



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

TÍTULO

Estandarización e implementación de una técnica de PCR en tiempo real para el Parvovirus Porcino tipo 5 (PPV5) a partir de linfonodos afectados por el Síndrome Multisistémico de Emaciación post destete (PMWS)

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de:
Médica Veterinaria Zootecnista

PRESENTA

Govea Vargas Maria Andrea

ASESOR: Dr. Alejandro Vargas Ruiz

COASESOR: MC Francisco Rodolfo González Díaz

Cuatitlán Izcalli, Estado de México, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ASUNTO: **VOTO APROBATORIO**



ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis.**

Estandarización e implementación de una técnica de PCR en tiempo real para el Parvovirus Porcino tipo 5 (PPV5) a partir de linfonodos afectados por el Síndrome Multisistémico de Emaciación post destete (PMWS)

Que presenta la pasante: **Maria Andrea Govea Vargas.**

Con número de cuenta: **314264871** para obtener el título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 06 de diciembre de 2022.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Hugo Ramírez Álvarez	
VOCAL	Dra. Cynthia González Ruíz	
SECRETARIO	Dr. Alejandro Vargas Ruiz	
1er. SUPLENTE	M.V.Z. Alma Noemi Montes de Oca Chávez	
2do. SUPLENTE	Dra. Yasmín Guadalupe De Loera Ortega	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

MCVB/ntm*

DEDICATORIAS

A mis padres por darme la oportunidad de vivir esta vida a su lado, por siempre confiar y creer en mí y apoyarme hasta en el más mínimo detalle, el camino fue difícil, pero al ir de su mano nunca se sintió así. Gracias por ser mis pilares más grandes en esta vida, por enseñarme a levantarme en cada uno de los momentos que he caído y nunca abandonarme. A mi papá Eduardo Govea porque de ti aprendí que no importa que obstáculos tenga enfrente, siempre saldremos adelante aunque todo parezca que no sera así, por siempre ayudarme a construir mis sueños y tener fé y confianza en que al final se harán realidad, por enseñarme a nunca rendirme. A mi mamá Guadalupe Vargas porque de ti aprendí que hay que entregarse en todo lo que hagas, las cosas hechas con amor, esmero y dedicación siempre tendrán una buena recompensa, por enseñarme el valor de la responsabilidad y la lealtad. Este logro no es solo mío, es de ustedes también. Siempre los amare.

A mi hermana Jessica, que siempre ha sido mi ejemplo a seguir para todo, por cuidarme, procurarme, guiarme y querer siempre lo mejor para mí, por ser no solo mi hermana si no también mi amiga y mi confidente. Solo tú y yo sabemos cuánto nos costó llegar hasta el final, pero te admiro por sobre todo a ti porque nunca te rendiste y no dejaste que me rindiera tampoco. El camino fue más sencillo porque estabas tú para encaminarme. Te amo hermana.

A mi amiga Carmen Rivera, por todas las veces en las que ayudo a mi y a mi familia, me cuido y me protegio como si fuera su propia hija. Eres uno de los apoyos mas incondicionales que he tenido en todos los aspectos, nunca tendre las palabras exactas para agradecer todo lo que has hecho y sigues haciendo por mi, este logro también es tuyo. Te quiero muchísimo.

A mi mejor amiga Leyda Flores, quien ha sido mi apoyo incondicional durante toda la carrera y fuera de ella, me enseñó el valor de la amistad, contigo aprendí que una persona puede tener familia, aunque no sea de sangre. Nos vimos crecer desde el

primer día de universidad y no puedo creer que estemos culminando este camino llamado “sueño” que comenzamos juntas. La escuela fue más bonita porque estabas tú para hacerme reír en cualquier momento y sostenerme cuando más lo necesite. Te quiero demasiado

A mi mejor amigo José Luis Ramírez, quien me ofreció su amistad desde inicios de la preparatoria, siempre apoyándome, escuchándome, y dándome los mejores consejos, nadie podría entenderme mejor que tú. Me enseñaste que una amistad no tiene que ser perfecta para que sea la mejor, que lo importante ante todo es estar el uno para el otro siempre, aunque nos separen cientos de Km. Te quiero mucho.

A mi amiga Montserrat Alatorre, por todas las veces que necesite ayuda., tu siempre estuviste ahí para mi, apoyándome en cualquier cosa que necesitara, tu me enseñaste el valor de la lealtad y te admiro mucho por todo lo que eres y por la persona en quien te estas convirtiendo. Te quiero mucho.

A mi amigo Mauricio Cervantes, quien me enseñó a ver la vida de otra manera, me apoyo y me escucho cuando más lo necesité y me distraía cuando era necesario, siempre quise una amistad como la tuya y me siento muy afortunada de tenerla y de haberte conocido. Te quiero mucho.

A mis amigos Karina Díaz y Leonel Mejía, quienes fueron no solo mis amistades más valiosas durante la carrera sino, mi mejor equipo para cualquier cosa, siempre pensé que los grupos de 3 no funcionaban, pero con ustedes fue diferente, les agradezco por todo el cariño que me brindaron, por todo el apoyo y las palabras que me alentaron a ser mejor cada día. Todas las clases valían la pena porque ustedes estaban también ahí. Los quiero muchísimo

A Ulises Maya, que fue el apoyo incondicional más grande que he tenido en mi vida, te agradezco por todo lo que me enseñaste, por ayudarme como nadie lo ha hecho. Estuviste conmigo en las buenas, en las malas y en las peores y por todas las veces

que me alentaste a ser mejor, por confiar en mí y estar en mis momentos más difíciles, por sostenerme y no soltarme, gracias. Siempre serás mi amigo hasta el final y siempre te voy a querer.

A el Doctor Alejandro Vargas Ruiz, que no solo fue mi asesor en este gran proyecto, sino una pieza fundamental para mi desarrollo académico y amor por la carrera. Por creer en mí y brindarme todo su apoyo, su tiempo y su atención, por todos los consejos y comentarios que me permitieron crecer no solo a nivel académico, sino personalmente, ya que se convirtió en un gran amigo y un ejemplo a seguir para mí.

A el Maestro en Ciencias Rodolfo Francisco González Díaz, por ser mi co-asesor y un gran apoyo dentro de mi estancia en la UIM, que si no fuera por este proyecto no habría conocido a tan grandiosa persona que es. Le agradezco por todos sus comentarios, aportaciones y consejos que me dio y que me permitieron crecer a nivel personal, así como su tiempo, dedicación y esmero por enseñarme en cada una de las cosas que desarrollamos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por acogerme desde mis inicios en el bachillerato y posteriormente la licenciatura en mi alma mater la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, que me rodeo de personas maravillosas y grandes experiencias.

Agradezco a la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) por permitirme desarrollar mi más grande proyecto académico, enriqueciéndome de conocimiento y permitiéndome conocer y rodearme de exitosos académicos como la Dra. Lucía García Camacho, el Dr. Ernesto Marin Flamand y la Dra. Cynthia González Ruiz.

A todos y cada uno de mis compañeros y maestros que convivieron conmigo durante la carrera, les agradezco por regalarme risas, pláticas y experiencias que siempre llevare en mi memoria, todos de alguna manera aportaron algo en la persona en la que me estoy convirtiendo.

Este logro es por y para todas aquellas personas que confiaron en mí, que siempre recibí palabras alentadoras y que no dejaron de creer que todo podría ser posible. Muchas gracias.

El presente trabajo fue apoyado por la Cátedra de Investigación CI 2210: "Patología Morfológica y Molecular Veterinaria.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio "A" de Patología Molecular Veterinaria de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

RESUMEN

El *Ungulate protoparvovirus 1* (PPV1) es uno de los agentes virales más importantes causantes de los síndromes de falla reproductiva en cerdas, el cual se caracteriza por infertilidad, fetos momificados, muerte embrionaria temprana y mortinatos. En los últimos años se han reportado nuevas especies de la familia *Parvoviridae* en cerdos de todo el mundo. Fue hasta el año 2012 que el parvovirus porcino tipo 5 (PPV5), se identificó por primera vez a partir de tejidos de pulmón en los Estados Unidos y en el 2020 fue reportado en México en corazones fetales. El genoma del PPV5 tiene aproximadamente 5,805 nt de longitud e incluye dos marcos de lectura abiertos (ORF), que codifican proteínas de 601 y 991 nt de longitud. Con el objetivo de estandarizar una técnica de PCR en tiempo real para la amplificación de secuencias parciales de la región ORF2 de PPV5 se tomaron 30 muestras seleccionadas del archivo de casos procedentes del laboratorio A de patología molecular veterinaria de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4 (FESC-4) de linfonodos de cerdos no vacunados afectados por el Síndrome Multisistémico de Emaciación Post Destete (PMWS), por lo que se determinó que la concentración óptima de templado fue de 25 ng para su implementación y la concentración óptima de iniciadores fue de 5 μ M para obtener un producto de la amplificación de 318 pb. Los resultados de la técnica de PCR en tiempo real, a través de un análisis de datos por cuantificación relativa demostraron que el promedio de la carga viral fue de $10^{0.45}$ copias/ml, comprobando que la qPCR es una técnica sensible y específica para detectar el parvovirus porcino tipo 5.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ÍNDICE	2
LISTA DE FIGURAS	4
LISTA DE TABLAS	5
ABREVIATURAS	6
INTRODUCCIÓN	8
I. Antecedentes	8
II. Taxonomía	9
III. Generalidades de la familia <i>Parvoviridae</i>	12
IV. Especies emergentes de la familia <i>Parvoviridae</i>	13
V. Parvovirus porcino 5	14
VI. Transmisión y patogenia	16
VII. Distribución y prevalencia	19
VIII. Co-infección con circovirus porcino tipo 2 (PCV2) y PMWS	20
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS	23
MATERIAL Y MÉTODOS	24
I. Iniciadores ocupados	24
II. Selección de muestras	24
III. Extracción de ácido nucleico	24
IV. Estandarización de la qPCR	26
a) q-PCR	26
b) HPRT (Hipoxantil-Fosforibosil-Transferrasa-1) gen de referencia o constitutivo.	28
V. Validación	29
a) Electroforésis	29
b) Purificación del amplicón para secuenciación.	30
c) Secuenciación	31
VI. Implementación	31
VII. Análisis de datos	31
RESULTADOS	34

a) Análisis de iniciadores	34
b) Estandarización	34
c) Especificidad	39
d) Implementación	41
e) Cuantificación	43
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	49
REFERENCIAS	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Clasificación taxonómica del Parvovirus Porcino y sus distintas variedades.	11
Figura 2	Estructura del virón de la familia <i>Parvoviridae</i> .	12
Figura 3	Descripción esquemática del genoma de PPV5 y sus proteínas virales.	15
Figura 4	Propuesta de la patogenia de PPV1.	18
Figura 5	Distribución geográfica del PPV5 en los inicios de su descubrimiento a partir del 2013.	20
Figura 6	Diagrama de las condiciones de amplificación utilizadas para la detección de PPV5 por PCR en tiempo real.	29
Figura 7	Diagrama de las condiciones de amplificación por PCR en tiempo real para HPRT.	31
Figura 8	Diagrama de flujo para la detección de PPV5 por PCR tiempo real a partir de la estandarización.	33
Figura 9	Curvas de amplificación del templado.	35
Figura 10	Curvas de disociación del templado.	35
Figura 11	Amplificación obtenida por qPCR de diversas concentraciones de templado de PPV5.	36
Figura 12	Curva de amplificación de los iniciadores.	37
Figura 13	Curva de disociación de los iniciadores.	37
Figura 14	Amplificación obtenida por qPCR de diversas concentraciones de iniciadores para la amplificación de PPV5.	38
Figura 15	Similitud entre secuencias del Genbank referidas como PPV5.	39
Figura 16	Árbol filogenético que muestra las secuencias de aminoácidos pertenecientes a las diferentes especies de Parvovirus.	40
Figura 17	Curvas de amplificación de las muestras.	41
Figura 18	Curvas de disociación de las muestras.	42
Figura 19	Amplificación obtenida por qPCR de las muestras positivas a PPV5.	43

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación taxonómica de los principales parvovirus que afectan al cerdo.	10
Tabla 2.	Clasificación taxonómica del PPV5.	11
Tabla 3.	Mezcla de reacción general para la detección de PPV5 por PCR en tiempo real.	26
Tabla 4.	Mezcla de reacción general para la amplificación de HPRT por PCR en tiempo real.	28
Tabla 5.	Secuencia de iniciadores que amplifican un fragmento del gen HPRT por PCR en tiempo real.	28
Tabla 6.	Mezcla de reacción para la detección de PPV5 por PCR punto final.	31
Tabla 7.	Análisis de iniciadores.	34
Tabla 8.	Identificación de muestras en el software MxPro qPCR.	39
Tabla 9.	Identificación de muestras positivas a PPV5.	42
Tabla 10.	Cuantificación de muestras positivas a PPV5.	43

ABREVIATURAS

PPV: Parvovirus porcino	ORF: Marco de lectura abierto
PPVs: Parvovirus porcinos	ORF1: Marco de lectura abierto río arriba
PPV1: Parvovirus porcino tipo 1 (<i>Ungulate protoparvovirus 1</i>)	ORF2: Marco de lectura abierto río abajo
PPV2: Parvovirus porcino tipo 2 (<i>Ungulate tetraparvovirus 3</i>)	ORF3: Marco de lectura abierto 3
PPV3: Parvovirus porcino tipo 3 (<i>Ungulate tetraparvovirus 2</i>)	SF3: Superfamilia 3 helicasa
PPV4: Parvovirus porcino tipo 4 (<i>Ungulate copiparvovirus 2</i>)	PLA2: Fosfolipasa A2
PPV5: Parvovirus porcino tipo 5	Fase S: Fase de síntesis
PPV6: Parvovirus porcino tipo 6 (<i>Ungulate copiparvovirus 4</i>)	Fase G1: Fase Gap 1
PPV7: Parvovirus porcino tipo 7 (<i>Ungulate chaphamaparvovirus 1</i>)	REP: Replicación
PBoV1: <i>Ungulate bocaparvovirus 2</i>	CP: Proteína de cápside
PBoVSX: <i>Ungulate bocaparvovirus 3</i>	VP1: Proteína de cápside 1
PBoVH18: <i>Ungulate bocaparvovirus 4</i>	VP2: Proteína de cápside 2
PBoV3: <i>Ungulate bocaparvovirus 5</i>	VP3: Proteína de cápside 3
ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses	VLP: Partícula similar a virus
ADN: Ácido desoxirribonucleico	NGS: Secuenciación de próxima generación
ARN: Ácido ribonucleico	nAbs: Anticuerpos neutralizantes
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero	kb: Kilobases
ATPasa: Enzima que controla la concentración de iones H	pb: Pares de bases
ssDNA: ADN monocatenario	kDa: Kilodaltons
NS: Proteína no estructural	PCVAD: Enfermedad asociada a circovirus porcino tipo 2
NS1: Proteína no estructural 1	PCV2: Circovirus porcino tipo 2
	PMWS: Síndrome de Emaciación Multisistémico Post-destete
	EUA: Estados Unidos de América
	FFPE: Tejido Fijado con Formalina y

FR-PCV2+: Falla reproductiva asociada a circovirus porcino tipo 2

PRRS: Síndrome Reproductivo Respiratorio Porcino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

HPRT: Hipoxantil-Fosforibosil-Transferrasa-1

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

NCBI: National Center for Biotechnology Information

UIM: Unidad de Investigación Multidisciplinaria

μL: Microlitro

μM: Micromolar

mL: Mililitro

rpm: Revoluciones por minuto

ng: Nanogramo

cbp: Cuanto baste para

°C: Grado Celsius

Cp: Cross point (punto de cruce)

Ct: Cycle threshold (umbral de ciclos)

Tm: Melting temperatura (Temperatura de fusión)

Δ: Delta

ΔΔ: Doble delta

Embebido en Parafina

UV: Ultravioleta

H₂O: Agua

TBE: Solución amortiguadora Tris-Borato-EDTA

INTRODUCCIÓN

I. Antecedentes

La parvovirus porcina se considera una de las principales enfermedades que causa falla reproductiva en los cerdos, provocando enormes pérdidas económicas en la industria porcina mundial (Wang *et al.*, 2019). El *Ungulate protoparvovirus 1*, causante de la parvovirus porcina, se detectó por primera vez como contaminante del *Pestivirus C* (fiebre porcina clásica), se aisló por primera vez en 1965 en Múnich, Alemania, por Anton Mayr y sus colaboradores (Mayr & Manhel, 1964), 7 años después en 1972, Mengeling, fue el primero en encontrarlo en el continente americano, quien lo aisló a partir de cornetes nasales de cerdos con rinitis (Mengeling, 1972).

En las últimas dos décadas, con el desarrollo de técnicas de biología molecular se han descubierto seis nuevas especies de parvovirus que infectan a los cerdos y que se han designado en el último reporte del ICTV como: *Ungulate protoparvovirus 1* (PPV1); *Ungulate tetraparvovirus 2* (PPV3/ hokovirus porcino); *Ungulate tetraparvovirus 3* (PPV2); *Ungulate copiparvovirus 2* (PPV4); *Ungulate copiparvovirus 4* (PPV6) *Ungulate chaphamaparvovirus 1* (PPV7); *Ungulate bocaparvovirus 2* (bocavirus porcino 1); *Ungulate bocaparvovirus 3* (bocavirus porcino SX); *Ungulate bocaparvovirus 4* (bocavirus porcino H18); y *Ungulate bocaparvovirus 5* (bocavirus porcino 3) (Pénzes *et al.*, 2020). En la nomenclatura actual, PPV5 permanece sin clasificar, pero esta especie se ha considerado dentro del género *Copiparvovirus* en informes anteriores (García *et al.*, 2020). Fue hasta el 2012, que el PPV5 se identificó por primera vez a partir de tejidos de pulmón de cerdo en los Estados Unidos (Xiao *et al.*, 2013), y hasta el 2020 fue reportado en México por García *et al.*, 2020 en corazones fetales de cerdo. El análisis genético mostró que este virus está íntimamente relacionado con el PPV4 (Streck *et al.*, 2021).

II. Taxonomía

Los miembros de la familia *Parvoviridae* infectan a una gran variedad de especies animales y son agentes causales de enfermedades de suma importancia en veterinaria. Afectan tanto a vertebrados como a invertebrados y todos sus miembros están filogenéticamente relacionados, ya que poseen propiedades biológicas en común como la resistencia a la desecación en el ambiente y el requerimiento, en células en fase S del ciclo celular para poder replicarse (Moredo *et al.*, 2018).

Antes del 2019, la familia *Parvoviridae* se dividía en dos subfamilias: *Parvovirinae* que infectan a los vertebrados y *Densovirinae*, que infectan a los invertebrados. Recientemente, se han descrito diversas especies virales miembros de la familia *Parvoviridae* que infectan a los porcinos (PPV1-7) como se muestra en la Tabla 1.

De acuerdo a la similitud de aminoácidos en la proteína NS1, estos virus se dividen taxonómicamente en tres géneros: *Protoparvovirus* (PPV1), *Tetraparvovirus* (PPV2-3) y *Copiparvovirus* (PPV4-6). El Comité Internacional de Taxonomía de Virus conocido por sus siglas como ICTV, en 2019 aprobó la reorganización de la clasificación taxonómica de la Familia *Parvoviridae*, con la finalidad de agregar otra subfamilia para clasificar a la especie recientemente identificada, el *Ungulate chaphamaparvovirus 1* (PPV7). El parvovirus porcino 5 (PPV5) aún no está clasificado en la propuesta de taxonomía del ICTV, pero el análisis genético mostró que este virus está más estrechamente relacionado con el PPV4 (Milek *et al.*, 2019).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de los principales parvovirus que afectan al cerdo.
 Recopilación del ICTV, 2023.

Fam.	Subfamilia	Género	Especie	Acrónimo
<i>Parvoviridae</i>	<i>Parvovirinae</i>	<i>Protoparvovirus</i>	<i>Ungulate protoparvovirus 1</i>	PPV1
		<i>Tetraparvovirus</i>	<i>Ungulate tetraparvovirus 3</i>	PPV2
			<i>Ungulate tetraparvovirus 2</i>	PPV3
		<i>Copiparvovirus</i>	<i>Ungulate copiparvovirus 2</i>	PPV4
		No clasificado	No clasificado	PPV5
		<i>Copiparvovirus</i>	<i>Ungulate copiparvovirus 4</i>	PPV6
		<i>Bocaparvovirus</i>	<i>Ungulate bocaparvovirus 2</i>	PBoV1
			<i>Ungulate bocaparvovirus 3</i>	PBoVSX
			<i>Ungulate bocaparvovirus 4</i>	PBoVH18
			<i>Ungulate bocaparvovirus 5</i>	PBoV3
	<i>Hamaparvovirinae</i>	<i>Chaphamaparvovirus</i>	<i>Ungulate chaphamaparvovirus 1</i>	PPV7

Tabla 2. Clasificación taxonómica del PPV5.
Recopilación del ICTV, 2023.

Reino	<i>Monodnaviria</i>
Reino	<i>Shotokuvirae</i>
Filo	<i>Cossaviricota</i>
Clase	<i>Quintoviricetes</i>
Orden	<i>Piccovirales</i>
Familia	<i>Parvoviridae</i>
Subfamilia	<i>Parvovirinae</i>
Género	No clasificado
Especie	No clasificada

Los parvovirus pueden considerarse miembros de la misma especie, si sus proteínas NS1 comparten más del 85% de identidad de secuencia de aminoácidos, y pueden clasificarse en el mismo género, si sus secuencias de proteínas se agrupan como un linaje monofilético robusto basado en la secuencia completa de la proteína NS1, en el nivel de subfamilia y en sus dominios helicasa SF3, en la familia (Penzes *et al.*, 2020). Se han identificado secuencias de nucleótidos y aminoácidos de NS (ORF1) que mostraron identidades de 77,4% a 78,2% y 84,6% a 85,1% con el PPV4 (Xiao *et al.*, 2013). Aunque el PPV5 aun no está clasificado

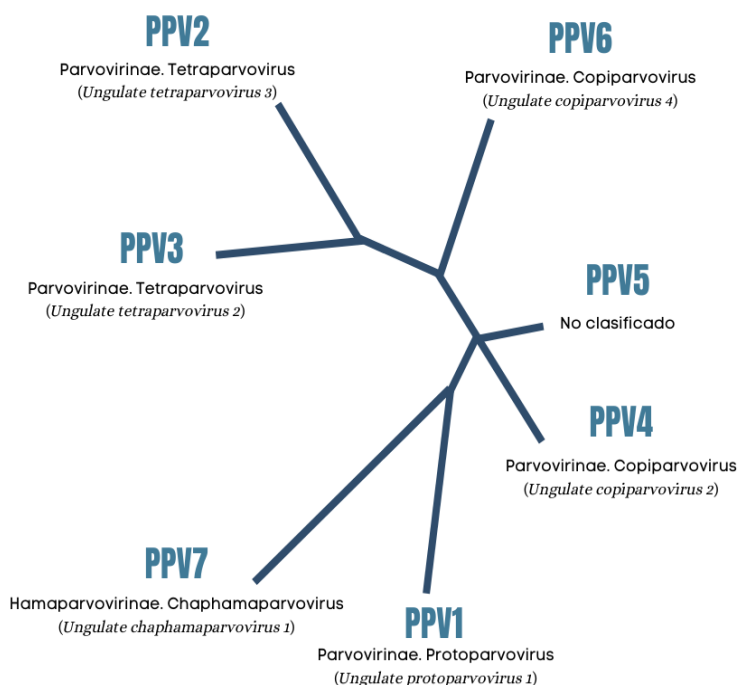


Figura 1. Clasificación taxonómica del Parvovirus Porcino y sus distintas variedades. Recopilación del ICTV, 2023.

por el ICTV por la similitud que tiene con el PPV4, se podría clasificar en el mismo género.

III. Generalidades de la familia *Parvoviridae*

Los virus *Parvoviridae* son una familia grande y notablemente diversa que tienen viriones pequeños, icosaédricos, no envueltos y genomas de ADN monocatenario (ssDNA) (Figura 2). El genoma del parvovirus es lineal, de 3.9 a 6.3 kb de tamaño, y la región de codificación está delimitada por repeticiones terminales que pueden plegarse en estructuras en forma de horquilla, que son

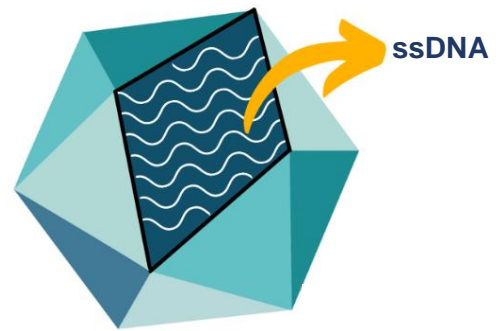


Figura 2. Estructura del virión de la familia *Parvoviridae*.

diferentes (heteroteloméricas) o idénticas (homoteloméricas). La región codificante del genoma contiene dos casetes de expresión principales, con marcos de lectura abiertos (ORF) río arriba, que dan lugar a proteínas no estructurales (NS), mientras que las poblaciones de ARNm responsables de traducir las proteínas estructurales (VP), se transcriben a partir del casete de la derecha. La más grande de las proteínas NS, tradicionalmente denominada NS1, es una proteína multidominio que contiene un dominio de la superfamilia 3 de helicasa (SF3) altamente conservado con actividad helicasa y ATPasa, así como otros dominios con actividad de unión al ADN endonucleasa y secuencia específica, los cuales son esenciales para la replicación viral (Penzes *et al.*, 2020).

Los miembros de la subfamilia *Parvovirinae* comparten genes codificantes de proteínas NS1 y VP de naturaleza claramente homóloga, como lo indica su similitud de secuencia detectable, lo que permite que las secuencias de ambas proteínas se alineen con seguridad en toda su longitud (Penzes *et al.*, 2020).

IV. Especies emergentes de la familia *Parvoviridae*

Los nuevos parvovirus porcinos (PPV2-7), pudieron haber surgido hace aproximadamente setenta años y poseen una alta tasa de sustitución de nucleótidos similar a los virus de ARN. A través de la recombinación frecuente, la selección positiva de parvovirus porcinos, tienen la capacidad de adaptarse y circular aún más entre las piaras, lo que amerita un mapeo filogenético continuo y el seguimiento de la asociación con enfermedades (Lagan *et al.*, 2021)

Durante las últimas dos décadas, se han identificado varios parvovirus nuevos en cerdos utilizando métodos moleculares, que se han designado como PPV2 a PPV6. El PPV2 y el PPV3 pertenecen al género *Tetraparvovirus* (Cui *et al.*, 2016). PPV2, descubierto en 2001 durante un estudio con sueros porcinos positivos al virus de la hepatitis E (Hijikata *et al.*, 2001). Posteriormente, en 2006 un estudio del sudeste de China reveló una cepa de PPV2 más divergente (cepa CN), que se originó a partir de una colección de muestras de cerdos con signos clínicos de “enfermedad con fiebre alta” (Wang *et al.*, 2010). Filogenéticamente, el PPV3 está más relacionado con PPV2 (Xiao *et al.*, 2013b) como se informó en el 2007 a partir de muestras de cerdos recolectadas en Hong Kong (Lau *et al.*, 2008). El PPV4, que posee 3 marcos de lectura (ORF), similar al género *Bocaparvovirus*, se identificó inicialmente en 2010 (Cheung *et al.*, 2010), en muestras de lavado pulmonar (recolectadas en 2005) de cerdos con emaciación durante un brote de PCVAD en Carolina del Norte (Cheung *et al.*, 2007). El PPV5 se descubrió en los EUA en 2013 en tejidos pulmonares y PPV6 en fetos abortados en China en 2014 (Ni *et al.*, 2014), y ambos están estrechamente relacionados con el PPV4, aunque sus genomas carecen del ORF3 adicional que se encuentra en PPV4 (Xiao *et al.*, 2013). La NS del PPV4, PPV5 y PPV6 son 28,1-49,8% idénticas a los miembros de *Copiparvovirus* y tienen menos del 30% de identidad con otros géneros, lo que lleva a su inclusión en el género *Copiparvovirus* (Palinski *et al.*, 2016). Recientemente, el PPV7 fue descubierto en 2016 por secuenciación de próxima generación (NGS), un grupo divergente del linaje de *Parvoviridae*, el cual está estrechamente relacionado con el parvovirus del pavo y el parvovirus 2 de *Eidolon helvum*, los cuales se

clasificaron en el nuevo género *Chaphamaparvovirus* (Palinski *et al.*, 2016).

A diferencia del parvovirus porcino tipo 1, la importancia de los nuevos parvovirus porcinos para la salud de los cerdos es poco conocida. Estas especies virales (PPV2 – PPV7) se detectaron en cerdos con diferentes signos clínicos, pero también en cerdos aparentemente sanos. Se han detectado en varios tipos de muestras de cerdos, incluidos suero, heces, hígado, pulmones, corazón, bazo, riñones, linfonodos, tonsilas y fetos abortados. El verdadero papel de los nuevos parvovirus para la salud de los cerdos es difícil de definir de manera inequívoca, porque nunca se han aislado en cultivos celulares y no se han realizado infecciones experimentales. Sin embargo, la importancia de cualquier virus se puede estimar a través del análisis de su circulación en las granjas de diferentes regiones, países, tipos de producción y estado de salud. Desafortunadamente, la mayoría de los resultados publicados sobre nuevos parvovirus porcinos se obtuvieron del análisis de muestras archivadas, a veces de casos de enfermedades inexplicables y casos de diagnóstico de rutina de infecciones virales y bacterianas enviados a laboratorios de diagnóstico o que se recolectaron aleatoriamente en el rastro (Milek *et al.*, 2019).

V. Parvovirus porcino 5

El genoma del PPV5 tiene aproximadamente 5,805 nt de longitud e incluye dos marcos de lectura abiertos (ORF). Los dos ORF principales codifican dos proteínas de 601 y 991 nt de longitud respectivamente (Xiao *et al.*, 2013a). El marco de lectura río arriba (ORF 1) se localiza en las secuencias nucleotídicas ubicadas en la posición 862 a 2667 y codifica la(s) proteína(s) no estructural(es) (NS) que tienen actividad de replicasa (REP) (Palinski *et al.*, 2016 y Xiao *et al.*, 2013). El marco de lectura río abajo (ORF 2) se localiza en las secuencias nucleotídicas ubicadas entre el 2787 a 5762 y codifica la(s) proteína(s) estructural (es) (VP1, VP2 y VP3) o de la cápside (CP) (Palinski *et al.*, 2016, Xiao *et al.*, 2013), que desempeñan un papel importante en el ensamblaje e infección del virus, incluida la unión, entrada, transporte y localización intracelular, autoensamblaje y salida viral.

La proteína VP1 es un componente menor de las cápsides naturales, incluyendo la secuencia completa de la VP2. La proteína VP2 es la principal proteína de la cápside y tiene la capacidad de autoensamblarse en partículas similares a virus (VLP) sin la proteína VP1 *in vitro*, que es un antígeno principal para inducir anticuerpos neutralizantes (nAbs) (Yunchao *et al.*, 2020). Las secuencias palindrómicas terminales forman estructuras de tallo-bucle y horquilla características vitales para la replicación del ADN. Las proteínas del virión varían en peso molecular de 45 a 96 kDa y pueden contener un dominio central enzimático de fosfolipasa A2 (PLA2), el cual se encuentra en la proteína VP1 de PPV5, este dominio enzimático está involucrado en el tráfico intracelular o escape de endosomas (Palinski *et al.*, 2016).

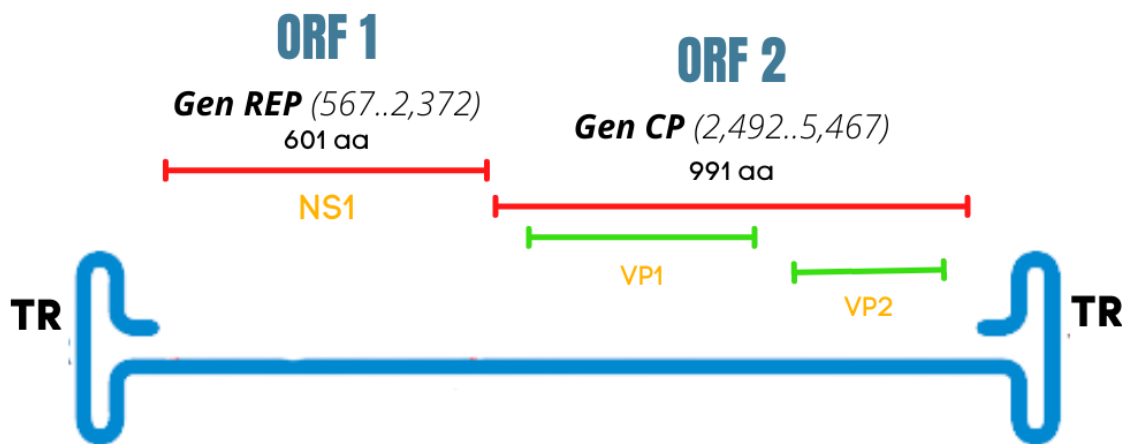


Figura 3. Descripción esquemática del genoma de PPV5 y sus proteínas virales.
 Datos recopilados del Genbank No. de acceso: JX896318 (Parvovirus porcino 5 aislado MI216, genoma completo), 2013.

VI. Transmisión y patogenia

El PPV5 desde su descubrimiento, se ha identificado en diferentes regiones geográficas y en una amplia gama de muestras, como suero, heces, fetos abortados, tejido pulmonar y linfonodos (Milek *et al.*, 2019).

Los parvovirus porcinos desde una perspectiva clínica, se encuentran entre los principales patógenos asociados con falla reproductiva de las cerdas (Vargas *et al.*, 2021). Aunque aún no se ha determinado un signo clínico particular asociado con el PPV5. García *et al.*, (2020) y Milek *et al.*, (2019), entre otros autores, han demostrado la presencia de PPV5-ssDNA en fetos abortados; esto sugiere una posible asociación con falla reproductiva.

En la mayoría de los casos la infección por PPV1 por sí sola no causa signos clínicos en lechones o cerdos adultos no gestantes. La virulencia de la cepa se define por la gravedad de la falla reproductiva que puede provocar. El resultado de la infección en el feto varía según el desarrollo de la gestación en las cerdas. Los fetos inmunocompetentes infectados después del día 70 de gestación desarrollan una respuesta de anticuerpos y por lo general sobreviven a la infección. La transmisión vertical al feto toma de 12 a 18 días después de la infección inicial de las madres por la ruta natural (oral) (Mészáros *et al.*, 2017).

La replicación viral del PPV1 es altamente dependiente de las fases celulares S o G1, las cuales corresponden al momento de la división celular, afectando por tanto órganos que presentan proliferación celular, como la médula ósea, las células embrionarias y el intestino delgado. El mecanismo de entrada del PPV1 en la célula no está claro, pero puede ocurrir por endocitosis o micropinocitosis mediada por clatrina a través de la vía endosomática, que permite que el virus alcance el núcleo y se replique mediante el mecanismo celular, lo que causa daño oxidativo e induce apoptosis. Inicialmente, se replica en el tejido linfoide y se disemina sistémicamente a través de la viremia. Cuando ocurre una infección fetal, el virus tiene un ambiente susceptible de infección y replicación debido a la alta tasa de mitosis presentes en

los tejidos fetales. Hasta el momento no se sabe cómo el PPV1 atraviesa la barrera placentaria, ya que está formada por capas que no permiten el paso de los anticuerpos. Sin embargo, la teoría mas aceptada es que el virus usa macrófagos para atravesar la placenta epiteliochorial e infectar al feto, debido a su potencial de permanecer infeccioso después de ser fagocitado (Streck *et al.*, 2021).

Las propiedades de virulencia del PPV1 parecen estar relacionadas con el gen de la capsida, se ha observado que el cambio de un solo aminoácido en la proteína de la cápsida afecta la capacidad de replicación en algunas líneas celulares y también influye drásticamente en los efectos patogénicos en los fetos. (Streck *et al.*, 2021). De acuerdo con lo anterior, Fan *et al.*, (2016) comentan que el árbol filogenético de genomas casi completos muestra que todas las cepas de PPV5 aisladas en Polonia se relacionan con la cepa china HN01. Sin embargo, observaron que en la cepa PPV5 K17-4 se identificaron dos supresiones de aminoácidos únicas en la proteína NS1, que también ocurrieron en la cepa china HN01 (número de acceso de GenBank AF661535, aa posiciones 22 y 222). La importancia de estas eliminaciones de aminoácidos podría influir en la patogenicidad de PPV5.



Figura 4. Propuesta de patogenia de PPV1. Mészáros et al., 2017; Streck et al., 2021; Jin et al., 2020; Vargas et al., 2021.

VII. Distribución y prevalencia

La distribución geográfica en diferentes estudios ha revelado que es muy amplia y con el surgimiento de nuevos parvovirus porcinos. Todas las especies de parvovirus porcinos se detectaron en China, E.U.A y Polonia. A diferencia del PPV1, la importancia de los nuevos parvovirus porcinos para la salud de los cerdos es poco conocida. Estos virus se detectaron en cerdos con diferentes signos clínicos, pero también en sanos (Milek *et al.*, 2019).

El PPV5 se ha reportado en algunas regiones del mundo y su prevalencia se considera variable. En América, concretamente en E.U.A fue reportado por Xiao *et al.*, (2013) en muestras de tejido pulmonar de cerdo. En México García *et al.*, 2020, reportaron su identificación en muestras de tejido linfoide (linfonodos y bazo) de casos de síndrome multisistémico de emaciación post destete (PMWS) en cerdos de 8 a 11 semanas de edad, así como en cerdos aparentemente sanos de la misma edad y en corazones fetales con miocarditis necrotizante a no supurativa afectados por el circovirus porcino tipo 2 (PCV2). En China Wu *et al.*, (2014) reportaron que en muestras de tejido pulmonar de lechones esta presente, mientras que en Polonia Fan *et al.*, 2016 lo encontraron en muestras de suero proveniente de diversas granjas de cerdos de todas las edades, por otro lado, en el mismo país Milek *et al.*, (2019) lo reportaron en muestras de hisopos fecales, así como en fluidos orales. Lo anterior muestra un amplio tropismo viral, similar al informado para PPV1 (Vargas *et al.*, 2021). Lo que indica las diversas vías de transmisión de esta cepa las cuales pueden ser vía horizontal y/o vertical.

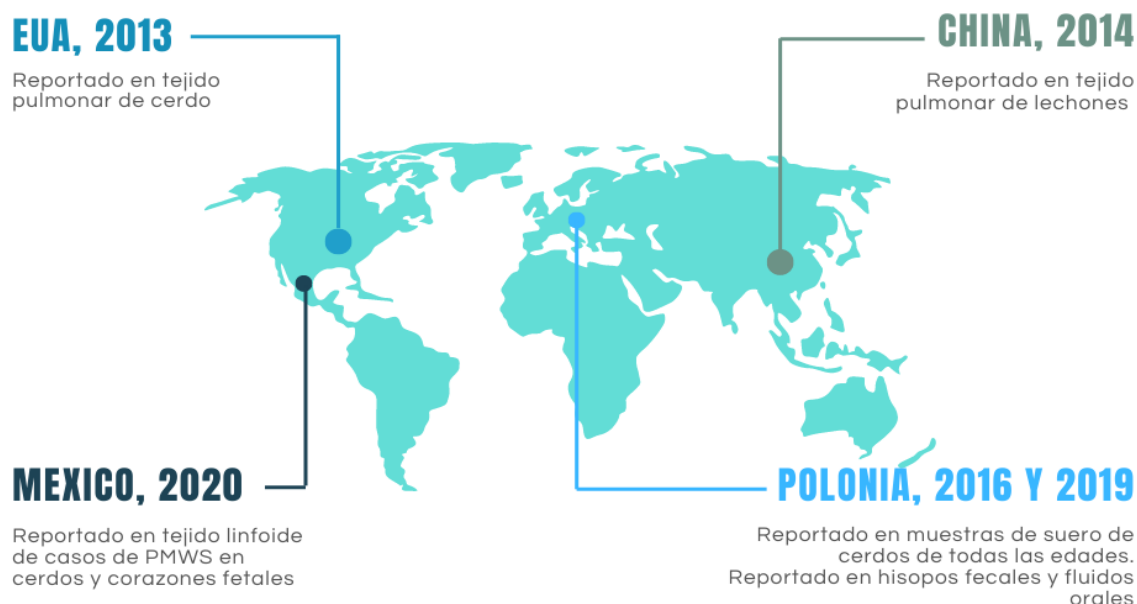


Figura 5. Distribución geográfica del PPV5 en los inicios de su descubrimiento a partir del 2013.

VIII. Co-infección con el Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2) y el PMWS

El circovirus porcino tipo 2 (PCV2) es la causa del síndrome multisistémico de emaciación post destete (PMWS), la cual es una enfermedad viral infecciosa de lechones post-destetados caracterizada por pérdida de peso progresiva, emaciación con o sin signos respiratorios, diarrea y ocasionalmente palidez de la piel o ictericia, ocurre principalmente en cerdos entre los 25 y 120 días de edad, en donde se ha reportado que la mayor incidencia es entre los 60 y 80 días de edad (Chae *et al.*, 2004). Al haber una co-infección del PCV2 con el PPV1, la gravedad de la enfermedad aumenta (García *et al.*, 2020). Hoy en día, el curso subclínico de la infección por PCV2 es más frecuente y se considera un factor importante para limitar el aumento de peso, se ha observado que no solo las infecciones por PPV1, sino que también las de las demás especies de PPVs contribuyen a aumentar la viremia del PCV2 en cerdos, mediante la estimulación de la replicación de PCV2 y eventualmente pueden conducir a enfermedad asociada al circovirus porcino tipo 2 (PCVAD) (Modificado de Milek *et al.*, 2020).

La enfermedad asociada al circovirus porcino tipo 2 (PCVAD) es un término que se refiere a la presencia de varias entidades clínico-patológicas, en las que el PCV2 desempeña un papel importante (Baekbo *et al.*, 2012).

Aunque PCV2 es el principal agente causante de PCVAD, no todos los cerdos infectados por PCV2 desarrollan PCVAD clínico (Meng, 2013).

Los PPVs emergentes están ampliamente distribuidos en todo el mundo, pero su conexión con la enfermedad ha sido difícil de determinar a pesar de su presunta asociación con PCVAD. Lo más probable es que la alta infección concurrente de parvovirus porcino esté asociada con la densidad de la población porcina en México, lo que ha contribuido no solo a la alta tasa entre especies de PPV sino también a las co-infecciones con PCV2. García *et al.*, 2020 demostraron por primera vez que los PPV son muy prevalentes en México y podrían tener asociación con PMWS y FR-PCV2+. A pesar de que la prevalencia mundial de PPV5 es bastante baja, el PPV5 fue el único PPV que mostró una relación significativa dentro de los casos de PMWS y es por ello que puede merecer una mayor investigación.

El presente proyecto subraya la necesidad de un enfoque más sistemático para estudiar el impacto del PPV5 en infecciones subclínicas por PCV2 y el papel que pueden tener en la eficacia de su diagnóstico mediante su detección empleando PCR en tiempo real.

JUSTIFICACIÓN

La producción animal efectiva depende en parte de la prevención de enfermedades infecciosas que afectan el desempeño productivo y reproductivo de los animales, en este caso de los porcinos y aunque pocos estudios se han hecho para determinar el impacto económico que se tiene sobre la presencia de PPV5 en México, la enfermedad se caracteriza por falla reproductiva por lo que se considera pérdidas económicas significativas para la producción intensiva de cerdos.

La mortalidad posterior al destete es una de las pérdidas más significativas en las piaras afectadas por PMWS, pero la reducción en el crecimiento y la mala utilización del alimento, así como el aumento del consumo de antibióticos, se suman al costo de la enfermedad. Por otro lado, el *Ungulate parvovirus 1* (PPV1) y el Circovirus porcino tipo 2 son los principales agentes virales involucrados. Sin embargo, diversos reportes a nivel mundial han identificado y sugerido la posible participación de otros agentes virales emergentes, como el Parvovirus Porcino tipo 5 por lo que es de vital importancia detectar su prevalencia y desarrollo en nuestro país.

La estandarización de un sistema de detección y cuantificación de la carga viral del PPV5, es el primer paso para lograr establecer el comportamiento de éste virus en nuestro país y así determinar, cuál es su participación en el PMWS.

HIPÓTESIS

La estandarización y detección del PPV5, por medio de PCR en tiempo real, puede identificar la presencia del virus en linfonodos de cerdos afectados por el Síndrome Multisistémico de Emaciación Post Destete.

OBJETIVOS

❖ Objetivo general:

- Estandarizar e implementar la técnica de PCR en tiempo real para la detección del PPV5 a partir de linfonodos de cerdos afectados por el Síndrome Multisistémico de emaciación post destete (PMWS).

❖ Objetivos particulares:

1. Estandarizar las condiciones óptimas de detección en la técnica de PCR en tiempo real para la identificación del PPV5, a partir de linfonodos de cerdo afectados por el Síndrome Multisistémico de Emaciación Post Destete (PMWS).
2. Implementar la técnica de PCR en tiempo real para la amplificación de la región VP1 parcial del Parvovirus porcino 5 (PPV5), a partir de linfonodos afectados por el Síndrome Multisistémico de Emaciación Post Destete (PMWS).
3. Determinar la especificidad de la prueba mediante secuenciación nucleotídica.

MATERIAL Y MÉTODOS

I. Iniciadores ocupados

Los iniciadores que se utilizaron están dirigidos para la amplificación de la región ORF 2 que codifica la proteína VP1 descritos por García *et al.*, (2020), se analizaron utilizando el programa Primer 3 (v3.0.0; Institute for Investigación Biomédica, Boston, MA). Los iniciadores se alinearon y editaron con el programa Bio Edit (v7.2.5; Ibis Bioscience, Carlsbad, CA).

II. Selección de muestras

Se ocuparon 30 muestras de la base de datos que se seleccionaron del archivo de casos del Laboratorio "A" de Patología Molecular Veterinaria de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo IV. Los linfonodos embebidos en parafina provienen de casos bien documentados de PMWS (lechones con signos clínicos asociados a la enfermedad, lesiones histopatológicas compatibles y un patrón positivo de hibridación *in situ*) que se conocía con anterioridad su estatus de positividad al PPV5 descritas por García *et al.*, 2020.

III. Extracción de ácido nucleico

Los cortes de 20 μm de grosor del tejido procesado en parafina se colocaron en microtubos estériles de 1.5 mL para la extracción de ADN mediante el uso de un Kit de marca comercial (QIAamp, DNA FFPE Tissue Kit).

Al microtubo se le agregó 1200 μL de xilol y se agito durante 10 segundos vigorosamente con un vortex, posteriormente se centrifugó a una velocidad de 14,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente (15 - 25°C), se removió cuidadosamente el exceso de xilol con una micropipeta sin tocar la pastilla formada, a continuación se agregó 1200 μL de etanol al 100% para eliminar el xilol residual y se mezcló suavemente en el vortex durante 10 segundos, después se centrifugó

nuevamente a 14,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se retiró el exceso de etanol con una micropipeta sin tocar la pastilla. Posteriormente se agregó 1200 μL de etanol al 100%, se agitó suavemente durante 10 segundos en el vortex, después se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se retiró el exceso de etanol con una micropipeta, después se incubó a 37°C por 10 minutos en la centrífuga vacuum concentrator 5301 (Eppendorf, Hamburg, Germany) para evaporar el exceso etanol. Seguidamente se agregó 180 μL de buffer ATL más 20 μL de proteinasa K, se mezcló por agitación en el vortex y se incubó a 56°C en un Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Germany), durante 20 horas. Al finalizar la incubación, se volvió a agitar levemente en el vortex durante 15 segundos y se adicionó 200 μL de buffer AL, se mezcló en vortex por 10 segundos más para enseguida adicionar 200 μL de etanol al 99% y mezclar en vortex por otros 10 segundos. Acto seguido, se centrifugó a 14,000 rpm durante un minuto y se transfirió el lisado entero a la mini columna centrífuga DNAeasy con un microtubo colector de 2 ml, procurando depositar la mezcla en el centro de la columna. Después ésta se centrifugó a 8,000 rpm durante un minuto, se eliminó el tubo colector y se colocó otro tubo colector nuevo para adicionar 500 μL de buffer AW1 justo en el centro de la membrana sin tocar los bordes y se centrifugó a 8,000 rpm durante un minuto, se eliminó el tubo colector y se usó un nuevo tubo donde se adicionó 500 μL de buffer AW2 y se centrifugó a 14,000 rpm por 3 minutos, se eliminó el tubo colector. Finalmente, se colocó un microtubo de 1.5 mL para recibir la elución que contiene el ADN purificado, esto se realizó cuando se agregaron 100 μL de buffer AE directamente en el centro de la membrana, se dejó incubar durante 1 minuto a 50 °C y posteriormente se centrifugó durante 1 minuto a 8,000 rpm . El procedimiento anterior se repitió una vez más para asegurar que en la columna no quedaran restos de ADN. La concentración de las muestras se determinó mediante Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer.

IV. Estandarización de la qPCR

a) q-PCR

La estandarización de la PCR en tiempo real para la identificación de PPV5 en las muestras seleccionadas se realizó de la siguiente manera:

1) Mezcla de reacción.

La mezcla de reacción general se observa en la tabla 3.

Tabla 3. *Mezcla de reacción general para la detección de PPV5 por PCR en tiempo real.*

Reactivos	1 Reacción
<i>SensiFast 2X</i>	10 μ L
<i>Iniciador sentido (1era reacción)</i>	1 μ L
<i>Iniciador antisentido (2da reacción)</i>	1 μ L
<i>Templado (ADN purificado)</i>	1 μ L
<i>Agua</i>	7 μ L

2) Curva de concentración de templado.

La determinación de la concentración óptima de templado se realizó empleando diferentes concentraciones del mismo, es decir, se emplearon 6.5, 12.5, 25 y 50 ng por reacción empleando una concentración de 10 μ M de ambos iniciadores.

3) Curva de concentración de iniciadores.

La determinación de la concentración óptima de los iniciadores se realizó utilizando diferentes concentraciones de los mismos, las cuales fueron 1, 3 y 5 μ M de cada iniciador por reacción. Es importante mencionar que estas curvas de calibración se realizaron con una muestra positiva al PPV5.

4) Condiciones de amplificación.

Pre calentamiento (desnaturalización inicial) de 3 minutos a una temperatura de 95° C, al término de ésta se realizaron 40 ciclos con las siguientes condiciones: desnaturalización a 95° C por 10 segundos, alineación a 60° C por 10 segundos (condición establecida por García *et al.*, 2020), elongación a 72° C por 20 segundos (Figura 6). La curva de disociación tuvo las siguientes características, un ciclo a 95° C por 5 segundos, 60 °C por 10 segundos y 95 °C por 10 segundos (Figura 6), para realizar lo anterior se utilizó el software MxPro qPCR (Stratagene, Agilent Technologies, EUA) en donde se determinó también la localización de las muestras.

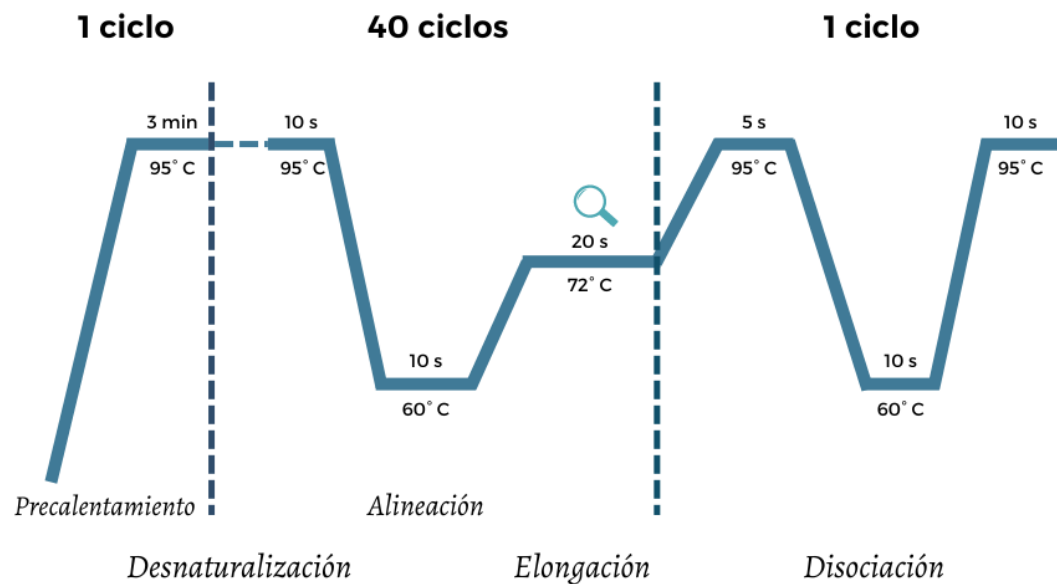


Figura 6. Diagrama de las condiciones de amplificación utilizadas para la detección de PPV5 por PCR en tiempo real.

b) HPRT (Hipoxantil-Fosforibosil-Transferrasa-1) gen de referencia o constitutivo

El gen de referencia que se utilizó fue el que codifica para la HPRT, la mezcla de la reacción se observa en la tabla 4.

Tabla 4. Mezcla de reacción general para la amplificación de HPRT por PCR en tiempo real.

Reactivos	1 Reacción
<i>SensiFast 2X</i>	10 µL
<i>Iniciador sentido (1era reacción)</i>	1 µL
<i>Iniciador antisentido (2da reacción)</i>	1 µL
<i>Templado (50 ng)</i>	1 µL
<i>Agua</i>	7 µL

Tabla 5. Secuencia de iniciadores que amplifican un fragmento del gen HPRT por PCR en tiempo real.

	Secuencia de Iniciadores del gen que codifica para HPRT	Tamaño del producto
<i>Iniciador sentido</i>	5'-TTG CTG ACC TGC TGG ATT AC-3'	229 pb
<i>Iniciador antisentido</i>	5'-CTG ACC AAG GAA AGC AAA GT-3'	

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: precalentamiento (desnaturalización inicial) de 2 minutos a una temperatura de 95° C, al término de ésta se realizaron 40 ciclos con las siguientes condiciones: desnaturalización a 95° C por 5 segundos, alineación a 50° C por 10 segundos (condición establecida por García *et al.*, 2020), elongación a 72° C por 20 segundos (Figura 7). La curva de disociación tuvo las siguientes características, un ciclo a 95° C por 5 segundos, 60 °C por 10 segundos y 95 °C por 10 segundos (Figura 7), para realizar lo anterior se utilizó el software MxPro qPCR (Stratagene, Agilent Technologies, EUA) en donde se determinó también la localización de las muestras.

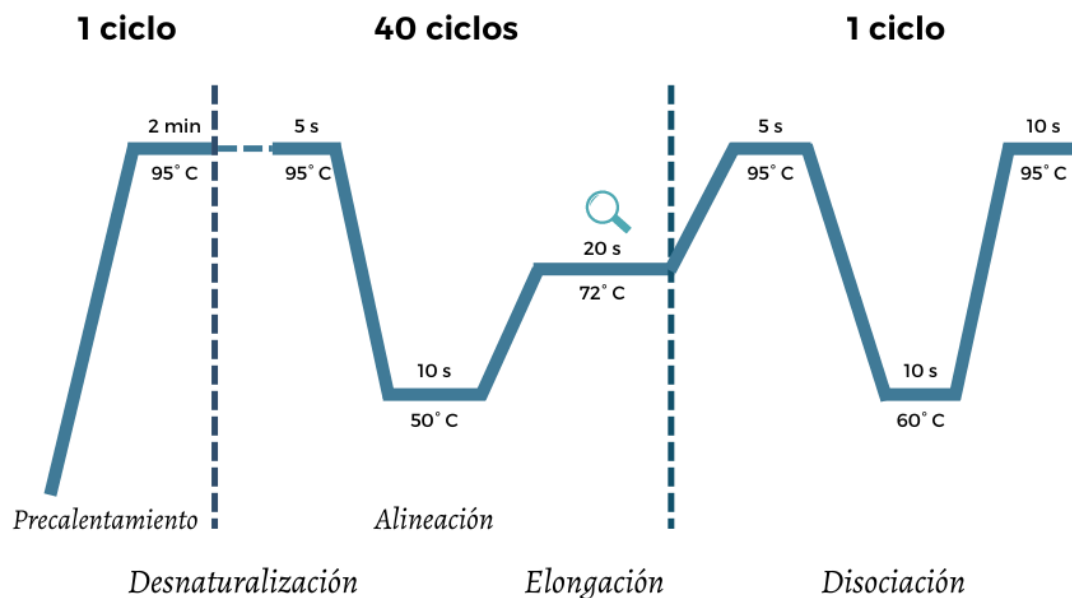


Figura 7. Diagrama de las condiciones de amplificación por PCR en tiempo real para HPRT.

V. Validación

a) Electroforesis

La visualización de los productos amplificados se realizó por electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa al 1.5%. Se pesaron 0.750g de agarosa y se depositó en un frasco de cristal con tapa, se pusieron 50 mL de TBE 1X calentando la mezcla para disolver la agarosa, una vez disuelta se le agregó 2.5 μ L de Bromuro de Etidio como agente intercalante para su visualización en el transiluminador. Una vez polimerizado el gel se introdujo en la cámara de electroforesis. Para depositar las muestras y el marcador de pares de bases se realizó el siguiente procedimiento: En un papel de parafina se adicionaron 2 μ L de buffer de carga más 2 μ L de marcadores de pares de bases. Para los demás pozos se mezclaron 2 μ L de buffer de carga más 10 μ L de la muestra y las condiciones de corrida para el gel fueron 85 volts durante 90 minutos utilizando una en la fuente de poder, al término de la corrida se observó en el transiluminador de luz UV

adquiriendo una fotografía empleando el programa Doc-IT.

b) Purificación del amplicón para secuenciación

Mediante el uso del kit comercial Molecular Biology Kit (Bioline, Toronto, Canadá), se sometieron las muestras a un proceso de purificación de bandas para su posterior secuenciación, siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. El gel se colocó sobre un transiluminador para observar los fragmentos que corresponden al producto esperado, se cortó el fragmento de ADN guiados por los marcadores de pares de bases. Este fragmento se transfirió a un microtubo estéril de 1.5 mL, a continuación se le agregó 400 μ L del buffer B3 previamente preparado con isopropanol, se dejó incubando durante 10 minutos a una temperatura de 56°C, pasado el tiempo se transfirió la solución de la mezcla anterior a la columna provista en el kit, se dejó incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente, al término de este tiempo se centrifugó a 10,000 rpm durante 2 minutos y se desechó la elución, a continuación se agregaron 750 μ L de Buffer de lavado a la columna y se centrifugó a 10,000 rpm por 2 minutos, se desechó la elución y se repitió el paso anterior. La columna que contiene al ADN se colocó en un microtubo nuevo estéril de 1.5 mL y se le adicionaron 40 μ L de Buffer de elución, se dejó incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente y finalmente se centrifugó por 2 minutos a una velocidad de 10,000 rpm para eluir el ADN. Para enviar el producto a su secuenciación las muestras nuevamente fueron separadas en un gel de agarosa al 1.5%, para comprobar que en la elución esta presente el producto de amplificación. Los fragmentos que se enviaron a secuenciar fueron procesados mediante una PCR punto final bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 95°C, durante 2 minutos, 40 ciclos con: desnaturalización 95°C 35 segundos, alineación 60°C durante 35 segundos, elongación a 72°C durante 35 segundos y una elongación final a 72°C durante 7 minutos. La mezcla de reacción se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Mezcla de reacción para la detección de PPV5 por PCR punto final.

Reactivos	1 Reacción
<i>MyTaq mix</i>	12.5 μ L
<i>Iniciador sentido 10 μM (1era reacción)</i>	1 μ L
<i>Iniciador antisentido 10 μM (2da reacción)</i>	1 μ L
<i>Templado (100 ng)</i>	1 μ L
<i>Agua</i>	8.5 μ L

c) Secuenciación

La secuenciación de los productos de PCR purificados se realizó usando un kit de enzimas de alta fidelidad, procesividad, y especificidad (Taq Platinum Polymerase; High Fidelity, Carsbald, California, EUA). El iniciador sentido fue usado para obtener secuencias parciales del ORF2, usando un secuenciador (Model 3100; Applied Biosystems, Foster, California, EUA) en el Instituto de Fisiología Celular (UNAM).

VI. Implementación

Con las condiciones de amplificación establecidas se procesaron las 30 muestras antes señaladas.

VII. Análisis de datos

Las secuencias fueron analizadas y editadas con el software Bioedit (Hall, 1999) y BLAST (NCBI). Para realizar la cuantificación relativa de las muestras se evaluaron por triplicado. Se utilizó el método de cuantificación relativa mediante la comparación del punto de cruce (cross-point/Cp). El gen de referencia utilizado fue la Hipoxantina fosforribosil transferansa 1 (HPRT1).

Las ecuaciones para calcular Delta, delta CT, para el método de cuantificación relativa son:

$$C_p \text{ de la muestra} - C_p \text{ (gen de referencia)} = \Delta C_p.$$

$$\Delta C_p \text{ de la muestra} = \Delta \Delta C_p.$$

$$\text{Cantidad relativa} = 2^{-\Delta \Delta C_p} (\text{LOG}_{10})$$



Figura 8. Diagrama de flujo para la detección de PPV5 por PCR tiempo real a partir de la estandarización.

RESULTADOS

a) Análisis de iniciadores

Los resultados que se obtuvieron para el análisis de iniciadores evaluados por el programa Primer 3 reveló que el iniciador sentido de primera reacción y el iniciador antisentido de segunda reacción son compatibles debido a que las T_m 's son muy similares y adicionalmente amplifican un producto de 318 pb (Tabla 7).

Tabla 7. *Análisis de iniciadores. Se muestra que el tamaño del producto es de 318 pb, teniendo un T_m de 60.14 y 60.48 para iniciador sentido y antisentido respectivamente. Primer 3 input.*

<i>Iniciador</i>	<i>T_m</i>	<i>Secuencia</i>
<i>Iniciador sentido (1era reacción)</i>	60.14	TTTGGGCGCCATATATTGAT
<i>Iniciador antisentido (2da reacción)</i>	60.48	TTGCTGGAGGCTCTTCATTC
<i>Tamaño de la secuencia de ref.</i>		5516 pb
<i>Tamaño del producto</i>		318 pb

b) Estandarización

En la curva de templado (sensibilidad) se observa que se logró amplificar en todas las concentraciones de templados utilizados, 6.5, 12.5, 25, y 50 ng (Figura 9), finalmente la curva de disociación (Figura 10) muestra un pico bien definido para todas las concentraciones de templado, por otro lado, se observa la falta de amplificación para la curva de los iniciadores sin templado.

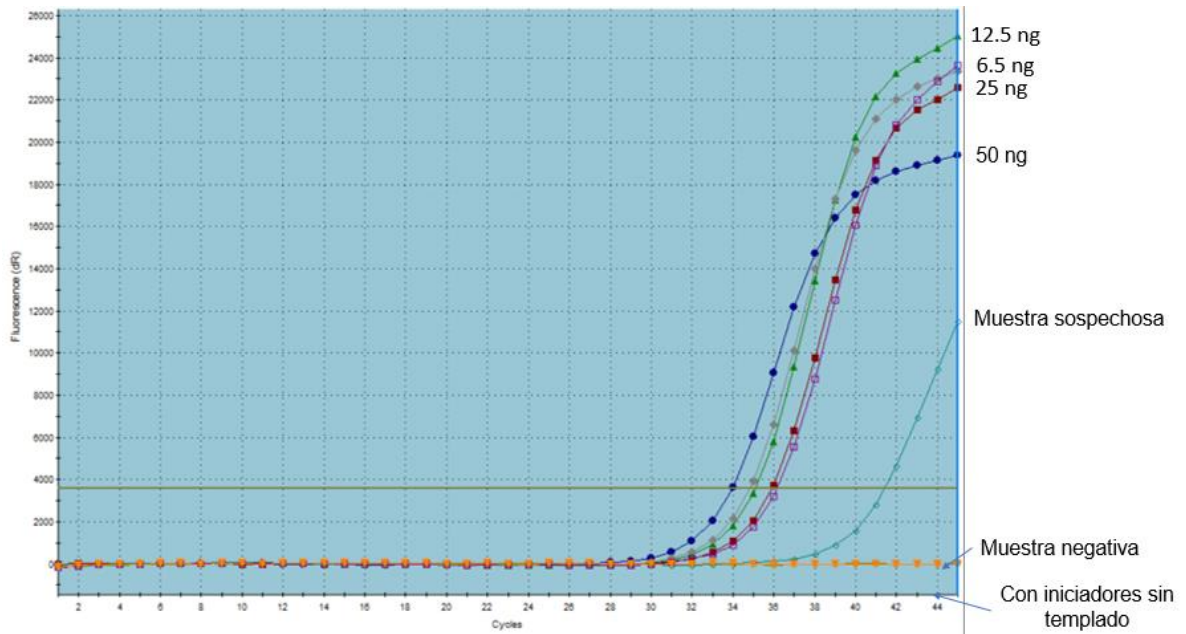


Figura 9. Curvas de amplificación de templado. Se puede observar el Cp (Cross-point) de muestras a diversas concentraciones de templado, siendo la línea color azul la que muestra un pico de amplificación más rápido, elevándose en el ciclo 34 correspondiendo a una concentración de 50 ng, mientras que la concentración a 25 ng se inició en el ciclo 36.

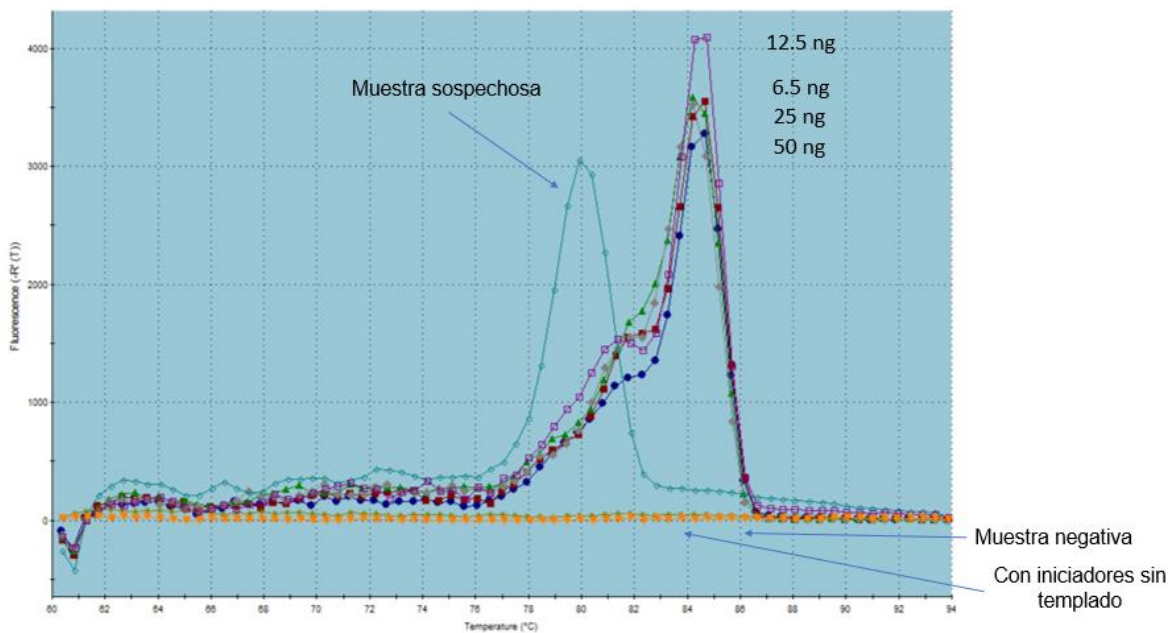


Figura 10. Curvas de disociación de templado. Se muestra el pico de disociación en el mismo punto para todas las muestras, excepto para la muestra sospechosa y la muestra negativa.

Para determinar si las lecturas corresponden a los amplicones buscados, las muestras fueron sometidas a una electroforesis en un gel de agarosa el cual mostró una banda bien definida para las concentraciones de templados 6.5, 12.5, 25, y 50 ng (Figura 11).

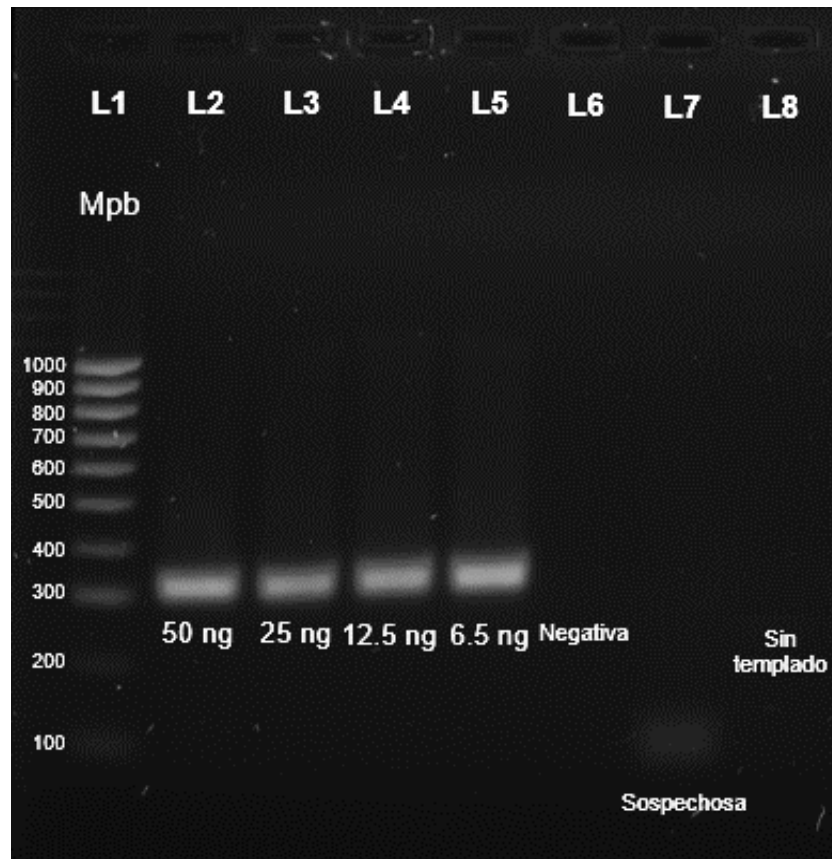


Figura 11. Amplificación obtenida por qPCR de diversas concentraciones de templado de PPV5. En la línea 1 se observa el marcador de pares de bases (1000). De la línea 2 a la 5 se observan productos amplificados del tamaño esperado positivos al PPV5. Gel de Agarosa al 1.5%.

En los resultados de la curva de los iniciadores probados a tres diferentes concentraciones, se observó que amplificaron con las concentraciones de 3 y 5 μM , sin embargo a 1 μM ya no se logró observar una amplificación (Figura 12). Por otro lado, se observó que el pico de disociación fue más alto en 5 μM (Figura 13).

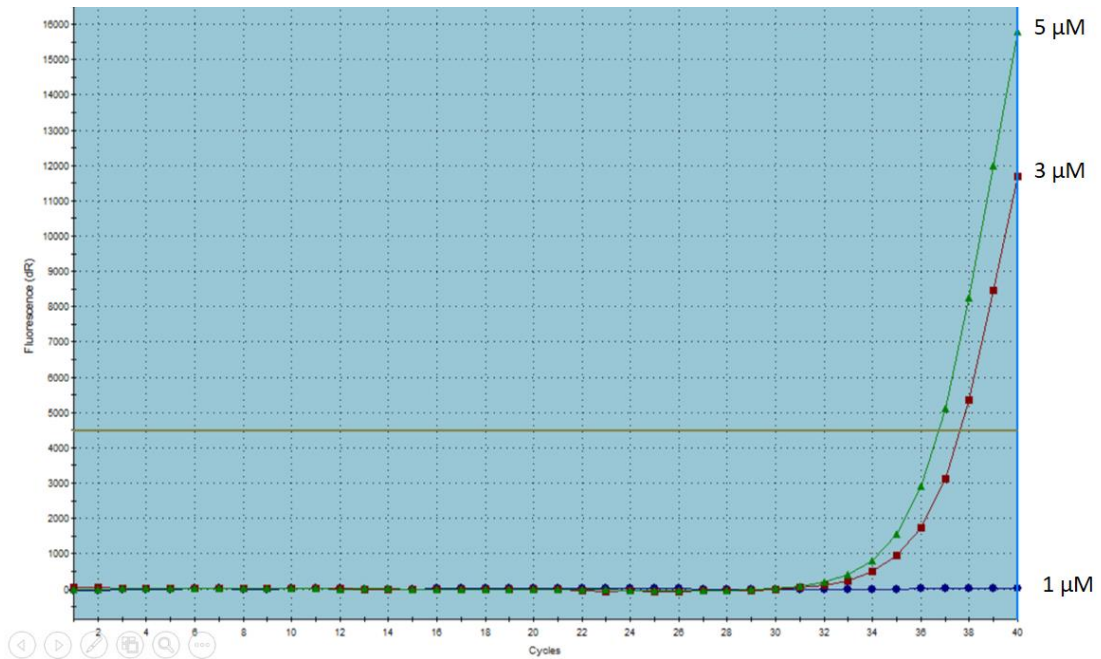


Figura 12. Curva de amplificación de los iniciadores. Se puede observar el Cp (Cross-point) de diversas concentraciones de los iniciadores, siendo la línea color verde la que mostro un pico de amplificación más rápido, elevándose casi en el ciclo 37 correspondiendo a una concentración de 5 μM.

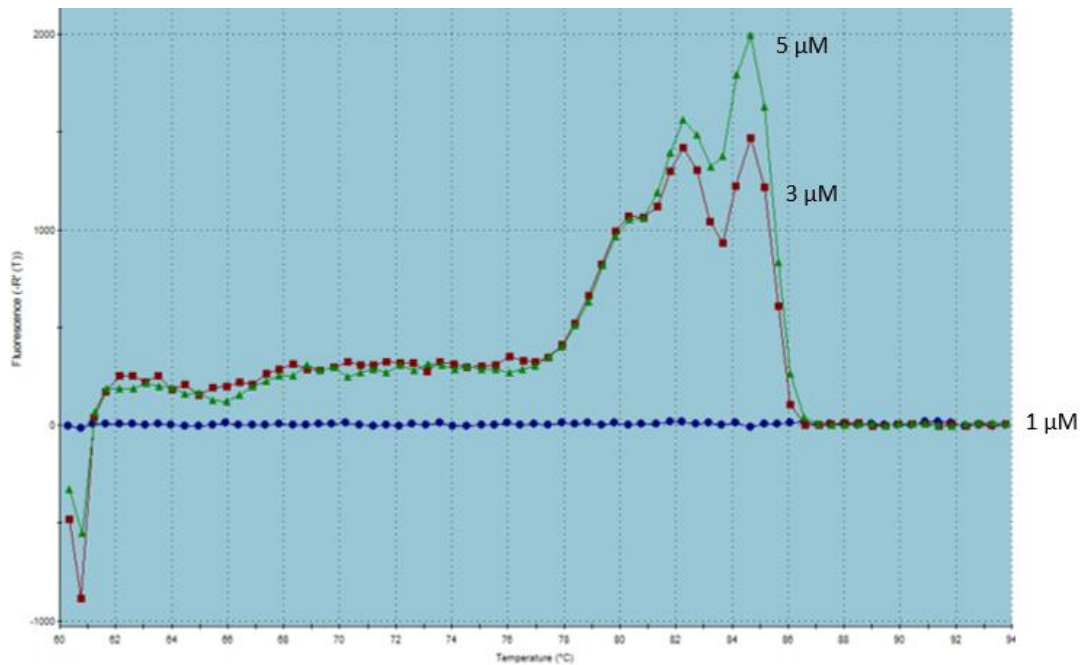


Figura 13. Curva de disociación de los iniciadores. Se muestra el pico de disociación en el mismo punto para las concentraciones a 5 y 3 μM.

Para corroborar el resultado se corrió un gel de agarosa el cual mostro una banda tenue en la concentración 3 μM y una banda definida en la concentración 5 μM (Figura 14).

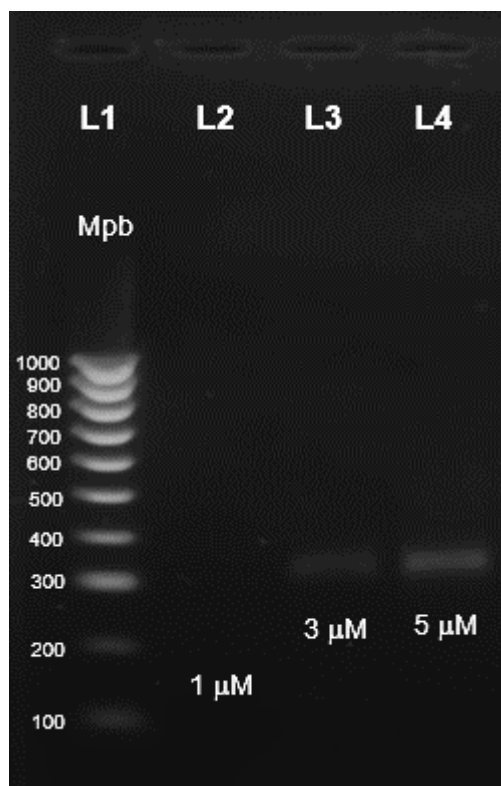


Figura 14. Amplificación obtenida por qPCR de diversas concentraciones de los iniciadores para la amplificación de PPV5. En la línea 1 se observa el marcador de pares de bases (1000). De la línea 3 a la 4, se observan productos amplificados del tamaño esperado positivos al PPV5. Gel de Agarosa al 1.5%.

Los resultados de la T_m de los productos esperados se observó que fue de ± 84.5 (Tabla 8).

Tabla 8. Identificación de muestras en el software MxPro qPCR. Datos obtenidos del software MxPro qPCR de diversas Tm obtenidas a diferentes concentraciones de templados.

#	Muestra	Ct (dR)	Tm Product
A1	PPV5-50	33.98	84.65
B1	PPV5-25	35.94	84.67
C1	PPV5-12.5	35.14	84.20
D1	PPV5-6.25	34.86	84.21
E1	PPV5-8B	No Ct	61.75
F1	PPV5-18A	41.49	79.92
H1	PPV5-ST	No Ct	62.73

c) Especificidad

La secuencia del producto mostro una similitud del 98.88% con las distintas secuencias del Genbank referidas como Parvovirus Porcino tipo 5 (Figura 15).

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Porcine parvovirus 5 isolate PPV5-DSH39 capsid protein gene complete cds	Porcine parvovir...	483	483	98%	7e-132	98.88%	3024	MK092461.1
<input checked="" type="checkbox"/> Porcine parvovirus 5 isolate PPV5-DSH35 capsid protein gene complete cds	Porcine parvovir...	483	483	98%	7e-132	98.88%	3024	MK092460.1
<input checked="" type="checkbox"/> Porcine parvovirus 5 isolate PPV5-DSH15 capsid protein gene complete cds	Porcine parvovir...	483	483	98%	7e-132	98.88%	3024	MK092458.1
<input checked="" type="checkbox"/> Porcine parvovirus 5 isolate PPV5-DJH26 partial genome	Porcine parvovir...	483	483	98%	7e-132	98.88%	5051	MK092453.1
<input checked="" type="checkbox"/> Porcine parvovirus 5 isolate PPV5-DSH40 partial genome	Porcine parvovir...	483	483	98%	7e-132	98.88%	5050	MK092449.1
<input checked="" type="checkbox"/> Porcine parvovirus 5 isolate PPV5-DSH38 partial genome	Porcine parvovir...	483	483	98%	7e-132	98.88%	5051	MK092448.1
<input checked="" type="checkbox"/> Porcine parvovirus 5 isolate PPV5-DSH37 partial genome	Porcine parvovir...	483	483	98%	7e-132	98.88%	5051	MK092447.1
<input checked="" type="checkbox"/> Porcine parvovirus 5 isolate PPV5-DSH34 partial genome	Porcine parvovir...	483	483	98%	7e-132	98.88%	5051	MK092445.1
<input checked="" type="checkbox"/> Porcine parvovirus 5 isolate PPV5-DSH31 partial genome	Porcine parvovir...	483	483	98%	7e-132	98.88%	5051	MK092443.1
<input checked="" type="checkbox"/> Porcine parvovirus 5 isolate PPV5-DSH25 partial genome	Porcine parvovir...	483	483	98%	7e-132	98.88%	5051	MK092438.1
<input checked="" type="checkbox"/> Porcine parvovirus 5 isolate PPV5-DSH22 partial genome	Porcine parvovir...	483	483	98%	7e-132	98.88%	5051	MK092437.1
<input checked="" type="checkbox"/> Porcine parvovirus 5 isolate PPV5-DSH19 partial genome	Porcine parvovir...	483	483	98%	7e-132	98.88%	5051	MK092435.1
<input checked="" type="checkbox"/> Porcine parvovirus 5 isolate PPV5-DSH18 partial genome	Porcine parvovir...	483	483	98%	7e-132	98.88%	5051	MK092434.1
<input checked="" type="checkbox"/> Porcine parvovirus 5 isolate PPV5-DSH17 partial genome	Porcine parvovir...	483	483	98%	7e-132	98.88%	5051	MK092433.1
<input checked="" type="checkbox"/> Porcine parvovirus 5 isolate PPV5-DSH11 partial genome	Porcine parvovir...	483	483	98%	7e-132	98.88%	5051	MK092432.1
<input checked="" type="checkbox"/> Porcine parvovirus 5 isolate PPV5-DSH10 partial genome	Porcine parvovir...	483	483	98%	7e-132	98.88%	5051	MK092431.1
<input checked="" type="checkbox"/> Porcine parvovirus 5 isolate PPV5-DSH5 partial genome	Porcine parvovir...	483	483	98%	7e-132	98.88%	5051	MK092428.1
<input checked="" type="checkbox"/> Porcine parvovirus 5 isolate PPV5-DSH4 partial genome	Porcine parvovir...	483	483	98%	7e-132	98.88%	5051	MK092427.1
<input checked="" type="checkbox"/> Porcine parvovirus 5 isolate PPV5-DSH3 partial genome	Porcine parvovir...	483	483	98%	7e-132	98.88%	5051	MK092426.1
<input checked="" type="checkbox"/> Porcine parvovirus 5 isolate PPV5-DSH1 partial genome	Porcine parvovir...	483	483	98%	7e-132	98.88%	5051	MK092425.1
<input checked="" type="checkbox"/> Porcine parvovirus 5 isolate PPV5_VIRES_ZJ01_C1 replicase and capsid protein genes complete cds	Porcine parvovir...	483	483	98%	7e-132	98.88%	5281	MK378349.1
<input checked="" type="checkbox"/> Porcine parvovirus 5 isolate PPV5_VIRES_YN01_C1 replicase gene complete cds and capsid protein gene par...	Porcine parvovir...	483	483	98%	7e-132	98.88%	5131	MK378347.1

Figura 15. Similitud entre secuencias del Genbank referidas como PPV5. Datos recopilados del análisis del BLAST.

El árbol filogenético de las diversas especies de parvovirus porcinos (1-7) mostró que nuestra secuencia de PPV5 tiene un 98% de similitud con las demás secuencias de PPV5 y esta estrechamente relacionada a la secuencia estadounidense (Figura 16).

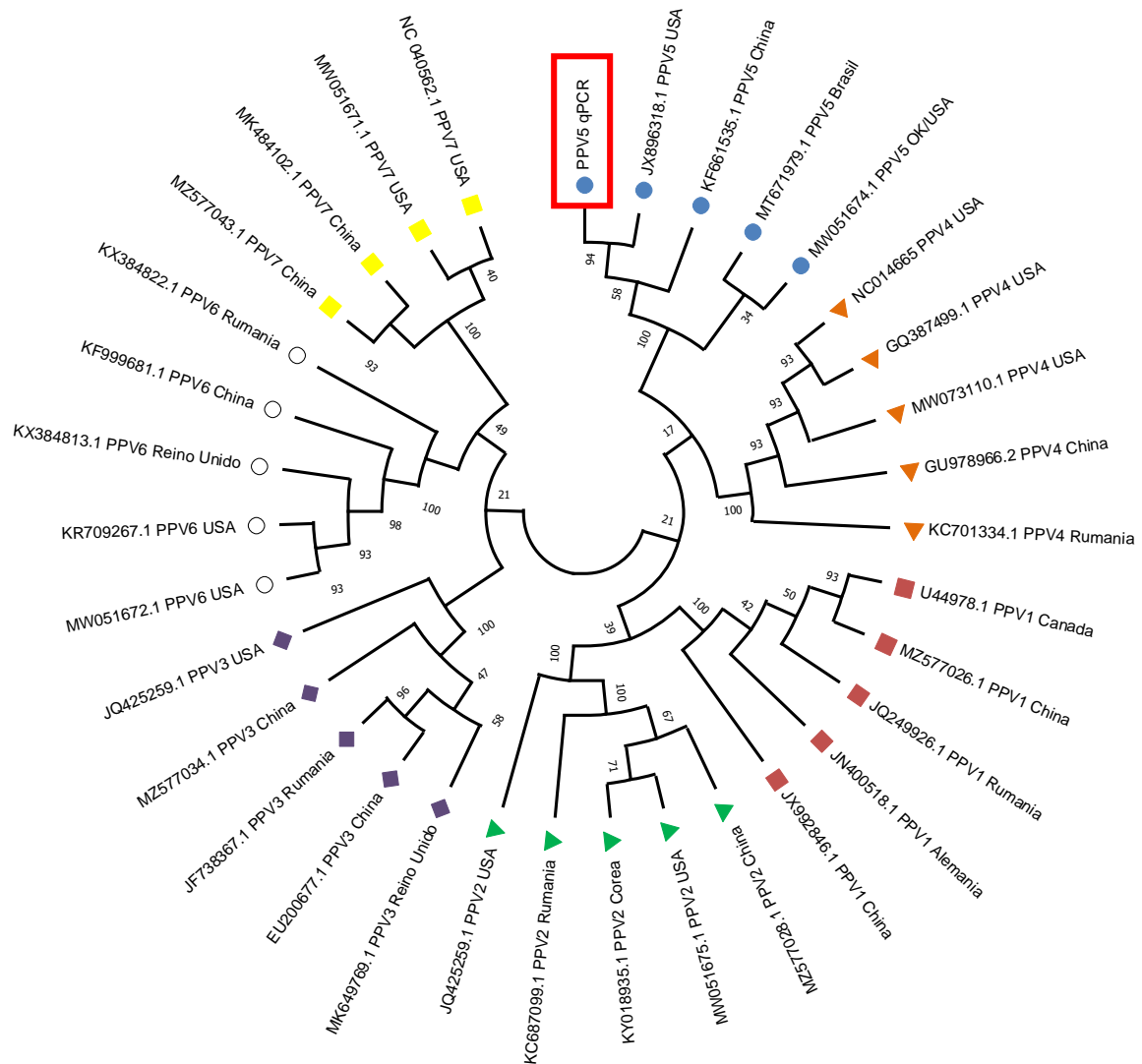


Figura 16. Árbol filogenético que muestra las secuencias de aminoácidos pertenecientes a las diferentes especies de Parvovirus con números de acceso GenBank y país de origen. Las secuencias se distribuyeron en siete especies: Protoparvovirus (PPV1) ■; Tetraparvovirus (PPV2) ▲; Tetraparvovirus (PPV3) ◆; Copiparvovirus (PPV4) ▼; Sin clasificar (PPV5) ●, la secuencia utilizada en este proyecto se resalta encerrado en un rectángulo rojo □; Copiparvovirus (PPV6) ○; Chaphamaparvovirus (PPV7) ◆. MEGA-X (Tamura et al., 2013).

d) Implementación

En los resultados de la curva de amplificación de las muestras procesadas, se observa amplificación en 8 muestras del grupo experimental (Figura 17), por otro lado, se observó que el pico de disociación se mostró en el mismo punto para las 8 muestras positivas (Figura 18).

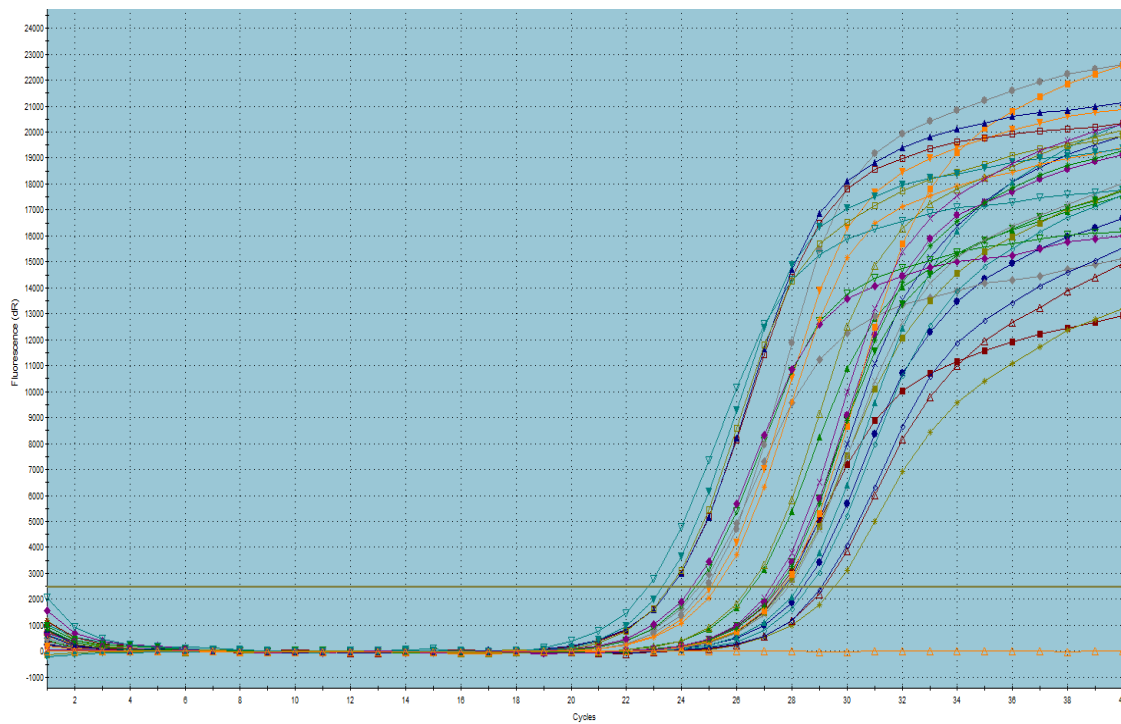


Figura 17. Curvas de amplificación de las muestras. Se puede observar el Cp (Cross-point) de diversas muestras.

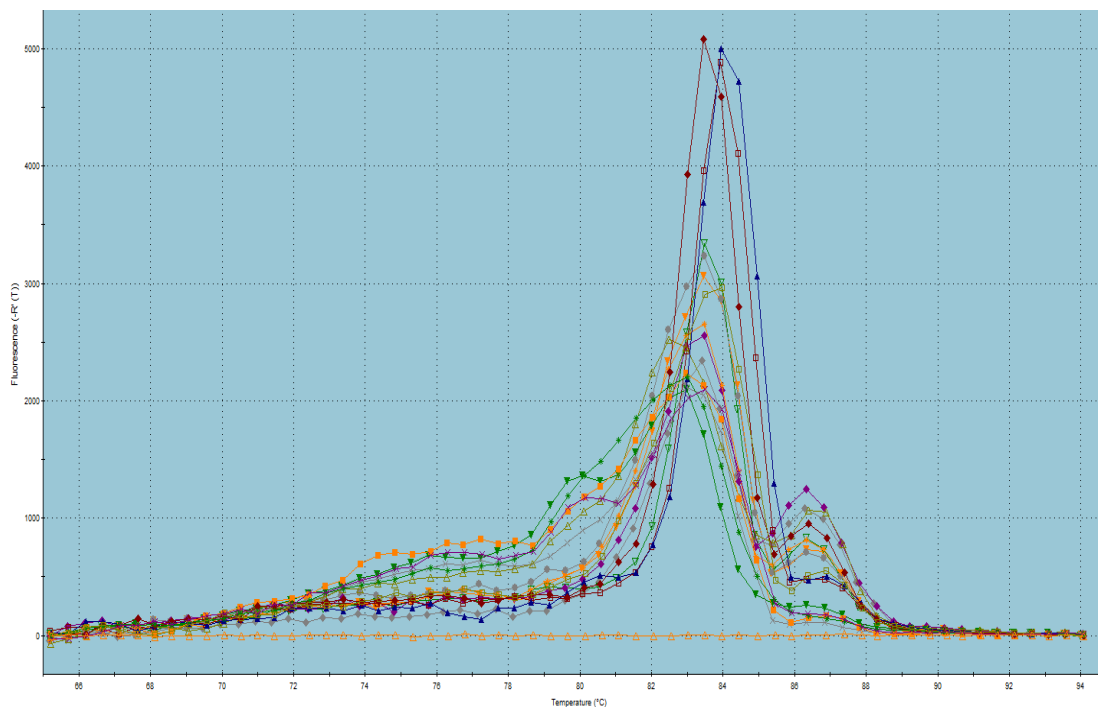


Figura 18. Curvas de disociación de las muestras. Se muestra que el pico de disociación está en el mismo punto para la mayoría de las muestras.

Se estableció que la T_m del producto fue la esperada para las 8 muestras positivas (valores de ± 84.5) (Tabla 9).

Tabla 9. Identificación de muestras positivas a PPV5. Datos obtenidos del software MxPro qPCR de diversas T_m obtenidas de las 30 muestras con $T_m \pm 84.5$.

#	Muestra	Ct (dR)	T_m Product
1	17-F-2	24.69	83.42
2	17g-1	25.10	83.45
3	17g-2	24.93	83.47
4	17a-A3	24.44	83.47
5	17-F-1	25.32	83.47
6	19-E	23.69	83.92
7	13g	23.64	83.96
8	17-C	23.37	83.50

e) Cuantificación

La carga viral en las muestras positivas tuvo un promedio de 0.45 (Tabla 10).

Tabla 10. *Cuantificación de muestras positivas a PPV5. Datos obtenidos del software MxPro qPCR de diversas Ct, calculando la carga viral de las muestras positivas.*

# de Muestra	Origen de la muestra	Nombre de la muestra	$2^{-\Delta\Delta C_p}$	Expresión
1	Linfonodo	17 G1	0.2002	0.6983
2	Linfonodo	17 G2	0.2146	0.6682
3	Linfonodo	17 F1	0.8467	0.0722
4	Linfonodo	17 F2	0.5176	0.2859
5	Linfonodo	17a-A3	0.2146	0.6682
6	Linfonodo	17C	0.8066	0.0933
7	Linfonodo	13 G	0.4005	0.3973
8	Linfonodo	19 E	0.1767	0.7525

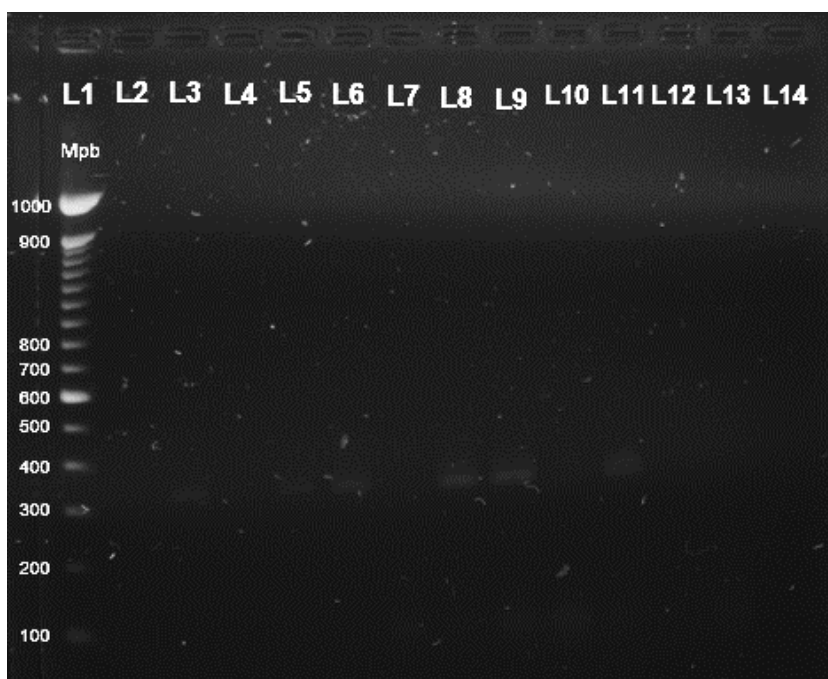


Figura 19. *Amplificación obtenida por qPCR de las muestras positivas a PPV5. En la línea 1 se observa el marcador de pares de bases. En las líneas 3, 5, 6, 8, 9 y 11 se observan productos amplificados del tamaño esperado positivos al PPV5. Gel de Agarosa al 1.5%.*

DISCUSIÓN

En la última década, la técnica de PCR ha establecido su valor como pruebas diagnósticas, dado su buen rendimiento para la detección de enfermedades infecto-contagiosas como el parvovirus porcino tipo 5. La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) es un método utilizado habitualmente para la detección y cuantificación de la expresión génica en “tiempo real” (Hawkins y Guest, 2017), es una técnica muy sensible y precisa que puede ofrecer un diagnóstico fiable en tan solo tres horas. En comparación con otros métodos disponibles de aislamiento de virus, la PCR en tiempo real es bastante más rápida y tiene menos posibilidades de contaminación o error, ya que todo el proceso puede llevarse a cabo en tubos cerrados. De los métodos existentes, sigue siendo el más exacto para detectar enfermedades virales, es ventajoso en comparación con el método tradicional de PCR basado en la visualización en gel, ya que la expresión génica se puede visualizar "en tiempo real" usando una computadora (software). Sin embargo, el éxito de la qPCR depende de los iniciadores óptimos que se utilicen y de las muestras (Thornton y Basu, 2015). Diversos estudios enfocados al diagnóstico del PPV5 han hecho uso de esta técnica en sus diversas variedades como la PCR anidada (García *et al.*, 2020), PCR punto final (Xiao *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2022) y PCR en tiempo real (Fan *et al.*, 2016; Xiao *et al.*, 2013a, Milek *et al.*, 2019), posicionándola como una de las técnicas de diagnóstico molecular más utilizadas actualmente.

Como la PCR en tiempo real es un método altamente sensible y requiere volúmenes de reacción muy pequeños, se debe tener un control específico para el tipo de amplificación que se desea, en el caso del PPV5, Xiao *et al.*, 2013a y Milek *et al.*, 2019, reportan que utilizaron la concentración de iniciadores a 10 μM . Sin embargo, en este estudio se demostró que hay amplificación a una concentración desde 3 μM . Por otra parte, Díaz *et al.*, 2014, mencionan que lo ideal para la muestra de ADN (templado) es utilizarla a una concentración de 10 ng, en cambio, en nuestro estudio se probó que el PPV5 puede utilizarse desde una concentración de 6.5 ng.,

lo que demuestra la alta sensibilidad que puede presentar la prueba. Por otro lado, es importante mencionar que los iniciadores de este estudio fueron diseñados originalmente para PCR anidada, sin embargo, se logró estandarizar la técnica con los mismos iniciadores para PCR en tiempo real, debido a que la PCR en tiempo real presenta mayor sensibilidad, solamente genera una sola reacción e incluso nos puede dar un valor cuantitativo en el número de copias/ml de las muestras.

El éxito del PCR radica principalmente en que pocos fragmentos de ADN se repliquen en millones o miles de millones de copias, es esta amplificación del ADN a detalle lo que nos permite estudiar la molécula o secuencia más minuciosamente., en este sentido, varios trabajos dedicados a la amplificación de los PPVs se han enfocado en las regiones genéticas ORF1 y ORF2 (Xiao *et al.*, 2013a; Wu *et al.*, 2014; Fan *et al.*, 2016), sin embargo, algunos autores se centran solamente en una de estas regiones, como García *et al.*, 2020, quienes desarrollaron su investigación en el ORF2, específicamente sobre la VP1. Tomando esto en cuenta y basado en los códigos de acceso del Genbank que citan los diversos autores de las regiones que amplificaron, se demuestra en este trabajo a través del análisis realizado en BLAST (Figura 15) la similitud entre especies de los parvovirus porcinos tipo 5, pero más importante aún, se comprobó que nuestra secuencia presenta una similitud de entre 94% y 58% con secuencias del PPV5, cabe resaltar que la similitud más alta fue de 98% con una secuencia de EUA., lo que significa que la validación de la región amplificada es la correcta para estudios filogenéticos, así mismo, se comprueba que la mezcla de los iniciadores sentido de la primera reacción y el reverso anidado de la segunda reacción diseñados por García *et al.*, 2020 utilizados en este trabajo, demostraron ser eficientes en la amplificación de la región genética ORF2. Ren *et al.*, 2013, reportan con que siendo la región genética ORF2 una zona con mayor variabilidad debido a la alta proporción de aminoácidos hidrofílicos en esta región, podría indicar su alto índice de mutabilidad, lo que permite distinguir las distintas especies de PPVs. Por otro lado, el árbol filogenético del trabajo demostró que a partir de la VP1 se puede discriminar entre los diferentes PPVs.

Las muestras de tejido fijado con formalina embebido en parafina (FFPE), se convirtieron con los años en una herramienta básica, ya que una gran cantidad de especímenes fijos se conservan en colecciones de todo el mundo y la información genética humana y de patógenos que contienen suele ser fundamental para importantes investigaciones relacionadas con la salud (Gilbert *et al.*, 2007). Los tejidos FFPE permiten a los veterinarios enviar muestras para la identificación de cualquier agente en un estado bien conservado y no infeccioso (Kim *et al.*, 2001), la ventaja en su uso es permitir conservar las muestras por varios años y su transporte no tiene inconvenientes. Sin embargo, se ha observado que la calidad del ADN disminuye. Los tejidos FFPE son una puerta para otras pruebas como la histopatología o la hibridación *in situ*, no obstante existen otro tipo de tejidos con los que se puede trabajar por ejemplo la sangre., Fan *et al.*, 2016 y Bovo *et al.*, 2017 lograron amplificación del PPV5 a partir de sangre. Sin embargo, el procesamiento de la muestra tiene que ser el mismo día, por lo que los muestreos, el clima, el tiempo, la manipulación de la muestra y el traslado de la misma puede alterar el resultado. Las muestras de este proyecto fueron seleccionadas del archivo de casos con el que cuenta el laboratorio A de patología molecular veterinaria de la UIM (FESC-4), los tejidos FFPE beneficiaron este proyecto por la extensa variedad que había de casos archivados, haciendo posible el análisis y la cuantificación de los mismos. El hallazgo del PPV5 es diverso, por la variedad de tejidos en los que se ha encontrado, como fue tejido pulmonar (Xiao *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2014), heces (Xiao *et al.*, 2013a; Milek *et al.*, 2019), fluidos torácicos (Xiao *et al.*, 2013a), tejido linfoide (García *et al.*, 2020), corazones fetales (García *et al.*, 2020), suero (Fan *et al.*, 2016) y fluidos orales (Milek *et al.*, 2019). Es importante aclarar que los autores mencionan que la mayoría de casos se presentaron en cerdos de todas las edades, estaban infectados por otros agentes como PCV2, incluso en aquellos que estaban aparentemente sanos o no presentaban ningún signo clínico, evidenciando así la infección por PPV5. En México, García *et al.*, 2020 reportaron en su estudio que el PPV5 estaba significativamente más relacionado o detectado en casos con asociación al PCV2, lo cual concuerda con nuestro trabajo, ya que la secuencia encontrada en estos casos está estrechamente relacionada con casos positivos a

PCV2, y para ser más concretos al PMWS. Esto sugeriría que el cofactor para que evolucione la enfermedad a PMWS podría considerarse la presencia PPV1, en este caso al PPV5. Por otra parte, Kim *et al.*, 2022, reitera lo mismo que García *et al.*, 2020, quienes en su reporte encontraron que el PPV5 se detectó con mucha más frecuencia en casos que estaban infectados por PCV2. Además, Kim *et al.*, 2003 sugirió que las lesiones producidas por la infección dual de cerdos con PCV2 y PPV1 se asocian con una abundancia de ADN de PCV2 y un mínimo de ADN de PPV1, lo que sugiere que la inoculación de PPV1 potencializó la replicación de PCV2, por otra parte, los mismos autores observaron que estos virus (PCV2 y PPV1) circulan principalmente a través de macrófagos depositándose así en tejido linfóide principalmente, eso nos puede dar una idea de que en la mayoría de los casos se encontraran en linfonodos y bazo, por lo cual concordamos con dicha sugerencia ya que el PPV5 de este proyecto fue hallado principalmente en linfonodos afectados por el PMWS. Por otro lado, Fan *et al.*, 2016 y Kim *et al.*, 2022, reportan que el PPV5 también fue encontrado en cerdos que estaban contagiados por PRRS, lo que hace más extensa la investigación sobre esta especie viral, ya que, podría tener más asociación con otros agentes infecciosos de lo que pensamos como lo es PRRS, PCV2, PMWS, etc., potenciando la enfermedad primaria que causan, actuando los PPVs de manera secundaria. Sin embargo, comprender el papel de los nuevos parvovirus porcinos en los trastornos de salud porcina es difícil. A diferencia de PPV1, PPV2 al PPV7 nunca se han cultivado *in vitro*, por lo que no se pudieron realizar experimentos de desafío. Su importancia solo puede inferirse o especularse a partir de su detección a nivel de ADN (Milek *et al.*, 2019).

El umbral de ciclos o cycle threshold (Ct) es el número de ciclos en el que la señal fluorescente cruza este umbral. Para valorar la presencia del virus en la muestra, se determinó el número de ciclos Ct de qPCR necesarios para que la prueba resulte positiva, es decir, indica el momento preciso de la amplificación en el que la prueba es capaz de identificar la presencia de la diana molecular investigada, sin indicar la cantidad presente. Así, el Ct es un valor semicuantitativo inversamente relacionado con la cantidad de ADN de la muestra, de manera que un

número bajo de Ct está relacionado con mayor carga viral y viceversa (Serrano *et al.*, 2021). La media de la carga viral calculada en este proyecto fue de $10^{0.45}$ copias/ml, obtenida de una media en la Ct de 25.91 de muestras positivas a PPV5, en comparación con la reportada por Milek *et al.*, 2019, para el PPV5 encontrando un de Ct fue igual a 20.4 y Xiao *et al.*, 2013a reportaron una Ct entre 28-38.9, dichas Ct. se encuentran en un rango de 20 a 39 y la reportada en este proyecto entra en este rango, por lo que, los resultados no difieren con los reportados en la bibliografía. Sin embargo, es importante aclarar que la diferencia podría deberse a las zonas donde fue obtenida la muestra, la diferencia de años y el tipo de muestra que se manejó.

Este trabajo demostró que la técnica de PCR en tiempo real es útil para la cuantificación de la carga viral, sin embargo, para poder buscar la asociación con otros agentes infecciosos como PCV2 se necesita trabajar con un número de muestras más elevado o con otro tipo de tejidos dada la alta sensibilidad de la técnica.

CONCLUSIONES

- ❖ La qPCR es una técnica sensible y específica para la detección de parvovirus porcino tipo 5.
- ❖ El PPV5 se encuentra presente en tejidos linfoides coinfectados a circovirus porcino tipo 2.
- ❖ Se logró estandarizar e implementar una técnica de PCR en tiempo real para la detección de PPV5.
- ❖ Se logró determinar la carga viral de las muestras mediante el uso de qPCR
- ❖ Los resultados y la bibliografía sugieren que hay una estrecha asociación entre el PPV5 y otros agentes infecciosos como el PCV2 o PRRS, sin embargo, se necesitan más investigaciones.

REFERENCIAS

- 1) Araiza-Hernández, D.M., (2019). Evaluación de la respuesta inmune celular y su relación con el desarrollo de linfocitosis persistente en vacas infectadas por el virus de la leucosis bovina (BLV). Tesis de maestría del programa en ciencias de la producción y de la salud animal. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México
- 2) Baekbo, P., Kristensen, C. S., & Larsen, L. E. (2012). Porcine circovirus diseases: a review of PMWS. *Transboundary and emerging diseases*, 59 Suppl 1, 60–67. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01288.x>
- 3) Bovo, S., Mazzoni, G., Ribani, A., Utzeri, V. J., Bertolini, F., Schiavo, G., & Fontanesi, L. (2017). A viral metagenomic approach on a non-metagenomic experiment: Mining next generation sequencing datasets from pig DNA identified several porcine parvoviruses for a retrospective evaluation of viral infections. *PloS one*, 12(6), e0179462. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179462>
- 4) Chae C. (2004). Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. *Veterinary journal*, 168(1), 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2003.09.018>
- 5) Cheung, A. K., Lager, K. M., Kohutyuk, O. I., Vincent, A. L., Henry, S. C., Baker, R. B., Rowland, R. R., & Dunham, A. G. (2007). Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. *Archives of virology*, 152(5), 1035–1044. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0909-6>
- 6) Cheung, A. K., Wu, G., Wang, D., Bayles, D. O., Lager, K. M., & Vincent, A. L. (2010). Identification and molecular cloning of a novel porcine parvovirus. *Archives of virology*, 155(5), 801–806. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0646-8>
- 7) Cui, J., Fan, J., Gerber, P. F., Biernacka, K., Stadejek, T., Xiao, C. T., & Opriessnig, T. (2017). First identification of porcine parvovirus 6 in Poland.

- Virus genes, 53(1), 100–104. <https://doi.org/10.1007/s11262-016-1386-y>
- 8) Díaz, Alejandra & Flores-Rentería, Lluvia & Cortez, Jaime & Sierra-Palacios, Edgar. (2014). PCR: reacción en cadena de la polimerasa. En Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos (pp.53-73) Edición: Primera Editorial: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat) Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC) Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I).
 - 9) Fan, J., Cui, J., Gerber, P. F., Biernacka, K., Stadejek, T., & Opriessnig, T. (2016). First Genome Sequences of Porcine Parvovirus 5 Strains Identified in Polish Pigs. *Genome announcements*, 4(5), e00812-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00812-16>
 - 10) García, C. L. A., Vargas, R. A., Marin, F. E., Ramírez, A. H., & Brown, C. (2020). A retrospective study of DNA prevalence of porcine parvoviruses in Mexico and its relationship with porcine circovirus associated disease. *Microbiology and immunology*, 64(5), 366–376. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12782>
 - 11) Gilbert, M. T., Haselkorn, T., Bunce, M., Sanchez, J. J., Lucas, S. B., Jewell, L. D., Van Marck, E., & Worobey, M. (2007). The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when?. *PloS one*, 2(6), e537. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000537>
 - 12) Hall, T. A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
 - 13) Hawkins, S., & Guest, P. C. (2017). Multiplex Analyses Using Real-Time Quantitative PCR. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1546, 125–133. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6730-8_8
 - 14) Hijikata, M., K. Abe, K. M. Win, Y. K. Shimizu, N. Keicho, and H. Yoshikura, 2001: Identification of new parvovirus DNA sequence in swine sera from Myanmar. *Jpn. J. Infect. Dis.* 54, 244–245.
 - 15) International Committee on Taxonomy of Viruses (2022). ICTV Master Species List 2019 v1. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/i4jnfv>

accessed via GBIF.org on 2023-02-15..

- 16)** Jin, X., Yuan, Y., Zhang, C., Zhou, Y., Song, Y., Wei, Z., & Zhang, G. (2020). Porcine parvovirus nonstructural protein NS1 activates NF- κ B and it involves TLR2 signaling pathway. *Journal of veterinary science*, 21(3), e50. <https://doi.org/10.4142/jvs.2020.21.e50>
- 17)** Kim, J., & Chae, C. (2001). Optimized protocols for the detection of porcine circovirus 2 DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues using nested polymerase chain reaction and comparison of nested PCR with *in situ* hybridization. *Journal of virological methods*, 92(2), 105–111. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(00\)00255-x](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(00)00255-x)
- 18)** Kim, J., Choi, C., & Chae, C. (2003). Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome reproduced by co-infection with Korean isolates of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Journal of comparative pathology*, 128(1), 52–59. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2002.0605>
- 19)** Kim, S. C., Kim, J. H., Kim, J. Y., Park, G. S., Jeong, C. G., & Kim, W. I. (2022). Prevalence of porcine parvovirus 1 through 7 (PPV1-PPV7) and co-factor association with PCV2 and PRRSV in Korea. *BMC veterinary research*, 18(1), 133. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03236-1>
- 20)** Lagan Tregaskis, P., Staines, A., Gordon, A., Sheridan, P., McMenamy, M., Duffy, C., Collins, P. J., Mooney, M. H., & Lemon, K. (2021). Co-infection status of novel parvovirus's (PPV2 to 4) with porcine circovirus 2 in porcine respiratory disease complex and porcine circovirus-associated disease from 1997 to 2012. *Transboundary and emerging diseases*, 68(4), 1979–1994. <https://doi.org/10.1111/tbed.13846>
- 21)** Lau, S. K. P., Woo, P. C. Y., Tse, H., Fu, C. T. Y., Au, W. K., Chen, X. C., Tsoi, H. W., Tsang, T. H. F., Chan, J. S. Y., Tsang, D. N. C., Li, K. S. M., Tse, C. W. S., Ng, T. K., Tsang, O. T. Y., Zheng, B. J., Tam, S., Chan, K. H., Zhou, B., & Yuen, K. Y. (2008). Identification of novel porcine and bovine parvoviruses closely related to human parvovirus 4. *The Journal of general virology*, 89(Pt 8), 1840–1848. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/000380-0>
- 22)** Liu, Y., Wang, J., Chen, Y., Wang, A., Wei, Q., Yang, S., Feng, H., Chai, S.,

- Liu, D., & Zhang, G. (2020). Identification of a dominant linear epitope on the VP2 capsid protein of porcine parvovirus and characterization of two monoclonal antibodies with neutralizing abilities. *International journal of biological macromolecules*, 163, 2013–2022. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.055>
- 23)** Mayr, A., & Mahnel, H. (1964). Züchtung von Schweinepestvirus in Schweinenieren-Kulturen mit cytopathogenem Effekt [Cultivation of hog cholera virus in pig kidney cultures with cytopathogenic effect]. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. 1. Abt. Medizinisch-hygienische Bakteriologie, Virusforschung und Parasitologie. Originale*, 195(2), 157–166. [PMID: 4953502](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4953502/)
- 24)** Meng X. J. (2013). Porcine circovirus type 2 (PCV2): pathogenesis and interaction with the immune system. *Annual review of animal biosciences*, 1, 43–64. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-031412-103720>
- 25)** Mengeling W. L. (1972). Porcine parvovirus: properties and prevalence of a strain isolated in the United States. *American journal of veterinary research*, 33(11), 2239–2248. [PMID: 4628211](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4628211/)
- 26)** Mészáros, I., Olasz, F., Cságola, A., Tijssen, P., & Zádori, Z. (2017). Biology of Porcine Parvovirus (Ungulate parvovirus 1). *Viruses*, 9(12), 393. <https://doi.org/10.3390/v9120393>
- 27)** Miłek, D., Woźniak, A., Guzowska, M., & Stadejek, T. (2019). Detection Patterns of Porcine Parvovirus (PPV) and Novel Porcine Parvoviruses 2 through 6 (PPV2-PPV6) in Polish Swine Farms. *Viruses*, 11(5), 474. <https://doi.org/10.3390/v11050474>
- 28)** Miłek, D., Woźniak, A., Podgórska, K., & Stadejek, T. (2020). Do porcine parvoviruses 1 through 7 (PPV1-PPV7) have an impact on porcine circovirus type 2 (PCV2) viremia in pigs?. *Veterinary microbiology*, 242, 108613. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108613>
- 29)** Moredo F, A., Larsen A., Stanchi N. O. (2018). Patogenicidad microbiana en Medicina Veterinaria. Volumen: Bacteriología. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). 1ra Edición. Argentina.

- 30)** Ni, J., Qiao, C., Han, X., Han, T., Kang, W., Zi, Z., Cao, Z., Zhai, X., & Cai, X. (2014). Identification and genomic characterization of a novel porcine parvovirus (PPV6) in China. *Virology journal*, 11, 203. <https://doi.org/10.1186/s12985-014-0203-2>
- 31)** Palinski, R. M., Mitra, N., & Hause, B. M. (2016). Discovery of a novel Parvovirinae virus, porcine parvovirus 7, by metagenomic sequencing of porcine rectal swabs. *Virus genes*, 52(4), 564–567. <https://doi.org/10.1007/s11262-016-1322-1>
- 32)** Péntzes, J. J., Söderlund-Venermo, M., Canuti, M., Eis-Hübinger, A. M., Hughes, J., Cotmore, S. F., & Harrach, B. (2020). Reorganizing the family Parvoviridae: a revised taxonomy independent of the canonical approach based on host association. *Archives of virology*, 165(9), 2133–2146. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04632-4>
- 33)** Ren, X., Tao, Y., Cui, J., Suo, S., Cong, Y., & Tijssen, P. (2013). Phylogeny and evolution of porcine parvovirus. *Virus research*, 178(2), 392–397. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.09.014>
- 34)** Serrano-Cumplido, A., Ruiz Garcia, A., Segura-Fragoso, A., Olmo-Quintana, V., Micó Pérez, R. M., Barquilla-García, A., & Morán-Bayón, A. (2021). Aplicación del valor umbral del número de ciclos (Ct) de PCR en la COVID-19 [Application of the PCR number of cycle threshold value (Ct) in COVID-19]. *Semergen*, 47(5), 337–341. <https://doi.org/10.1016/j.semerg.2021.05.003>
- 35)** Streck A. F., Biondo D., Gomes M. J. (2021). Parvovirus porcino: un antiguo pero todavía importante patógeno. *Diagnostic Laboratory in Veterinary Medicine*. University of Caxias do Sul. Brazil. HIPRA, España.
- 36)** Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- 37)** Thornton, B., & Basu, C. (2015). Rapid and simple method of qPCR primer design. *Methods in molecular biology*, 1275, 173–179.

https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_13

- 38)** Vargas-Bermudez, D. S., Rendon-Marin, S., Ruiz-Saenz, J., Mogollón, D., & Jaime, J. (2021). The first report of porcine parvovirus 7 (PPV7) in Colombia demonstrates the presence of variants associated with modifications at the level of the VP2-capsid protein. *PloS one*, 16(12), e0258311. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258311>
- 39)** Wang, F., Wei, Y., Zhu, C., Huang, X., Xu, Y., Yu, L., & Yu, X. (2010). Novel parvovirus sublineage in the family of Parvoviridae. *Virus genes*, 41(2), 305–308. <https://doi.org/10.1007/s11262-010-0506-3>
- 40)** Wang, Y., Yang, KK, Wang, J., Wang, XP, Zhao, L., Sun, P. y Li, YD (2019). Detection and molecular characterization of novel porcine parvovirus 7 in Anhui province from Central-Eastern China. *Infection, Genetics and Evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 71 , 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.03.004>
- 41)** Wu, R., Wen, Y., Huang, X., Wen, X., Yan, Q., Huang, Y., Ma, X., & Cao, S. (2014). First complete genomic characterization of a porcine parvovirus 5 isolate from China. *Archives of virology*, 159(6), 1533–1536. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1948-4>
- 42)** Xiao, C. T., Giménez, L. G., Jiang, Y. H., Halbur, P. G y Opriessnig, T. (2013). Caracterización de un nuevo parvovirus porcino tentativamente denominado PPV5. *PloS uno* , 8 (6), e65312. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065312>
- 43)** Xiao, C. T., Halbur, P. G., & Opriessnig, T. (2013a). Complete Genome Sequence of a Novel Porcine Parvovirus (PPV) Provisionally Designated PPV5. *Genome announcements*, 1(1), e00021-12. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00021-12>
- 44)** Xiao, C. T., Gerber, P. F., Giménez, L. G., Halbur, P. G., & Opriessnig, T. (2013b). Characterization of porcine parvovirus type 2 (PPV2) which is highly prevalent in the USA. *Veterinary microbiology*, 161(3-4), 325–330. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.038>