidad en células en crecimiento y con alta tasa de división mitótica (Hueffer, 2003; Suikkanen, 2003). Una vez el virus se ha unido al receptor TfR en regiones RAFT's de la membrana celular, inicia un proceso de endocitosis mediada por clatrina y es transportado a través de endosomas reciclados (Suikkanen, 2003; Cotmore, 2007). La acidificación del endosoma es necesaria para la exposición de la porción amino terminal de la proteína viral 1 (VP1) y así liberar las partículas víricas lentamente al citosol (Vihinen-Ranta, 1998; Suikkanen, 2003; Cotmore, 2007). La porción amino terminal de la VP1 ha demostrado ser un localizador nuclear del CPV y el virus del minuto del ratón (VMR) y se ha postulado que esta región amino terminal posee acción fosfolipasa A₂ (PLA₂) que es necesaria para la salida de los endosomas, el ingreso de las partículas virales al núcleo y la activación temprana de genes (Vihinen-Ranta, 1998; Suikkanen, 2003). La liberación de la partícula viral del endosoma se ha demostrado que ocurre sin la ruptura de la membrana, como sí ocurre en los adenovirus, este cambio en la permeabilidad de la membrana endosomal ocurre por interacción con los lípidos Fosfatidil-inositol bifosfato (PtdIns(3,5)P₂), esfingolípidos y sulfátidos por la acción PLA₂ de la VP1. Suikkanen *et al.* (2003) demostraron estas alteraciones en la permeabilidad al coinfectar partículas del VPV adosadas a polímeros de Dextrán de tamaño 3000 y 10000, luego del proceso de infección fue posible localizar las partículas virales con el polímero Dextrán 3000 en el núcleo de la célula mientras que las que fueron adosadas con partículas de Dextrán 10000 sólo se encontraron en las vesículas cercanas al núcleo exclusivamente.

CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DEL VIRUS DE LA PARVOVIROSIS CANINA 2 (CPV-2.)

El virus de la Parvovirus canina es un miembro la familia *Parvoviridae*, virus autónomos replicativos, la cual comprende los virus adeno-asociados (Battilani,

2006) y la subfamilia *parvovirinae*. A esta subfamilia pertenece los virus del minuto (CMV) (Ros, 2006), Parvovirus canino CPV-2, Virus de la panleucopenia felina (FPV) y el virus B19 causante de enfermedades abortivas en humanos (Goff, 2001). Esta familia está compuesta por virus DNA de una sola hebra de polaridad negativa de 5.2 kpb (Pérez, 2007) con dos marcos de lectura que codifican para proteínas no estructurales (NS) y estructurales (VP). Las proteínas estructurales son VP1 (83 kDa) y VP2 (67 kDa) las cuales son transcritas en forma alternada por cortes en el RNAm, dado que la secuencia de la VP2 está completamente contenida dentro de la VP1 (Reed, 1988). Pequeños cambios en la secuencia de aminoácidos de la VP2 son los causantes de las relevantes diferencias biológicas de las variantes virales. Esta familia posee cápside eicosaédrica tipo T1, de 280 Å de diámetro, consistente en 60 copias de VP1 y VP2 (Simpson, 2002). La región amino terminal de la VP2 se externaliza en cápsides conteniendo ssDNA para formar canales de 5 vértices ricos en glicina. La estructura del CPV muestra pequeñas espículas sobre el eje 3, pequeños hoyuelos sobre el eje 2 y depresiones sobre el eje 5 que conforman el receptor viral a las células hospedadoras (Simpson, 2002). Por acción de proteasas del hospedador la VP2 es clivada y convertida en VP3 (63 kDa), la cual es necesaria para la interacción con las membranas celulares (Paradiso, 1982; Langelveld, 1993; Suikkanen, 2003).

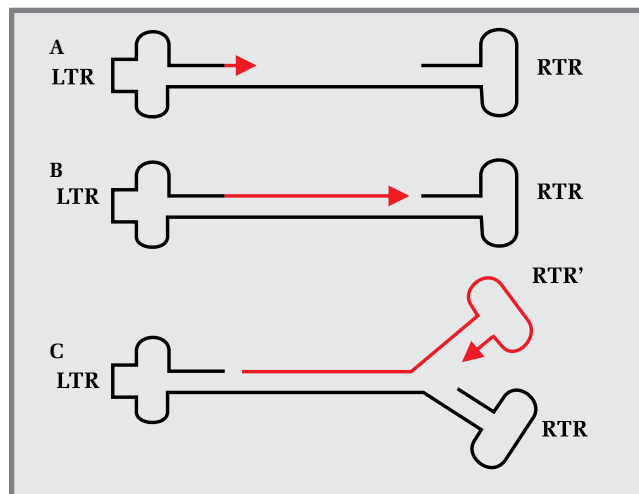
EXPRESIÓN GENÓMICA Y REPLICACIÓN VIRAL

La cápside de los parvovirus es altamente resistente a condiciones fisicoquímicas por su conformación eicosaédrica, resiste la inactivación a temperaturas inferiores a 70°C (Ros, 2006). Estudios han demostrado que el virus no se decapsida antes de llegar al núcleo de la célula y que llega ensamblado. El poro nuclear permite el ingreso de partículas de hasta 39 nm que son mayores que el tamaño del virus (Bartlett, 1999; Ros, 2006). El mecanismo por el cual se produce la replicación del

genoma no está clarificado del todo, se postulan dos hipótesis: (1) el virus entra completo al núcleo y por un poro presente en la simetría del pentámero (Eje quintuple) pueden penetrar algunos componentes de los procesos de replicación viral e iniciarla (Ros, 2006). (2) Una vez la cápside llega al núcleo el material genómico es liberado dentro y la maquinaria celular se encarga de iniciar los procesos de transcripción y traducción (Ros, 2006). Las secuencias en los extremos 3' y 5' son diferentes en el DNA del CPV que son dos secuencias auto complementarias en los extremos del genoma y hacen que el DNA se pliegue sobre sí mismo formando dos ganchos dándole la apariencia de T o Y (Patial, 2007). Los parvovirus usan dos promotores durante la expresión de su genoma. El primero para las proteínas no estructurales o proteína reguladora localizada en la posición 4 del extremo izquierdo del mapa genómico

(Patial, 2007) y el segundo es para las proteínas estructurales y está localizado en la posición 38. El transcripto del promotor de las proteínas reguladoras es primero sellado por una metilación y luego agregada la cola de poliadeninas. Una pequeña porción del genoma es removida entre las posiciones 46 – 48 (Patial, 2007). Esta molécula puede ser usada directamente como RNAm para la NS-1 o ser cortada entre las posiciones 8 a 38 para dar origen a un segundo RNAm que da origen a la NS-2 (Cotmore, 2007). Las proteínas estructurales VP1 y VP2 usan una estrategia similar, la primera se obtiene por transcripción a un RNAm desde la posición 38 hasta la 96 con un corte entre las bases 2317 a la 2399. La VP2 se obtiene por un corte entre las posiciones 2280 y la 2377. La VP3 ocurre por un corte por proteasas después de la traducción a proteína (Cotmore, 2007; Patial, 2007).

GRÁFICO 1. ESQUEMA DE REPLICACIÓN DEL PARVOVIRUS CANINO. A. LOS EXTREMOS COMPLEMENTARIOS LTR Y RTR FORMAN LAZOS PARA ACTUAR COMO INICIADORES DE LA REPLICACIÓN. B. LA DNA POLIMERASA INICIA LA REPLICACIÓN DEL GENOMA. C. SE INICIA EL DESPLAZAMIENTO DE LA HEBRA ORIGINAL.



Fuente: adaptado de Voyles, 2003.

La replicación del virus se inicia por los extremos auto complementarios (LTR y RTR) 5' Y 3', los cuales, al formar los lazos sirven como iniciadores para la DNA polimerasa del hospedador, la cual se expresa en células con una alta tasa de división y en fase S del ciclo celular (Cotmore, 2007). La DNA polimerasa inicia la replicación en sentido 5' – 3'

hasta el extremo RTR, donde inicia el desplazamiento de la hebra original (ver Gráfico 1), al llegar al extremo LTR se termina la replicación y la nueva molécula de DNA positivo sirve como plantilla para la formación de nuevas hebras DNA de sentido negativo que pueden ser empaquetadas dentro de los viriones (Cotmore, 2007).

LA ENFERMEDAD

La vía más común de infección es la vía oro-nasal (Decaro, 2006), la fuente principal de partículas virales la constituye las heces infectadas provenientes de animales enfermos (Appel, 1979). El período de incubación puede ser de 3 a 10 días (Carmichael, 1999). Los sitios de replicación primarios son el tejido linfoide como amígdalas, nódulos linfoides y tracto gastrointestinal (Luengo, 1999). Después se inicia la viremia la cual presenta altos títulos de DNA viral. Los patrones de difusión a los tejidos después de la viremia son similares entre las variantes CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c revelando que tienen el mismo comportamiento biológico. Los principales sitios de replicación son los tejidos con alta tasa de división mitótica como médula ósea, órganos linfoides y criptas intestinales (Appel, 1979; Decaro, 2006; Cotmore, 2007; Decaro, 2007). En el FPV se ha detectado la presencia de genoma viral y partículas virales en tejido nervioso de gatos (Paltrinieri, 2007) mientras que no se ha podido detectar la presencia de partículas víricas en caninos infectados con el CPV, utilizando técnicas inmunistoquímicas de avidina - biotina, a pesar de presentar signos de degeneración neuronal como desintegración del perikarion, vacuolización del neuropilo en el cuerpo geniculado lateral (Url, 2005). Decaro (2007) demostró la presencia de DNA viral por medio de PCR en tiempo real en cerebro, cerebelo y bulbo raquídeo de cachorros infectados experimentalmente con CPV. La no presencia de partículas virales pero sí de genoma viral puede estar indicando fallas en los procesos de ensamblaje del virus o de síntesis de proteína en las neuronas de caninos infectados con CPV, lo cual requiere de mayores estudios.

Los títulos virales en el epitelio intestinal son menores pero más persistentes que los obtenidos en el tejido linfoide y alcanza su pico máximo entre los 5 a 7 días pos-infección (Cotmore, 2007; Decaro, 2007) y persiste por varias semanas, antes de desaparecer

del contenido intestinal (Decaro, 2007) dado los altos niveles de anticuerpos presentes en el lumen intestinal.

A nivel gastrointestinal el daño histopatológico más encontrado es necrosis subaguda que afecta la mucosa en todo su espesor, caracterizada por un acortamiento de las vellosidades intestinales, con fusión de los extremos, desestructuración completa de arquitectura glandular en el fondo de las criptas y una moderada reacción inflamatoria (Luengo, 1999).

Los cachorros menores de 16 semanas pueden presentar un cuadro de miocarditis aguda con una alta tasa de mortalidad (Langelveld, 1993). Se ha discutido sobre la diferencia en patogenicidad de las variantes del CPV-2, algunos autores mencionan que las variantes CPV-2b y CPV-2c producen signos más hemorrágicos y con mayores lesiones que la variante CPV-2a (Carmichael, 2005; Decaro, 2006).

DIAGNÓSTICO

Se han desarrollado varios métodos diagnósticos para detectar en forma temprana la presencia del CPV-2 en heces tales como la hemoaglutinación (Truyen, 2006) ELISA (Ariza, 2005) y la aglutinación en látex con muy buenos resultados en cuanto a confiabilidad y economía.

Las pruebas de tipo molecular como PCR en tiempo real pueden diferenciar entre cepas vacunales y de campo al ser usadas con muestras de materia fecal fresca (Decaro, 2007), con una alta sensibilidad y especificidad pero todavía a costos altos. Las sondas genómicas MGB (Minor Groove Binder) reconocen diferencias en las secuencias de nucleótidos de las cepas vacunales producidas por la mayoría de las casas comerciales en comparación con las cepas de campo y se han postulado como técnicas diagnósticas de rápido uso y bajo costo (Decaro, 2007).

TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN

Desde el inicio de la enfermedad se han usado vacunas vivas modificadas para el control de la enfermedad basadas en el virus original CPV-2, con buenos resultados (Yule, 1997; Carmichael, 1999; Truyen, 2006) lo que ha permitido pasar de una pandemia a un estado actual de endemia controlada; sin embargo, con el surgimiento de la variante CPV-2c se ha postulado la necesidad de utilizar nuevas vacunas (Truyen, 2006). Los estudios realizados han mostrado que existe una buena reactividad cruzada entre las tres variantes del CPV así como con el FPV, pero con sustanciales diferencias en los títulos de anticuerpos neutralizantes, siendo mejores los títulos proporcionados cuando se empleaba la variante CPV-2b en animales con infección con la variante CPV-2a y no al revés (Truyen, 1992; 2006). La transmisión de anticuerpos calostrales de las madres a los cachorros se ha demostrado que previene la infección contra parvovirus y pueden ser suficientes para conceder resistencia contra variantes heterólogas. Pero, por otro lado, también se ha reportado la presencia de enfermedad en animales que presentaban títulos de anticuerpos neutralizantes altos (Barlett, 1999; Elia, 2005; Truyen, 2006), indicando que la reactividad cruzada entre variante todavía no está completamente clara.

Los títulos conferidos por las vacunas vivas modificadas usadas en la mayoría de los biológicos comerciales confieren protección por años, aun sin usar

revacunación anual (Carmichael, 1999; Simpson, 2002) y demostraron proteger a animales expuestos de la enfermedad clínica (Simpson, 2002).

Se han realizado ensayos con vacunas recombinantes de ácido nucleico (NAV) que utilizan vectores de expresión con genes para antígenos de cápside para el CPV-2 que han demostrado conferir inmunidad humoral y celular por transfección de células en ratones y caninos monovalentes (Langelveld, 1993; Jiang, 1998) o bivalentes (Patial, 2007). Estas vacunas presentan las ventajas de no requerir cadenas de frío para su utilización y mantenimiento.

CONCLUSIONES

La variabilidad genética de CPV2 es alta, principalmente en los epítomos relativos a inmunidad y receptores a hospederos, lo que ha llevado a que en la actualidad existan tres subtipos de CPV2 que difieren en la secuencia de aminoácidos de la VP2. Se conoce que el CPV2 se libera del endosoma por alteración de la permeabilidad de membrana endosomal con dos teorías aceptadas en la actualidad: cambios en la permeabilidad de la membrana por acción fosfolipasa 2 de la VP1 y otra por activación de poros con daño parcial de la membrana. La inmunidad cruzada entre los subtipos permite la utilización de inmunógenos CPV2a y CPV2b para el subtipo CPV2c aunque falta determinar la verdadera duración de la inmunidad conferida por vacunas vivas utilizadas.

BIBLIOGRAFÍA

Appel M., Scout W. and Carmichael L. « Isolation and immunization studies of canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis ». *Vet. Rec.* 105. (1979): 156 – 159.

Ariza S, Fuentes D. Vera V. Villamil L. y Ramírez G. “Aglutinación en látex, Elisa y hemoaglutinación: Alternativas para el diagnóstico de la Parvovirus canina en heces”. *Rev. Med. Vet. Zoot.* 52. (2005): 5 - 11.

- Bartlett J., Kleinschmidt J., Boucher R. and Samulski R. "Targeted adeno-associated virus vector transduction of nonpermissive cells mediated by a bispecific F(ab'gamma)2 antibody". *Nat. Biotechnol.* 17. (1999): 181 – 186.
- Battilani M., Scagliarini A., Ciulli S., Morganti L. y Proserpi S. "High genetic diversity of the VP2 gene of a canine parvovirus strain detected in a domestic cat". *Virology* 352. (2006): 22 – 26.
- Carmichael L. *Canine viral vaccines at a turning point – a personal perspective. Advances in veterinary medicine.* Academic Press. 1999
- Carmichael L. "An annotated historical account of canine parvovirus". *J. Vet. B. Infect.* 52. (2005): 303 – 311.
- Cotmore S. & Tattersall P. "Parvoviral host range and cell entry mechanisms". *Advance in Virus Research.* 70. (2007):183 – 227
- Decaro N., Martella V., Elia G., Desario C., Campolo M., Buonavoglia D., Bellacico A., Tempesta M. y Buonavoglia C. "Diagnostic tools based on minor groove binder probe technology for rapid identification of vaccinal and field strains of canine parvovirus type 2b". *J. Virol. Methods.* 138. (2006):10 – 16.
- Decaro N., Martella V., Elia G., Desario C., Campolo M., Lorusso E., Colaianni M. Lorusso A. and Buonavoglia C. "Tissue distribution of the antigenic variants of canine parvovirus type 2 in dogs". *Vet. Microbiol.* 121. (2007): 39 – 44.
- Elia G., Cavalli A., Cirone F., Lorusso E., Camero M., Buonavoglia D., Tempesta M. "Antibody level and protection to canine parvovirus type 2". *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet.* 52. (2005): 320 – 322.
- Goff M. "Parvovirus B19 in pregnancy". *Journal of Midwifery & Women's Health.* 50.6. (2001): 536 – 538.
- Hueffer K. And Parrish C. "Parvovirus host range, cell tropism and evolution". *Current opinion in Microbiology* 6. (2003): 392 – 398.
- Jiang W., Baker H., Swango L., Schorr J., Self M., and Smith B. "Nucleic acid immunization protects dogs against challenge with virulent canine parvovirus". *Vaccine* 6. (1998): 601 – 607.
- Langeveld J., Casal J., Vela C., Dalsgaard S., Smale S., Puijk W. and Meloen R. "B-cell epitopes of canine parvovirus: distribution on the primary structure and exposure on the viral surface". *J. Virolo.* 67.(1993): 765 – 772.
- Luengo M., Flores J. y Gutiérrez J. "Aspectos endoscópico e histopatológico de las gastroenteritis víricas caninas producidas por Parvovirus y Coronavirus. A propósito de 4 casos clínicos". II Congreso nacional AEVEDI. Córdoba, Argentina. Marzo 5 al 7 de 1999.
- Martella V., Cavalli A., Pratelli A., Bozzo G., Camero M., Buonavoglia D., Narcis D., Temspra M. and Buonavoglia C. "A canine parvovirus mutant is spreading in Italy". *J. Clin. Microbiol.* 42. (2004): 1 Cotmore S. & Tattersall P. "Parvoviral host range and cell entry mechanisms". *Advance in Virus Research* 70. (2007):183 - 2273 – 1336.
- Nakamura M., Tohya Y., Miyazawa T., Mochizuki M., Phung H., Nguyen N., Huynn L., Nguyen L., Nguyen P., Nguyen P., Nguyen N. And Akashi H. "A novel antigenic variant of canine parvovirus from a vietnamese dog". *Arch. Virol.* 149. (2004): 2261 – 2269.
- Paltrinieri S., Crippa A., Comerio T., Angioletti A. and Roccabianca P. Evaluation of inflammation and immunity in cats with spontaneous parvovirus infection: Consequences of recombinant feline interferon- ω administration. VETIMM. 2007. 7 pages. Article in press. Disponible en www.sciencedirect.com.
- Paradiso P., Rhode S. and Singer L. "Canine parvovirus: a biochemical and structural characterization". *J. Gen. Virol.* 62. (1982): 113 – 125.

- Patial S., Chaturvedi V., Rai A., Saini M., Chandra R., Saini Y. and Gupta P. "Virus neutralizing antibody response in mice and dogs with a bicistronic DNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein and canine parvovirus VP2". *Vaccine*. 25. (2007): 4020 – 4028.
- Pereira C., Leal E. and Durigon E. "Selective regimen shift and demographic growth increase associated with the emergence of high-fitness variants of canine parvovirus". *Inf. Gen Evol*. 7. (2007): 399 – 409.
- Pérez R., Francia L., Romero V., Maya L., López I. y Hernández M. "First detection of canine parvovirus type 2c in South America". *Vet. Microbiol* 124. (2007): 147 – 152.
- Reed A., Jones E. and Miller T. "Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus". *J. Virol*. 62. (1998): 266 – 276.
- Ros C., Baltzer C., Bernhard M. y Kempf C. "Parvovirus uncoating in vitro reveals a mechanism of DNA release without capsid disassembly and striking differences in encapsidated DNA stability". *Virology* 345. (2006): 137 – 147.
- Schultz R. "Duration of immunity for canine and feline vaccines: A review". *Vet. Microbiol* 117. (2006): 75 – 79.
- Simpson A., Hébert B., Sullivan G., Parrish C., Zádori Z., Tijssen P. And Rossmann M. "The structure of porcine parvovirus: Comparison with related viruses". *J. Mol. Biol.* 315. (2002): 1189 – 1198.
- Suikkanen S., Antila M., Jaatinen A., "Vihinen-Ranta M. and Vuento M. Release of canine parvovirus from endocytic vesicles". *Virology* 316. (2003): 267 – 280.
- Truyen U. "Evolution of canine parvovirus – A need for new vaccines?" *Vet. Microbiol.* 117. (2006): 9 – 13.
- Truyen U. and Parrish C. "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. (1992): 5399 – 5408.
- Url A. y Schmidt P. "Do canine parvovirus affect canine neurons? An immunohistochemical study". *Res. Vet. Sci.* 79. (2005): 57 – 59.
- Vihinen-Ranta M., Kalela A., Makinen P, Kakkola L., Marjomäki V. and Vuento M. "Intracellular route of canine parvovirus entry". *J. Virol.* 72. (1998): 802 – 806.
- Voyles B. *The Biology of Viruses*. (2 ed.). Boston: McGraw Hill, 2003.
- Yule T., Roth M., Dreier K. Johnson A., Palmer M., Simmons K. and Fanton R. "Canine parvovirus vaccine elicits protection from inflammatory and clinical consequences of the disease". *Vaccine* 15. (1997): 720 – 729.