

Identificación de genogrupos de protoparvovirus y sus variantes en leucocitos de gatos domésticos del Valle Central de Costa Rica

Identification of protoparvovirus genogroups and their variants in leukocytes of domestic cats from the Central Valley of Costa Rica

Identificação de genogrupos de protoparvovírus e suas variantes em leucócitos de gatos domésticos do Vale Central da Costa Rica

Andrea Obando Corella¹✉, Antony Solórzano Morales², Mauricio Jiménez-Soto³, Gaby Dolz²

1 Estudiante de la Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Lagunilla, Heredia, Costa Rica. aobandocorella@gmail.com,  <https://orcid.org/0000-0002-5794-338X>

2 Programa de Investigación en Medicina Poblacional, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Lagunilla, Heredia, Costa Rica. antony.solorzano.morales@una.ac.cr,  <https://orcid.org/0000-0001-7774-8306>, gaby.dolz.wiedner@una.ac.cr,  <https://orcid.org/0000-0002-9566-5130>

3 Hospital de Especies Menores y Silvestres, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Lagunilla, Heredia, Costa Rica. drmjimenezsoto@hotmail.com,  <https://orcid.org/0000-0003-3393-5710>

Recibido: 31 de enero de 2023. **Corregido:** 25 de abril de 2024. **Aceptado:** 15 de mayo de 2024

Resumen

El protoparvovirus carnívoro 1 (CPPV-1), incluye al parvovirus felino (o virus de la panleucopenia felina, FPV) y al parvovirus canino 2 (CPV-2). En la actualidad CPV-2 no se encuentra en la naturaleza como tal, sino sus variantes CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c, que pueden infectar también al gato. El objetivo de esta investigación fue identificar CPPV-1 y sus variantes, como anticuerpos contra CPPV-1 en sangre de felinos domésticos del Valle Central de Costa Rica. Se recolectaron muestras de sangre de 155 gatos, y se recopilieron los siguientes datos: sexo, edad, raza, información sobre vacunación, ambiente en el que vive el animal (urbano o rural), si convive con otros gatos, estado de salud, padecimiento de enfermedades crónicas, estilo de vida (gato de interior o exterior) y lugar de procedencia. Las muestras de sangre se analizaron mediante inhibición de la hemaglutinación (IHA), técnicas moleculares (reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación). Mediante IHA se detectó anticuerpos contra CPPV-1 en todos los gatos, 112 gatos (72,3%) presentaron títulos protectivos ($\geq 1:80$). Mediante PCR en tiempo real se detectó la presencia de CPPV-1 en sangre de 42 (27,1%) gatos, ninguno presentó anemia, leucopenia o alguna enfermedad crónica, cinco (11,9%) se encontraban vacunados y tres (7,1%) presentaron una baja condición

✉ Autor de correspondencia: aobandocorella@gmail.com



corporal, pero con apetito, y sin ningún otro síntoma o signo asociado al CPPV-1. El grupo de gatos qPCR positivo no mostró diferencias significativas con el grupo qPCR negativo con respecto a edad, sexo, estilo de vida, convivencia con otros gatos y título de anticuerpos. En diez gatos asintomáticos y saludables se logró detectar la presencia de FPV (n=2) y CPV-2c (n=8) en sangre, con similitudes nucleotídicas de 100% (GenBank M38246) y 99,8%-100% (GenBank AF401519), respectivamente.

Palabras clave: Parvovirus canino, Panleucopenia felina, leucocitos, IHA, PCR, gato.

Abstract

Carnivore protoparvovirus 1 (CPPV-1) includes feline parvovirus (or feline panleukopenia virus, FPV) and canine parvovirus 2 (CPV-2). Currently, although CPV-2 is not found in nature, its variants CPV-2a, CPV-2b, and CPV-2c are found and can infect cats as well. The objective of this research was to identify CPPV-1 and its variants as antibodies against CPPV-1 in the blood of domestic cats from the Central Valley of Costa Rica. Blood samples were collected from 155 cats, along with the following data: sex, age, breed, vaccination information, the environment where the animal lives (urban or rural), coexistence with other cats, health status, any chronic diseases, lifestyle (indoor or outdoor cat), and place of origin. Blood samples were analyzed by hemagglutination inhibition assay (HIA) and molecular techniques (polymerase chain reaction (PCR) and sequencing). Antibodies against CPPV-1 were detected using HIA in all cats; a total of 112 (72.3%) had protective titers ($\geq 1:80$). Using real-time PCR, CPPV-1 was detected in the blood of 42 (27.1%) cats, none of which presented anemia, leukopenia, or any chronic disease; five (11.9%) were vaccinated, and three (7.1%) had low body condition but showed appetite and had no other symptom or sign associated with CPPV-1. The group of qPCR-positive cats did not show significant differences compared to the qPCR-negative group regarding age, sex, lifestyle, coexistence with other cats, and antibody titers. Ten asymptomatic and healthy cats showed FPV (n=2) and CPV-2c (n=8) in blood with nucleotide similarities of 100% (GenBank M38246) and 99.8%-100% (GenBank AF401519), respectively.

Keywords: Canine parvovirus, feline panleukopenia, leukocytes, HIA, PCR, cat.

Resumo

O protoparvovírus carnívoro 1 (CPPV-1), inclui o parvovírus felino (ou vírus da panleucopenia felina, FPV) e o parvovírus canino 2 (CPV-2). Atualmente, o CPV-2 não é encontrado na natureza como tal, mas sim suas variantes CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c, que também podem infectar o gato. O objetivo desta pesquisa foi identificar CPPV-1 e suas variantes, bem como anticorpos contra CPPV-1 no sangue de felinos domésticos do Vale Central da Costa Rica. Foram coletadas amostras de sangue de 155 gatos, e os seguintes dados foram obtidos: sexo, idade, raça, informações sobre vacinação, ambiente em que o animal vive (urbano ou rural), se convive com outros gatos, estado de saúde, padecimento de doenças crônicas, estilo de vida (gato de interior ou exterior) e local de procedência. As amostras de sangue foram analisadas por inibição da hemaglutinação (IHA), técnicas moleculares (reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento). Através do IHA, foram detectados anticorpos contra CPPV-1 em todos os gatos, 112 gatos (72,3%) apresentaram títulos protetores ($\geq 1:80$). Através do PCR em tempo real, foi detectada a presença de CPPV-1 no sangue de 42 (27,1%) gatos, nenhum apresentou anemia, leucopenia ou alguma doença crônica, cinco (11,9%) estavam vacinados e três (7,1%) apresentaram uma baixa condição corporal, mas com apetite, e sem nenhum outro sintoma ou sinal associado ao CPPV-1. O grupo de gatos qPCR positivo não mostrou diferenças significativas com o grupo qPCR negativo em relação à idade, sexo, estilo de vida, convivência com outros gatos e título de anticorpos. Em dez gatos assintomáticos e saudáveis, foi possível detectar a presença de FPV (n=2) e CPV-2c (n=8) no sangue, com similaridades nucleotídicas de 100% (GenBank M38246) e 99,8%-100% (GenBank AF401519), respectivamente.

Palavras-chave: Parvovírus canino, Panleucopenia felina, leucócitos, IHA, PCR, gato.



Introducción

El *protoparvovirus carnívoro 1* (CPPV-1) pertenece al orden Piccovirales, familia *Parvoviridae*, subfamilia *Parvovirinae*, género *Protoparvovirus*, e incluye el parvovirus felino (o virus de la panleucopenia felina, FPV) y el parvovirus canino 2 (CPV-2, con las variantes CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c). El CPV-2 emergió del FPV en 1978, mostrando una homología del 98% con FPV y afectando a todos los perros (Battilani et al., 2006; Hoelzer et al., 2008). Hoy en día se consideran como una sola entidad taxonómica (Tattersall, 2006), y se consideran patógenos importantes de gatos y perros domésticos, pero también de carnívoros de vida silvestre (Steinel et al., 2000).

Actualmente el CPV-2 no se encuentra en la naturaleza, sino las variantes CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c, que poseen la capacidad de infectar tanto a caninos como a felinos; mientras que FPV afecta solamente a los gatos domésticos (Balboni et al., 2018; Battilani et al., 2011; Decaro et al., 2008). El FPV ocasiona panleucopenia (disminución de todos los linajes de leucocitos circulantes en sangre) y enteritis (por replicación en enterocitos de las criptas intestinales) (Steinel et al., 2001; Stuetzer and Hartmann, 2014) que se manifiestan con los siguientes signos clínicos: anorexia, vómitos y diarrea. La infección del feto en el tiempo del parto provoca hipoplasia cerebelar. Las tasas de mortalidad se reportan entre 25 y 100%, y dependen de la gravedad de los signos clínicos (Stuetzer and Hartmann, 2014).

Los gatos infectados excretan el agente en grandes cantidades con las heces; sin embargo, desarrollan también anticuerpos, capaces de neutralizar el virus en las heces y en la sangre (Greene and Sykes, 2011; Stuetzer and Hartmann, 2014). En gatos infectados experimentalmente se ha detectado el virus en orina y heces hasta 41 días post infección, y en pulmones y riñones durante más de 50 semanas (Balboni et al., 2018). La detección de FPV y CPV-2 en células mononucleares de sangre periférica, en presencia de anticuerpos neutralizantes sugiere, que estos patógenos son capaces de mantenerse en los gatos después de la infección por períodos prolongados y de manera asintomática (Balboni et al., 2018; Decaro and Buonavoglia, 2017; Ikeda et al., 2000; Miyazawa et al., 1999).

En un estudio realizado entre 1998 y 2001 en Costa Rica, se determinó una seropositividad para FPV de 92,8% (n= 96) en gatos domésticos del Valle Central y un 100% (n=93) en gatos silvestres, usando Inhibición de la Hemaglutinación (IHA). En estos estudios se concluyó, que el alto número de seropositivos se debía probablemente a una alta contaminación ambiental debido a las altas tasas de infección y vacunación de perros (Blanco et al., 2009; 2011). Hasta la fecha, no se han determinado las variantes de protoparvovirus presentes en gatos domésticos de Costa Rica, por lo que la presente investigación propuso detectar y caracterizar las variantes de protoparvovirus presentes en células mononucleares de gatos seropositivos, para establecer el papel epidemiológico de estos agentes en los gatos y el riesgo potencial de transmisión de CPPV-1 en transfusiones de sangre entre gatos.

Materiales y métodos

Tipo de estudio y población a estudiar

Se realizó un estudio transversal, descriptivo y por conveniencia, con la finalidad de determinar la presencia e identificar el CPPV-1 (FPV, CPV-2 y sus variantes) en leucocitos de gatos del Valle Central de Costa Rica. Se contó con la autorización de la Comisión de Bienestar Animal y Bioética de la Escuela de Medicina Veterinaria



de la Universidad Nacional de Costa Rica (UNA-EMV-CBBA-ACUE-002-2021). A los propietarios de los gatos se les informó de la investigación y se les solicitó su consentimiento.

Toma de muestras de sangre e información general

Entre mayo y agosto de 2021 se recolectaron muestras de sangre de un total de 155 gatos domésticos del Valle Central de Costa Rica. Este número se determinó con WinEpi (95% de confianza y prevalencia mínima esperada del 2%), basándose en la suposición, de que el número total de gatos en la gran área metropolitana de Costa Rica es proporcional al 5% de la población humana de esa zona. Se recopilieron los siguientes datos de cada animal mediante una ficha clínica: fecha de recolecta de la muestra, identificación del animal, sexo, edad, raza, información sobre vacunación, ambiente en el que vive el animal (urbano o rural), si convive con otros gatos, estado de salud, padecimiento de enfermedades crónicas, estilo de vida (gato de interior o exterior) y lugar de procedencia. Posteriormente se procedió a tomar la muestra sanguínea, bajo la supervisión de un médico veterinario. Las muestras se mantuvieron a 4°C y en el laboratorio se separó 100ul para someterlas al analizador hematológico Abaxis VetScan HM5 de Zoetis. El resto de las muestras de sangre con EDTA se congelaron a -20°C hasta ser sometidas a análisis molecular. Las muestras de sangre recolectadas sin anticoagulante se centrifugaron a 10000 g por 19 minutos y el suero se guardó a -20°C hasta ser sometido a análisis serológico.

Inhibición de la hemaglutinación

El título de anticuerpos contra parvovirus se determinó en los sueros felinos utilizando la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IHA) descrita por Blanco y colaboradores (2009). Se utilizó como antígeno viral la vacuna contra parvovirus canino Vanguard® (Zoetis, USA), luego de su inactivación a 56°C por 30 minutos. Los sueros igualmente se inactivaron a 56°C por 30 minutos, se realizaron diluciones 1/10 de los mismos con PBS, y se absorbieron por cuatro horas a temperatura ambiente con eritrocitos de cerdo (al 1% en PBS y 1% suero fetal bovino). Posteriormente se realizaron diluciones en base de dos (1:20 hasta 1:2520) y añadió el antígeno viral (8 UHA), incubándose por 1 hora a temperatura ambiente, para luego agregar una suspensión de eritrocitos en PBS al 1% e incubar nuevamente por 40-50 minutos a 4°C. El título se determinó hasta la dilución en la que se observó la inhibición de la aglutinación (lengüetas). Gatos con títulos $\geq 1:80$ se consideraron protegidos.

Análisis molecular (reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación) y análisis filogenéticos

La extracción de ADN de la capa leucocitaria de las muestras de sangre se realizó con el kit DNeasy® Blood and Tissue (QIAGEN, Hilden, Alemania), como recomienda el fabricante. Luego se analizaron las muestras mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) siguiendo el protocolo de Balboni et al. (2018). Se utilizaron los iniciadores, A-for (5'-AGCTACTATTATGAGACC AGCTGAG-3') y B-rev (5'-CCTGCTGCAATAGGTGTTTAA-3'), direccionados para amplificar un fragmento de 99 pb del gen VP2. Como control positivo se utilizó el extracto de las vacunas Felocell® y Vanguard® (Zoetis, USA)



y como control negativo agua grado molecular. Todas las muestras amplificando el segmento esperado y con una curva de crecimiento superando el umbral (calculado automáticamente) entre los primeros 35 ciclos se consideraron positivas.

Las muestras que resultaron positivas en la qPCR se sometieron a una PCR anidada, según el protocolo descrito por Balboni et al. (2018) dirigido al gen de la proteína VP2 para diferenciar entre las variantes del CPPV-1, mediante los residuos de aminoácidos críticos 297, 300, 305, 323 y 426. En la primera ronda se utilizaron los iniciadores C-for (5'-CCATTTCCTAAATTCCTTTG-3'), D-rev (5'-TTTCTAGGTGCTAGTTG AG-3') y en la segunda ronda C-for (5'-CCATTTCCTAAATTCCTTTG-3'), E-rev (5'-AAG TCAGTATCAAATTCCT-3'), los cuales amplifican segmentos de 881 pb y 569 pb, respectivamente.

Los productos amplificados se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en Tris-Borato-EDTA (TBE), teñidos con fluorocromo GelRed DNA Stain (Biotium®). Las muestras que presentaron bandas con el peso molecular esperado de 569 pb fueron consideradas positivas. Las mismas fueron amplificadas y purificadas para ser enviadas a secuenciar por la empresa Macrogen en Seoul, Corea del Sur. Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor® (Hall, 1999) y alineadas con el programa Clustal Omega, además fueron comparadas con las secuencias disponibles en la base de datos de GenBank mediante la utilización del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Análisis estadístico

Se aplicó un análisis estadístico descriptivo para caracterizar las muestras positivas de la población muestreada.

Resultados

Del total de 155 muestras analizadas, 130 (84%) provenían de San José, 19 (12%) de Cartago, tres (2%) de Alajuela y tres (2%) de Heredia. Las muestras fueron recolectadas en clínicas veterinarias (20), en campañas de castraciones (120) y en hogares (15). La mayoría de los gatos analizados tenían edades entre uno a cinco años (68%), eran sin raza definida (97%), hembras (70%), no vacunados (89%), conviviendo con otros gatos (68%) de zonas urbanas (98%), y con posibilidad de salir de la casa (66%) (Cuadro 1).



Cuadro 1.

Características de los 155 gatos del Valle Central de Costa Rica que participaron en el estudio entre mayo y agosto de 2021.

Variable	Categoría	Gatos (n=155)	%
Edad	<6m	12	8
	6-11m	29	18
	1-5a	105	68
	>5a	9	6
Raza	Sin Raza Definida	151	97
	De Raza	4	3
Sexo	Macho	46	30
	Hembra	109	70
Vacunas	Vacunado	17	11
	No Vacunado	138	89
Enfermedades Crónicas	Presente	7	5
	No Presente	148	95
Estilo de Vida	Interior	52	34
	Exterior	103	66
Estado	Saludable	129	83
	No Saludable	26	17
Ambiente	Urbano	152	98
	Rural	3	2
Convivencia	Solo	49	32
	Con Otros Gatos	106	68
Anemia	Presente	3	2
	No Presente	152	98
Leucopenia	Presente	3	2
	No Presente	152	98
Procedencia	San José	130	84
	Alajuela	3	2
	Cartago	19	12
	Heredia	3	2



Mediante IHA se detectaron anticuerpos contra CPPV-1 en todos los gatos, 112 gatos (72,3%) presentaron títulos $\geq 1:80$ (Cuadro 2).

Cuadro 2.

Título de anticuerpos detectados contra CPPV-1 mediante IHA en sueros de 155 gatos del Valle Central de Costa Rica entre mayo a agosto de 2021.

Título	Gatos (n=155)	%
<1:80	43	28
$\geq 1:80$ -1:320	93	60
>1:320 -1:640	16	10
>1:640 - 1: 2560	3	2
TOTAL	155	100

Del total de 43 gatos que presentaron títulos menores a 1:80, la mayoría no se encontraban vacunados (97,7%), contaban con buena salud (83,7%), y convivían con otros gatos (65,1%). De éstos, 20 (46,5%) no tenían acceso al exterior, pero 13 de estos (30,2%) convivían con otros gatos. Tres gatas (2,0%) presentaron altos títulos con respecto a los demás, una de ellas con 1:2560 y dos con 1:1280, mientras que en los gatos vacunados se determinó que 16/17 (94,1%) mostraron títulos $\geq 1:80$, solamente uno de estos animales mostró título menor de 1:80.

Mediante la qPCR se detectó la presencia de CPPV-1 en sangre de 42 (27,1%) gatos (Ct 27-35). Un total de 34 (81%) gatos qPCR positivos presentaron títulos de anticuerpos igual o mayores a 1:80, la mayoría viviendo en áreas urbanas (97,6%), conviviendo con otros gatos en su vida diaria (69,0%), con acceso al exterior de su casa (59,5%), y en el rango etario de uno a cinco años (64,3%). Ninguno de los gatos positivos presentó enfermedad crónica, anemia o leucopenia, tres (7,1%) presentaron una baja condición corporal, pero con apetito, y sin ningún otro síntoma o signo asociado al CPPV-1, y cinco (11,9%) se encontraban vacunados (Cuadro 3).



Cuadro 3.

Características de los 42 gatos del Valle Central de Costa Rica que resultaron positivos en la qPCR entre mayo y agosto de 2021.

Variable	Categoría	N° Gatos positivos (n=42)	%
Edad	<6m	4	9,5
	6-11m	10	23,8
	1-5a	27	64,3
	>5a	1	2,4
Raza	Sin Raza Definida	41	97,6
	De Raza	1	2,4
Sexo	Macho	12	28,6
	Hembra	30	71,4
Vacunas	Vacunado	5	11,9
	No Vacunado	37	88,1
Castración	Castrado	42	100
	No Castrado	0	0
Enfermedades Crónicas	Presente	0	0
	No presente	42	100
Estilo de Vida	Interior	17	40,5
	Exterior	25	59,5
Estado	Saludable	39	92,9
	No Saludable	3	7,1
Ambiente	Urbano	41	97,6
	Rural	1	2,4
Convivencia	Solo	13	31
	Con otros gatos	29	69
Anemia	Presente	0	0
	No presente	42	100
Leucopenia	Presente	0	0
	No presente	42	100
Títulos de anticuerpos	<1:80	8	19
	≥1:80 -1:320	20	47,7
	>1:320 -1:640	11	26,2
	>1:640 - 1: 2560	3	7,1



No se encontró diferencias significativas entre gatos qPCR positivos y gatos qPCR negativos con respecto a títulos de anticuerpos contra CPPV-1, edad, convivencia, estilo de vida y sexo (Figura 1).

Prueba Chi Cuadrado

Nivel de confianza % : 95%
 Grados de libertad (gl) : 1

Títulos		qPCR		
		Positivos	Negativos	Total
menor 80		8	35	43
	mayor o igual 80	34	78	112
Total		42	113	155

Estadístico Chi-cuadrado (χ^2): 2.172
 Significación (p) : **0.1405**

Estilo de vida		qPCR		
		Positivos	Negativos	Total
Interior		17	35	52
	Exterior	25	78	103
Total		42	113	155

Estadístico Chi-cuadrado (χ^2): 1.240
 Significación (p) : **0.2654**

Edad		qPCR		
		Positivos	Negativos	Total
Adultos		28	86	114
	Cachorros	14	27	41
Total		42	113	155

Estadístico Chi-cuadrado (χ^2): 1.402
 Significación (p) : **0.2363**

Sexo		qPCR		
		Positivos	Negativos	Total
Hembra		30	79	109
	Macho	12	34	46
Total		42	113	155

Estadístico Chi-cuadrado (χ^2): 0.034
 Significación (p) : **0.8542**

Convivencia		qPCR		
		Positivos	Negativos	Total
Solos		13	36	49
	Con otros gatos	29	77	106
Total		42	113	155

Estadístico Chi-cuadrado (χ^2): 0.012
 Significación (p) : **0.9141**

Figura 1.

Resultados de la prueba del chi cuadrado entre el grupo de gatos qPCR positivos y negativos para las variables títulos de anticuerpos contra CPPV-1, edad, convivencia, estilo de vida y sexo.

Diez (23,8%) del total de 42 muestras positivas en la qPCR se lograron amplificar en la PCR convencional, purificar y secuenciar. Los genogrupos determinados fueron FPV en dos casos, con una similitud nucleotídica de 100% (532pb/532pb) con la secuencia M38246 depositada en GenBank, y que fue aislada de un gato con sintomatología en Estados Unidos y CPV-2, variante 2c en ocho casos. Seis muestras mostraron similitud nucleotídica del 100% (532pb/532pb) con la secuencia AF401519 de CPV-2c, aislada de heces de un perro con sintomatología en Estados Unidos, mientras que dos muestras presentaron una similitud del 99,8%, mostrando un cambio de nucleótido, una guanina en la posición 393 en lugar de una adenina (muestra M46) y una adenina en vez de una guanina en la posición 408 (muestra M91). En el Cuadro 4 se presentan las características de estos animales, ninguno contaba con vacunas, la mayoría (80%) tenían acceso al exterior y convivían con otros gatos.



Cuadro 4.

Características de los 10 gatos en los que se logró determinar la presencia del genogrupo de CPPV-1.

ID	Edad	Sexo	Acceso al exterior	Acceso a otros gatos	Vacunado	Título IHA	Genogrupo	Similitud nucleotídica (%)	Saludable
M8	1-5a	M	Sí	Sí	No	1:320	CPV-2c	100	Sí
M20	1-5a	M	Sí	Sí	No	1:640	CPV-2c	100	Sí
M21	1-5a	M	Sí	Sí	No	1:320	CPV-2c	100	Sí
M46	1-5a	H	Sí	Sí	No	1:640	CPV-2c	99.8	Sí
M60	<6m	H	No	No	No	1:640	FPV	100	Sí
M79	1-5a	H	Sí	Sí	No	1:160	CPV-2c	100	Sí
M85	1-5a	H	Sí	Sí	No	1:640	CPV-2c	100	Sí
M88	6-11m	H	Sí	Sí	No	1:160	CPV-2c	100	Sí
M91	6-11m	H	Sí	Sí	No	1:640	CPV-2c	99.8	Sí
M153	<6m	H	No	No	No	1:640	FPV	100	Sí

NOTA H= Hembra, M= Macho

En el Cuadro 5 se muestran las posiciones más importantes en la identificación de genotipos del CPPV-1, comparando los aminoácidos que corresponden a las secuencias de referencia con los obtenidos de las muestras secuenciadas en esta investigación.



Cuadro 5.

Comparación de aminoácidos relevantes de la proteína parcial VP2 encontrada en la cápside de CPPV-1 en las muestras secuenciadas e identificación de genogrupos y sus variantes.

Muestra	297	300	305	323	375	426	Tipo
FPV ^a	Ser	Ala	Asp	Asp	Asp	Asn	
CPV-2 ^b	●	●	●	Asn	Asn	●	
CPV-2a ^c	●	Gly	Tyr	Asn	●	●	
CPV-2b ^d	●	Gly	Tyr	Asn	●	Asp	
CPV-2a ^e	Ala	Gly	Tyr	Asn	●	●	
CPV-2b ^f	□	Gly	Tyr	Asn	●	Asp	
CPV-2c ^g	Ala	Gly	Tyr	Asn	●	Glu	
M8	Ala	Gly	Tyr	Asn	●	Glu	CPV-2c
M20	Ala	Gly	Tyr	Asn	●	Glu	CPV-2c
M21	Ala	Gly	Tyr	Asn	●	Glu	CPV-2c
M46	Ala	Gly	Tyr	Asn	●	Glu	CPV-2c
M60	●	●	●	●	●	●	FPV
M79	Ala	Gly	Tyr	Asn	●	Glu	CPV-2c
M85	Ala	Gly	Tyr	Asn	●	Glu	CPV-2c
M88	Ala	Gly	Tyr	Asn	●	Glu	CPV-2c
M91	Ala	Gly	Tyr	Asn	●	Glu	CPV-2c
M153	●	●	●	●	●	●	FPV

NOTA Los aminoácidos específicos del huésped que diferencian FPV y CPV están resaltados con gris. Las secuencias de aminoácidos deducidas del gen VP2 se obtuvieron de GenBank, específicamente: ^aPrototipo FPV: cepa FPV-b (M38246), ^bPrototipo CPV tipo 2: cepa CPV-b (M38245), ^cPrototipo CPV tipo 2a: cepa CPV-15 (M24003), ^dPrototipo CPV tipo 2b: cepa CPV-39 (M74849), ^eCepa de referencia CPV tipo 2a: CPV-677 (AF306445), ^fCepa de referencia CPV tipo 2b: CPV-637 (AF306450), ^gCepa de referencia CPV tipo 2c: CPV-695 (AF401519).

El análisis filogenético de las secuencias obtenidas de los diez gatos se muestra en la Figura 2.

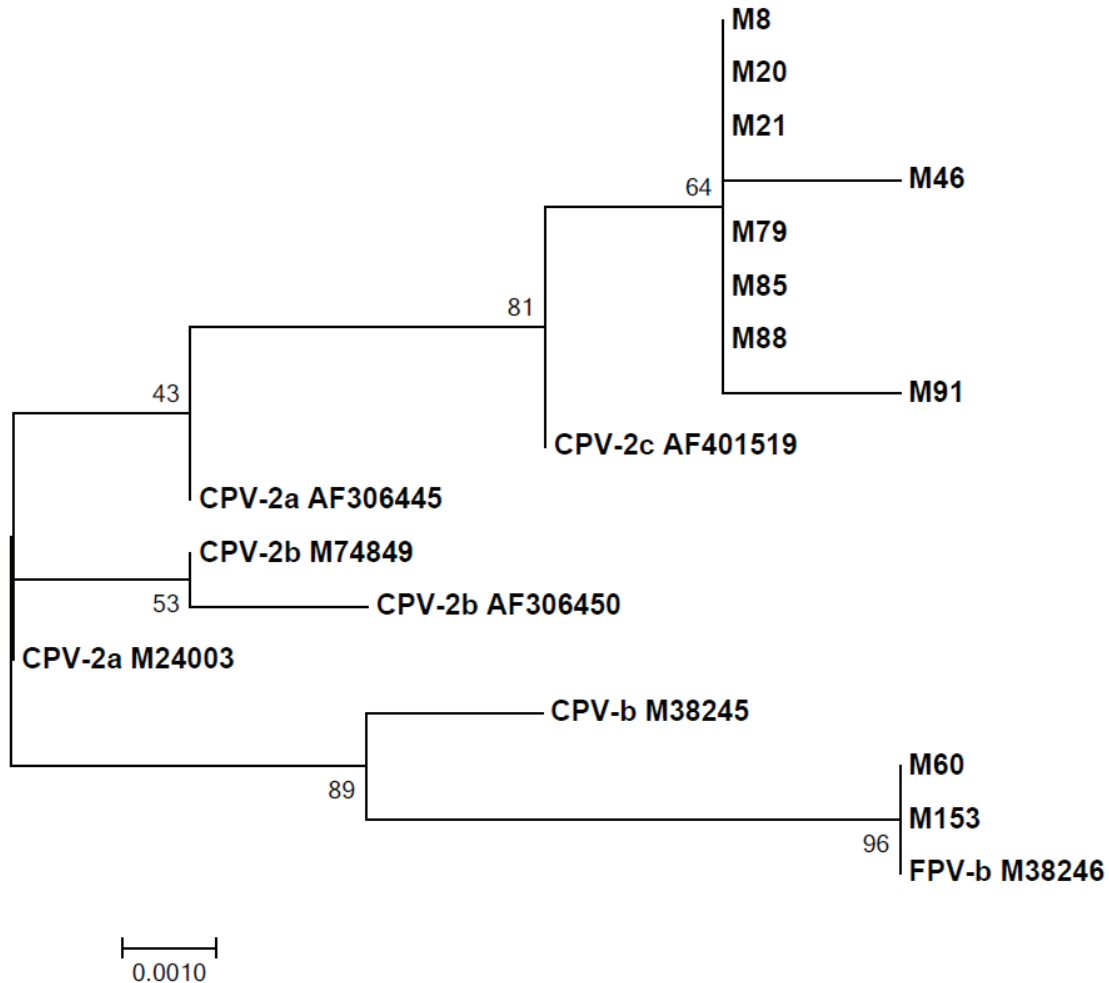


Figura 2.

Cladograma del análisis filogenético de 10 secuencias de CPPV-1 aisladas de gatos de Costa Rica (M8, M20, M21, M46, M60, M79, M85, M88, M91, M153), y 7 secuencias de referencia (FPV-b (M38246), CPV-b (M38245), CPV-15 (M24003), CPV-39 (M74849), CPV-677 (AF306445), CPV-637 (AF306450), CPV-695 (AF401519)) por método de máxima verosimilitud, se eliminaron todas las posiciones que contenían lagunas y datos faltantes, finalmente se trabajó con 532 posiciones.

Discusión

Todos los animales analizados presentaron anticuerpos contra CPPV-1, lo que concuerda con el estudio de Blanco y colaboradores (2009) que encontraron una seroprevalencia de FPV de 92,8% en la población de gatos de la Gran Área Metropolitana del país. Del total de los 155 gatos analizados un 72,3% de los animales mostraron títulos protectivos, mientras que en el estudio de Blanco et al. (2009) todos los gatos seropositivos mostraron títulos protectivos. Esta diferencia podría deberse a un cambio en el comportamiento de los

propietarios de gatos, que han ido entendiendo la importancia de mantener a sus mascotas dentro de la casa (World Animal Protection, 2016). Solamente 17 animales se encontraban vacunados, de los cuales 16 mostraron títulos protectivos (1:80-1:1280). Solamente en un caso se determinó un título bajo, en un gato de un año, esto podría haberse debido a una interferencia de los anticuerpos maternos con la vacuna (Truyen et al., 2009). Sin embargo, la gran mayoría de gatos en edad adulta (94,3%) no se encontraban vacunados. La alta presencia de anticuerpos contra CPPV-1 determinada en la población de gatos se puede deber por un lado a la alta resistencia del agente en el medio ambiente (hasta dos años) y en superficies, lo que ocasiona, que los animales se infecten en forma indirecta en varios momentos de su vida (Mauro, 2015; Neuerer et al., 2008; Poole, 1972), por el otro lado, al estilo de vida de los gatos, ya que un 66% tenían acceso al exterior, lo que se considera un factor de riesgo (Blanco et al., 2009), así Balboni y colaboradores (2018) detectaron CPPV-1 en el 67% de gatos que tenían acceso al exterior. En el estudio de Blanco et al. (2008) se sugirió una exposición natural de los gatos de Costa Rica al FPV, y en etapas tempranas de la vida, debido por un lado a la estabilidad y resistencia del agente en el medio ambiente como también a una alta presencia del agente en la población felina. Otra posible razón que se discutió fue el contacto y la exposición natural de gatos domésticos con CPV, una infección muy común en perros de Costa Rica, y que al compartir antígenos con FPV, podría estar reaccionando en forma cruzada e induciendo infección natural y seroconversión en los gatos.

La detección de ADN de CPPV-1 en sangre de un 27% de gatos, confirma lo reportado por Balboni et al. (2018) e Ikeda et al. (2000), que también encontraron el agente en 16,7% y 66,7% de gatos sanos, como recuperados de Italia y Vietnam-Taiwán, respectivamente, sugiriendo infecciones latentes (Balboni et al., 2018; Ikeda et al., 2002). Los mecanismos que utiliza el agente para ocasionar estas infecciones persistentes se desconocen; sin embargo, se cree que las células mononucleares de la sangre periférica de gatos infectados funcionan como reservorio del virus (Ikeda et al., 2002). Esto es importante tomar en cuenta, al momento de realizar transfusiones sanguíneas entre gatos, ya que los pacientes que requerirán la sangre podrían encontrarse con la salud y el sistema inmune comprometido (Pennisi et al., 2015). Sin embargo, se desconoce a la fecha, si el animal que recibirá células mononucleares infectadas se infectará y enfermará, lo que aún debe de investigarse.

El grupo de gatos qPCR positivo no mostró diferencias significativas con el grupo qPCR negativo con respecto a edad, sexo, estilo de vida, convivencia con otros gatos y título de anticuerpos, por lo que no se pudo establecer que estas variables cualitativas y su resultado en la qPCR estén significativamente asociados, concordando con estudios anteriores (Balboni et al., 2018; Ikeda et al., 2002); sin embargo, se requiere de más estudios con una población más amplia para poder establecer si existe o no asociación.

De los animales qPCR positivos, cinco (11,9%) tenían historial de vacunación; sin embargo, es imposible establecer, si el ADN encontrado en los gatos era de la vacuna, de una infección previa o una infección después de la vacunación. Estudios han demostrado que el virus vacunal (CPPV-1) se replica en sangre y mucosa intestinal, y que los animales liberan el virus por algunos días en sus heces, sufriendo una infección leve o asintomática (Bergmann, 2019), pero se desconoce hasta la fecha, si las vacunas producen persistencia o pueden evitar una infección persistente en los animales

Los resultados obtenidos también parecen indicar, que el título de anticuerpos del animal no se relaciona con la persistencia del virus en la sangre, ya que se determinaron gatos con títulos de anticuerpos tanto altos como bajos, infectados persistentemente con CPV y FPV, por lo que se recomienda analizar en futuros estudios factores que pueden ocasionar la persistencia del virus en los gatos (Balboni et al., 2018; Ikeda et al., 2002).



Esta es la primera vez que se determina la presencia de FPV y CPV-2c en gatos domésticos en el país y en Centroamérica. Los dos gatos en los que se detectó FPV fueron hembras, con menos de seis meses de edad, saludables, sin vacunación, y con un estilo de vida de interior, sin convivir con otros gatos, y presentaron títulos de anticuerpos protectivos. La infección de estos dos animales parece haber ocurrido a muy temprana edad, por transmisión de sus madres, antes de llegar a vivir con sus propietarios, o por contaminación de fómites que ingresaron al hogar (Hellard et al., 2011; Truyen et al., 2009), mientras que los ocho gatos CPV-2c positivos, en contraste, fueron adultos (entre seis meses a cinco años), sin vacunación, con un estilo de vida de exterior, y que convivían con otros gatos.

Se recomienda seguir investigando el riesgo de infección y propagación de CPPV-1 en gatos de Costa Rica, sobre todo, si la vacunación con FPV induce persistencia, si la vacuna puede prevenir infecciones con FPV o PVC-2 en los gatos, establecer el momento en que los gatos seroconvierten por primera vez, y si es debido a FPV o PVC, si desarrollan enfermedad, si se generan animales portadores sanos, y si estos gatos eliminan el FPV o PVC-2 en las heces. Esto ayudaría a comprender el papel de los gatos en el ciclo de infección de CPPV-1 (Blanco et al., 2009; Byrne et al., 2018; Gleich et al., 2009; Hellard et al., 2011; Murray et al., 2009).

La razón por la cual solamente se lograron amplificar y secuenciar diez de un total de 27 muestras en la PCR anidada se debe probablemente a la mayor sensibilidad de la PCR en tiempo real (Desario et al., 2005).

El CVP-2c fue la variante predominante en esta investigación, sin embargo, por ser este un estudio no sistemático no se puede descartar la presencia de las otras variantes en la población de gatos de nuestro país. Los resultados, sin embargo, coinciden con los presentados por Orozco et al. (2021), en donde se reportó la CPV-2c como la cepa más prevalente en perros de Latinoamérica, seguidas por CPV2a y CPV-2b.

No se pudo determinar si CPV-2c y FPV ocasionan enfermedad clínica en los gatos, debido a que se analizaron animales sanos, pero reafirma que CPPV-1 es capaz de mantenerse en los gatos de manera asintomática (Balboni et al., 2018; Haynes & Holloway, 2012; Ikeda et al., 2000; Miyazawa et al., 1999), apuntando a que éstos puedan jugar un papel como reservorios del virus (Clegg et al., 2012).

Las variaciones nucleotídicas encontradas en dos de las secuencias de CPV-2c, aunque se trataron de mutaciones sinónimas (que producen el mismo aminoácido), demuestran la gran capacidad de cambio del virus. Además, los felinos podrían infectarse tanto con FPV como con las tres variantes de CPV-2, y podrían ocurrir superinfecciones y coinfecciones con diversas cepas de parvovirus (Balboni et al., 2018; Battilani et al., 2006; Battilani et al., 2011), ocasionando oportunidades de recombinaciones y ocasionando una heterogenicidad genética alta (Battilani et al., 2011). Es importante investigar esto también para determinar el papel del gato en la propagación y patogenicidad de CPPV-1.

Conflicto de Intereses

Los autores declaramos que no poseemos conflicto de intereses con los temas expuestos.



Conclusiones

En un 27,1% (n=42) de los gatos analizados del Valle Central de Costa Rica se detectó la presencia de CPPV1 en sangre, identificándose el genogrupo FPV en dos gatos menores de seis meses y el genogrupo CPV-2c en leucocitos de ocho gatos adultos. Todos los gatos presentaron anticuerpos contra el virus, pero solo un 72% (n=112) mostró títulos protectivos (mayor o igual a 1:80). Se recomienda realizar estudios con una muestra más amplia de felinos, para determinar si existen más genogrupos presentes en gatos, si alguna de las variantes ocasiona enfermedad en los gatos, además investigar el riesgo de infección y propagación de CPPV-1 y establecer si la vacuna previene la persistencia de FPV en estos.

Agradecimientos

Al doctor Julio Murillo y a la doctora Gloriana Castillo de la Universidad Nacional por su disposición de ayudar. A la Doctora Alexandra Fallas y a Julia Rojas de Catrix por todo el apoyo brindado.

Referencias

- Balboni, A., Bassi, F., De Arcangeli, S., Zobba, R., Dedola, C., Alberti, A., Battilani, M. (2018). Molecular analysis of carnivore Parvovirus detected in white blood cells of naturally infected cats. *BMC Veterinary Research*, 14(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1356-9>
- Battilani, M., Forti, D., Morganti, L. (2006). Analysis of the evolution of feline parvovirus (FPV). *Veterinary Research Communications*, 30(1), 223-226. <https://doi.org/10.1007/s11259-006-0046-4>
- Battilani, M., Scagliarini, A., Ciulli, S., Morganti, L., Prospero, S. (2006). High genetic diversity of the VP2 gene of a canine parvovirus strain detected in a domestic cat. *Journal of Virology*, 352(1), 22-26. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.06.002>
- Battilani, M., Balboni, A., Ustulin, M., Giunti, M., Scagliarini, A., Prospero, S. (2011). Genetic complexity and multiple infections with more Parvovirus species in naturally infected cats. *Veterinary Research Communications*, 42(1), 43. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-43>
- Bergmann, M., Schwertler, S., Speck, S., Truyen, U., Reese, S., Hartmann, K. (2019). Faecal shedding of parvovirus deoxyribonucleic acid following modified live feline panleucopenia virus vaccination in healthy cats. *Veterinary Record*, 185(3), 83-83. <https://doi.org/10.1136/vr.104661>
- Blanco, K., Prendas, J., Cortes, R., Jimenez, C., Dolz, G. (2009). Seroprevalence of viral infections in domestic cats in Costa Rica. *Journal of Veterinary Science*, 71(5), 661-663. <https://doi.org/10.1292/jvms.71.661>
- Blanco, K., Peña, R., Hernández, C., Jiménez, M., Araya, L.N., Romero, J.J., Dolz, G. (2011). Serological detection of viral infections in captive wildcats from Costa Rica. *SAGE-Hindawi Access to Research, Veterinary Medicine International*, Article 879029. <https://doi.org/10.4061/2011/879029>
- Byrne, P., Beatty, J.A., Šlapeta, J., Corley, S.W., Lyons, R.E., McMichael, L., Kyaw-Tanner, M.T., Dung, P.T., Decaro, N., Meers, J., Barrs, V.R. (2018). Shelter-housed cats show no evidence of faecal shedding of canine parvovirus DNA. *Veterinary Journal*, 239, 54-58. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.08.005>



- Castro, F.F.C., Rodríguez, M.P.M. (2016). Rabia en un gato doméstico (*Felis silvestris catus*) en el municipio de Yumbo, Valle del Cauca, Colombia. *UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 19(1), 243-246. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262016000100028
- Clegg, S.R., Coyne, K.P., Dawson, S., Spibey, N., Gaskell, R.M., Radford, A.D. (2012). Canine parvovirus in asymptomatic feline carriers. *Veterinary Microbiology*, 157(1-2), 78-85. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.12.024>
- Dawson, S., Willoughby, K., Gaskell, R.M., Wood, G., Chalmers, W.S.K. (2001). A field trial to assess the effect of vaccination against feline herpesvirus, feline calicivirus and feline panleucopenia virus in 6-week-old kittens. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 3(1), 17-22. <https://doi.org/10.1053/jfms.2000.0154>
- Decaro, N., Desario, C., Miccolupo, A., Campolo, M., Parisi, A., Martella, V., Amorisco, F., Lucente, M.S., Lavazza, M., Buonavoglia, C. (2008). Genetic analysis of feline panleukopenia viruses from cats with gastroenteritis. *Journal of General Virology*, 89(9), 2290-2298. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/001503-0>
- Decaro, N., Buonavoglia, C. (2017). Canine parvovirus post-vaccination shedding: interference with diagnostic assays and correlation with host immune status. *The Veterinary Journal*, 221, 23-24. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.01.020>
- Desario, C., Decaro, N., 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? *Journal of Virological Methods*, 126(1-2):179-185. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.02.006>
- Greene, C., Sykes, J. (2011). *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. (4th ed). Elsevier. 120-121p.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: to user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98. <https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/29520866/1999hall1-libre.pdf?1390876715=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DBioEdit+a+user+friendly+biological+sequ.pdf&Expires=1674852391&Signature=QODmY~hEMBFZqtRJfpgCfDLHqj4XMGYZXRzbt0xWr6~A5Bfh3JldMwmCrEbkMd7r4y-Hq2OUAzC9j-PdMUv8833nUBZcAzFQfjDdhTtT9~uQ5OOpmCwqoMDZ0P31CZ7jZ6wZazOpubR3lRzblTC9Q5xyftd~Sfb2y3TxRVSp6O88PNZ~-dZTcitu89DUjf10LEYS7inHk0bbRTFHP9xkhgcQ0Maxs4HM~MnB3A5N~42w6miWlglucUcVie8mxUPMcFom2xjCa4izypvOPVadGnRVBH65vVI36nPLedk5KdMRHdRNeaUS6FM9m54GQ836KwuSOmlWxuu5BouPOY-w &Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA>
- Haynes, S.M., Holloway, S.A. (2012). Identification of parvovirus in the bone marrow of eight cats. *The Australian Veterinary Journal*, 90(4), 136-139. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2012.00899.x>
- Hellard, E., Fouchet, D., Santin-Janin, H., Tarin, B., Badol, V., Coupier, C., Leblanc, G., Poulet, H., Pontier, D. (2011). When cat's ways of life interact with their viruses: a study in 15 natural populations of owned and unowned cats (*Felis silvestris catus*). *Preventive Veterinary Medicine*, 101(3-4), 250-264. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.04.020>
- Hoelzer, K., Shackelton, L.A., Parrish, C.R., Holmes, E.C. (2008). Phylogenetic analysis reveals the emergence, evolution and dispersal of carnivore parvoviruses. *Journal of General Virology*, 89(9), 2280. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/002055-0>
- 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 Journal*, 278(1), 13-19. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0653>



- Ikeda, Y., Nakamura, K., Miyazawa, T., Tohya, Y., Takahashi, E., Mochizuki, M. (2002). Feline host range of canine parvovirus: recent emergence of new antigenic types in cats. *Emerging Infectious Diseases*, 8(4), 341. <https://doi.org/10.3201/eid0804.010228>
- Mauro, L.D. (2015). Claves para comprender a la Parvovirus canina producida por la variante CPV-2c. *Revista Electronica de Veterinaria*, 16(2), 1555–60. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63641398001>
- Miyazawa, T., Ikeda, Y., Nakamura, K., Naito, R., Mochizuki, M., Tohya, Y., Vu, D., Mikami, T., Takahashi, E. (1999). Isolation of feline parvovirus from peripheral blood mononuclear cells of cats in northern Vietnam. *Medical Microbiology and Immunology*, 43(6), 609-612. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1999.tb02447.x>
- Neuerer, F., Horlacher, F.K., Truyen, U., Hartmann, K. (2008). Comparison of different in-house test systems to detect parvovirus in faeces of cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 10(3), 247–251. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2007.12.001>
- Orozco, C.V., Osorio, A.L.B., López, M.F.L., Morales, A.J.R. (2021). *Parvovirus canino en Latinoamérica*. [Tesis de Licenciatura, Universidad Tecnológica de Pereira]. <https://repositorio.utp.edu.co/server/api/core/bitstreams/666c0ec1-b373-4321-a2e9-7253f8e5cb9f/content#:~:text=El%20parvovirus%20canino%20no%20solamente,en%20los%20diferentes%20pa%C3%ADses%20latinoamericanos.>
- Parrish, C.R. (1999). Host range relationships and the evolution of canine parvovirus. *Veterinary Microbiology*, 69(1-2), 29-40. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00084-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00084-X)
- Poole, G.M. (1972). Stability of a modified, live panleucopenia virus stored in liquid phase. *Journal of Applied Microbiology*, 24(4), 663-664. <https://doi.org/10.1128/am.24.4.663-664.1972>
- Restrepo, J.F.C., González, L.F., Zapata, L.M.M., Sáenz, J.R. (2013). Virus de la leucemia felina: un patógeno actual que requiere atención en Colombia. *Veterinaria y Zootecnia*, 7(2), 117-138. <https://revistasojs.ucaldas.edu.co/index.php/vetzootec/article/view/4387>
- Steinel, A., Munson, L., Van Vuuren, M., Truyen, U. (2000). Genetic characterization of feline parvovirus sequences from various carnivores. *Journal of General Virology*, 81(2), 345-350. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-2-345>
- Steinel, A., Parrish, C.R., Bloom, M.E., Truyen, U. (2001). Parvovirus infections in wild carnivores. *Journal of Wildlife Diseases*, 37(3), 594-607. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-37.3.594>
- Stuetzer, B., Hartmann, K. (2014). Feline parvovirus infection and associated diseases. *The Veterinary Journal*, 201(2), 150-155. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.05.027>
- Tattersall, P. (2006). *The evolution of parvovirus taxonomy*. Hodder Arnold. 5-14 p.
- Truyen, U., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Hosie, M.J., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M.G., Radford, A.D., Thiry, E., Horzinek, M.C. (2009). Feline panleukopenia. ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11(7), 538-546. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2009.05.002>
- World Animal Protection. (2016). *Estudio Nacional sobre tenencia de perros en Costa Rica 2016*. World Animal Protection. 50p. <https://issuu.com/wspalatam/docs/estudioperros-web-singles>