



Facultad de Veterinaria

Trabajo de
Fin de Grado

Caracterización molecular de
cepas de parvovirus felino en
Galicia

Sara Dans Rodríguez

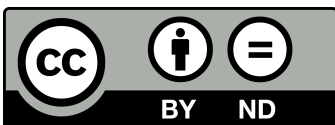
Grado en Veterinaria

Año 2025

Modalidad del Trabajo: Experimental

Licencia

Excepto donde se haga constar explícitamente, esta obra pertenece a Sara Dans Rodríguez y está bajo una licencia de “Creative Commons Reconocimiento 4.0 Internacional”.



RESUMEN

La panleucopenia felina es una enfermedad viral altamente contagiosa causada por el parvovirus felino (FPV), que afecta a gatos de todo el mundo. Su impacto es especialmente relevante en poblaciones felinas, sobre todo en gatos jóvenes no vacunados, alcanzando tasas de mortalidad de hasta el 90%. Dada su estabilidad en el ambiente y su resistencia a desinfectantes comunes, la prevención mediante la vacunación es la principal estrategia de control; no obstante, existe cierta inquietud acerca de si las vacunas disponibles siguen siendo eficaces frente a las cepas circulantes actualmente.

Este estudio tuvo como objetivo caracterizar molecularmente las cepas de FPV que circulan en gatos de Galicia, comparándolas además con las cepas presentes en vacunas comerciales disponibles actualmente en España. Asimismo, se llevó a cabo un análisis filogenético para evaluar la similitud genética entre las cepas detectadas en este estudio, las cepas vacunales y otras previamente reportadas.

Para ello, se analizaron 28 muestras de heces de gatos con sintomatología compatible con panleucopenia. Se realizó la extracción de ADN y la amplificación del gen VP2 mediante PCR, seguido de secuenciación y análisis filogenético. De las muestras analizadas, 24 resultaron positivas, de las cuales diecisiete fueron secuenciadas con éxito. Se encontró que dieciséis muestras eran compatibles con FPV, mientras que una correspondía a CPV-2b, un parvovirus de origen canino, lo que confirma la posibilidad de transmisión cruzada entre especies.

Otro de los hallazgos más relevantes fue la detección de FPV en gatos vacunados. Además, el análisis filogenético sugiere una posible divergencia genética entre las cepas circulantes y las vacunas actuales, lo que podría afectar potencialmente a su eficacia. Por otro lado, la identificación de CPV-2b en un gato confirma la presencia de esta variante en gatos de nuestra comunidad, con posibles implicaciones epidemiológicas. Estos resultados destacan la importancia de la vigilancia molecular y la monitorización de la evolución de las cepas de campo con el fin de optimizar las estrategias de prevención y control de la enfermedad.

Palabras clave: panleucopenia felina, gatos, parvovirus, vacunación, secuenciación, PCR, filogenia.

RESUMO

A panleucopenia felina é unha enfermidade viral altamente contaxiosa causada polo parvovirus felino (FPV), que afecta a gatos de todo o mundo. O seu impacto é especialmente relevante nas poboacións felinas, sobre todo en gatos novos sen vacinar, alcanzando taxas de mortalidade de ata o 90%. Debido á súa estabilidade no ambiente e á súa resistencia aos desinfectantes comúns, a prevención mediante a vacinación constitúe a principal estratexia de control. Porén, existe certa preocupación sobre se as vacinas dispoñibles seguen sendo eficaces fronte ás cepas circulantes na actualidade.

Este estudo tivo como obxectivo caracterizar molecularmente as cepas de FPV que circulan en gatos de Galicia, comparándoas coas cepas presentes nas vacinas comerciais dispoñibles en España. Así mesmo, realizouse unha análise filoxenética para avaliar a semellanza xenética entre as cepas detectadas neste estudo, as cepas vacinais e outras previamente reportadas.

Para iso, analizáronse 28 mostras de feces de gatos con sintomatoloxía compatible con panleucopenia. Realizouse a extracción de ADN e a amplificación do xene VP2 mediante PCR, seguido da secuenciación e análise filoxenética. Das mostras analizadas, 24 resultaron positivas, das cales dezasete foron secuenciadas con éxito. Atopouse que dezaseis mostras eran compatibles con FPV, mentres que unha correspondía a CPV-2b, un parvovirus de orixe canina, o que confirma a posibilidade de transmisión cruzada entre especies.

Outro dos achados máis relevantes foi a detección de FPV en gatos vacinados. Ademais, a análise filoxenética suxire unha posible diverxencia xenética entre as cepas circulantes e as vacinas actuais, o que podería afectar potencialmente a súa eficacia. Doutra banda, a identificación de CPV-2b nun gato confirma a presenza desta variante en gatos da nosa comunidade, con posibles implicacións epidemiolóxicas. Estes resultados destacan a importancia da vixilancia molecular e do seguimento da evolución das cepas de campo co obxectivo de optimizar as estratexias de prevención e control da enfermidade.

Palabras chave: panleucopenia felina, gatos, parvovirus, vacinación, secuenciación, PCR, filoxenia.

ABSTRACT

Feline panleukopenia is a highly contagious viral disease caused by feline parvovirus (FPV), which affects cats worldwide. Its impact is particularly significant in feline populations, especially in young, unvaccinated cats, reaching mortality rates of up to 90%. Due to its environmental stability and resistance to common disinfectants, vaccination is the primary control strategy. However, concerns exist regarding whether currently available vaccines remain effective against the circulating strains.

This study aimed to molecularly characterize FPV strains circulating in cats from Galicia, comparing them to those present in commercial vaccines available in Spain. Additionally, a phylogenetic analysis was conducted to evaluate the genetic similarity between the strains detected in this study, vaccine strains, and others previously reported.

To achieve this, 28 fecal samples were analyzed from cats with symptoms consistent with panleukopenia. DNA extraction and VP2 gene amplification by PCR were performed, followed by sequencing and phylogenetic analysis. Of the samples analyzed, 24 tested positive, of which seventeen were successfully sequenced. It was found that sixteen samples were compatible with FPV, while one corresponded to CPV-2b, a canine-origin parvovirus, confirming the possibility of cross-species transmission.

Another significant finding was the detection of FPV in vaccinated cats. Furthermore, phylogenetic analysis suggests a possible genetic divergence between circulating strains and current vaccines, which could potentially impact their effectiveness. Additionally, the identification of CPV-2b in a cat confirms the presence of this variant in cats within our community, with potential epidemiological implications. These results highlight the importance of molecular surveillance and monitoring the evolution of field strains to optimize prevention and disease control strategies.

Keywords: Feline panleukopenia, cats, parvovirus, vaccination, sequencing, PCR, phylogeny.

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
ÍNDICE.....	6
ABREVIATURAS.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1. Definición e importancia de la enfermedad.....	8
1.2. Etiología.....	9
1.3. Epidemiología.....	10
1.4. Patogenia, signos clínicos y lesiones.....	12
1.5. Tratamiento.....	15
1.6. Prevención y control.....	17
2. OBJETIVOS.....	21
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
3.1. Recogida de muestras.....	22
3.2. Análisis de laboratorio.....	23
3.3. Secuenciación, trabajo bioinformático y análisis filogenético.....	29
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
5. CONCLUSIONES.....	37
6. BIBLIOGRAFÍA.....	38

ABREVIATURAS

AIC: Akaike Information Criterion

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BFPV: Blue Fox Parvovirus (parvovirus del zorro azul)

CPV: Canine Parvovirus (parvovirus canino)

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato

FCV: Feline Calicivirus (calicivirus felino)

FeLV: Feline Leukemia Virus (virus de la leucemia felina)

FHV-1: Feline Herpesvirus-1 (herpesvirus felino tipo 1)

FIV: Feline Immunodeficiency Virus (virus de la inmunodeficiencia felina)

FPV: Feline Panleukopenia Virus (virus de la panleucopenia felina)

ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses

IgG: Inmunoglobulina G

IV: Vía intravenosa

IFN- ω : Interferón omega recombinante

MDA: Maternal-Derived Antibodies (anticuerpos maternos)

MLV: Modified Live Vaccine (vacuna de virus vivo modificado)

MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis

MEV: Mink Enteritis Virus (virus de la enteritis del visón)

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NV: Neutralizing Viral Antibodies (anticuerpos virales neutralizantes)

PBS: Phosphate Buffered Saline (solución salina tamponada con fosfato)

TAE: Tris-Acetato-EDTA (buffer utilizado en electroforesis)

WSAVA: World Small Animal Veterinary Association

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Definición e importancia de la enfermedad

La panleucopenia felina es una enfermedad vírica, de aparición súbita y curso rápido causada por el parvovirus felino (virus de la panleucopenia felina; FPV), el cual fue identificado por primera vez en el año 1928 a partir de muestras fecales de gatos con gastroenteritis (Capozza et al., 2021). Se trata de un virus altamente contagioso que afecta fundamentalmente a especies incluidas dentro de la familia *Felidae*, y también a algunos miembros de las familias *Viverridae*, *Procyonidae* y *Mustelidae* (Greene, 2012). Desde un punto de vista patogénico, el FPV tiene afinidad por las células de rápido crecimiento del tejido linfoide, la médula ósea y el intestino, provocando la destrucción de la barrera intestinal, lo que favorece el posterior desarrollo de bacteriemias e incluso septicemias en algunos casos (Fooshee, 2007).

La enfermedad en su forma aguda cursa con depresión, anorexia y signos gastrointestinales (vómitos y, en algunos casos, diarrea posterior) a los que se suma una leucopenia grave, con neutropenia temprana por pérdidas de neutrófilos en el tracto gastrointestinal, seguida de una leucopenia por supresión de la médula ósea (Litster et al., 2014). La gravedad de los signos clínicos está condicionada por el estado inmunitario del animal, la presencia de enfermedades concurrentes y la edad; si bien puede afectar a gatos en cualquier etapa de su vida, los individuos jóvenes son más susceptibles, alcanzando mortalidades de entre el 50% y el 90%. En gatos adultos la infección se presenta habitualmente de forma subclínica.

El FPV se encuentra distribuido por todo el mundo y, según diferentes estudios, la seroprevalencia varía notablemente de unas zonas a otras, desde 22,9% en Bangladesh (Kabir et al., 2023), 36,6% en Florida (DiGangi et al., 2012), 85,4% en los gatos que habitan las calles de Milán (Dall'Ara et al., 2019) y hasta un 92,8% en gatos domésticos de la zona del Valle Central de Costa Rica y el 100% de los gatos silvestres de esta misma región (Blanco et al., 2009; 2011).

1.2. Etiología

El FPV, agente causal de la panleucopenia, es un virus perteneciente a la especie *Protoparvovirus carnívoro-1* del género Parvovirus, dentro de la familia *Parvoviridae*. Se trata de un virus ADN de pequeño tamaño (diámetro de 20 a 30 nm), monocatenario y sin envoltura lipídica. Su genoma posee alrededor de 5.200 bases nitrogenadas, con dos marcos de lectura abiertos principales que codifican respectivamente dos proteínas no estructurales (NS1 y NS2) y dos proteínas de la cápside (VP-1 y VP-2) (Truyen & Parrish, 2013). La estructura de la cápside está formada por 60 copias de una combinación de las proteínas de la cápside dispuestas en simetría icosaédrica, con una composición aproximada de un 10% de VP-1 y un 90% de VP-2 (Parrish, 1995). Solo se conoce un serotipo de FPV que, al igual que otros parvovirus, necesita células con gran actividad mitótica para replicarse; una vez infecta una célula, el virus se multiplica en el núcleo produciendo unos cuerpos de inclusión intranucleares característicos (Verde & Marca, 1987). Se han encontrado pequeñas diferencias en el genoma entre aislados virales de distintos hospedadores e incluso dentro del mismo hospedador; sin embargo, parece que estas mutaciones son aleatorias y sin ninguna significación clínica (Greene, 2012).

La especie *Protoparvovirus carnívoro-1*, dentro de la que se incluye el FPV, comprende también a otros virus genética y antigénicamente relacionados como el parvovirus canino tipo 2 (CPV-2) y otros parvovirus de animales silvestres como el virus de la enteritis del visón (MEV) o el parvovirus del zorro azul (BFPV). Esto se debe a que, según las directrices actuales del ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses), se considera que los parvovirus pertenecen a la misma especie si sus proteínas NS1 comparten más del 85% de su secuencia de aminoácidos. De manera similar al FPV, todos ellos son causantes de enfermedades clínicamente importantes, especialmente en animales jóvenes (Capozza et al., 2021).

El CPV-2 se identificó por primera vez en el año 1978 en diferentes zonas de Europa y América del Norte, habiéndose aislado de perros con un cuadro severo de gastroenteritis hemorrágica y casos de miocarditis en cachorros (Truyen et al., 2009). Desde un punto de vista genético, el CPV-2 evoluciona más rápidamente que el FPV, mostrando altas tasas de cambios de nucleótidos. Así, el CPV-2 original comenzó a generar variantes antigénicas poco después de su identificación, denominadas 2a y 2b, en 1979 y 1984 respectivamente (Nakamura et al., 2001); años más tarde, en el

2000, se identificó en Italia una tercera variante que se denominó CPV-2c, y se descubrió que se propagaba rápidamente en todos los continentes a excepción de Australia (Capozza et al., 2021). Si bien el CPV-2 original no se replicaba en otras especies, sus variantes posteriores sí adquirieron esta capacidad y comenzaron a infectar a otros muchos carnívoros incluidos los gatos, causando en estos cuadros similares a los producidos por el FPV (Diakoudi et al., 2019); de hecho, los tres subtipos del parvovirus canino (2a, 2b y 2c) han sido aislados tanto en gatos sanos como en gatos con signos clínicos de panleucopenia. El hecho de que el CPV-2 tenga capacidad de producir infección en gatos no ocurre a la inversa; aunque las variantes de CPV-2 pueden replicarse tanto en células caninas como felinas en cultivo, las cepas de FPV solamente pueden replicarse eficientemente en células felinas (Nakamura et al., 2001). A nivel de infección experimental, aunque se ha observado replicación vírica en algunos tejidos linfáticos como el timo en perros a los que se les inoculó FPV, no se ha observado replicación a nivel intestinal ni tampoco una diseminación orgánica del mismo (Truyen et al., 2009).

Desde un punto de vista de resistencia físico-química, el FPV es un virus muy estable con una alta capacidad para sobrevivir en el medio ambiente y mantenerse activo, llegando a permanecer viable durante un año en materia orgánica; no obstante, el calor y las condiciones de humedad durante los meses de verano o la eliminación de los desechos orgánicos pueden acelerar su inactivación. Se sabe que el FPV es capaz de resistir temperaturas de hasta 56°C durante 30 min, y también la desinfección con alcohol al 70% y diferentes diluciones de productos a base de fenoles, clorhexidina, iodinas y amonio cuaternario (Palmero & Carballés, 2010).

1.3. Epidemiología

El FPV puede infectar a todos los miembros de la familia *Felidae* y, aunque la mayoría de los estudios se concentran en el gato doméstico (*Felis catus*), los grandes felinos y otros felinos no domésticos también pueden verse igualmente afectados. Por otro lado, los individuos de otras familias de carnívoros como *Viverridae*, *Procyonidae* y *Mustelidae*, incluyendo especies como el binturong, el coatí, el mapache, el visón y el gato de cola anillada, también son susceptibles a infectarse, aunque en la mayoría de los casos no llegan a mostrar signos clínicos de enfermedad (Greene, 2012).

El FPV tiene una distribución mundial gracias a su naturaleza extremadamente contagiosa y a su capacidad para persistir durante largos periodos en el medio ambiente, capacidad que se ve favorecida por la estabilidad física de la cápside viral y la gran excreción de partículas por parte de los animales afectados; de hecho, los gatos infectados pueden llegar a eliminar hasta 10^9 partículas virales por gramo de heces (Greene, 2012). Un animal es contagioso desde los 2-3 días previos antes de aparecer sintomatología clínica, durando el periodo de excreción de dos a tres semanas, aunque se han encontrado casos en los que se ha prolongado hasta las seis semanas. Cabe mencionar que no existen casos descritos de portadores crónicos ni de FPV persistente en pacientes (Kennedy & Little, 2012).

La principal vía de transmisión del FPV es la horizontal, ya sea directa o indirecta, por el contacto con un animal infectado o a través de las secreciones y excreciones corporales. Los fómites tienen un papel importante en la transmisión de la enfermedad, sobre todo en gatos *indoor* o aislados, debido a la supervivencia del virus en superficies contaminadas como bandejas de arena, ropa, zapatos, platos de comida, cunas, ropa de cama... Se cree que también puede existir la transmisión a través de vectores como las moscas o los mosquitos, sobre todo durante las épocas cálidas. El FPV también puede transmitirse de manera vertical, que normalmente deriva en abortos o, en aquellos casos en los que la infección se produce en los últimos días de gestación, en gatitos severamente afectados que presentan afectación neurológica y/o cardíaca (Greene, 2012). Teniendo en cuenta esto, la panleucopenia ocurre con mayor frecuencia en hogares con varios gatos, especialmente en entornos cerrados y refugios (Sykes, 2014). Además, la enfermedad presenta algunas variaciones estacionales, con aparición de brotes que se relacionan con un aumento de la cantidad de gatitos recién nacidos susceptibles (Greene, 2012).

A pesar de que todos los gatos pueden padecer panleucopenia, los gatitos menores de 6 meses sin vacunar tienen una mayor predisposición a manifestar la enfermedad. La morbilidad y la mortalidad más elevadas se encuentran normalmente entre los tres y los cinco meses de edad (Greene, 2012). Como ejemplo, en un estudio retrospectivo realizado en Madrid durante los años 2004-2010, la gran mayoría de los animales infectados (89%) eran gatitos de entre tres y cuatro meses sin acceso al exterior, con una supervivencia del 52% (Aybar & Vega, 2015).

La mayoría de los gatos susceptibles están expuestos a este virus durante el primer año de vida. Un 75% de los gatos no vacunados y clínicamente sanos poseen

anticuerpos contra el virus de la panleucopenia al año de edad (Greene, 2012). Los gatitos no vacunados que adquieren anticuerpos maternos a través del calostro están protegidos aproximadamente hasta los tres meses de edad, aunque se ha llegado a ver casos en los que se prolongan hasta las 20 semanas, siendo este periodo lo suficientemente amplio como para interferir con la correcta vacunación (Greene, 2012). En relación con esto, si bien la mayoría de gatos vacunados no suelen mostrar sintomatología, sí se han registrado muertes en gatitos con la pauta vacunal completa, posiblemente debido a la exposición a grandes cantidades de virus en su entorno (Sykes, 2014).

1.4. Patogenia, signos clínicos y lesiones

Como se ha mencionado anteriormente, el virus de la panleucopenia se transmite principalmente por vía oro-fecal. Una vez en el interior del organismo, el virus se replica inicialmente en el tejido linfoide de la orofaringe a partir de 18-24 horas tras la infección (Greene, 2012). El periodo de incubación tiene una duración de 5-7 días, pudiendo prolongarse hasta los 14, periodo a partir del cual se produce una diseminación del virus por todos los tejidos (Palmero & Carballés, 2010). El FPV necesita células que se multipliquen rápidamente para provocar una infección, por lo que dentro de un huésped felino las lesiones se distribuyen en los tejidos con una frecuencia más elevada de actividad mitótica (Greene, 2012); esto es debido a que carece de una ADN-polimerasa propia, por lo que para replicarse necesita emplear los mecanismos enzimáticos de las células que están en fase de mitosis. En general, los órganos más afectados tanto en gatitos como en gatos adultos tras una infección horizontal son la médula ósea, el intestino, los nódulos linfáticos, el bazo, el timo y los ojos (Tabla 1).

Tabla 1. Principales órganos afectados en gatos tras la infección horizontal por FPV.

Órgano	Lesiones
Médula ósea	Replicación del virus en las células madre, causando inmunosupresión con neutropenia y linfopenia .
Intestino	Dstrucción de las criptas intestinales, pudiendo llegar a la membrana basal.
Nódulos linfáticos y bazo	Necrosis y linfocitosis.
Timo	Atrofia tímica.
Ojos	Displasia de retina y lesiones del nervio óptico.

En el caso de que la exposición al FPV se produzca durante la gestación las consecuencias son diferentes según el momento de la infección (Palmero & Carballés, 2010):

- Primer tercio de la gestación → infertilidad de la madre; muerte y reabsorción fetal.
- Segundo tercio de la gestación → aborto y expulsión de fetos, que pueden aparecer momificados.
- Último tercio de la gestación → retinopatías, atrofia del nervio óptico, atrofia del timo, hidrocefalia, hipoplasia cerebelar por destrucción activa de las células de Purkinje (también presente si la exposición al FPV ocurre durante las primeras semanas de vida).

Las formas clínicas en las que se presenta la panleucopenia varían desde la infección subclínica hasta el desarrollo de un síndrome hiperagudo con resultado de muerte súbita; en este último caso, suelen aparecer cuadros de shock séptico con deshidratación aguda, hipotermia y coma, produciéndose la muerte en un plazo de 12 horas. Este cuadro fatal se produce generalmente en gatitos desde las 4 semanas hasta los 12 meses de vida.

La forma aguda es la más común. Entre los días 5 y 14 tras la infección los gatos muestran fiebre de 40°C a 41,6°C (Greene, 2012), anorexia y depresión marcada, mostrándose muy poco o nada reactivos ante cualquier tipo de estímulo (Palmero & Carballés, 2010). Durante la progresión del proceso los animales enfermos sufren una deshidratación extrema, produciéndose una hipotermia secundaria y, por lo tanto, ya no veremos fiebre. En relación a los signos digestivos, la mayoría de los gatos presentan vómitos que no están relacionados con la alimentación (presencia de bilis) y,

aunque puede aparecer diarrea aguda de intestino delgado, esta es menos frecuente y de producirse suele ocurrir en una fase más tardía de la enfermedad (Fooshee, 2007). Normalmente la panleucopenia tiene un curso autolimitante y los gatos que sobreviven a la infección más de cinco días tras el comienzo de los síntomas suelen recuperarse, aunque a menudo tardan varias semanas (Litster et al., 2014).

1.5. Tratamiento

De manera general, los animales que presenten signos clínicos de panleucopenia deben ser hospitalizados de inmediato, y debido al elevado riesgo de contaminación y diseminación del virus hacia otros animales susceptibles se recomienda un aislamiento estricto de los mismos.

Tratamiento de soporte

Durante la fase aguda de la enfermedad es importante mantener una adecuada temperatura corporal, así como extremar las medidas de higiene. El tratamiento se debe iniciar aportando fluidoterapia vía parenteral, siendo lo más recomendable la vía intravenosa (IV), con el fin de recuperar la pérdida de electrolitos y corregir la deshidratación. Se aconseja restringir la ingesta de agua o alimento mientras persistan los vómitos, pero esta debería reiniciarse tan pronto como fuera posible. Está indicada la utilización de Ringer Lactato, suplementado con K^+ si fuera necesario, y si el animal presenta hipoglucemia o septicemia se deben añadir sueros con dextrosa al 2,5-5% (Palmero & Carballés, 2010). En el caso de que el paciente presente hipoalbuminemia (albúmina <2 mg/dl) esta se debe corregir mediante una transfusión de plasma o sangre entera o administrando coloides sintéticos, si bien en este último caso deben administrarse una vez se haya corregido la deshidratación (Palmero & Carballés, 2010).

Las infecciones bacterianas secundarias deben tratarse de forma agresiva para evitar la sepsis, ya que esta podría verse favorecida por la translocación bacteriana hacia la circulación sanguínea a consecuencia de la destrucción de la barrera intestinal. Normalmente, se utiliza antibioterapia de amplio espectro eficaz contra Gram (-) y anaerobias por vía parenteral (Greene, 2012); una opción sería administrar amoxicilina-clavulánico junto con un aminoglucósido como la gentamicina o una fluoroquinolona como la enrofloxacin (Palmero & Carballés, 2010), aunque también

está indicado su uso unido a una cefalosporina de tercera generación (Aybar & Vega, 2015).

Para el manejo de los vómitos se recomienda el uso de metoclopramida IV a dosis de 1 mg/kg/24 horas en infusión constante (Palmero & Carballés, 2010), aunque también pueden utilizarse otros antieméticos como el ondasetrón o el maropitant. Cuando los vómitos remitan, el gato podrá empezar con la alimentación por vía oral con comida húmeda en pequeñas cantidades varias veces al día. En caso de que el animal rechace el alimento, se debe colocar una sonda nasogástrica o un tubo de esofagostomía para realizar alimentación forzada. También pueden resultar útiles estimuladores del apetito como la mirtazapina, el complejo vitamínico B o la ciproheptadina (Palmero & Carballés, 2010).

Interferón omega recombinante (IFN- ω)

El IFN- ω se ha identificado en humanos, felinos, cerdos, caballos, conejos, murciélagos, ganado vacuno y ovejas. Debido a su actividad antiviral, inmunomoduladora, antiproliferativa y antitumoral, se ha contemplado como una opción de tratamiento para algunas enfermedades e infecciones virales (Li et al., 2017). En relación con las infecciones por parvovirus, el IFN- ω se ha usado con éxito en infecciones por CPV-2, llegando a reducir la mortalidad un 6,4% (Greene, 2012).

En lo que respecta al FPV, no existe demasiada información acerca de su eficacia. En un estudio realizado en un criadero felino, se administró IFN- ω al inicio de un brote de panleucopenia felina; los animales afectados se dividieron en dos grupos: a uno de ellos se le administró una dosis de 1 MU/kg SC una vez al día durante 3 días, mientras que el otro grupo (control) no recibió este tratamiento. Los resultados del trabajo mostraron que, aunque los signos clínicos y la supervivencia resultaron similares, los gatos tratados con IFN- ω tenían niveles más bajos de α -1-globulinas y valores medios más altos de γ -globulinas (Paltrinieri et al., 2007); por lo tanto, a diferencia de la enteritis parvoviral canina, el tratamiento con IFN- ω no parece tan beneficioso en el caso de la panleucopenia, aunque bien es cierto que se observó un aumento de la producción de anticuerpos y una reducción de la respuesta inflamatoria aguda (Sykes, 2014). Con todo, también se ha observado que, después de la recuperación y la posterior vacunación con vacunas con virus vivo modificado (MLV), los gatos tratados con IFN- ω tenían niveles más altos de γ -globulinas e inmunoglobulina G (IgG) específica anti-FPV en comparación con los gatos del grupo control; así, a pesar de que el tratamiento de gatos enfermos con IFN- ω no ha obtenido por ahora resultados

satisfactorios, parece que este compuesto puede ser beneficioso si se administra a las gatas gestantes antes de la vacunación para aumentar los niveles de anticuerpos calostrales en la transferencia pasiva, o a los gatitos antes de introducirlos en ambientes que puedan estar contaminados (Greene, 2012).

1.6. Prevención y control

La vacunación se considera la forma más eficaz y la medida de control más importante para reducir la incidencia de la panleucopenia. Debido a la resistencia del FPV en el ambiente y a la gravedad de la enfermedad, la inmunización activa se recomienda en todos los gatos independientemente de su estilo de vida, incluyendo aquellos gatos que viven solos y sin acceso al exterior; así, la vacunación frente a FPV se considera esencial para la Asociación Mundial de Veterinarios de Pequeños Animales (Squires et al., 2024).

En la actualidad existen vacunas inactivadas y vacunas con MLV, ambas efectivas, si bien en España solo se comercializan estas últimas. Hay que tener en cuenta que las vacunas con MLV no deben administrarse en gatitos menores de 4 semanas, ya que suponen un riesgo de degeneración cerebelar en animales con un desarrollo incompleto del cerebelo (Fooshee, 2007). Por otro lado, las vacunas inactivadas son seguras en gatas gestantes y también en gatitos con menos de 4 semanas, y pueden administrarse a gatos con fiebre cuando no estemos seguros de que su sistema inmune vaya a tener una respuesta eficaz; sin embargo, su principal inconveniente es que si no hay una correcta transferencia de inmunidad materna se requieren dos dosis para obtener el mismo título de anticuerpos que con una sola inyección de MLV (Greene, 2012).

Las vacunas MLV también pueden suponer un riesgo en animales que padecen inmunodeficiencias adquiridas o congénitas. En gatos infectados con el virus de inmunodeficiencia felina (FIV) se han reportado casos en los que la vacunación ha provocado la enfermedad. Los gatos con infección por retrovirus, como FIV o el virus de la leucemia felina (FeLV), o aquellos inmunocomprometidos por otras razones pueden responder correctamente a la vacuna inactivada contra FPV con un riesgo mínimo (Greene, 2012).

Los **anticuerpos maternos** del calostro contra la panleucopenia felina tienen una vida media de 9,5 días (Greene, 2012). En general, las vacunas no son eficaces cuando los títulos de anticuerpos de neutralización viral (NV) derivados de la madre son superiores a 1:10; por lo tanto, para conseguir una vacunación efectiva que evite la interferencia de los anticuerpos maternos se debe esperar a las 12-14 semanas en la mayoría de los casos, siendo el rango completo entre las 6,8 y las 18,8 semanas (Greene, 2012).

La pauta de vacunación inicial empieza con una primera dosis a las 8 semanas de edad y se repite cada 2-4 semanas hasta las 16 semanas de edad, pudiendo prolongarse si fuera necesario. La vacunación puede iniciarse antes si consideramos que el gatito no ha obtenido anticuerpos maternos o se encuentra en una situación de riesgo (entornos muy contaminados). Independientemente de la edad a la que comiencen, todos los gatitos deben recibir al menos dos dosis de la vacuna para el FPV con una separación de 2-4 semanas entre ellas (Squires et al., 2024). Después de esta pauta inicial se debe realizar vacunación de refuerzo al año de edad, y de aquí en adelante no más frecuente de cada 3 años, siempre y cuando sea posible valorar el estado inmunológico del animal para saber si se encuentra protegido contra el FPV (Squires et al., 2024). Estas vacunas se administran generalmente por vía subcutánea, aunque existen fórmulas de MLV por vía intranasal (Squires et al., 2024), y con frecuencia se encuentran en combinación con las vacunas contra el herpesvirus felino-1 (FHV-1) y el calicivirus felino (FCV) formando una vacuna trivalente (Fooshee, 2007).

En colectividades o entornos con una alta tasa de infección la primovacunación debe comenzar a las 4-6 semanas de edad. Se recomienda usar vacunas MLV si hay algún caso activo, ya que después de una única dosis la protección es mayor que con las vacunas inactivadas. Todos los gatos que se introduzcan deben ser vacunados y separados de los gatos residentes. Los refuerzos posteriores no deben de superar el intervalo de 3 semanas y deben prolongarse al menos hasta que los gatitos lleguen a las 16 semanas de edad (Sykes, 2014). No obstante, debe valorarse que los gatitos que se encuentran muy expuestos, en ambientes altamente contaminados, y los hijos de gatas que han sido correctamente inmunizadas, pueden tener títulos más altos de anticuerpos, por lo que la última vacuna de la serie inicial debería administrarse entre las 16 y las 20 semanas de edad (Fooshee, 2007). Hay que tener en cuenta que aquellos gatitos con títulos de NV de 1:10 a 1:30 no pueden ser vacunados con éxito,

pero sin embargo son susceptibles a la infección por FPV; con todo, una vez infectados, si consiguen superar la enfermedad se cree que probablemente obtengan inmunidad de por vida (Greene, 2012).

Hay que mencionar que las vacunas contra el FPV pueden ofrecer una protección parcial contra las infecciones por las cepas de CPV-2. En relación con esto, aunque se desconoce la duración exacta de la inmunidad contra infecciones subsiguientes por cepas del CPV-2 tras la vacunación frente al FPV, un estudio ha demostrado la infección por el CPV-2a en guepardos, a pesar de que habían sido vacunados contra el FPV (Greene, 2012).

Además de las vacunas, también se han utilizado antisueros homólogos de gatos con un alto título de anticuerpos frente al FPV como terapia de **inmunidad pasiva** para prevenir la panleucopenia. Se recomiendan dosis de 2 ml por gatito administradas por vía subcutánea (SC) o intraperitoneal (IP) (Greene, 2012). En estos casos, como las inmunoglobulinas administradas pueden persistir 2-4 semanas e interferir con la vacunación neonatal, esta debe retrasarse. La terapia con antisueros solo se recomienda en gatos susceptibles, como los no vacunados, que se encuentren expuestos al virus y que necesiten protección inmediata, o para aquellos que no pudieron recibir el calostro; no obstante, en ambos casos serán necesarias vacunaciones posteriores con vacunas inactivadas o MLV (Greene, 2012).

Control de brotes

El FPV se mantiene infectante en el ambiente durante largos periodos de tiempo, por lo que cualquier instalación que haya albergado gatos infectados presenta un riesgo elevado para los gatos que ingresen posteriormente, y por tanto puede conducir a la aparición de brotes.

Como los desinfectantes tradicionales no son capaces de inactivar el virus, se deben utilizar únicamente aquellos efectivos, como por ejemplo diluciones de hipoclorito de sodio al 5,25%, formaldehído al 4%, ácido peracético, hidróxido de sodio (0,1 M a pH 12,8 o superior) y glutaraldehído al 1% (Greene, 2012). Lo más utilizado y económico acostumbra a ser una dilución de lejía 1:30 durante 10 min en todas las superficies contaminadas, incluyendo bandejas de arena, platos de comida, suelo, ropa, camas y, en general, sobre cualquier objeto que haya estado en contacto con el gato enfermo (Palmero & Carballés, 2010). La desinfección no será correcta si hay presencia de materia orgánica, por lo que antes de esto debemos realizar una exhaustiva limpieza

previa. Las personas que hayan estado al cuidado del gato o gatos enfermos deben cambiarse y desinfectar o eliminar todas las prendas que hayan tenido contacto con estos (Addie & Thompson, 2004).

Recientemente se ha realizado un estudio con dióxido de cloro y peroximonosulfato potásico, ambos presentes en desinfectantes de uso veterinario, que ha demostrado que inactivan completamente el virus con la ventaja de evitar el efecto corrosivo de la lejía (Palmero & Carballés, 2010). Para la desinfección por calor de parvovirus, se requieren temperaturas de al menos 90°C durante 10 min (Greene, 2012), por lo que no es un procedimiento práctico.

Tal como se ha mencionado, la desinfección de las superficies no es fácil, por lo que se deben utilizar protocolos de inmunización en todos los gatos susceptibles que vayan a ser introducidos en estas instalaciones (Greene, 2012). No se deben introducir gatitos nuevos en hogares donde se hayan alojado previamente gatitos infectados con FPV antes de que estén completamente vacunados y todo el entorno debidamente desinfectado (Sykes, 2014).

2. OBJETIVOS

Este trabajo tiene como finalidad profundizar en la epidemiología molecular del virus de la panleucopenia felina (FPV), analizando gatos con sintomatología compatible en Galicia a través del análisis de la proteína VP2, un componente de la cápside viral que es clave en la virulencia y antigenicidad del virus. Para ello, se plantean los siguientes objetivos:

- 1º. Caracterizar molecularmente las cepas de FPV detectadas en gatos de Galicia de diferentes características (edad, raza, estilo de vida...) y procedencia, mediante el análisis de la secuencia de la proteína VP2, con el fin de identificar posibles variaciones genéticas.
- 2º. Comparar las secuencias obtenidas con las presentes en vacunas que están actualmente disponibles en España, evaluando el grado de similitud entre ellas.
- 3º. Contrastar las secuencias de FPV detectadas en este estudio con otras secuencias previamente descritas de interés, tanto nacionales como de referencia, para determinar su relación filogenética y evaluar la posible circulación de variantes emergentes en la población felina.
- 4º. Contribuir al conocimiento sobre la evolución y variabilidad genética de los parvovirus, proporcionando información que pueda ser relevante para futuras estrategias de vacunación y control de la enfermedad en la población felina.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Recogida de muestras

El estudio se ha realizado a partir de un total de 28 muestras de heces de gatos domésticos recogidas entre los años 2021-2023, siendo la primera de ellas obtenida el día 18/10/2021 y la última el 05/11/23.

La mayor parte de las muestras (n=23) fueron proporcionadas por diferentes clínicas y hospitales de la provincia de Lugo. El criterio de inclusión en el estudio fue o bien pacientes felinos con resultado positivo en un test rápido de FPV, o bien pacientes con una sintomatología compatible con un cuadro clínico de panleucopenia. Además, para cada una de las muestras se registraron los siguientes datos:

1. Edad
2. Sexo
3. Raza
4. Municipio de residencia
5. Estilo de vida: indoor, outdoor, colonia
6. Estatus vacunal frente a FPV

Además de estas muestras clínicas, también se obtuvieron muestras fecales (n=5) procedentes de distintas colonias felinas registradas en la ciudad de Lugo; esta toma de muestras se realizó el 18 de mayo de 2022 con la colaboración de la Asociación Protectora de Gatos da Rúa Michos de Lugo. Durante esta recogida, se incluyeron en el estudio aquellas muestras de heces que eran compatibles de pertenecer a felinos por diferentes características, entre ellos el aspecto, el tamaño y la presencia de pelo en las mismas.

Por último, se recogieron muestras de tres vacunas comerciales que incluían diferentes cepas de FPV (Tabla 2), con el objetivo de comparar las secuencias de estas cepas con las obtenidas a partir de las muestras fecales.

Tabla 2. Vacunas comerciales empleadas en el presente trabajo.

Vacuna	Cepa FCV incluida
Feligen CRP (Virbac, Carros, Francia)	LR-72
Tricat NOVUM (MSD, Rahway, Nueva Jersey, Estados Unidos)	MW-1
Purevax RCP (Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Alemania)	PLI-IV

3.2. Análisis de laboratorio

Extracción del ADN:

Para llevar a cabo la extracción del ADN de las muestras de heces recogidas se empleó un kit comercial diseñado para trabajar sobre este tipo de muestras (HigherPurity™ Stool DNA Isolation Kit, Canvax Reagents S.L., Valladolid, España). El procedimiento de este kit se puede realizar a partir tanto de muestras frescas como congeladas. Este procedimiento utiliza una lisis mecánica y química; mediante el método mecánico de agitación con perlas de vidrio o “bead beating” en combinación con diferentes reactivos se favorece la lisis de las muestras, permitiendo posteriormente que el ADN se enlace a la superficie de la membrana de sílice de la columna de centrifugado. Este proceso se basa en la capacidad del ADN para unirse a la sílice de la membrana cuando este se encuentra en presencia de concentraciones elevadas de sales caotrópicas como es el Tiocianato de guanidinio.

Durante el procedimiento de extracción se siguió el protocolo indicado por el fabricante, que tiene los siguientes pasos:

1. Transferimos 100-200 mg de la muestra de heces a un tubo con perlas de vidrio.
2. Añadimos 300 µl de Lysis Solution 1 (LS1) y 10 µl de proteinasa K (30 mg/ml). La mezcla se homogeniza en el agitador de tubos durante 5 min a máxima velocidad y nos aseguramos de que la muestra está completamente homogeneizada al finalizar.

3. Incubamos la muestra a 70°C durante 5 min en un baño seco y la homogenizamos de nuevo en el agitador dos veces durante esta incubación. Precalentamos el Elution Buffer a 70°C.
4. Dejamos enfriar la muestra y añadimos 100 µl de Buffer A. Mezclamos bien y la introducimos en hielo durante 5 min.
5. Centrifugamos a máxima velocidad (13000 rpm) durante 5 min. Posteriormente pipeteamos el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga y descartamos el pellet (Figura 1).



Figura 1. Imagen de una muestra tras la primera centrifugación, donde se debe conservar el sobrenadante y descartar el pellet.

6. Añadimos 200 µl de IR-Buffer a la muestra y homogeneizamos en el agitador. Incubamos a temperatura ambiente durante 2 min.
7. Centrifugamos a máxima velocidad 2 min y pipeteamos 250 µl del sobrenadante a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Descartamos el pellet.
8. Añadimos 250 µl de Buffer B y 250 µl de etanol y mezclamos bien con el agitador.
9. Colocamos una columna de centrifugado en un tubo colector e introducimos toda la muestra en ella. Cerramos y centrifugamos a máxima velocidad durante 1 min. Descartamos el tubo colector lleno y colocamos la columna en un nuevo tubo colector.
10. Abrimos la columna de centrifugado y añadimos 750 µl de Bufer WB1. Cerramos y centrifugamos de nuevo a máxima velocidad durante 1 min (primer lavado). Descartamos el tubo colector lleno y colocamos la columna en un nuevo tubo colector.

11. Repetimos el paso 10 de nuevo (segundo lavado).
12. Centrifugamos a máxima velocidad durante 3 min para secar la columna de centrifugado.
13. Descartamos el tubo colector y colocamos la columna de centrifugado en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Abrimos y añadimos 100 µl de Elution Buffer (precalentado a 70°C durante el paso 3). Cerramos e incubamos a temperatura ambiente 2 min, posteriormente centrifugamos a máxima velocidad durante 1 min para extraer el ADN.

Para la extracción del ADN a partir de las muestras de las vacunas comerciales se empleó también un kit comercial apto para una variedad de tipos de muestra diferentes (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Al igual que el anterior, este procedimiento se realizó siguiendo el protocolo recomendado por del fabricante:

1. En un eppendorf estéril con rosca añadimos 200 µl de muestra de vacuna junto con 200 µl de Tissue Lysis Buffer y 40 µl de Proteinasa K reconstituida.
2. Colocamos en el agitador de tubos durante 1 minuto y posteriormente incubamos a 55°C durante 1 hora.
3. Añadimos 200 µl de Binding Buffer.
4. Homogeneizamos en el agitador de tubos durante 1 minuto. Incubamos a 70°C durante 10 minutos.
5. Añadimos 100 µl de isopropanol y colocamos en el agitador 15 segundos. Damos un pulso de centrifuga.
6. Colocamos una columna de filtrado en un tubo colector y pipeteamos el contenido del eppendorf en la columna. Centrifugamos 1 minuto a 9300 rpm.
7. Colocamos la columna sobre un nuevo tubo colector y desechamos el anterior.
8. Añadimos 500 µl de Inhibitor Removal Buffer. Centrifugamos 1 minuto a 9300 rpm.
9. Colocamos la columna sobre un nuevo tubo colector y desechamos el anterior.
10. Añadimos 500 µl de Wash Buffer (primer lavado). Centrifugamos 1 minuto a 9300 rpm.
11. Colocamos la columna sobre un nuevo tubo colector y desechamos el anterior.
12. Añadimos 500 µl de Wash Buffer (segundo lavado). Centrifugamos 1 minuto a 9300 rpm.

13. Vaciamos el tubo colector y volvemos a colocar la columna. Centrifugamos 3 minutos a 10400 rpm (secado de membrana).
14. Colocamos la columna en un nuevo tubo eppendorf estéril donde se almacenará la muestra hasta su análisis. A continuación añadimos en la columna 100 µl de Elution Buffer precalentado a 70°, dejamos incubar 2 minutos y finalmente centrifugamos 1 minuto a 9300 rpm.

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa):

Tras extraer el ADN de las muestras realizamos una PCR de tipo convencional. Para ello se emplearon los cebadores descritos por Battilani et al. (2006), que amplifican prácticamente la totalidad del gen VP2 tanto del FPV como del CPV-2 (aproximadamente una longitud de 1755 pb):

- Cebador *Forward* (P1): (5'-ATGAGTGATGGAGCAGTTC-3')
- Cebador *Reverse* (VPR): (5'-TTCTAGGTGCTAGTTGAG-3')

Los reactivos, concentraciones y volúmenes empleados para la preparación de la mezcla de PCR (Master Mix) pueden verse en la tabla 3. Para cada muestra se empleó un volumen de Master Mix de 20 µl.

Tabla 3. Reactivos empleados para la preparación de la Master Mix.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen/reacción
Taq polimerasa NZYTaq DNA Polymerase (NZYTech Lda., Lisboa, Portugal)	5 UI/µl	2,5 UI/µl	0,5 µl
Reaction Buffer (NZYTech Lda., Lisboa, Portugal)	10X	1X	2,5 µl
Cloruro de Magnesio (MgCl ₂) (NZYTech Lda., Lisboa, Portugal)	50 mM	2 mM	1 µl
Mezcla de desoxirribonucleótidos-trifosfato (dNTPs) NZYMix (NZYTech Lda., Lisboa, Portugal)	2 mM	0,2 mM	2,5 µl
Cebador <i>Forward</i> (P1)	10 µM	0,5 µM	1,25 µl
Cebador <i>Reverse</i> (VPR)	10 µM	0,5 µM	1,25 µl
NZYTaq Optimizer Solution (NZYTech Lda., Lisboa, Portugal)	5X	1X	5 µl
Agua ultra pura (DEPC Treated Water) (MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad, EE. UU.)	1X	1X	6 µl

Una vez preparada la Master Mix, dispensamos un volumen de 20 µl de la misma en microtubos de 200 µl (tantos como muestras se van a analizar), y a continuación

añadimos a cada microtubo 5 µl de la muestra o control correspondiente, para un volumen final de 25 µl. Como control positivo se empleó una muestra de heces de un perro que había sido previamente confirmada como positiva a CPV-2, mientras que como control negativo se empleó la misma agua ultra pura descrita en la tabla 3. Una vez preparados todos los microtubos, las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Bio-Rad T100 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, Estados Unidos) utilizando el protocolo de temperaturas descrito en la tabla 4.

Tabla 4. Protocolo térmico empleado para la realización de la PCR convencional.

Fase	Temperatura	Tiempo
Activación Taq Polimerasa	95°C	1 min
10 ciclos Touch-down (se va reduciendo la temperatura de alineamiento 0,5°C en cada ciclo):		
Desnaturalización	95°C	20 s
Alineamiento	55°C	30 s
Elongación	68°C	1 min
25 ciclos estándar:		
Desnaturalización	95°C	20 s
Alineamiento	50°C	30 s
Elongación	68°C	1 min
Elongación final	68°C	3 min

Una vez terminada la amplificación de las muestras en el termociclador, procedimos a realizar una electroforesis en gel de agarosa para comprobar los resultados de la PCR.

Para ello, preparamos el gel de agarosa al 1% añadiendo a un matraz 60 ml de buffer Tris Acetato-Etilendiaminotetraacético (TAE) 1x y 0,6 g de agarosa (ambos reactivos suministrados por NZYTech Lda., Lisboa, Portugal). Calentamos la mezcla en el microondas, agitamos y la dejamos enfriar para luego incorporar 3 µl de RedSafe (iNtRON Biotechnology Inc., Boston, Massachusetts, Estados Unidos); este compuesto es un agente intercalante que se une a cualquier ADN de doble cadena y permite su visualización bajo luz ultravioleta. A continuación, ajustamos el soporte para el gel para que esté nivelado, colocamos el peine que servirá para formar los pocillos y lo vertemos en el mismo desde una esquina para evitar que se formen burbujas. Dejamos solidificar durante aproximadamente 40 minutos, y mientras tanto

preparamos una placa de microtitulación con 2 μ l de tampón de muestra para cada una de nuestras muestras (NZYDNA Loading Dye, NZYTech Lda., Lisboa, Portugal).

Una vez tenemos el gel solidificado lo retiramos del soporte, lo colocamos en la cubeta de electroforesis y cubrimos con buffer TAE 1x. Cargamos 10 μ l de las muestras y controles en los pocillos formados con el peine, añadiendo también en el primer pocillo el marcador de ADN (NZYDNA Ladder I, NZYTech Lda., Lisboa, Portugal), que sirve para comprobar si los productos amplificados son del tamaño esperado, y también permite una valoración semicuantitativa de la concentración (a mayor intensidad de la banda, mayor concentración). A continuación cerramos la cubeta, asegurándonos de que los polos positivo y negativo de la tapa y la cubeta coinciden, y finalmente encendemos la fuente de alimentación e iniciamos la electroforesis, empleando un voltaje de 100V y amperaje de 400mA durante 45 minutos. En la figura 2 puede observarse la imagen de uno de los geles realizados, obtenida mediante fotografía en el transiluminador.

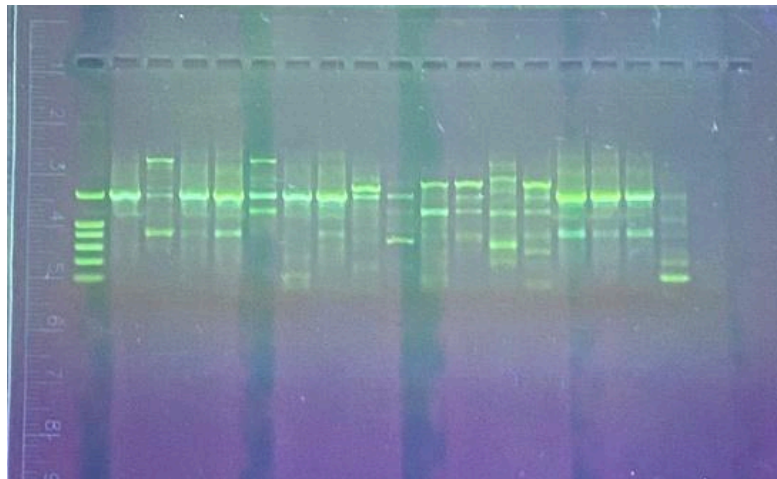


Figura 2. Imagen de un gel de electroforesis al someterlo a luz ultravioleta en el transiluminador. En el primer pocillo se sitúa el marcador de ADN, en el segundo el control positivo y en el penúltimo el control negativo, correspondiendo los pocillos intermedios a diferentes muestras problema.

3.3. Secuenciación, trabajo bioinformático y análisis filogenético

Las muestras que resultaron positivas en la PCR fueron enviadas para su secuenciación al laboratorio STABVida Lda. ubicado en Caparica, Portugal. Una vez obtenidas, las secuencias genéticas fueron procesadas en varias etapas.

El primer paso consistió en la edición manual de las secuencias utilizando el software ChromasPro 2.1.4 (Technelysium, Brisbane, Australia), el cual nos permite ensamblar las secuencias y corregir posibles errores producidos durante la secuenciación (discrepancias en nucleótidos homólogos o regiones con lecturas dañadas por ejemplo). Tras la edición, las secuencias se sometieron a una comparación con la base pública de datos GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool); esta herramienta busca similitudes entre las secuencias que introducimos y las disponibles en la base de datos, por lo que nos sirve para una primera identificación de la especie y variante específica asociada a cada secuencia.

A continuación, alineamos las secuencias utilizando el software MEGA X (Kumar et al., 2018), un programa diseñado para organizar y alinear las posiciones homólogas de las secuencias, facilitando su comparación. Además, durante este proceso se realizó también la transcripción de las secuencias nucleotídicas a aminoácidos para identificar el aminoácido presente en la posición 426, una región de especial interés para nuestro análisis ya que permite diferenciar entre FPV y CPV-2 clásico y algunas de las variantes de CPV-2. Resumidamente, las cepas de FPV, CPV-2 clásico y CPV-2a presentan en esta posición una asparagina (N), mientras las cepas de CPV-2b y CPV-2c presentan ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E) respectivamente.

Posteriormente, utilizamos el software jModelTest2 (Darriba et al., 2012) para seleccionar el modelo de sustitución nucleotídica más adecuado para la construcción del árbol filogenético. Este software analiza el alineamiento generado y aplica posteriormente un criterio estadístico denominado Akaike Information Criterion (AIC) para determinar el modelo evolutivo que mejor se ajusta a los datos. Este paso es crucial para garantizar la precisión en análisis filogenéticos y evolutivos.

Para la construcción del árbol filogenético utilizamos el software MrBayes 3.2.7 que utiliza un método basado en inferencia bayesiana (Ronquist et al., 2012). Para este análisis, las secuencias previamente alineadas en MEGA X fueron transformadas en primer lugar del formato FASTA a NEXUS utilizando la herramienta online ALTER (González-Peña et al., 2010), ya que MrBayes solo permite este formato de alineamiento. A continuación, se realizó el análisis filogenético configurando en MrBayes una cadena de Monte Carlo-Markov de 10000000 generaciones con un muestreo cada 1000 generaciones, lo que generó un total de 10000 árboles. Estos árboles fueron utilizados para crear un árbol consenso y calcular las probabilidades posteriores asociadas a cada nodo, proporcionando una medida de la fiabilidad de las relaciones filogenéticas.

Cabe señalar que el conjunto de datos que utilizamos incluyó diversas secuencias previamente descritas en GenBank de cepas de referencia de FPV y CPV-2 de cara a poder realizar una comparación con las secuencias obtenidas en este trabajo. Además, también se emplearon algunas secuencias procedentes de España, lo que nos aportó una información adicional sobre la variabilidad genética regional y su relación con las cepas de referencia (Tabla 5).

Tabla 5. Cepas previamente escritas obtenidas de la base de datos GenBank y empleadas para la construcción del árbol filogenético.

Secuencia	Variante	Nº acceso GenBank	Referencia
Feline panleukopenia virus cepa CU-4		M38246	Parrish et al., 1991
CPV-2 cepa referencia Cornell	2	M38245	Parrish et al., 1991
CPV-2b cepa 158, España	2b	KP682512	Calatayud et al., 2020
CPV-2b cepa referencia 15	2b	M24003	Parrish et al., 1988
CPV-2b cepa referencia 133	2b	M74852	Sin publicar
CPV-2c cepa 150, España	2c	KP682511	Calatayud et al., 2020
CPV-2c cepa referencia BRA01/10	2c	MF177250	Grecco et al., 2018

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio se analizaron 28 muestras correspondientes a gatos de diferente sexo y procedencia, de las cuales cinco fueron recogidas directamente del suelo en diversas colonias felinas de la ciudad de Lugo, por lo que no se dispone los datos de los animales. Las 23 muestras restantes nos fueron facilitadas por clínicas veterinarias y provenían de pacientes positivos a un test rápido de inmunocromatografía o con sintomatología compatible con infección por FPV. De estas últimas, trece pertenecían a machos y diez a hembras. La edad de los animales estaba comprendida dentro del rango de 2 a 54 meses, con una media de 15,6.

En cuanto al estilo de vida, de las muestras individuales recogidas siete de los gatos formaban parte de colonias felinas mientras que quince llevaban un estilo de vida outdoor, es decir, residían en un domicilio con acceso al exterior; solo uno de los gatos analizados permanecía permanentemente dentro de una vivienda. Respecto a las razas, diecinueve de los individuos eran cruces europeos, uno era un gato de angora y tres eran de raza siamesa.

En relación con los municipios de procedencia, las muestras se distribuyeron de la siguiente manera: doce provenían de gatos residentes en Lugo, cinco en Meira, tres en Monterroso, dos en A Pastoriza, y las restantes correspondían a individuos de Foz (1), Castroverde (1), Ferrol (1), Villalba (1), Outeiro de Rei (1) y Baralla (1). Estas localizaciones pueden observarse detalladamente en el mapa adjunto (Figura 3).

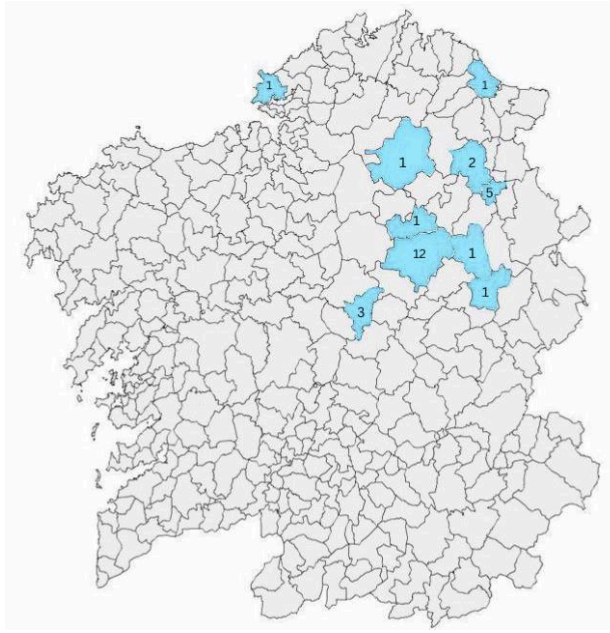


Figura 3. Distribución geográfica de las muestras utilizadas en este trabajo.

Tras la realización de la PCR, 21 de las 23 muestras de gatos identificados resultaron positivas (91,3%), lo que sugiere que tanto los tests diagnósticos previos realizados como el criterio clínico de los compañeros veterinarios que nos enviaron las muestras era muy preciso. En lo referente a las cinco muestras recogidas directamente en colonias felinas, tres resultaron positivas (60%), lo que sugiere una elevada presencia de este agente en las poblaciones urbanas. Cabe señalar que, de las 24 muestras positivas detectadas en total, siete no pudieron ser secuenciadas, bien ya fuese debido a la presencia de bandas inespecíficas en la electroforesis o bien a que la concentración de ADN presente en la muestra era demasiado baja, destacando también que ninguna de las muestras positivas obtenidas directamente en las colonias presentó la calidad suficiente como para ser secuenciada. De esta forma, diecisiete de estas muestras fueron secuenciadas correctamente, comprobando en el alineamiento y posterior transcripción a aminoácidos que dieciséis de ellas presentaban una asparagina (N) en la posición 426; esto implica por tanto que estas secuencias eran compatibles con FPV, CPV-2 clásico o CPV-2a. La secuencia restante, en cambio, presentaba un ácido aspártico (D) en dicha posición, lo que indica que se trataba de una cepa de CPV-2b, y por tanto de origen canino. Esto se ve también apoyado por los resultados obtenidos a través del árbol filogenético (Figura 4), donde puede verse como las dieciséis secuencias que presentaban una asparagina (en color azul) se encuentran filogenéticamente más próximas de la cepa de referencia de FPV, mientras que la secuencia que presentaba un ácido aspártico (en color rojo) se sitúa en el

medio de las cepas de CPV-2b de referencia y las descritas previamente en nuestro país. La sustitución del aminoácido en la posición 426 de la proteína VP2 es un marcador clave en la diferenciación entre FPV y CPV-2b; así, se ha demostrado que esta mutación tiene un papel fundamental en la expansión del rango de hospedadores del CPV, permitiendo que algunas variantes sean capaces de replicarse eficientemente en felinos (Battilani et al., 2011).

Como se ha indicado en la introducción, el hallazgo de CPV-2 en gatos no es un fenómeno reciente, aunque tampoco especialmente frecuente. Así, fue en Japón en el año 1987 cuando se identificó por primera vez la presencia de una variante CPV-2a en las heces de un gato que, en este caso, no mostraba síntomas de enfermedad (Ikeda et al., 2002). También en estudios posteriores se ha indicado que el 5% de los aislados de gatos domésticos en Alemania y Estados Unidos eran CPV-2a o 2b (Nakamura et al., 2001), y estudios más recientes indican que se ha detectado también CPV-2c en gatos sin signos clínicos, lo que sugiere que el virus podría mantenerse en la población felina sin manifestarse clínicamente, actuando como un posible reservorio epidemiológico (Balboni et al., 2018; Obando et al., 2024). No obstante, hay referencias donde se han identificado cepas CPV-2a y CPV-2c en gatos de Italia con sintomatología compatible con panleucopenia, demostrando que estas variantes pueden causar enfermedad grave en felinos (Decaro et al., 2010). En lo referente a este trabajo, la única muestra positiva a CPV-2b en este estudio provino de una gata de raza común europeo de 17 meses, sin vacunar, con un estilo de vida outdoor y residente en Foz. La transmisión ambiental del parvovirus es altamente eficiente debido a su estabilidad en el medio, y estudios previos han demostrado que los gatos con acceso al exterior tienen un mayor riesgo de exposición a parvovirus (Obando et al., 2024; Balboni et al., 2018; Blanco et al., 2009), por lo que no es descabellado que este animal se infectase de esta manera. Por otro lado, cabe mencionar que existen también evidencias de recombinación entre el FPV y las cepas de CPV-2 en la naturaleza, lo que puede dar lugar a nuevas variantes híbridas (Greene, 2012).

Relacionado con esto, en un estudio publicado en el año 2000 solo el 30% de los parvovirus presentes en los grandes felinos de diferentes zoos eran FPV (Addie & Thompson, 2004), y los análisis serológicos y de secuencias de aislados procedentes de felinos realizados en Vietnam y Taiwán revelaron que más del 80% de ellos eran en realidad CPV-2 y no FPV (Ikeda et al., 2000).

Estos hallazgos han llevado a cuestionar la eficacia de las vacunas contra FPV frente a las variantes emergentes de CPV-2. Se ha sugerido que las vacunas actuales podrían no conferir inmunidad cruzada suficiente contra CPV-2a, 2b y 2c, lo que aumentaría el riesgo de infección en gatos vacunados (Ikeda et al., 2002). Decaro et al. (2012) destacaron que, aunque las vacunas basadas en FPV pueden ofrecer cierta protección contra CPV-2, su efectividad frente a estas nuevas variantes aún no ha sido completamente evaluada. Asimismo, se ha reportado que la presión inmunológica generada por la vacunación podría estar favoreciendo la aparición de nuevas variantes del CPV-2, lo que resalta la importancia de una vigilancia epidemiológica continua y la evaluación de estrategias de inmunización más efectivas (Decaro et al., 2012). Así, algunos autores han expresado ya hace tiempo la necesidad de realizar pruebas de neutralización cruzada entre las cepas circulantes de FPV y CPV-2 para determinar si las formulaciones actuales siguen siendo eficaces (Ikeda et al., 2002).

En cuanto al estado vacunal de los gatos muestreados, diecisiete no habían sido inmunizados contra FPV, mientras que, de los seis restantes, uno había recibido una única dosis y los otros cinco tenían una pauta vacunal completa. No obstante, cabe destacar que dentro del grupo vacunado cinco de los seis gatos (83,3%) resultaron positivos a la PCR, detectándose en todos ellos cepas compatibles con FPV. Esto sugiere o bien un posible fallo en el protocolo vacunal o bien una protección insuficiente por parte de las vacunas empleadas. Estos hallazgos coinciden con estudios previos que han revelado la presencia de parvovirus en gatos vacunados, lo que genera dudas sobre la eficacia de las vacunas actuales; como muestra, Balboni et al. (2018) destacaron que FPV y CPV-2 pueden persistir en células sanguíneas de los gatos incluso en presencia de anticuerpos neutralizantes, lo que sugiere que la inmunización actual podría no prevenir completamente la infección ni en consecuencia la transmisión viral.

La alta tasa de infección en gatos vacunados también podría estar relacionada con la evolución del parvovirus y la aparición de variantes intermedias. Según indican algunos autores, las coinfecciones con FPV y CPV-2 están generando una mayor diversidad genética de parvovirus en los gatos, lo que podría facilitar la aparición de nuevas cepas con mayor capacidad de evasión inmunológica (Battilani et al., 2011). En este sentido, la detección de variantes con características intermedias entre FPV y CPV-2 sugiere que este último podría estar en un proceso de adaptación al hospedador felino (Battilani et al., 2011). Lo señalado por estos autores coincide en

cierta manera con lo encontrado en el presente trabajo ya que, como puede observarse en el árbol filogenético (Figura 4), las secuencias de FPV detectadas (en color azul) presentan, además de cierta divergencia entre ellas, una distancia genética relativa en comparación con las secuencias obtenidas a partir de vacunas actualmente comercializadas (en color verde), y aún mayor con la cepa de referencia empleada como raíz del árbol (Feline Panleukopenia virus cepa CU-4), encontrándose situadas entre estas y las cepas de CPV-2.

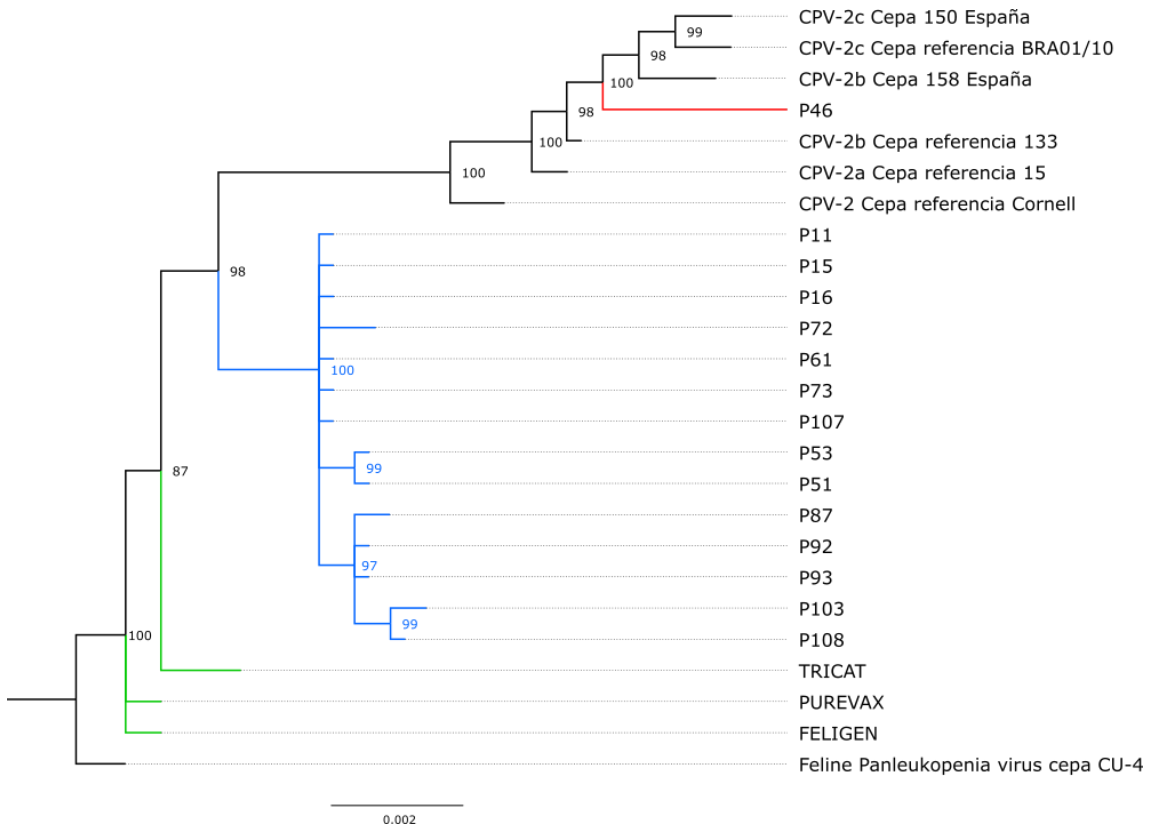


Figura 4. Árbol filogenético construido mediante inferencia Bayesiana. Se destacan tres grupos: en color verde, las secuencias de las cepas obtenidas a partir de las vacunas comerciales estudiadas; en color azul, las dieciséis muestras compatibles con FPV; en color rojo, la única secuencia compatible con CPV-2b de origen canino.

La presencia de casos positivos en gatos correctamente vacunados, así como las diferencias a nivel molecular encontradas en este trabajo, refuerzan la importancia de monitorizar la evolución de los virus circulantes y considerar una actualización de las vacunas para garantizar una protección efectiva frente a las variantes emergentes. En relación con esto, algunos autores han sugerido la posible necesidad de vacunas basadas en CPV-2a/2b para mejorar la protección felina, dado que las vacunas

actuales pueden no ser suficientes a largo plazo (Ikeda et al., 2002); no obstante, hasta la fecha no se han realizado ningún intento por modificar o actualizar las vacunas frente a la panleucopenia felina, algo que si se ha hecho sin embargo recientemente en la especie canina frente a CPV-2. De esta forma, en 2023 se desarrolló una nueva vacuna contra el parvovirus canino (cepa CPV-630a), con el objetivo de mejorar la protección en cachorros jóvenes, especialmente en aquellos con altos niveles de anticuerpos maternos (MDA), que pueden interferir con la efectividad de las vacunas convencionales (Pearce et al., 2023). Esta nueva cepa vacunal toma como base genética la cepa CPV-2 (154), muy relacionada con la cepa de referencia Cornell y ya utilizada en vacunas previas, y fue modificada mediante recombinación para incorporar los aminoácidos característicos de la variante CPV-2c en la proteína VP2. A partir de esta estructura, se creó un virus atenuado, diseñado para estimular una respuesta inmune más efectiva, dando como resultado una vacuna capaz de inducir inmunidad en cachorros desde las 4 semanas de edad, ofreciendo una mejor protección contra las variantes actuales del parvovirus canino y representando un avance significativo en la vacunación temprana de los perros (Pearce et al., 2023).

5. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo y tras la discusión realizada se han obtenido las siguientes conclusiones:

- 1°. El presente estudio ha permitido identificar la presencia de cepas de CPV-2b en gatos de Galicia, lo que refuerza la evidencia de que las variantes del CPV-2 pueden infectar a felinos. No obstante, la mayoría de las secuencias analizadas corresponden a FPV, lo que sugiere que esta sigue siendo la variante predominante en la población felina de la región estudiada.
- 2°. El análisis comparativo de las secuencias de FPV obtenidas con las cepas utilizadas en las vacunas actuales revela que existe cierta divergencia genética entre ellas. Este hecho, junto con el hallazgo de un porcentaje apreciable de gatos correctamente vacunados que habían enfermado, sugiere que la protección conferida por las vacunas actualmente disponibles podría no ser completamente eficaz para prevenir el desarrollo de la enfermedad en todos los individuos.
- 3°. En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo señalan la importancia de vigilar la evolución de las variantes circulantes de parvovirus así como continuar investigando la capacidad protectora de las vacunas frente a las mismas, apoyando de esta manera la posible necesidad de una actualización de las formulaciones vacunales que mejoren la inmunización de la población felina.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Addie, D. D. & Thompson, H. (2004). Feline Panleucopenia/Feline Parvovirus Infection. En: Chandler, E. A. & Gaskell, R. M. (Eds.) *Feline Medicine and Therapeutics*, Third Edition (pp. 571-574). Oxford, Reino Unido: Blackwater Publishing.
- Aybar Rodríguez, V. & Vega Guerrero, J. (2015). *Manual práctico. Enfermedades infecciosas felinas*. Zaragoza, España: Servet Editorial.
- Balboni, A., Bassi, F., De Arcangeli, S., Zobba, R., Dedola, C., Alberti, A., & Battilani, M. (2018). Molecular analysis of carnivore Protoparvovirus 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., 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* 42(1), 43. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-43>
- 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. *Virology*, 352(1), 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.06.002>
- Blanco, K., Peña, R., Hernández, C., Jiménez, M., Araya, L. N., Romero, J. J., & Dolz, G. (2011). Serological detection of viral infections in captive wild cats from costa rica. *Veterinary medicine international*, 2011, 879029. <https://doi.org/10.4061/2011/879029>
- 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>
- Capozza, P., Martella, V., Buonavoglia, C., & Decaro, N. (2021). Emerging Parvoviruses in Domestic Cats. *Viruses*, 13(6), 1077. <https://doi.org/10.3390/v13061077>
- Dall'Ara, P., Labriola, C., Sala, E., Spada, E., Magistrelli, S., & Lauzi, S. (2019). Prevalence of serum antibody titres against feline panleukopenia, herpesvirus

- and calicivirus infections in stray cats of Milan, Italy. *Preventive veterinary medicine*, 167, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.03.010>
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods* 9, 772–772.
- Decaro, N., Buonavoglia, D., Desario, C., Amorisco, F., Colaianni, M. L., Parisi, A., Terio, V., Elia, G., Martella, V., & Buonavoglia, C. (2010). Characterisation of canine parvovirus strains isolated from cats with feline panleukopenia. *Research in Veterinary Science*, 89(2), 275–278. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.04.015>
- Decaro, N., Desario, C., Amorisco, F., Losurdo, M., Elia, G., Parisi, A., Martella, V., & Buonavoglia, C. (2012). Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. *Vaccine*, 30(10), 1805–1809. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.12.026>
- Diakoudi, G., Lanave, G., Capozza, P., Di Profio, F., Melegari, I., Di Martino, B., Pennisi, M. G., Elia, G., Cavalli, A., Tempesta, M., Camero, M., Buonavoglia, C., Bányai, K., & Martella, V. (2019). Identification of a novel parvovirus in domestic cats. *Veterinary Microbiology*, 228, 246–251. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.12.006>.
- DiGangi, B. A., Levy, J. K., Griffin, B., McGorray, S. P., Dubovi, E. J., Dingman, P. A., & Tucker, S. J. (2012). Prevalence of serum antibody titers against feline panleukopenia virus, feline herpesvirus 1, and feline calicivirus in cats entering a Florida animal shelter. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 241(10), 1320–1325. <https://doi.org/10.2460/javma.241.10.1320>
- Fooshee Grace, S. (2007). Panleukopenia (Feline Parvovirus Infection). En: Norsworthy, G. D.; Fooshee Grace, S.; Crystal, M. A.; Tilley, L. P. (Eds.) *The Feline Patient* (pp. 382–383). Ames, Estados Unidos: Blackwell Publishing.
- González-Peña, D., Gómez-Blanco, D., Reboiro-Jato, M., Fdez-Riverola, F., & Posada, D. (2010). ALTER: Program-oriented conversion of DNA and protein alignments. *Nucleic Acids Research*, 38(suppl_2), W14–W18. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq321>

- Greene, C. E. (2012). Feline Enteric Viral Infections. En Greene, C. E. (Ed.) *Infectious Diseases of the Dog and the Cat* (pp. 80-91). Missouri, Estados Unidos: Saunders.
- 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*, 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), 341-346. <https://doi.org/10.3201/eid0804.010228>.
- Kabir A, Habib T, Chouhan CS, Hassan J, Rahman AKMA, Nazir KHMNH (2023) Epidemiology and molecular characterization of Feline panleukopenia virus from suspected domestic cats in selected Bangladesh regions. *PLoS ONE* 18(10): e0282559. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282559>
- Kennedy, M. & Little, S. E. (2012). Infectious diseases: Viral diseases. En Little, S. E. (Ed.) *The Cat. Clinical Medicine and Management* (p. 1029). Missouri, Estados Unidos: Saunders.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547.
- Li, S. F., Zhao, F. R., Shao, J. J., Xie, Y. L., Chang, H. Y., & Zhang, Y. G. (2017). Interferon-omega: Current status in clinical applications. *International immunopharmacology*, 52, 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.08.028>
- Litster A, Benjanirut C. Case series of feline panleukopenia virus in an animal shelter. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2014;16(4):346-353. <https://doi.org/10.1177/1098612X13497738>
- Nakamura, K., Sakamoto, M., Ikeda, Y., Sato, E., Kawakami, K., Miyazawa, T., Tohya, Y., Takahashi, E., Mikami, T., & Mochizuki, M. (2001). Pathogenic potential of

canine parvovirus types 2a and 2c in domestic cats. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 8(3), 663–668.
<https://doi.org/10.1128/CDLI.8.3.663-668.2001>

Obando, M., Rojas, M., Vega, E., & Gutiérrez-Escolano, A. L. (2024). Identification of CPV-2c in domestic cats from Costa Rica: Genetic and phylogenetic analysis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 26(1), 1-10.
<https://doi.org/10.1177/1098612X231213456>

Palmero Colado, M. L. & Carballés Pérez, V. (2010). *Enfermedades infecciosas felinas*. Zaragoza, España: Servet Editorial.

Paltrinieri, S., Crippa, A., Comerio, T., Angioletti, A., & Roccabianca, P. (2007). Evaluation of inflammation and immunity in cats with spontaneous parvovirus infection: consequences of recombinant feline interferon-omega administration. *Veterinary immunology and immunopathology*, 118(1-2), 68–74.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.04.007>

Parrish, C. R. (1995). Pathogenesis of feline panleukopenia virus and canine parvovirus. *Baillière's Clinical Haematology*, 8(1), 57-71.
[https://doi.org/10.1016/S0950-3536\(05\)80232-X](https://doi.org/10.1016/S0950-3536(05)80232-X)

Pearce, J., Spibey, N., Sutton, D., & Tarpey, I. (2023). Development of a novel canine parvovirus vaccine capable of stimulating protective immunity in four-week-old puppies in the face of high levels of maternal antibodies. *Vaccines*, 11(1499).
<https://doi.org/10.3390/vaccines11091499>

Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology* 61, 539-542.

Squires, R. A., Crawford, C., Marcondes, M., & Whitley, N. (2024). 2024 guidelines for the vaccination of dogs and cats – compiled by the Vaccination Guidelines Group (VGG) of the World Small Animal Veterinary Association (WSAVA). *Journal of Small Animal Practice* 65 (5), 277-316.
<https://wsava.org/wp-content/uploads/2024/04/WSAVA-Vaccination-guidelines-2024.pdf>.

- Sykes, J. E. (2014). Feline Panleukopenia Virus Infection and Other Viral Enteritides. En Sykes, J. E. (Ed.) Canine and Feline Infectious Diseases (pp. 187-194). Missouri, Estados Unidos: Saunders.
- Truyen, U., Parrish, C. R. (2013). Feline panleukopenia virus: Its interesting evolution and current problems in immunoprophylaxis against a serious pathogen. *Veterinary Microbiology*, 165(1-2), 29-32. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.02.005>
- Truyen, U.; Addie, D.; Belák, S.; Boucraut-Baralon, H. E.; 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, 538-546.
- Verde Arribas, M.T. & Marca Andrés, M. C. «Panleucopenia felina : una revisión». *Clínica veterinaria de pequeños animales*, Vol. 7, Núm. 3 (Juliol-Setembre 1987), p. 123-132. <https://ddd.uab.cat/record/68997>