

Original

# Identificación de parvovirus canino tipo 2C en cachorros de Nicaragua

Byron Flores S<sup>1\*</sup>  Ph.D; Jairo Mairena S<sup>1</sup>  DMV; Jorge Gutiérrez S<sup>1</sup>  DMV; Jessica Sheleby-Elías<sup>1</sup>  Ph.D; Héctor Fuertes N<sup>2</sup>  Ph.D; Nabil Halaihel K<sup>2</sup>  Ph.D.

<sup>1</sup>Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León (UNAN-León), Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinarias, Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación (CEVEDI), Carretera a la Ceiba 1 Km al Este, León, Nicaragua.

<sup>2</sup>Universidad de Zaragoza, Faculty of Veterinary Sciences, Department of Animal Pathology, Miguel Servet 177, 50013, Zaragoza, Spain.

\*Correspondencia: [byronfloressomarriba@gmail.com](mailto:byronfloressomarriba@gmail.com)

Recibido: Agosto 2019; Aceptado: Enero 2020; Publicado: Mayo 2020.

## RESUMEN

**Objetivo.** Identificar los genotipos de parvovirus canino-circulantes en cachorros en dos municipios de Nicaragua. **Materiales y métodos.** Se recolectaron muestras por hisopado rectal de 45 cachorros con y sin antecedentes de vacunación, menores de 6 meses de edad, con y sin sintomatología compatible con parvovirus. Las muestras y dos de las vacunas que se comercializan en Nicaragua (vacuna n<sup>o</sup>1 y vacuna n<sup>o</sup>2) fueron analizadas por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional para un producto de  $\approx 630$  pb del gen VP2. Además, el producto directo del PCR se secuenciaron en sentido reverso cuatro muestras de campo elegidas aleatoriamente y las dos cepas vacunales. **Resultados.** El 28.9% (13/45) de las muestras analizadas fueron positivas en PCR. No se encontraron diferencias significativas en la detección por PCR del fragmento de VP2, respecto al estado de vacunación de los animales ( $p \geq 0.05$ ). Las cuatro muestras de campo secuenciadas fueron identificadas como genotipo CPV-2C y las dos cepas vacunales se identificaron como genotipo CPV-2A. **Conclusiones.** la inferencia evolutiva de las secuencias alineadas de cepas vacunales mostró alta divergencia evolutiva respecto a las cepas de campo, este hallazgo lleva a replantear el tema sobre la eficacia de las vacunas analizadas en este trabajo y que son aplicadas en Nicaragua.

**Palabras clave:** Vacuna, PCR, genotipo, parvovirus, diarrea (*Fuente: DeCS*).

## ABSTRACT

**Objective.** To identify genotypes of canine parvovirus circulating in puppies in two municipalities of Nicaragua. **Materials and methods.** Rectal swab samples were collected from 45 puppies (less than 6 months of age) with or without a vaccination history, showing or not symptomatology compatible with parvovirus. The samples and two of the vaccines that are marketed in Nicaragua (vaccine n<sup>o</sup>1 and vaccine n<sup>o</sup>2) were analyzed by conventional Polymerase Chain Reaction (PCR) to a product of  $\approx 630$  bp of the VP2 gene. In addition, four randomly chosen field samples and both vaccine strains were sequenced in reverse sense. **Results.** 28.9% (13/45) of the analyzed samples were positive by PCR, for the fragment of CPV VP2 gene. No significant difference ( $p \geq 0.05$ ) was seen in PCR detection between dogs with or without vaccination history. The four sequenced field samples were identified

### Como citar (Vancouver).

Flores B, Mairena J, Gutiérrez J, Sheleby-Elías J, Fuertes H, Halaihel N. Identificación de parvovirus canino tipo 2C en cachorros de Nicaragua. Rev MVZ Córdoba. 2020; 25(2):e1788. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1788>



©El (los) autor (es), Revista MVZ Córdoba 2020. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

as CPV-2C genotype while both vaccine strains were identified as CPV-2A genotype. **Conclusions.** The aligned sequences showed high evolutionary divergence of field strains with respect to vaccines strains, leading us to rethink the efficacy of the analyzed vaccines which are nowadays commercially available in Nicaragua.

**Keywords:** Vaccine, PCR, genotype, parvoviruses, diarrhea (*Source: DeCS*).

## INTRODUCCIÓN

El parvovirus canino tipo 2 (PVC-2), es el agente causal más importante de muertes en cachorros alrededor del mundo, desde su aparición en 1978 (1). Este virus se ha asociado a una enfermedad caracterizada por un síndrome que consiste en vómitos, diarrea hemorrágica severa, de aparición súbita (2).

El CPV-2 apareció como mutación de un virus similar al de la panleucopenia felina (FPLV), y logró adaptarse a los caninos. A pesar de haber vacunas disponibles en el mercado, el parvovirus aún es el agente etiológico más importante de gastroenteritis virales en cachorros. La cepa original denominada parvovirus canino tipo 2 (CPV-2) desde que surgió, ha sufrido alteraciones genéticas, llevando a la aparición de nuevas variantes (3). En 1980 el CPV-2, mutó a la variante CPV-2A y en 1984 se describió el CPV-2B, asociada a una mutación, que resultó en un cambio del aminoácido asparagina por aspartato en la posición 426 del gen VP-2 (4,5).

En el año 2000 se detectó en Italia por primera vez una tercera variante conocida como CPV-2C, con otra mutación en la misma posición, (glutamato). Esta nueva variante se ha diseminado rápidamente en la población canina en varias regiones (5). En Sudamérica, se han diagnosticado cepas CPV-2C más virulentas que sus antecesoras CPV-2A y CPV-2B (6–8)CPV-2b, and CPV-2c. En México los investigadores también refieren que la variante C es la predominante (9,10). En Centroamérica los estudios moleculares para identificar variantes son inexistentes. Por lo tanto, se hace necesario conocer las variantes de parvovirus canino-circulantes en Nicaragua y la relación filogenética con las cepas vacunales que actualmente se comercializan en la región.

El objetivo del presente trabajo fue identificar los genotipos de parvovirus canino-circulantes en cachorros en dos municipios de Nicaragua.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Recolección de muestras e información general.** Se recolectaron muestras por hisopado rectal de 45 cachorros con y sin antecedentes de vacunación, los perros debían tener menos de seis meses de edad y presentar (n=30) o no (n=15) sintomatología compatible con parvovirus. Los datos sobre las diferentes variables fueron recolectados en el mismo momento de la toma de muestra, con ayuda de una ficha de colección de datos, que incluyó información general y sobre la enfermedad en el canino.

**Extracción de ADN viral.** Los hisopos con las muestras fueron colocados en viales de 1.5 ml, se agregaron 200 µl de agua libre de nucleasas, se aplicó Vortex por 20 segundos, luego se utilizó el protocolo descrito por el fabricante (QIAamp DNA Mini Kit QIAGEN), con la diferencia de que, en el último paso, el ADN se eluyó en 200 µl de agua libre de nucleasas. También se obtuvo ADN de las dos vacunas que son comercializadas en país; estas fueron identificadas como vacuna n°1 y vacuna n°2. Como control negativo para la extracción se utilizó agua libre de nucleasas.

**Amplificación del gen VP2.** Se utilizó PCR convencional con los cebadores Hfor/Hrev (5'-CAGGTGATGAATTTGCTACA-3'/5'-CATTTGGATAAACTGGTGGT-3'), descritos previamente (5), que flanquean un segmento de ≈ 630 pb del gen VP2 del parvovirus canino. El volumen final de reacción fueron 50 µl, agregando 25 µl de Máster Mix 2X (Promega, EE. UU), 12 µl de agua libre de nucleasas, 4 µl del cebador Hfor (1x10<sup>3</sup> nM), 4 µl de cebador Hrev (1x10<sup>3</sup> nM) y 5µl de muestra de ADN. La reacción de PCR se realizó con el Termociclador Applied Biosystem 2720, elevando la temperatura a 94°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos (95°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto), una extensión final durante 7 minutos a 72°C. Se utilizó como control positivo el ADN extraído de las vacunas n°1 y n°2, como control

negativo se utilizó la muestra de agua que fue procesada como una muestra en la extracción de ADN. Para visualizar los productos del PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.3% teñido con bromuro de etidio, aplicando 10 µl del producto de amplificación en cada pozo. La visualización se realizó en un transiluminador de luz UV.

**Secuenciación.** Se realizó la secuenciación en sentido reverso (cebador Hrev) para cuatro muestras de campo elegidas aleatoriamente más las vacunas nº1 y nº2. Las secuencias fueron realizadas en el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Universidad de Costa Rica (UCR),

**Análisis filogenético.** Las secuencias de cada cepa fueron alineadas mediante ClustalW 1.6, la historia de evolución fue inferida usando el método de Neighbor-Joining, mientras que las divergencias evolutivas fueron calculadas aplicando el método de máxima verosimilitud y se presentan como unidades de bases de sustituciones por sitio. Se realizó la prueba bootstrap (500 repeticiones) como estadístico de significancia y se muestra como el porcentaje de aparición de cada taxón en el árbol filogenético (11). El análisis se llevó a cabo con ayuda del software Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6 (MEGA 6) (12). La identificación del genotipo se determinó en base al aminoácido correspondiente al codón 426 del gen VP2 (5). Las secuencias fueron enviadas al National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando BankIt (13), obteniendo los números de acceso MN517818, MN517819, MN541177, MN541178 para las muestras, los números MN541179 y MN541180 fueron asignados a la vacuna nº1 y vacuna nº2 respectivamente.

**Análisis estadístico.** Los resultados se presentan en porcentajes y números absolutos, mientras que, para la búsqueda de asociación de variables categóricas se aplicó la prueba exacta de Fisher y T de Student para la edad en meses.

**Consideraciones éticas.** La toma de muestra se realizó siempre y cuando el dueño estuviera de acuerdo una vez explicado el motivo, sin causarle ningún daño o alteración al cachorro.

## RESULTADOS

En el presente estudio el 28.9% (13/45) de los cachorros analizados fueron positivos a parvovirus canino en la PCR. El 66.7% (30/45) de los perros muestreado presentaron diarrea, el 43.3% (13/30) de los perros con diarrea amplificaron el gen VP2 y el 100% (15/15) de los perros sin diarrea fueron negativos a parvovirus, ( $p < 0.01$ ) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Asociación del PCR con variables de los caninos muestreados.

Variables	Resultado PCR		Total	Sig	
	Positivo	Negativo			
Diarrea	Si	13	17	30	$p < 0.01^a$
	No	0	15	15	
	Total	13	32	45	
Hematoquecia	Si	11	7	18	$p < 0.01^a$
	No	2	25	17	
	Total	13	32	45	
Antecedentes de Vacunación*	Si	7	11	18	$p \geq 0.05^a$
	No	4	15	19	
	Total	11	26	37	
Edad en meses	2.70	5.05			$p < 0.01^b$

Sig= Significancia;

\*Solo se obtuvo información de 37 caninos

<sup>a</sup>:Según la prueba de Fisher; <sup>b</sup>:Según la prueba de T de Student

Las muestras que resultaron positivas para el fragmento de Vp2, provenían de animales con un promedio de edad de 2.7 meses, los animales en los que no se detectó parvovirus, tenían un promedio de edad de 5.05 meses ( $p < 0.01$ ) (Tabla 1).

Los perros positivos en PCR presentaron una media de 2.70 meses de edad, en cambio los negativos presentaron promedio de edad de 5.05 meses ( $p < 0.01$ ) (Tabla 1).

De los 45 perros muestreados, solo en 37 se obtuvo alguna información relacionada con la vacunación contra parvovirus. De estos, 18 propietarios afirmaron haber vacunado sus cachorros, y 19 no recibieron vacunación. No obstante, el 38.9% (7/18) de los perros vacunados, resultaron positivos, y el 21.0% (4/19) de los no vacunados resultaron infectados con parvovirus ( $p \geq 0.05$ ) (Tabla 1).

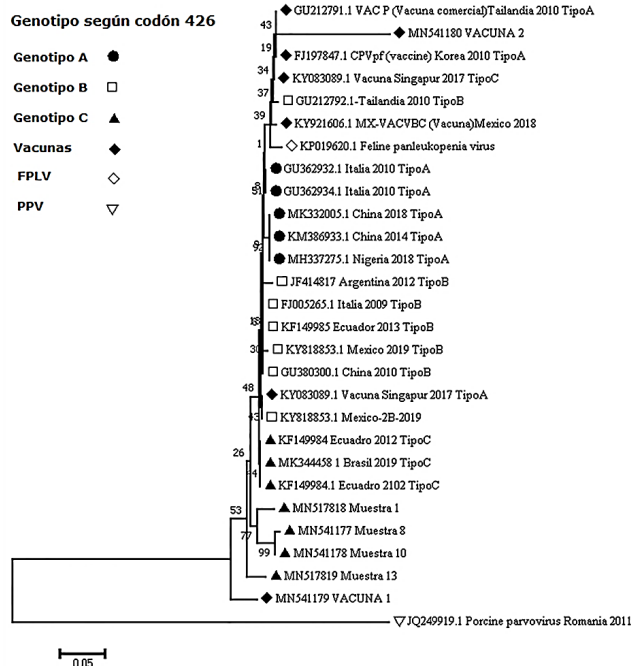
Basado en la secuencia nucleotídica de la posición 426 del gen VP2, las cuatro muestras de campo secuenciadas fueron identificadas como genotipo CPV-2C y las dos cepas vacunales se identificaron como genotipo CPV-2A (Figura 1).

MT: Sequence Data Explorer		MT: Sequence Data Explorer	
Name	T N D	Name	T N D
1. KP019620.1 Feline panleukopenia virus	T N D	1. KP019620.1 Feline panleukopenia virus	A A T
2. MK332005.1 China 2018 TipoA	T N D	2. MK332005.1 China 2018 TipoA	A A T
3. GU362932.1 Italia 2010 TipoA	T N D	3. GU362932.1 Italia 2010 TipoA	A A T
4. GU362934.1 Italia 2010 TipoA	T N D	4. GU362934.1 Italia 2010 TipoA	A A T
5. KM386933.1 China 2014 TipoA	T N D	5. KM386933.1 China 2014 TipoA	A A T
6. KF149985 Ecuador 2013 TipoB	T D D	6. KF149985 Ecuador 2013 TipoB	G A T
7. KY818853.1 Mexico 2019 TipoB	T D D	7. KY818853.1 Mexico 2019 TipoB	G A T
8. JF414817 Argentina 2012 TipoB	T D D	8. JF414817 Argentina 2012 TipoB	G A T
9. GU380300.1 China 2010 TipoB	T D D	9. GU380300.1 China 2010 TipoB	G A T
10. GU212792.1-Tailandia 2010 TipoB	T D D	10. GU212792.1-Tailandia 2010 TipoB	G A T
11. FJ005265.1 Italia 2009 TipoB	T D D	11. FJ005265.1 Italia 2009 TipoB	G A T
12. KF149984 Ecuador 2012 TipoC	T E D	12. KF149984 Ecuador 2012 TipoC	G A A
13. KY083089.1 Vacuna Singapur 2017 TipoA	T E D	13. KY083089.1 Vacuna Singapur 2017 TipoA	G A A
14. KY818853.1 Mexico-2B-2019	T E D	14. KY818853.1 Mexico-2B-2019	G A A
15. MH337275.1 Nigeria 2018 TipoA	T N D	15. MH337275.1 Nigeria 2018 TipoA	A A T
16. MN344458.1 Brasil 2019 TipoC	T E D	16. MN344458.1 Brasil 2019 TipoC	G A A
17. KF149984.1 Ecuador 2102 TipoC	T E D	17. KF149984.1 Ecuador 2102 TipoC	G A A
18. FJ197847.1 CPVpf (vaccine) Korea 2010 TipoA	T N D	18. FJ197847.1 CPVpf (vaccine) Korea 2010 TipoA	A A T
19. JQ249919.1 Porcine parvovirus Romania 2011	T N N	19. JQ249919.1 Porcine parvovirus Romania 2011	A A T
20. KY083089.1 Vacuna Singapur 2017 TipoC	T N D	20. KY083089.1 Vacuna Singapur 2017 TipoC	A A T
21. GU212791.1 VAC P (Vacuna comercial)Tailandia 2010 TipoA	T N D	21. GU212791.1 VAC P (Vacuna comercial)Tailandia 2010 TipoA	A A T
22. KY921606.1 MX-VACVBC (Vacuna)Mexico 2018	T N D	22. KY921606.1 MX-VACVBC (Vacuna)Mexico 2018	A A T
23. MN517818 Muestra 1	T E D	23. MN517818 Muestra 1	G A A
24. MN541177 Muestra 8	T E D	24. MN541177 Muestra 8	G A A
25. MN541178 Muestra 10	T E D	25. MN541178 Muestra 10	G A A
26. MN517819 Muestra 13	T E D	26. MN517819 Muestra 13	G A A
27. MN541179 VACUNA 1	T N K	27. MN541179 VACUNA 1	A A T
28. MN541180 VACUNA 2	T N D	28. MN541180 VACUNA 2	A A T

**Figura 1.** Genotipos de CPV según codón 426 de VP2. En la izquierda se muestran los aminoácidos Aparagina (N) para el genotipo A, Aspartato (D) para el genotipo B y Glutamato (E) para el genotipo C, en la derecha la secuencia de nucleotídicas.

La inferencia evolutiva de las secuencias nucleotídicas de cepas de campo alineadas mostró divergencia entre 7.7 y 8.9% respecto a la vacuna n°1 y entre 18.0 y 19.0% respecto a la vacuna n°2. La divergencia entre ambas vacunas fue de 17.7% y entre las cuatro muestras presentó valores entre 0.5 y 5.4%, mientras que entre las muestras de campo respecto a las secuencias de CPV encontradas en otros países (GenBank) fue desde 3.2% hasta 6.3%, mientras que respecto al FPLV se observó una divergencia entre 5.7 y 6.5% (Figura 2).

La historia evolutiva se infirió utilizando el método de *Neighbor-Joining*, se muestran junto a las ramas el porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados agrupados en la prueba *bootstrap* (1000 repeticiones). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método *Maximum Composite Likelihood*, el análisis involucró 28 secuencias de nucleótidos en un total de 383 posiciones en el conjunto de datos final.



**Figura 2.** Árbol filogenético basado en la secuencia nucleotídica del gen VP2 de parvovirus canino, se presentan las cuatro muestras de campo de Nicaragua (MN517818, MN541177, MN541178, MN517819) y las dos vacunas (MN541179, MN541180), comparadas con secuencias obtenidas del GenBank para parvovirus canino, Virus de la Panleucopenia Felina (FPLV) y Parvovirus Porcino (PPV).

## DISCUSIÓN

Las variantes genotípicas presentes en las cuatro muestras secuenciadas fueron identificadas como genotipo CPV-2C según el codón 426 de gen VP2. Este resultado demuestra que en Nicaragua se observa un comportamiento similar al de otros países en los que se observa que CPV-2C es la variante más frecuente, coincidiendo con el estudio realizado en Argentina por Calderón et al (7), quienes encontraron un 91% de CPV-2C entre los años 2003 y 2010, además de haber sido el genotipo prevalente desde 2008, mientras que CPV2A y CPV2B representaron en el 3.6 y 5.4% de la población, respectivamente. Cabe mencionar que el haber encontrado CPV-2C en este estudio, no es excluyente de que se pueda encontrar las otras dos variantes genotípicas.

Se observó asociación de presencia de diarrea con la positividad en PCR, dado que en todos los perros con CPV presentaron diarrea y en ningún canino sin diarrea se encontró el virus, indicando que el síntoma diarreico está presente en todos

los animales infectados, tal como se refleja en el estudio realizado por Zhao et al (14), quienes encontraron que todos los perros infectados experimentalmente presentaron síntomas de diarrea cuatro días post infección.

En el análisis de la asociación parvovirus con la presencia de hematoquecia se observó que el 61.1% (11/18) de los perros con hematoquecia mostraron amplificación de la porción del gen VP2, en ausencia de hematoquecia el 7.2% (2/27) de caninos resultaron positivos. Estos resultados coinciden con lo descrito por Mauro et al (15), según sus registros, sólo en 7 de cada 10 casos con sospecha clínica, fueron positivos al virus, por tanto, se deberían de considerar otras etiologías como agentes causales.

Respecto a edad, se observó que la edad promedio de perros positivos fue menor que la edad de los negativos. En el estudio realizado por Nandi et al (1). las mayores tasas de infección se observan en cachorros mayores de 1.5 meses. Al igual que con otras enfermedades infecciosas de los caninos, los cachorros que nacen de perras inmunizadas, quedan protegidos durante la primera semana gracias al consumo de calostro rico en anticuerpos, pero luego los títulos disminuyen hasta alcanzar un período crítico en el que los anticuerpos maternos ya son insuficientes para proteger al cachorro (16).

La divergencia evolutiva observada en las vacunas con respecto a las cepas de campo lleva a realizar el planteamiento sobre la eficacia de

las dos vacunas utilizadas en este estudio, en resultados obtenidos en este trabajo se encontró asociaciones de las sintomatologías de diarrea, hematoquecia con perros cuyas muestras presentaban CPV, los cuales tenían antecedentes de vacunación. Como se puede observar en el estudio realizado por Ohshima et al (17), los anticuerpos producidos por perros vacunados con la nueva cepa de vacuna CPV-2B reaccionaron más eficientemente a los aislamientos de CPV de campo recientes en comparación a los vacunados con CPV-2 convencional, por lo que, las mutaciones en la proteína VP2 pueden ocasionar fallos en la vacunación. La secuencia de la vacuna n°2 mostró alta similitud con la descrita para vacunas analizadas en Corea por Yoon et al (18), así como en México (ID KY921606), mientras que la vacuna n°1 mostró más similitud con las muestras de campo analizadas, sin embargo, se requiere de un estudio que evalúe la estimulación de anticuerpos neutralizantes para los virus circulantes que determinar la efectividad de la vacunación.

### Conflicto de intereses

Todos los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses para la publicación del presente manuscrito.

### Agradecimientos

Agradecemos a Alquizvetek su asesoría en diagnóstico molecular

## REFERENCIAS

1. Nandi S, Kumar M. Canine Parvovirus: Current Perspective. *Indian J Virol.* 2010; 21(1):31-44. <https://doi.org/10.1007/s13337-010-0007-y>
2. Puentes R, Eliopulos N, Pérez R, Franco G, Sosa K, Bianchi P, et al. Isolation and characterization of canine parvovirus type 2c (CPV-2c) from symptomatic puppies. *Braz J Microbiol.* 2012; 43(3):1005-1009. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000300022>
3. Miranda C, Thompson G. Canine parvovirus: the worldwide occurrence of antigenic variants. *J Gen Virol.* 2016; 97(9):2043-2057. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000540>
4. Decaro N, Buonavoglia C. Canine parvovirus—A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet Microbiol.* 2012; 155(1):1-12. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.09.007>

5. Buonavoglia C, Martella V, Pratelli A, Tempesta M, Cavalli A, Buonavoglia D, et al. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *J Gen Virol.* 2001; 82(12):3021–3025. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-12-3021>
6. De la Torre D, Mafla E, Puga B, Erazo L, Astolfi-Ferreira C, Ferreira AP. Molecular characterization of canine parvovirus variants (CPV-2a, CPV-2b, and CPV-2c) based on the VP2 gene in affected domestic dogs in Ecuador. *Vet World.* 2018; 11(4):480–487. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.480-487>
7. Calderón MG, Romanutti C, D' Antuono A, Keller L, Mattion N, La Torre J. Evolution of canine parvovirus in Argentina between years 2003 and 2010: CPV2c has become the predominant variant affecting the domestic dog population. *Virus Res.* 2011; 157(1):106–110. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.02.015>
8. 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. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.06.012>
9. Pedroza-Roldán C, Páez-Magallan V, Charles-Niño C, Elizondo-Quiroga D, De Cervantes-Mireles RL, López-Amezcu MA. Genotyping of Canine parvovirus in western Mexico. *J Vet Diagn Invest.* 2015; 27(1):107–111. <https://doi.org/10.1177/1040638714559969>
10. 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. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-4072-7>
11. Makarenkov V, Boc A, Xie J, Peres-Neto P, Lapointe F-J, Legendre P. Weighted bootstrapping: a correction method for assessing the robustness of phylogenetic trees. *BMC Evol Biol.* 2010; 10(1):250. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-250>
12. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013; 30(12):2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
13. National Center for Biotechnology Information. BankIt, Submit new sequences to GenBank. USA: National Library of Medicine; 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/>
14. Zhao Y, Lin Y, Zeng X, Lu C, Hou J. Genotyping and pathobiologic characterization of canine parvovirus circulating in Nanjing, China. *Viol J.* 2013; 10(1):272. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-272>
15. Mauro L. Claves para comprender a la Parvovirosis Canina producida por la variante CPV-2c. *Rev Vet Arg.* 2012; 29(287):10. <https://www.veterinariargentina.com/revista/2012/03/claves-para-comprender-a-la-parvovirosis-canina-producida-por-la-nueva-variante-cpv-2c/>
16. Mokhtari A, Farmani N, Rajabi M, Mokhtari A, Farmani N, Rajabi M. Detection of Canine Parvovirus by PCR and its association with some of risk factors. *Rev MVZ Córdoba.* 2018; 23(2):6607–6616. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1334>
17. Ohshima T, Hisaka M, Kawakami K, Kishi M, Tohya Y, Mochizuki M. Chronological Analysis of Canine Parvovirus Type 2 Isolates in Japan. *J Vet Med Sci.* 2008; 70(8):769–775. <https://doi.org/10.1292/jvms.70.769>
18. Yoon SH, Jeong W, Kim H-J, An D-J. Molecular insights into the phylogeny of canine parvovirus 2 (CPV-2) with emphasis on Korean isolates: a Bayesian approach. *Arch Virol.* 2009; 154(8):1353–1360. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0444-3>