

DIAGNÓSTICO Y DIFERENCIACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE CAMPO Y VACUNALES DE PARVOVIRUS CANINO

D. Bucafusco, L. Jáuregui, M. Gonzalez, S. Zacarías, G. Delhon, P. Maure*, A. Bratanich

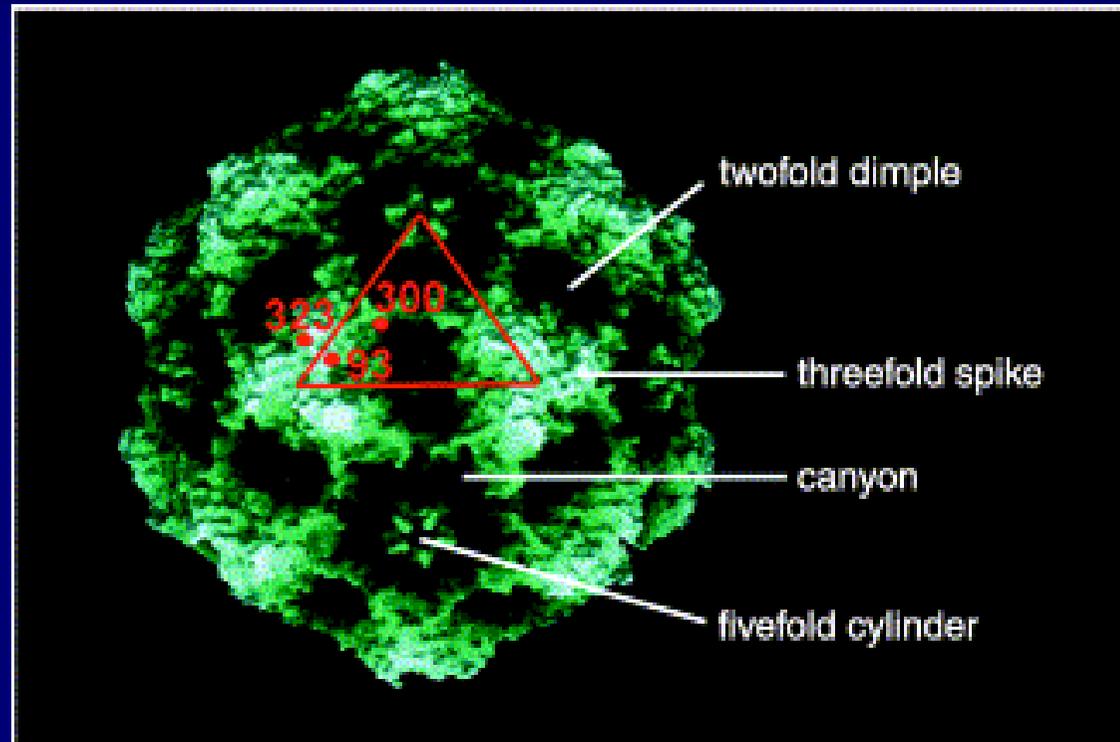
Área de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias,
Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

*Laboratorio Paul, Argentina

INTRODUCCIÓN

Parvovirus canino:
(CPV)

- DNA simple cadena 5323 bp.
- Desnudo
- Simetría icosaédrica
- T=1
- 260 Å
- Cápside formada por 60 copias de VP1 y VP2
- Cánidos domésticos y salvajes
- Necesita células en alto índice de replicación
- Cuadros de miocarditis aguda en animales menores a 2 semanas o de enteritis hemorrágica, vómitos y leucopenia en animales mayores



Current Opinion in Microbiology

EVOLUCIÓN

FVP

Felinos
~~Caninos~~

< 1900-Presente

Lys 93 Asn
Asp 323 Asn
Lys 80 Arg
Ser 564 Asn
Gly 568 Ala

Afinidad para TfR canino

1976-1978

CPV type-2

~~Felinos~~
Caninos

1978-1980

Leu 87 Met
Ala 300 Gly
Asp 305 Try

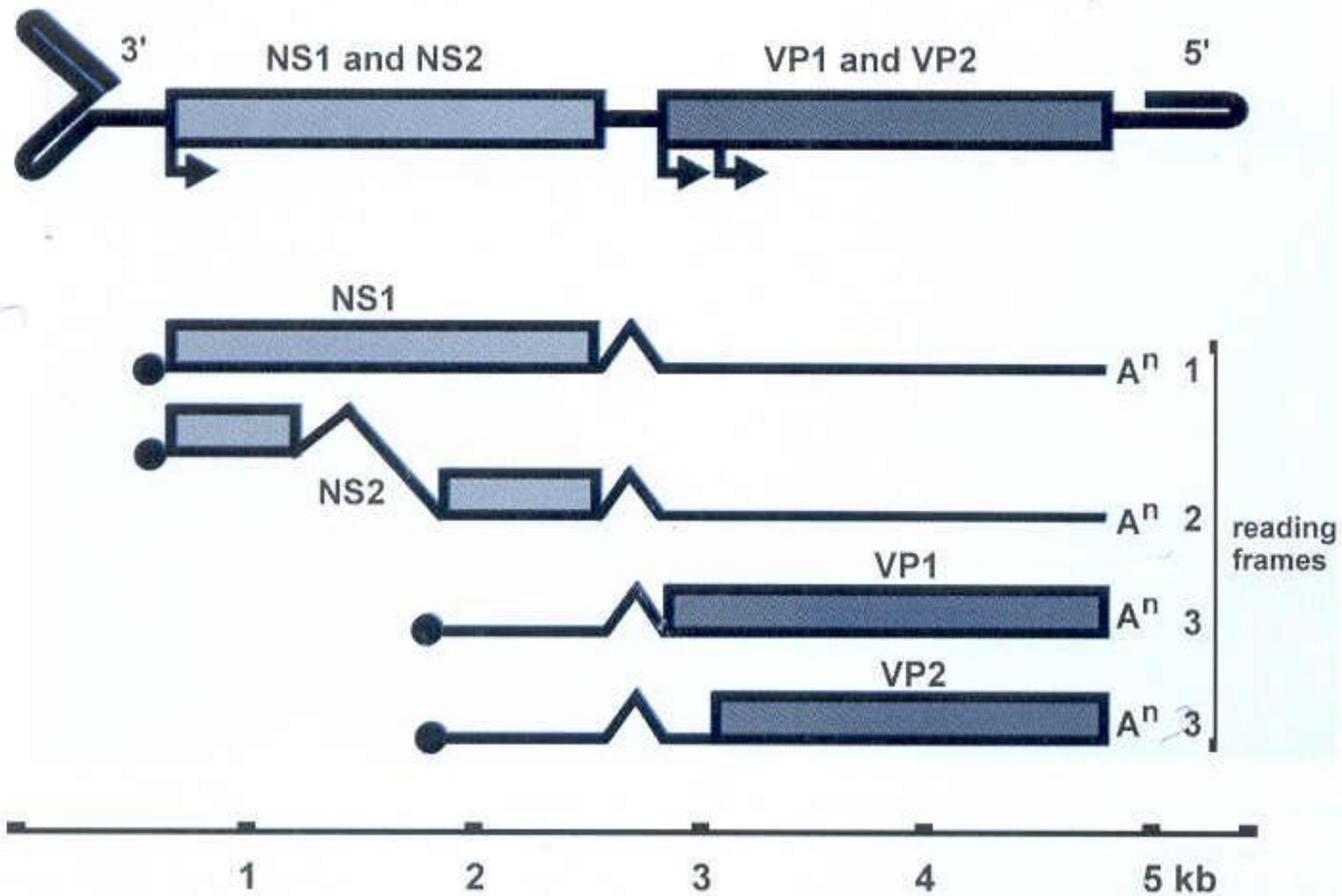
Adaptación al TfR canino

CPV type-2a y -2b

Felinos
Caninos

1979-Presente

Canine parvovirus genome and transcription strategy



Canine Parvovirus Genome

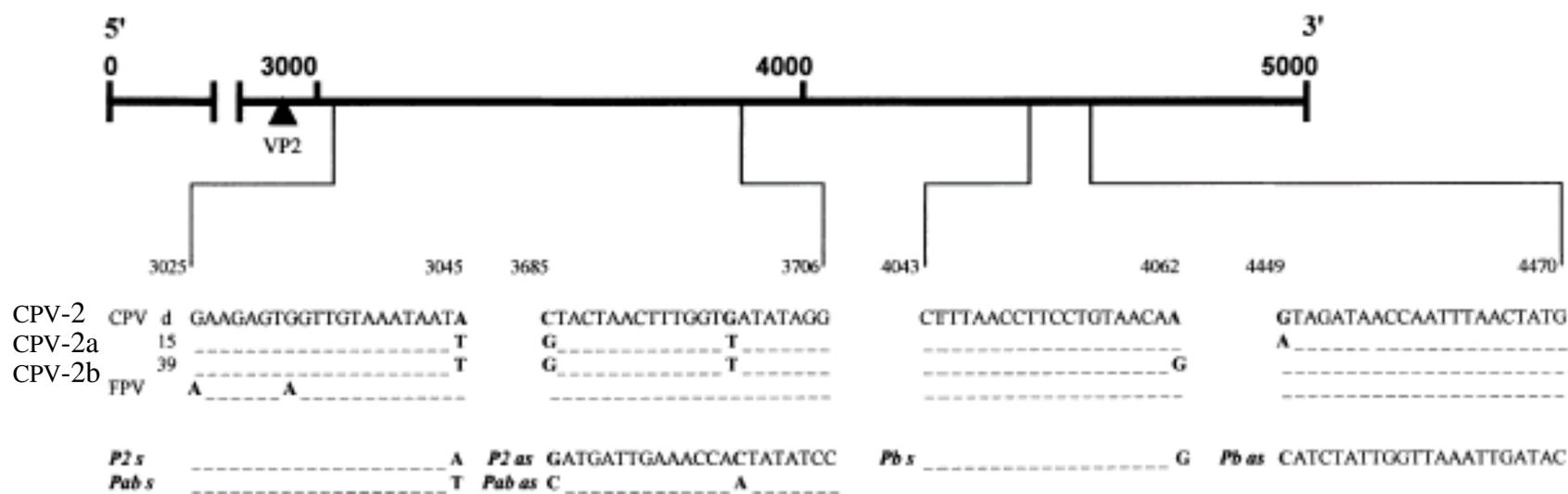


Fig. 1. Nucleotide alignment between complementary regions in the CPV-2 (CPV-d), CPV-2a (CPV-15), CPV-2b (CPV-39) and FPV genome (top) and primer sets for distinguishing between CPV types (bottom).

P2 y Pab Forward

CPV-2b GTGAAAATTATAGAAGAGTGGTTGTAATAAATTTGGATAAAAAGTGCAGTTAACGGAAACA
 CPV-2a GTGAAAATTATAGAAGAGTGGTTGTAATAAATTTGGATAAAAAGTGCAGTTAACGGAAACA
 CPV-2 GTGAAAATTATAGAAGAGTGGTTGTAATAAATTTGGATAAAAAGTGCAGTTAACGGAAACA
 consensus GTGAAAATTATAGAAGAGTGGTTGTAATAAATTTGGATAAAAAGTGCAGTTAACGGAAACA

CPV-2b TGGCTTTAGATGATACTCATGCACAAATTTGTAACACCTTGGTCATTGGTTGATGCAAATG
 CPV-2a TGGCTTTAGATGATACTCATGCACAAATTTGTAACACCTTGGTCATTGGTTGATGCAAATG
 CPV-2 TGGCTTTAGATGATACTCATGCACAAATTTGTAACACCTTGGTCATTGGTTGATGCAAATG
 consensus TGGCTTTAGATGATACTCATGCACAAATTTGTAACACCTTGGTCATTGGTTGATGCAAATG

CPV-2b CTTGGGGAGTTTGGTTTAAATCCAGGAGATTGGCACTAATTGTTAATACTATGAGTGAGT
 CPV-2a CTTGGGGAGTTTGGTTTAAATCCAGGAGATTGGCACTAATTGTTAATACTATGAGTGAGT
 CPV-2 CTTGGGGAGTTTGGTTTAAATCCAGGAGATTGGCACTAATTGTTAATACTATGAGTGAGT
 consensus CTTGGGGAGTTTGGTTTAAATCCAGGAGATTGGCACTAATTGTTAATACTATGAGTGAGT

CPV-2b TGCATTTAGTTAGTTTTTGAACAAGAAATTTTAAATGTTGTTTTAAAGACTGTTTCAGAAT
 CPV-2a TGCATTTAGTTAGTTTTTGAACAAGAAATTTTAAATGTTGTTTTAAAGACTGTTTCAGAAT
 CPV-2 TGCATTTAGTTAGTTTTTGAACAAGAAATTTTAAATGTTGTTTTAAAGACTGTTTCAGAAT
 consensus TGCATTTAGTTAGTTTTTGAACAAGAAATTTTAAATGTTGTTTTAAAGACTGTTTCAGAAT

CPV-2b CTGCTACTCAGCCACCAACTAAAGTTTATAATAATGATTTAACTGCATCATTGATGGTTG
 CPV-2a CTGCTACTCAGCCACCAACTAAAGTTTATAATAATGATTTAACTGCATCATTGATGGTTG
 CPV-2 CTGCTACTCAGCCACCAACTAAAGTTTATAATAATGATTTAACTGCATCATTGATGGTTG
 consensus CTGCTACTCAGCCACCAACTAAAGTTTATAATAATGATTTAACTGCATCATTGATGGTTG

CPV-2b CATTAGATAGTAATAATACTATGCCATTTACTCCAGCAGCTATGAGATCTGAGACATTGG
 CPV-2a CATTAGATAGTAATAATACTATGCCATTTACTCCAGCAGCTATGAGATCTGAGACATTGG
 CPV-2 CATTAGATAGTAATAATACTATGCCATTTACTCCAGCAGCTATGAGATCTGAGACATTGG
 consensus CATTAGATAGTAATAATACTATGCCATTTACTCCAGCAGCTATGAGATCTGAGACATTGG

CPV-2b GTTTTTATCCATGGAAACCAACCATAACCACTCCATGGAGATATTATTTTCAATGGGATA
 CPV-2a GTTTTTATCCATGGAAACCAACCATAACCACTCCATGGAGATATTATTTTCAATGGGATA
 CPV-2 GTTTTTATCCATGGAAACCAACCATAACCACTCCATGGAGATATTATTTTCAATGGGATA
 consensus GTTTTTATCCATGGAAACCAACCATAACCACTCCATGGAGATATTATTTTCAATGGGATA

CPV-2b GAACATTAATACCATCTCATACTGGAACCTAGTGGCACACCAACAAATATATACCATGGTA
 CPV-2a GAACATTAATACCATCTCATACTGGAACCTAGTGGCACACCAACAAATATATACCATGGTA
 CPV-2 GAACATTAATACCATCTCATACTGGAACCTAGTGGCACACCAACAAATATATACCATGGTA
 consensus GAACATTAATACCATCTCATACTGGAACCTAGTGGCACACCAACAAATATATACCATGGTA

CPV-2b CAGATCCAGATGATGTTCAATTTTATACTATTGAAAATTTCTGTGCCAGTACACTTACTAA
 CPV-2a CAGATCCAGATGATGTTCAATTTTATACTATTGAAAATTTCTGTGCCAGTACACTTACTAA
 CPV-2 CAGATCCAGATGATGTTCAATTTTATACTATTGAAAATTTCTGTGCCAGTACACTTACTAA
 consensus CAGATCCAGATGATGTTCAATTTTATACTATTGAAAATTTCTGTGCCAGTACACTTACTAA

CPV-2b GAACAGGTGATGAATTTGCTACAGGAACATTTTTTTTTGATTGTTAAACCATGTAGACTAA
 CPV-2a GAACAGGTGATGAATTTGCTACAGGAACATTTTTTTTTGATTGTTAAACCATGTAGACTAA
 CPV-2 GAACAGGTGATGAATTTGCTACAGGAACATTTTTTTTTGATTGTTAAACCATGTAGACTAA
 consensus GAACAGGTGATGAATTTGCTACAGGAACATTTTTTTTTGATTGTTAAACCATGTAGACTAA

CPV-2b CACATACATGGCAAACAATAGAGCATTGGGCTTACCACCATTTCTAAATTCCTTGCCTC
 CPV-2a CACATACATGGCAAACAATAGAGCATTGGGCTTACCACCATTTCTAAATTCCTTGCCTC
 CPV-2 CACATACATGGCAAACAATAGAGCATTGGGCTTACCACCATTTCTAAATTCCTTGCCTC
 consensus CACATACATGGCAAACAATAGAGCATTGGGCTTACCACCATTTCTAAATTCCTTGCCTC

CPV-2b AACTGAAGGAGTACTAACTTTGGTTATATAGGAGTTCACAAGA
 CPV-2a AACTGAAGGAGTACTAACTTTGGTTATATAGGAGTTCACAAGA
 CPV-2 AACTGAAGGAGTACTAACTTTGGTTATATAGGAGTTCACAAGA
 consensus AACTGAAGGAGTACTAACTTTGGTTATATAGGAGTTCACAAGA

P2 y Pab Reverse

Pb Forward

CPV-2b GATTCAAAATATTAACCTTTAACCTTCCTGTAAACAATGATAATGTATTGCTACCAACAGA
 CPV-2 GATTCAAAATATTAACCTTTAACCTTCCTGTAAACAATGATAATGTATTGCTACCAACAGA
 CPV-2a GATTCAAAATATTAACCTTTAACCTTCCTGTAAACAATGATAATGTATTGCTACCAACAGA
 consensus GATTCAAAATATTAACCTTTAACCTTCCTGTAAACAATGATAATGTATTGCTACCAACAGA

CPV-2b TCCAATTGGAGGTAAAACAGGAATTAAC TATACTAATATATTTAATACTTATGGTCCTTT
 CPV-2 TCCAATTGGAGGTAAAACAGGAATTAAC TATACTAATATATTTAATACTTATGGTCCTTT
 CPV-2a TCCAATTGGAGGTAAAACAGGAATTAAC TATACTAATATATTTAATACTTATGGTCCTTT
 consensus TCCAATTGGAGGTAAAACAGGAATTAAC TATACTAATATATTTAATACTTATGGTCCTTT

CPV-2b AACTGCATTAAATAATGTACCACCAGTTTATCCAAATGGTCAAATTTGGGATAAAGAATT
 CPV-2 AACTGCATTAAATAATGTACCACCAGTTTATCCAAATGGTCAAATTTGGGATAAAGAATT
 CPV-2a AACTGCATTAAATAATGTACCACCAGTTTATCCAAATGGTCAAATTTGGGATAAAGAATT
 consensus AACTGCATTAAATAATGTACCACCAGTTTATCCAAATGGTCAAATTTGGGATAAAGAATT

CPV-2b TGATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAAATGCACCATTTGTTTGTCAAATAAATTG
 CPV-2 TGATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAAATGCACCATTTGTTTGTCAAATAAATTG
 CPV-2a TGATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAAATGCACCATTTGTTTGTCAAATAAATTG
 consensus TGATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAAATGCACCATTTGTTTGTCAAATAAATTG

CPV-2b TCCTGGTCAATTATTTGTAAAAGTTGCGCCTAATTTAACAAATGAATATGATCCTGATGC
 CPV-2 TCCTGGTCAATTATTTGTAAAAGTTGCGCCTAATTTAACAAATGAATATGATCCTGATGC
 CPV-2a TCCTGGTCAATTATTTGTAAAAGTTGCGCCTAATTTAACAAATGAATATGATCCTGATGC
 consensus TCCTGGTCAATTATTTGTAAAAGTTGCGCCTAATTTAACAAATGAATATGATCCTGATGC

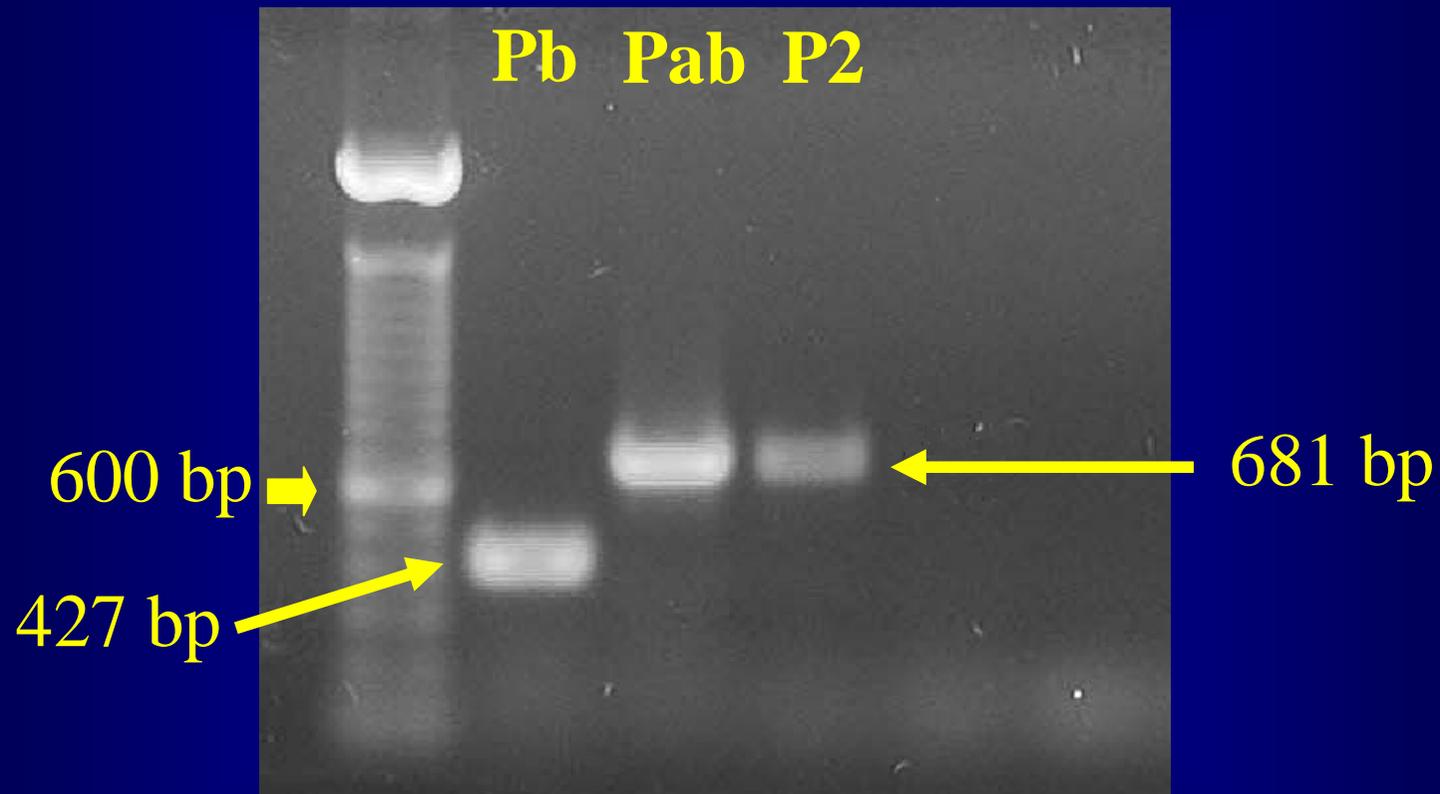
CPV-2b ATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACCTTACTCAGATTTTTGGTGGAAAGGTAAATTAGT
 CPV-2 ATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACCTTACTCAGATTTTTGGTGGAAAGGTAAATTAGT
 CPV-2a ATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACCTTACTCAGATTTTTGGTGGAAAGGTAAATTAGT
 consensus ATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACCTTACTCAGATTTTTGGTGGAAAGGTAAATTAGT

CPV-2b ATTTAAAGCTAAACTAAGAGCCTCTCATACTTGGAAATCCAATTCAACAAATGAGTATTAA
 CPV-2 ATTTAAAGCTAAACTAAGAGCCTCTCATACTTGGAAATCCAATTCAACAAATGAGTATTAA
 CPV-2a ATTTAAAGCTAAACTAAGAGCCTCTCATACTTGGAAATCCAATTCAACAAATGAGTATTAA
 consensus ATTTAAAGCTAAACTAAGAGCCTCTCATACTTGGAAATCCAATTCAACAAATGAGTATTAA

CPV-2b TTAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATA
 CPV-2 TTAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATA
 CPV-2a TTAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATA
 consensus TgTAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATA

Pb Reverse

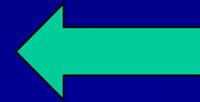
RESULTADOS



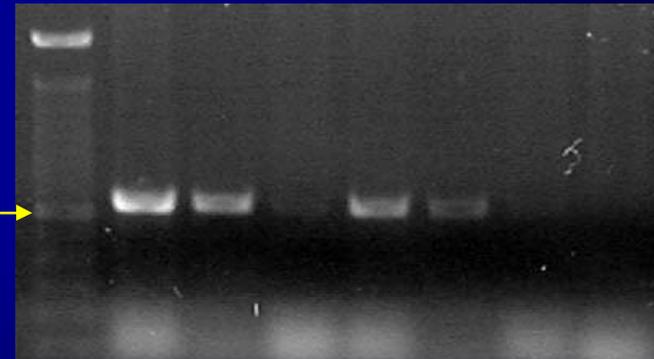
Agarosa 1% Teñido con Bromuro de Etidio
Visualizado con luz UV

Primers

p2	pab	pb	Resultado
+	-	-	CPV-2
-	+	-	CPV-2a
-	+	+	CPV-2b
-	-	-	Negativa

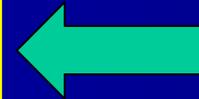


600 bp →

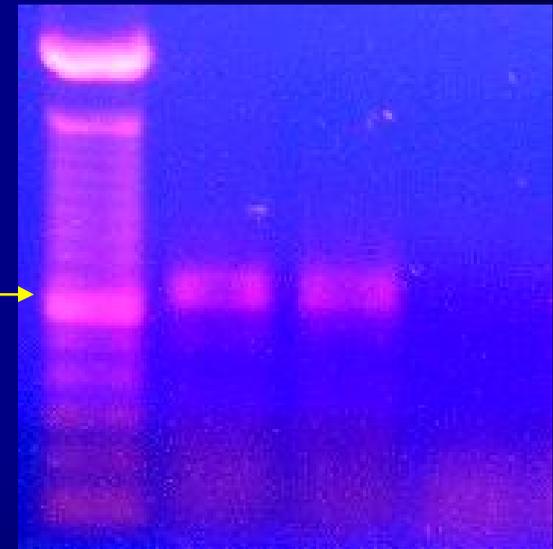


Primers

p2	pab	pb	Resultado
+	-	-	CPV-2
-	+	-	CPV-2a
-	+	+	CPV-2b
-	-	-	Negativa



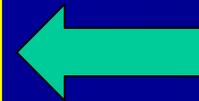
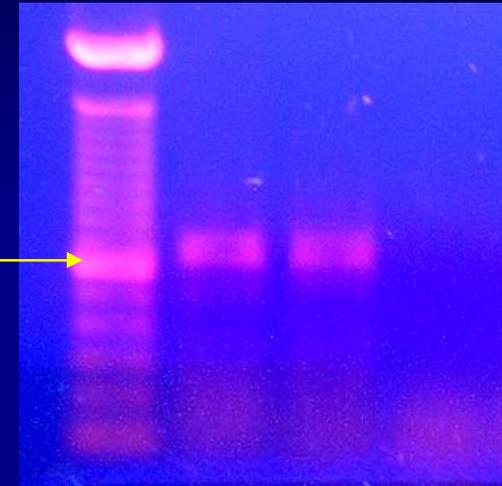
600 bp →



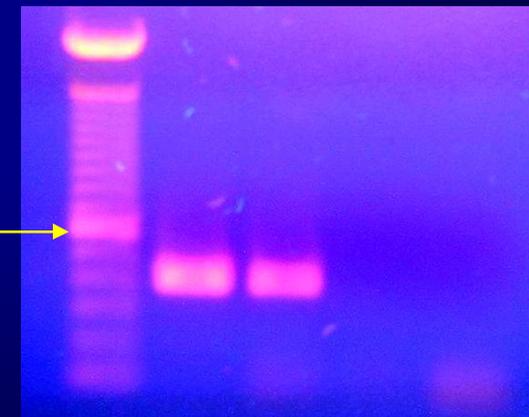
Primers

p2	pab	pb	Resultado
+	-	-	CPV-2
-	+	-	CPV-2a
-	+	+	CPV-2b
-	-	-	Negativa

600 bp



600 bp



UTILIZAMOS

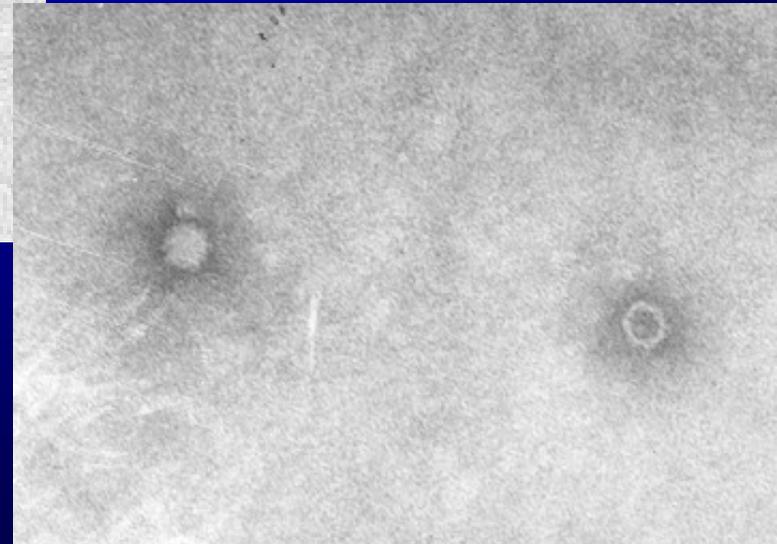
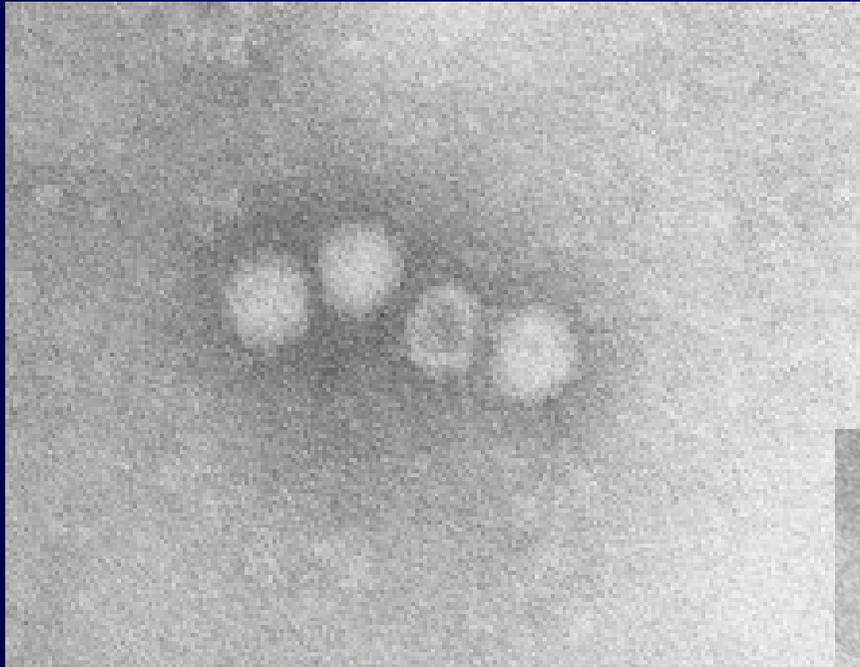
Cepas vacunales :

5 vacunas comerciales monovalente CPV-2

1 vacuna comercial polivalente incluyendo CPV-2b

28 muestras de contenido intestinal de caninos necropsiados y materia fecal o hisopados rectales de caninos con sintomatología compatible con Parvovirus

Vacunas monovalentes testeadas por microscopía electrónica de transmisión para constatar la presencia de partículas virales



VACUNAS CPV-2

- P2: positivas
- Pab: negativas
- Pb: positivas!!!!

VACUNA CPV-2b

- P2: negativa
- Pab: positiva
- Pb: positiva

CASOS CLÍNICOS

- P2: todos negativos
- Pab: 20 positivos
- Pb: 19 positivos

Pb Forward

CPV-2b GATTCAAAATATTAACCTTTAACCTTCCTGTAAACAATGATAATGTATTGCTACCAACAGA
 CPV-2 GATTCAAAATATTAACCTTTAACCTTCCTGTAAACAATGATAATGTATTGCTACCAACAGA
 CPV-2a GATTCAAAATATTAACCTTTAACCTTCCTGTAAACAATGATAATGTATTGCTACCAACAGA
 consensus GATTCAAAATATTAACCTTTAACCTTCCTGTAAACAATGATAATGTATTGCTACCAACAGA

CPV-2b TCCAATTGGAGGTAAAAACAGGAATTAAC TATACTAATATATTTAATACTTATGGTCCTTT
 CPV-2 TCCAATTGGAGGTAAAAACAGGAATTAAC TATACTAATATATTTAATACTTATGGTCCTTT
 CPV-2a TCCAATTGGAGGTAAAAACAGGAATTAAC TATACTAATATATTTAATACTTATGGTCCTTT
 consensus TCCAATTGGAGGTAAAAACAGGAATTAAC TATACTAATATATTTAATACTTATGGTCCTTT

CPV-2b AACTGCATTAAATAATGTACCACCAGTTTATC CAAATGGTCAAATTTGGGATAAAGAATT
 CPV-2 AACTGCATTAAATAATGTACCACCAGTTTATC CAAATGGTCAAATTTGGGATAAAGAATT
 CPV-2a AACTGCATTAAATAATGTACCACCAGTTTATC CAAATGGTCAAATTTGGGATAAAGAATT
 consensus AACTGCATTAAATAATGTACCACCAGTTTATC CAAATGGTCAAATTTGGGATAAAGAATT

CPV-2b TGATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAAATGCACCATTTGTTTGTCAAATAATTG
 CPV-2 TGATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAAATGCACCATTTGTTTGTCAAATAATTG
 CPV-2a TGATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAAATGCACCATTTGTTTGTCAAATAATTG
 consensus TGATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAAATGCACCATTTGTTTGTCAAATAATTG

CPV-2b TCCTGGTCAATTATTTGTAAAAAGTTGCGCCTAATTTAACAAATGAATATGATCCTGATGC
 CPV-2 TCCTGGTCAATTATTTGTAAAAAGTTGCGCCTAATTTAACAAATGAATATGATCCTGATGC
 CPV-2a TCCTGGTCAATTATTTGTAAAAAGTTGCGCCTAATTTAACAAATGAATATGATCCTGATGC
 consensus TCCTGGTCAATTATTTGTAAAAAGTTGCGCCTAATTTAACAAATGAATATGATCCTGATGC

CPV-2b ATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACCTTACTCAGATTTTTGGTGGAAAGGTAAATTAGT
 CPV-2 ATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACCTTACTCAGATTTTTGGTGGAAAGGTAAATTAGT
 CPV-2a ATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACCTTACTCAGATTTTTGGTGGAAAGGTAAATTAGT
 consensus ATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACCTTACTCAGATTTTTGGTGGAAAGGTAAATTAGT

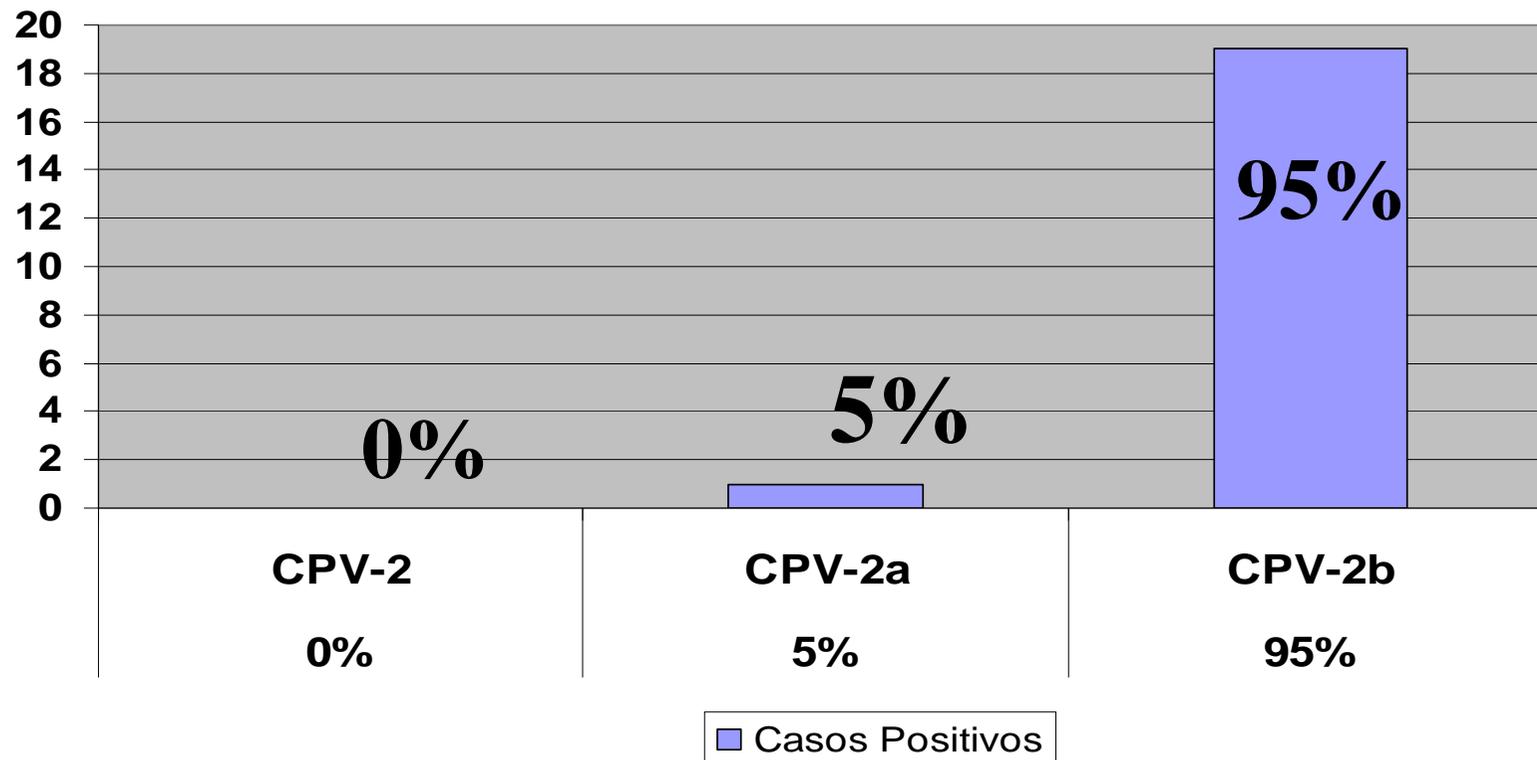
CPV-2b ATTTAAAGCTAAACTAAGAGCCTCTCATACTTGGAAATCCAATTCAACAAATGAGTATTAA
 CPV-2 ATTTAAAGCTAAACTAAGAGCCTCTCATACTTGGAAATCCAATTCAACAAATGAGTATTAA
 CPV-2a ATTTAAAGCTAAACTAAGAGCCTCTCATACTTGGAAATCCAATTCAACAAATGAGTATTAA
 consensus ATTTAAAGCTAAACTAAGAGCCTCTCATACTTGGAAATCCAATTCAACAAATGAGTATTAA

CPV-2b TTAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATA
 CPV-2 TTAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATA
 CPV-2a TTAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATA
 consensus TgTAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATA

Pb Reverse

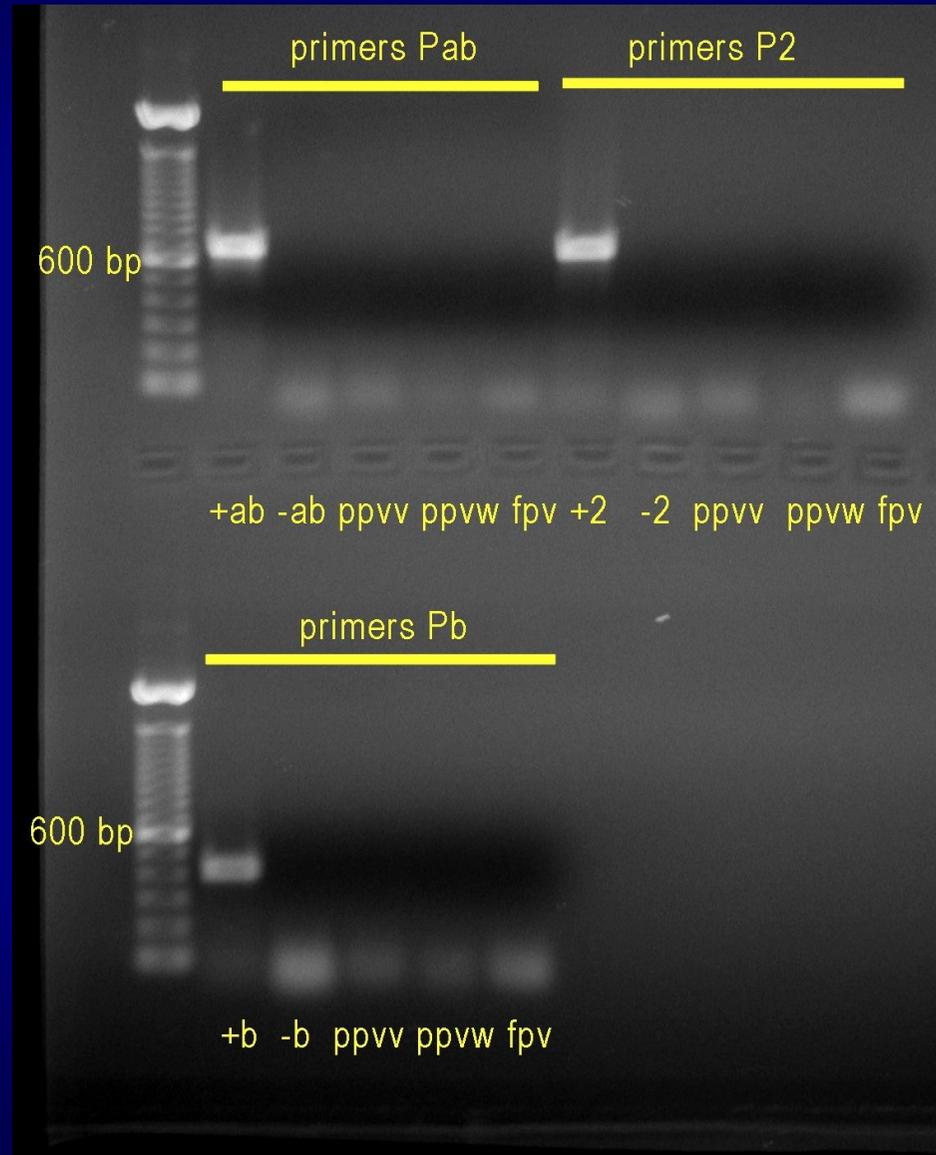
El 71.4 % de los casos remitidos fueron positivos por PCR

Prevalencia de genotipos de CPV en los casos positivos
(abril 2003 - agosto 2004)



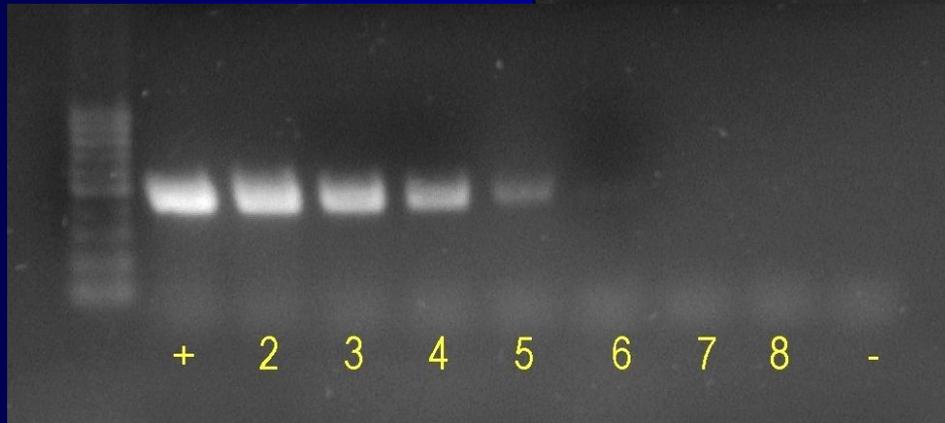
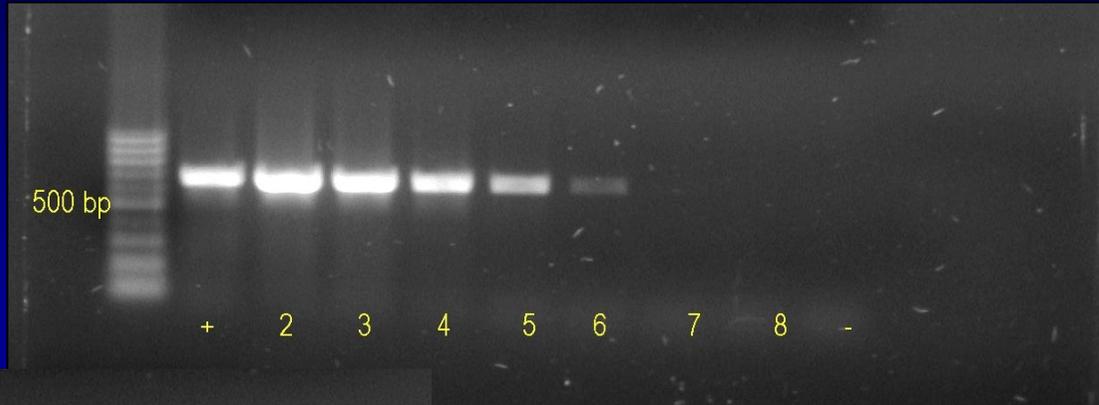
Fragmentos amplificados con primers P2 , Pab y Pb fueron secuenciados y mostraron tener un 100% de identidad con las secuencias de CPV almacenadas en el Genbank.

Pruebas de especificidad

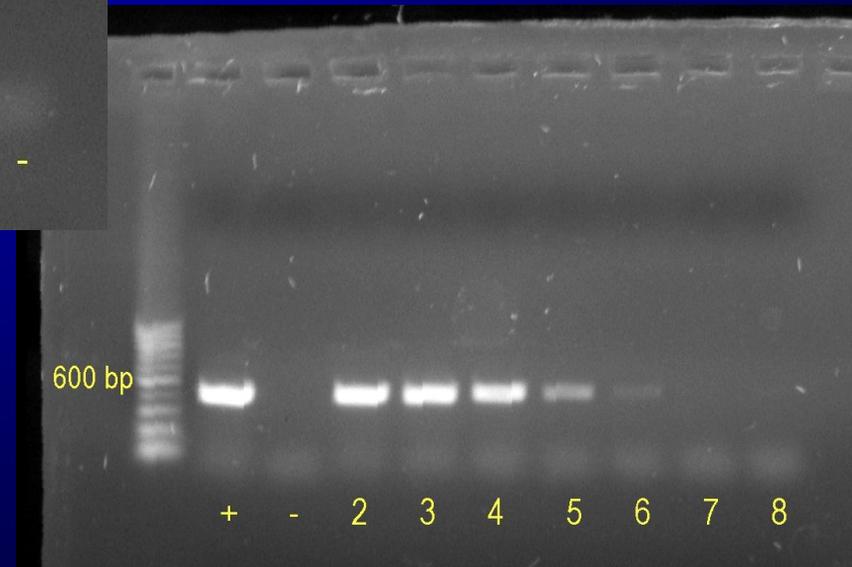


Pruebas de sensibilidad

P2 (2 fg/ μ l)



Pab (20 fg/ μ l)



Pb (2 fg/ μ l)

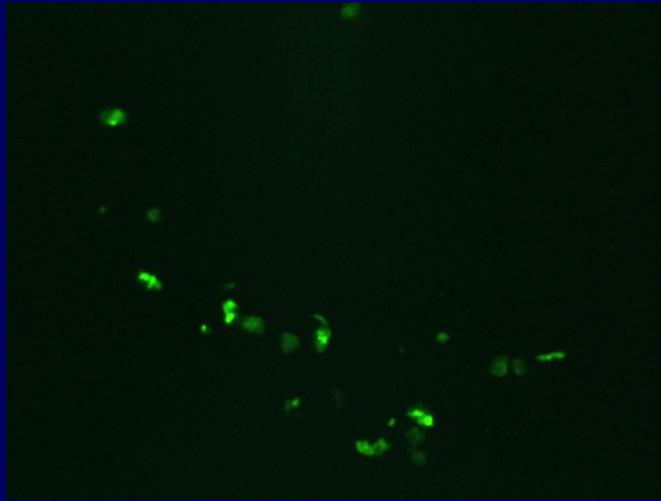
CONCLUSIONES

-La PCR es útil en la identificación de CPV como agente etiológico de gastroenteritis hemorrágicas caninas

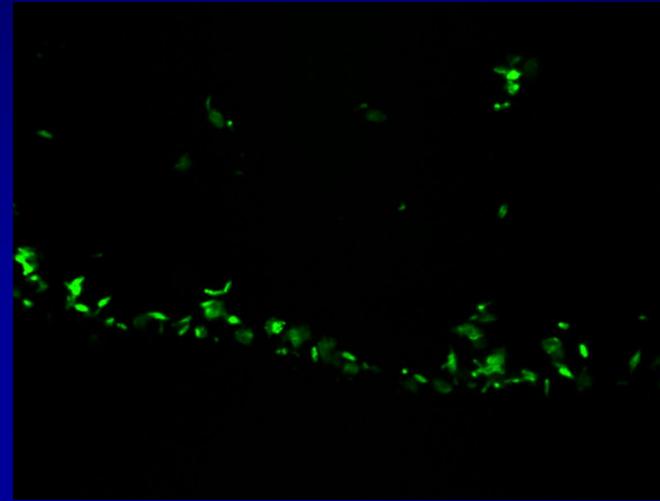
-Permitiría además diferenciar entre la excreción de virus vacunal o virus de campo en caso de que el animal haya sido vacunado con una vacuna CPV2.

-El genotipo predominante entre los casos de campo analizados es el CPV-2b

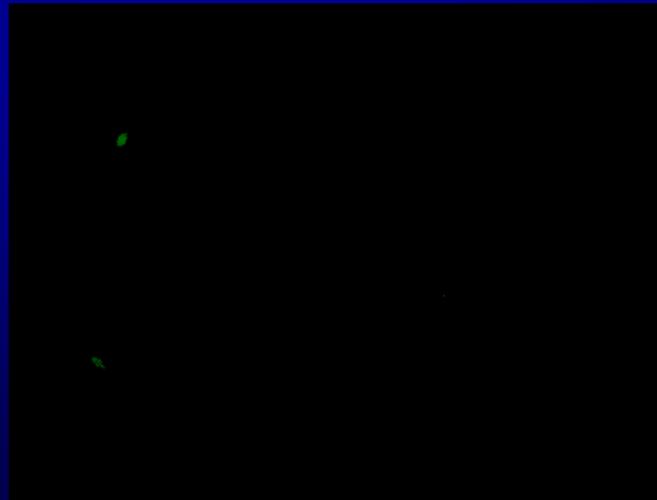
IFD con anticuerpos policlonales



48 hpi



72 hpi



Film



E-mail: virologia@fvet.uba.ar