



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**Amplificación y análisis *in silico* de la ORF2 parcial del  
Parvovirus porcino 5 (PPV5).**

**T E S I S**

**Que para obtener el título de:  
Médico Veterinario Zootecnista**

**Presenta**

**Oscar Uriel Bardomiano Bernardo**

**Asesor: Dr. Alejandro Vargas Ruiz**

**Coasesor: Dra. Lucia Angélica García Camacho**

**Cuautitlán 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.

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por toda la formación académica que logró construir en mí.

Al laboratorio A de la UIM, por permitirme realizar este proyecto de tesis.

Al Dr. Alejandro Vargas Ruiz y al Dr. Ernesto Marin Flamand, por el aprendizaje, los consejos y confianza que me brindaron.

Agradezco el técnico académico del laboratorio A de la UIM, MC Francisco Rodolfo González Díaz por su apoyo técnico en el desarrollo experimental de este trabajo.

A mis padres y a mi hermano, por existir, por siempre dar más de lo necesario y jamás abandonarme.

A mis amigos, Lalo, Armando, Marco, Yayo, Alejandra y Erika por su compañía en este trayecto universitario

## **Dedicatoria**

### **A mi madre**

Que con admirable esfuerzo, perseverancia y amor, nunca te rendiste para darnos lo mejor.

### **A mi padre**

Siempre serás el máximo ejemplo que necesito para salir adelante con honestidad y responsabilidad.

### **A mi hermano**

Por la calidez, comprensión y apoyo que me brindas.

Gracias por eso y más.

## Índice

Resumen.....	1
Introducción.....	2
1. Antecedentes.....	2
2. Generalidades de la familia <i>Parvoviridae</i> .....	2
3. Parvovirus porcino.....	7
4. Surgimiento de nuevos parvovirus.....	11
5. Parvovirus porcino 5.....	13
Justificación.....	15
Objetivos.....	16
Metodología.....	17
Resultados.....	20
Discusión.....	28
Conclusiones.....	32
Referencias.....	33

## Lista de figuras

Figura 1. Estructura morfológica de los parvovirus. ....	2
Figura 2. Entrada del virus a la célula.....	5
Figura 3. Modelo de replicación de los parvovirus. ....	6
Figura 4. Lesiones macroscópicas en fetos.....	10
Figura 5. Esquema de la infección por PPV1 en la gestación.....	11
Figura 6. Prevalencia de PPV1-7 en diferentes grupos de edad.....	12
Figura 7. Comparación de los genomas de PPV5 y PPV4. ....	14
Figura 8. Secuencias de primers para amplificación de fragmento 1.....	20
Figura 9. Secuencias de primers para amplificación de fragmento 2.....	20
Figura 10. PCR anidado para amplificación de la VP1 fragmento 1 y 2 del PPV5.....	21
Figura 11. Especificidad de los fragmentos 1 y 2.....	22
Figura 12. Matriz de identidad de la ORF2 parcial del PPV5. ....	23
Figura 13. Predicción de aminoácidos de la ORF 2 parcial del PPV5.....	24
Figura 14. Árbol filogenético de la ORF2 parcial del PPV5 basado en nucleótidos.....	25
Figura 15. Árbol filogenético de la ORF2 parcial del PPV5 basado en aminoácidos.....	26
Figura 16. Predicción de epitopes dominantes de la ORF2 parcial del PPV5. ....	27

## Abreviaturas

aa: aminoácido

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

cbp: cuanto baste para

ELISA: ensayo de inmunoabsorción  
ligado a enzima

g: gramo

GC: guanina-citosina

ICTV: comité internacional de  
taxonomía viral

Kb: kilo base

mg: miligramo

ml: mililitro

ng: nanogramo

NLS: señal de localización nuclear

nm: nanómetro

ORF: marco de lectura abierto

PCR: reacción en cadena de la  
polimerasa

PCV2: circovirus porcino 2

PCVAD: enfermedad asociada a  
circovirus porcino 2

PLA2: fosfolipasa A2

PMWS: síndrome multisistémico de  
emaciación post destete

PPV: parvovirus porcino

PRRS: síndrome respiratorio y  
reproductivo porcino

rpm: revoluciones por minuto

VLP: partículas similares a virus

VP1u: región única de VP1

μl: microlitro

## Resumen

Actualmente de las siete especies identificadas del parvovirus porcino (PPV1-7), la clasificación taxonómica del PPV5 es la única que no ha sido determinada por el ICTV. Con el objetivo de aportar información referente al genoma de PPV5, el presente trabajo llevó a cabo una metodología para analizar y comparar la secuencia parcial de la región genética ORF 2, a partir de linfonodos de lechones con estatus de Parvovirus porcino 5 previamente establecido. Se realizó la construcción de árboles filogenéticos, matrices de identidad, predicción de aminoácidos y predicción de epítopes dominantes. En los resultados obtenidos se observó que a pesar de que el ORF2 tiende a una mayor variabilidad genética, la matriz de identidad presenta un alto grado de conservación entre los distintos PPV5 obteniendo homologías del 99-100%. La topología de los arboles filogenéticos sugiere una estrecha relación entre PPV5 y PPV4 cuando se comparan con secuencias de nucleótidos y entre PPV5 y PPV1 cuando se usan aminoácidos. Además, de acuerdo a la disposición de las ramas en el clado correspondiente a los PPV5 es probable la presencia de una especie endémica en el país. Finalmente se logró identificar la presencia de nueve potenciales sitios antigénicos. Esta información abre una brecha de conocimiento a fin de obtener la secuencia completa del PPV5 en México.

## Introducción

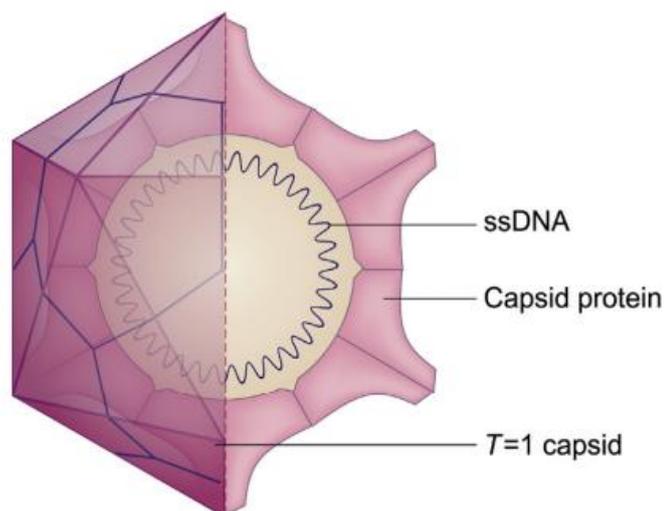
### 1. Antecedentes

Los *Parvoviridae*, son una familia de virus con genomas de ADN monocatenario ampliamente distribuidos desde invertebrados hasta mamíferos y huéspedes humanos, muestran una notable capacidad evolutiva poco común en los genomas de ADN. Las poblaciones de parvovirus muestran una alta heterogenicidad genética y grandes tamaños de población que se asemejan a las especies que se encuentran en los virus con genoma ARN. Estos virus se multiplican en células en proliferación, causando infecciones agudas, persistentes o latentes que dependen de la inmunocompetencia y la etapa de desarrollo del huésped (López-Bueno *et al.*, 2006).

### 2. Generalidades de la familia *Parvoviridae*

#### a) Genoma

Los miembros de la familia *Parvoviridae* son virus pequeños con genoma ADN de cadena sencilla con una longitud de 4-6kb. Los viriones poseen una simetría icosaédrica T=1 con un diámetro de 23-28 nm y presenta protrusiones tipo spike (Figura 1). Los genomas virales contienen de dos a tres marcos de lectura abiertos (ORF). El ORF1 también llamado gen NS (proteína no estructural) o rep, codifica una serie de proteínas reguladoras indispensables para la replicación viral. El ORF2 o gen cap codifica las proteínas VP que ensamblan la cápside la cual se forma a partir de 60 copias de proteínas estructurales, siendo aproximadamente el 90% VP2 y el 10% la proteína VP1 (Maclachlan, J. y Dubovi, 2017; Cotmore *et al.*, 2019; Mietzsch *et al.*, 2019).



**Figura 1. Estructura morfológica de los parvovirus.** Recuperado de Payne, 2017.

La proteína reguladora NS1 es clave en la propagación del virus. Tiene muchas propiedades y actividades enzimáticas, incluidas la unión e hidrólisis de ATP, la oligomerización, la unión de ADN específico de sitio a un motivo de reconocimiento, función de helicasa y capacidad para la transposición de promotores. Esto permite que esta proteína multifuncional controle una variedad de procesos necesarios para la producción de partículas de progenie, incluida la amplificación del ADN viral y la regulación de la expresión génica (Nüesch y Rommelaere, 2006).

Las proteínas VP1 y VP2 son transcritas en forma alternada por cortes en el RNAm, dado que la secuencia de la VP2 está completamente contenida dentro de la VP1 pequeños cambios en la secuencia de aminoácidos de la VP2 son los causantes de las relevantes diferencias biológicas de las variantes virales. En algunas especies, se forma una tercera proteína estructural VP3 por la escisión de un péptido del extremo amino terminal de VP2 (Díaz R. *et al.*, 2008; Maclachlan, J. y Dubovi, 2017).

VP1 tiene una longitud extra al de VP2 con alrededor de 140 aminoácidos en el N-terminal, con un dominio de fosfolipasa A2 (PLA2) y señalización de localización nuclear (NLS). VP2 es capaz de autoensamblarse en cápsides vacías, conocidas como partículas similares a virus (VLP), las cuales son los principales antígenos para inducir anticuerpos neutralizantes (Tu *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2021).

En las secuencias terminales del virus se forman complejos palindrómicos con una longitud de 120-200 bases en estructura de horquilla (Streck *et al.*, 2015). Individualmente, estos telomeros dan lugar al origen de replicación viral en ADN (Cotmore y Tattersall, 2014).

Estas estructuras secundarias pueden ser iguales o diferentes en los extremos 5' y 3', lo que conduce a genomas homoteloméricos o heteroteloméricos. Los virus homoteloméricos empaquetan cantidades iguales de genomas de cadena positiva o negativa en partículas virales. En parvovirus con genomas heteroteloméricos se observa un sesgo de empaquetamiento hacia una hebra del genoma viral (Jager *et al.*, 2021).

## **b) Replicación**

El genoma de los parvovirus puede codificar solo unas pocas proteínas, por lo que el virus depende de su célula huésped para proporcionar proteínas importantes. Algunas de estas proteínas celulares como la polimerasa de ADN están disponibles solo

durante la fase S del ciclo celular cuando tiene lugar la síntesis de ADN (Carter y Saunders 2007). La dependencia del estado del ciclo celular resulta una característica definitoria de los parvovirus autónomos y desempeña un papel importante en el tropismo tisular y la manifestación de enfermedad (Jager *et al.*, 2021).

## **I. Unión a receptores**

La infección por parvovirus comienza con la unión del virión a uno o más receptores de la superficie celular, seguida de endocitosis mediada por receptores. Se han identificado muchos tipos diferentes de moléculas como receptores para diferentes cápsides virales, incluidas glicoproteínas, glucanos y glicolípidos (Parrish, 2010).

La interacción inicial de los parvovirus con la célula huésped se produce al unirse a un receptor específico expuesto en la membrana celular. El reconocimiento de las moléculas permite el primer paso de la infección, por lo tanto, representa un parámetro clave del tropismo y la patogénesis. Hasta la fecha, diferentes biomoléculas receptoras, como proteínas y carbohidratos, se han identificado como factores de unión. El ácido N-acetilneuramínico es probablemente el receptor más usado ya que los glicanos representan los principales componentes de carbohidratos en la superficie celular (Ros *et al.*, 2017)

## **II. Entrada a la célula**

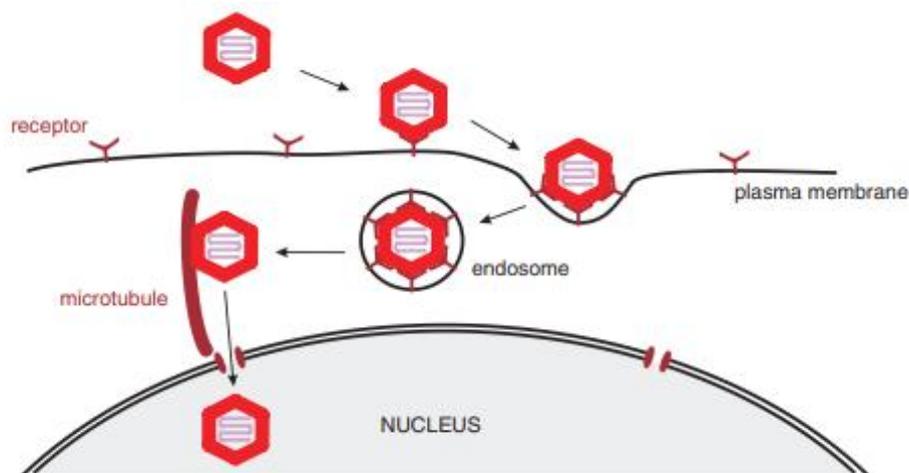
Durante el proceso de entrada, el virión debe sufrir ciertos cambios estructurales y superar numerosas barreras de la célula huésped para transitar con éxito desde la superficie celular hasta el núcleo (Ros *et al.*, 2017).

La secuencia de VP1 comprende una extensión N-terminal de aproximadamente 140 aminoácidos también llamada región única de VP1 (VP1u). El VP1u, alberga el dominio de PLA2 y NLS que son necesarios para la infectividad. Después de ingresar por endocitosis, el bajo pH del endosoma expone tanto el dominio PLA2 como el NLS (Liu *et al.*, 2017; Payne, 2017).

El escape endosomal depende de un reordenamiento estructural de la cápside. En La mayoría de los parvovirus, la N-terminal de VP1 cambia de ubicación interna a externa cuando se expone a algunas condiciones químicas y físicas extremas, como es el caso del pH bajo. La PLA2 es una enzima lipolítica que destruye la membrana y permite que los virus escapen del lisosoma (Tu *et al.*, 2015; Ros *et al.*, 2017).

Por lo general, el gen de la cápside del parvovirus contiene una o más NLS, que son necesarias para guiar la partícula del virus hacia el núcleo a través del poro nuclear. En el caso de PPV1 se han encontrado cinco secuencias potenciales de localización nuclear, denominadas región básica (Liu *et al.*, 2017).

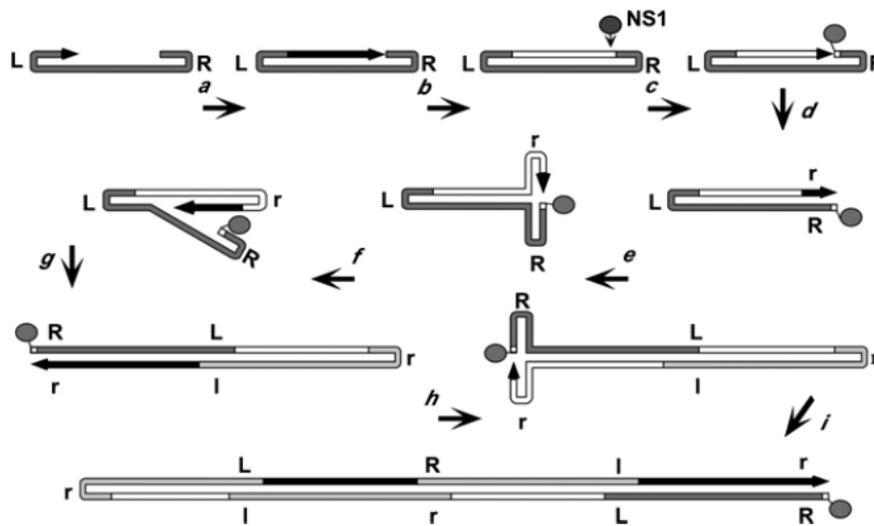
Los componentes citoplasmáticos y del citoesqueleto crean un entorno citosólico viscoso. Estas propiedades físicas del citoplasma restringen la libre difusión de partículas mayores de 25 nm de diámetro. El diámetro de la partícula de parvovirus está cerca del límite de tamaño, lo que prohíbe la difusión pasiva. Por lo tanto, se espera que el movimiento eficiente de las partículas de parvovirus a través del citoplasma hacia el núcleo celular dependa principalmente de los microtúbulos y sus proteínas motoras asociadas (Ros *et al.*, 2017).



**Figura 2. Entrada del virus a la célula.**  
Recuperado de Carter, 2007.

### III. Síntesis de ADN

Estos virus se replican a través de un mecanismo de "horquilla rodante", con fuertes vínculos evolutivos y mecánicos con la replicación en "círculo rodante". La síntesis de las horquillas se basa en la capacidad de cada horquilla para dar lugar a una secuencia de origen dúplex, que puede ser cortada por una nucleasa iniciadora viral para crear un cebador de ADN con bases emparejadas, y para funcionar como eje, permitiendo la síntesis semicircular al plegarse y desplegarse alternativamente para transportar una horquilla de replicación unidireccional continua hacia adelante y hacia atrás a lo largo del ADN lineal (Cotmore y Tattersall 2013).



**Figura 3. Modelo de replicación de los parvovirus.**  
 Recuperado de Cotmore, 2020.

### c) Taxonomía

La organización taxonómica de los parvovirus puede resultar confusa debido a que la agrupación de los virus dentro de un género obedece a las características moleculares y no a su especie huésped de origen (Maclachlan y Dubovi, 2017).

La familia *Parvoviridae* se estableció en 1975, posteriormente en 1993 se dividió en dos subfamilias: *Parvovirinae* y *Densovirinae*, a fin de acomodar los parvovirus que infectan a los animales vertebrados e invertebrados, respectivamente (Pénzes *et al.*, 2020).

Esta clasificación fue cuestionada recientemente por el descubrimiento de parvovirus de vertebrados, identificados a través de muestras metagenómicas de heces de animales y denominados chapparovirus, que están más estrechamente relacionados con los virus de la subfamilia *Densovirinae* que con los de la subfamilia *Parvovirinae* (Jager *et al.*, 2021).

Para que un virus sea clasificado como miembro de la familia *Parvoviridae*, debe haber sido aislado y secuenciado a partir de muestras de tejido, secreciones o excreciones de su probable huésped. La secuencia debe ser contigua y contener la región codificante completa de la proteína no estructural NS1, que debe poseer un dominio helicasa SF3 en su secuencia proteica, así como las regiones codificantes de la proteína de la cápside VP. Además, debe cumplir con las restricciones de tamaño (4–6 kb) (Pénzes *et al.*, 2020).

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 en función de su secuencia de proteína NS1 completa en el nivel de subfamilia y en sus dominios de helicasa SF3 en la familia. Además, las proteínas NS1 de miembros del mismo género deben compartir al menos un 35-40 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una cobertura mayor al 80 % entre dos miembros cualesquiera (Pénzes *et al.*, 2020).

Si no se cumplen los criterios basados en la identidad de la secuencia, la afiliación de género común también se puede justificar en función de una organización del genoma similar, es decir, la presencia o ausencia de ciertos genes que codifican proteínas auxiliares, la longitud del genoma y la estrategia de transcripción (Pénzes *et al.*, 2020)

Además de la clasificación basada en la organización del genoma y la identidad de una secuencia, los parvovirus también se pueden clasificar funcionalmente como parvovirus autónomos o parvovirus dependientes, según su capacidad para completar su ciclo de replicación de forma independiente o su dependencia de la coinfección con otro virus ADN para replicarse con éxito (Jager *et al.*, 2021).

### **3. Parvovirus porcina**

#### **a) Etiología**

El PPV1 (*Ungulate parvovirus 1*) se aisló por primera vez en Alemania en 1965 como un contaminante del cultivo celular primario porcino. PPV1 pertenece al género *Protoparvovirus*, es el agente mejor conocido que causa fallas reproductivas en los rebaños porcinos (Oh *et al.*, 2017).

El genoma de PPV1 contiene solo dos promotores y codifica siete proteínas. Las dos proteínas no estructurales NS1 y NS2 se transcriben a partir del promotor P4. También se ha descrito una proteína no estructural NS3. Las proteínas estructurales VP1 y VP2 se transcriben a partir del promotor P40. VP1 tiene 729 residuos de aminoácidos, de los cuales 120 sitios son exclusivos de VP1 y están ausentes en VP2. La tercera proteína estructural, VP3, es un producto de modificación de VP2. Además, una proteína no estructural tardía (SAT) se expresa a partir del mismo ARNm de VP2. (Streck *et al.*, 2015)

Las cepas NADL-2 y Kresse tienen distintos tropismos tisulares y patogenicidad, que están mediados por uno o más de los residuos de aminoácidos 381, 386 y 436. Estos residuos están sobre o cerca de la superficie de la cápside del virus, donde se es probable que estén asociados con interacciones virus-célula (Simpson *et al.*, 2002)

## **b) Epidemiología**

El PPV1 se encuentra presente en las áreas con mayor producción porcina, describiéndose ampliamente en Estados Unidos de Norte América, China, Alemania, Europa, Hungría, México, Colombia y Cuba (Rivera *et al.*, 2021).

El virus se elimina a través de diversas excreciones corporales durante la fase aguda de la infección, siendo especialmente abundante en las heces, que es la fuente principal de contaminación del ambiente. Las rutas de infección son la oronasal en los animales adultos y la transplacentaria para la fase prenatal (Prieto *et al.*, 2017).

PPV1 puede permanecer infeccioso durante meses en el medio ambiente y en herramientas contaminadas y, por lo tanto, puede ser una fuente constante de nuevas infecciones. Sin embargo la introducción de PPV1 en una piara no causa problemas inmediatos si una proporción suficiente de cerdas son inmunes a través de la vacunación o exposición natural. Sin embargo, el virus es capaz de replicarse incluso en cerdos vacunados. Por lo tanto, la circulación del virus dentro de una población no puede prevenirse por completo mediante la vacunación (Truyen, 2019).

## **c) Patogenia**

La patogenicidad de PPV1 es la más conocida entre los diferentes genotipos. Causa falla reproductiva en cerdas gestantes con signos clínicos también conocidos como SMEDI, acrónimo en inglés para muerte fetal, momificación, muerte embrionaria e infertilidad (Díaz *et al.*, 2020).

Después de la replicación primaria en los tejidos linfoides, PPV1 se distribuye sistémicamente. Sin embargo, la placenta epiteliocorial porcina está compuesta por seis capas de tejido que separan completamente la circulación sanguínea materna de la fetal, y las células placentarias están tan estrechamente conectadas que no permiten el paso ni siquiera de moléculas pequeñas. Por lo tanto, lo más probable es que el virus llegue al feto a través de las células inmunitarias infectadas por el virus (Truyen, 2019).

La viremia, que suele persistir durante 7 a 14 días, se detecta en cerdos alrededor de 3 días después de la infección. El virus se excreta en las heces y se puede detectar durante 28 días (Paul *et al.*, 2003).

Se ha observado la inducción de una respuesta inmune celular a la infección con PPV1. Específicamente, se encontró que las células T CD4+ CD8+ proliferaban, mientras que la actividad de los linfocitos T citotóxicos era débil durante la infección, lo que indica el papel de la actividad humoral. La invasión por PPV1 también provoca la muerte celular por apoptosis, probablemente como resultado de la formación de especies reactivas de oxígeno, posteriormente se desencadena la liberación de citocromo C y una cascada de caspasas. Además, estudios recientes destacan que la proteína no estructural NS1 es responsable de la inducción de la apoptosis y por lo tanto, está involucrada en el daño del tejido placentario y la falla reproductiva (Díaz *et al.*, 2020).

#### **d) Signos y lesiones**

Clínicamente, solo se induce el fallo reproductivo en hembras gestantes, siendo la infección de animales en la fase posnatal totalmente asintomática (Prieto *et al* 2015). Los signos clínicos reproductivos se correlacionan con la etapa de gestación en la que ocurre la infección. Al comienzo de la gestación, el producto de la concepción está protegido por la zona pelúcida, por lo tanto no es susceptible a infecciones (Truyen, 2019).

Las lesiones que se observan en la parvovirus porcina se circunscriben fundamentalmente a los embriones o fetos afectados, ya que en los animales jóvenes o en las hembras gestantes las lesiones son inexistentes o muy leves. En los fetos afectados entre los días 35 y 70 de gestación se puede ver pérdida de condición corporal, congestión externa, edema y acumulación de líquidos en cavidades, y en los fetos en un estado más avanzado de momificación podemos observar decoloración y deshidratación (Prieto *et al* 2015).

Las lesiones microscópicas en las hembras incluyen la acumulación focal de células mononucleares adyacentes al endometrio y en las capas más profundas de la lámina propia. En el feto, los cambios histopatológicos tienden a ser generalizados en los diferentes tejidos y las principales lesiones representan necrosis de células en sistema

de órganos en desarrollo. Las hemorragias están presentes en los tejidos subcutáneos y las masas musculares. La necrosis y la mineralización son comunes en los pulmones, riñones y músculo esquelético, particularmente en el hígado y el corazón. Una vez que los fetos se vuelven inmunocompetentes, las lesiones microscópicas son principalmente hipertrofia endometrial e infiltración de células mononucleares (Streck y Truyen, 2020).

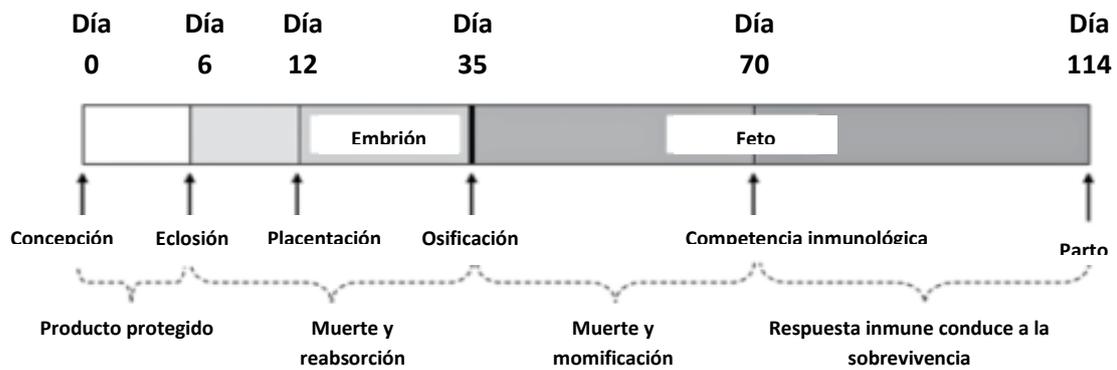


**Figura 4. Lesiones macroscópicas en fetos**  
Recuperado de Carr, 2017

#### **e) Impacto en la producción**

La parvovirus porcina causa pérdidas reproductivas en cerdas las cuales están caracterizadas por muerte fetal intrauterina, momificación, muerte embrionaria e infertilidad. Cuando el virus llega al feto, alrededor del día 35 de gestación, se produce la muerte embrionaria y reabsorción fetal. Luego de esta etapa, donde el feto completó su organogénesis, la infección con PPV1 resulta en muerte fetal manifestada como momificación. Alrededor del día 70, el feto ya es capaz de responder mediante su sistema inmune eliminando el virus, mientras que luego de este periodo, la infección fetal se hace subclínica y los animales nacen con anticuerpos contra PPV1 (Fuentealba y Serena, 2018).

Por lo general, la infección con PPV1 en cerdos en crecimiento y animales maduros no se asocia a signos clínicos. En verracos infectados experimentalmente con PPV1 no se han encontrado alteraciones de fertilidad, libido y calidad del semen. (Martinez *et al* 2018).



**Figura 5. Esquema de la infección por PPV1 en la gestación.**

Recuperado de Truyen, 2019

#### f) Diagnóstico

El aislamiento de PPV1 en cultivos celulares es laborioso y no se puede lograr para todas las cepas de PPV1. Se han desarrollado otras técnicas diagnósticas como hemaglutinación, ELISA, hibridación *in situ*, inmunofluorescencia y PCR. Comparando estas técnicas, PCR ha demostrado ser el método más sensible (Wilhelm *et al.*, 2006).

Para la determinación del antígeno en los fetos debemos recoger muestras de pulmón y de líquidos extravasados en cavidades, que son los lugares en los que más carga vírica existe (Prieto *et al* 2015).

Las pruebas serológicas tienen un valor limitado, porque el virus está muy difundido en los cerdos y es difícil distinguir la inmunidad vacunal. Sin embargo, actualmente, las vacunas inactivadas inducen anticuerpos solo contra las proteínas VP y no contra las proteínas NS, los ELISA que diferencian estas dos proteínas podrían identificar anticuerpos producidos por una infección natural (Maclachlan y Dubovi, 2017).

### 4. Surgimiento de nuevos parvovirus

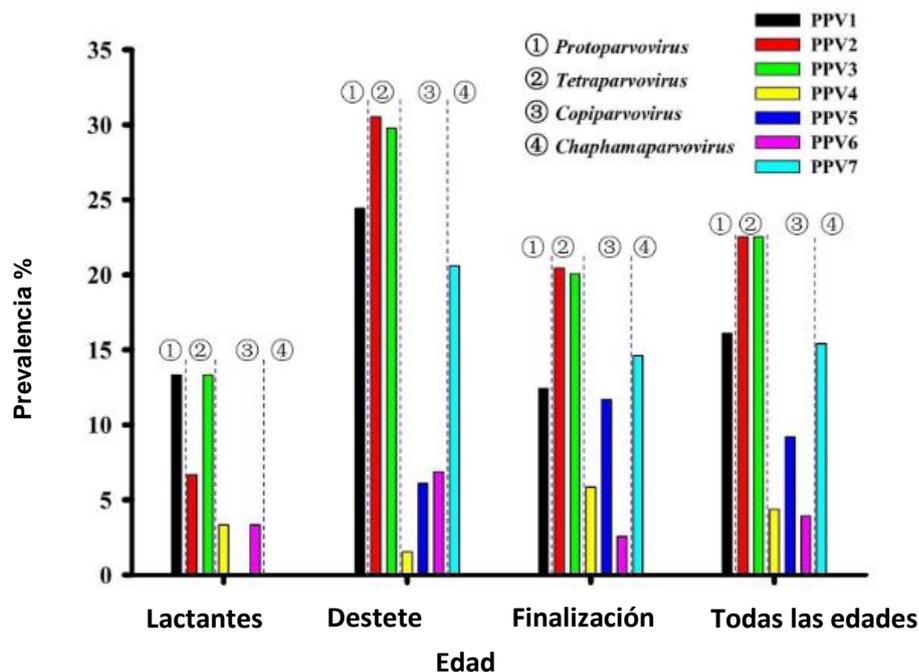
#### a) Historia

El parvovirus porcino 2 (PPV2) se identificó inicialmente en Birmania en 2001 en sueros de cerdo durante una investigación sobre el virus de la hepatitis E (Xiao *et al.*, 2013a). Para 2008, se encontró un virus estrechamente relacionado con el parvovirus humano 4 en cerdos sacrificados en Hong Kong, el cual se nombró como PPV3 (Streck y Truyen, 2020). Mas tarde en 2010, se describió en Estados Unidos otro parvovirus en cerdos afectados por enfermedades asociadas al circovirus porcino y se designó como parvovirus porcino 4 (PPV4) (Streck y Truyen, 2020). En 2013 PPV5 fue descrito

durante una investigación sobre la prevalencia de PPV4 en cerdos en Estados Unidos (Xiao *et al.*, 2013b). Un año después PPV6 se identificó a partir de fetos de cerdo abortados en China (Ni *et al.*, 2014). Por último en 2016 mientras se realizaba una secuenciación metagenómica de hisopos rectales de cerdos adultos se logró identificar a PPV7 (Palinsky *et al.*, 2016).

## b) Epidemiología

En estudios sobre la prevalencia de PPV1-7 en diferentes grupos de edad en China, se ha encontrado que en general, PPV2 y PPV3 han sido los genotipos más prevalentes, seguidos de PPV1 y PPV7, mientras que PPV4, PPV5 y PPV6 presentan una menor incidencia. Además, la prevalencia de estos parvovirus fue significativamente mayor en cerdos de destete y cerdos de finalización que en lechones lactantes. Específicamente, la prevalencia de PPV1, PPV2, PPV3, PPV6 y PPV7 fue más alta en lechones al destete, mientras que la prevalencia de PPV4 y PPV5 fue más alta en cerdos de finalización (Fig. 6) (Li *et al.*, 2021).



**Figura 6. Prevalencia de PPV1-7 en diferentes grupos de edad.** Recuperado de Li *et al* 2017.

## c) Coinfección

Está bien estudiado que PPV1 puede actuar como un factor desencadenante de la enfermedad asociada a circovirus porcino (PCVAD) apoyando la replicación del circovirus porcino tipo 2 (PCV2). Se sabe menos sobre el impacto de PPV2-PPV7 en la

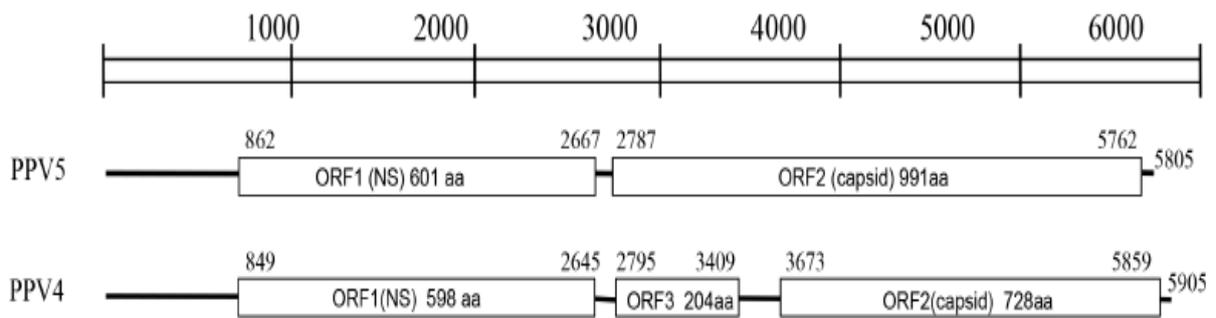
viremia de PCV2. Nuevas investigaciones han encontrado que el nivel de viremia de PCV2 fue significativamente mayor en muestras de suero positivas para PPV1 y PPV7 en comparación con las muestras negativas. Estos resultados sugieren que además de PPV1, también PPV7 estimula la replicación de PCV2 (Milek *et al.*, 2020).

Otro estudio realizado en tejidos pulmonares en Corea, el cual tenía como objetivo definir la asociación de PPV1 con PCV2 y PRRS, evidenció que cuando sólo se consideró PCV2, se mostraron tasas de prevalencia significativamente más altas para PPV1, PPV3 y PPV6. La prevalencia de PPV2 y PPV7 fue significativamente mayor en los tejidos de PRRS, independientemente de PRRS1 o PRRS2. PPV5 y PPV6 fueron significativamente mayores sólo en el caso de la coinfección de PRRS1 y PRRS2. Respecto al complejo respiratorio, se identificaron asociaciones de Coinfección de PPV1 y PPV6 con sospecha de PCVAD (independientemente de PRRS) y de PPV2 y PPV7 con infección por PRRS (independientemente de PCVAD). PPV5 se detectó con mucha más frecuencia en casos asociados a complejo respiratorio porcino que mostraban infección tanto por PCV2 como PRRS (Kim *et al.*, 2022).

Con respecto a la tasa de coinfección entre los PPVs en casos de fallo reproductivo, se tiene reportado coinfecciones del 43% para más de tres PPVs en granjas mexicanas. Es probable que la alta infección simultánea de diferentes PPVs esté asociada con la densidad de población en las unidades de producción porcina en México (García-Camacho *et al.*, 2020).

## **5. Parvovirus porcino 5**

El genoma de PPV5 está compuesto por 5.805 pb, con un contenido de GC del 40,9%, similar al de otros PPV. Posee una organización genómica típica de los parvovirus con dos marcos de lectura abiertos (ORF1 y ORF2). Está estrechamente relacionado con el PPV4 con identidad genómica del 64,1–67,3%. El ORF3 descrito para el genoma de PPV4 con una longitud de 204 aminoácidos, no está presente en el genoma de PPV5, pero con 991 aminoácidos de longitud, el ORF2 de PPV5 es 263 aminoácidos más largo en comparación con el ORF2 de PPV4, compuesto solo por 728 aminoácidos de longitud aunque esta porción adicional del ORF2 de PPV5 solo comparte una similitud del 11% con ORF3 de PPV4 (Figura 7) (Xiao *et al.*, 2013b).



**Figura 7. Comparación de los genomas de PPV5 y PPV4.**

Recuperado de Xiao, 2013

Con respecto a la situación actual en México, en 2020 se analizaron por medio de pruebas de PCR, tejidos parafinados fijados en formalina con el fin de determinar la prevalencia de parvovirus porcino en el país. Se identificó una tasa del 36.4% para el PPV5 en correlación con el circovirus porcino tipo 2. Esta prevalencia de coinfección resulta ser marcadamente mayor a la reportada en otros países, lo que sugiere una correlación entre PPV5 y la enfermedad asociada a circovirus porcino (García-Camacho *et al.*, 2020).

Siendo la porcicultura una de las producciones clave en la economía del país, siempre será necesario abrirse paso en temas de investigación respecto a los agentes etiológicos que afectan a las granjas porcícolas. Dicha tarea se ha propuesto en este trabajo y es presentada a continuación.

## Justificación

La parvovirus porcina se encuentra distribuida mundialmente en las áreas con mayor producción porcina, siendo la especie *Ungulate protoparvovirus 1* de importancia patológica para la porcicultura (Rivera, 2021). No obstante, gracias al desarrollo de técnicas moleculares modernas se tienen identificadas nuevas especies de parvovirus porcino (Kim *et al.*, 2022) de las cuales el ICTV ha logrado asignar a todas ellas una clasificación taxonómica, con excepción del PPV5. Lo anterior demanda la necesidad de analizar las secuencias de PPV5 disponibles a fin de proveer información que sea útil en relación a su estudio taxonómico, lo cual brindará nuevas perspectivas referente a su epidemiología, patogenicidad y diagnóstico.

## Objetivos

### ❖ Objetivo general:

- Realizar un análisis in silico comparativo de la secuencia VP1 parcial del parvovirus porcino 5.

### ❖ Objetivos particulares:

- Realizar el diseño de primers a partir de secuencias del PPV5 obtenidas del GenBank.
- Implementar una PCR para la amplificación de la región genética ORF 2 parcial.
- Elaborar una matriz de identidad y predicción de aminoácidos con el programa Bioedit.
- Construcción de árboles filogenéticos en el programa MEGA usando el algoritmo Maximum parsimony y con el método de validación de bootstrap.
- Determinar los epitopes dominantes con el programa Antibody Epitope Prediction.

## **Metodología**

### **Selección de muestras**

Se seleccionó una muestra que corresponden a ADN extraído a partir de linfonodos de lechones de 25 días de edad, embebido en parafina del archivo de muestras del Laboratorio A: Patología Molecular Veterinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, con el estatus de Parvovirus porcino 5 previamente establecido, siguiendo las condiciones descritas por García-Camacho *et al.*, 2020.

### **Diseño de primers**

Se realizó una búsqueda de secuencias de Parvovirus porcino 5 (PPV5) de distintos países en el GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). El blanco fue la ORF2 parcial con el fin de obtener 2 fragmentos traslapados de 600 pb cada uno. Los cuales se denominaron como fragmento 5 y fragmento 6. Se diseñaron cuatro pares de primers para ciclo 1 y reacción anidada, usando el programa Primer 3 v0.4.0 (Untergrasser *et al.*, 2012), posteriormente fueron alineados y evaluados utilizando el software Bioedit (Hall, 1999), los iniciadores fueron sintetizados comercialmente (Oligo T4, Guanajuato México).

### **PCR anidada**

El ADN genómico se utilizó para estandarizar la técnica. Para la primera reacción de amplificación se emplearon los primers de ciclo 1, disponiendo del termociclador Master Cycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany), utilizando Master mix (Bioline). La amplificación se desarrolló en reacciones de 25 µl en microtubos de 0.2 ml. Conteniendo 12.5µl de Master Mix, 10 µM de cada primer, 50ng de templado y agua grado molecular cbp 25 µl. Las condiciones de amplificación del ciclo 1 para ambos fragmentos fueron las siguientes: Seguido de una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, se realizaron 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos. Luego la alineación para el fragmento 5 fue de 59°C y para el fragmento 6 de 63°C por 30 segundos, la extensión a 72°C por 30 segundos y una extensión final a 72°C por 7 minutos. Posteriormente se llevó a cabo la amplificación de la reacción anidada utilizando el segundo par de primers con los mismos parámetros descritos.

## **Visualización de productos**

Los productos amplificados se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% ocupando una mezcla de 0.75 g de agarosa (Promega Corp., Madison WI., USA) teñido con 2.5 µl de bromuro de etidio (Promega Corp., Madison WI., USA) en 50 ml de amortiguador TBE 1X. A continuación se colocó en una cámara horizontal de electroforesis (Owl separation systems, Inc. Portsmouth, NH, USA) cargando en el primer pozo 5 µl de marcador de pares de bases. La mezcla para el llenado de los pozos restantes constó de 8 µl del producto obtenido de la PCR con 4µl del amortiguador de carga (Loading buffer, Promega Corp., Madison WI., USA). Una vez cargado el gel con las muestras se procedió a iniciar la electroforesis a 85 volts durante 90 minutos. Por último, los productos se visualizaron en un transiluminador de luz UV (Apollo, Instrumentation, Claremont).

## **Especificidad**

Los productos positivos fueron recuperados y purificados usando el kit EZ10 spin column Gel Extraction Minipreps (Bio Basic) a partir del siguiente protocolo: *extracción de ADN para gel de agarosa*. Los fragmentos de ADN se extrajeron del gel con un bisturí estéril. Se pesó el fragmento obtenido y se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml agregando 400µl de buffer binding II por cada 100 mg de gel. Acto seguido se incubó a 50°C - 60°C durante 10 minutos agitando ocasionalmente hasta que la agarosa se disolviera por completo. Una vez hecho lo anterior, la mezcla se agregó a la columna EZ-10 dejando reposar durante 2 minutos, se centrifugó a 10,000 rpm nuevamente por 2 minutos con el fin de descartar el tapón de lavado residual. Tras este paso se agregó en dos ocasiones 750 µl de solución de lavado y centrifugó a 10,000 rpm durante un minuto, eliminando de igual manera la solución sobrenadante. Por último, se colocó la columna en un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 ml y se le agregó 30-50 µl de buffer de elución, incubando a temperatura ambiente durante 2 minutos y después centrifugando a 10,000 rpm durante 2 minutos para eluir el ADN.

El ADN purificado fue secuenciado en el Instituto de Fisiología Celular (UNAM) usando ambos primers, aplicando el método Sanger.

## **Análisis de datos**

Las secuencias obtenidas se buscaron con el software BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con el fin de comprobar la especificidad. Luego se editaron y alinearon ambos fragmentos para la construcción de una sola secuencia utilizando Bioedit (bioEdit v7.2.5, Ibis Bioscience, Carlsbad, CA).

Una vez realizado lo anterior se llevo a cabo la predicción de aminoácidos usando 14 secuencias de PPV5 recuperadas del GenBank previamente alineadas y editadas. La matriz de identidad fue elaborada con la secuencia de referencia para cada especie de PPV registrada por el ICTV y distintas secuencias obtenidas del GenBank. Cada una fue alineada y editada. Ambos procedimientos se ejecutaron con el programa Bioedit (bioEdit v7.2.5, Ibis Bioscience, Carlsbad, CA).

El árbol filogenético se construyó para nucleótidos y aminoácidos usando el algoritmo Maximum parsimony y con el método de validación de bootstrap, valores mayores a 70 fueron considerados significativos usando el programa MEGA (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, y Kumar, 2013).

La predicción de epitopes dominantes se efectuó con el programa Antibody Epitope Prediction (IEDB Analysis Resource, Vita *et al.*, 2014). Apoyándose en el método de predicción de determinantes antigénicos en proteínas (Kolaskar y Tongaonkar 1990).

## Resultados

### Diseño de primers

Se obtuvieron cuatro pares de primers diseñados para ciclo 1 y reacción anidada específicos para la amplificación de la VP1 en dos fragmentos del PPV5 (1 y 2). La secuencia de los primers, longitud, posición de hibridación, temperatura de alineación, porcentaje de GC y el tamaño del producto amplificado se indican en la figura 8 y 9.

No mispriming library specified								<b>A</b>
Using 1-based sequence positions								
OLIGO	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>	
LEFT PRIMER	2858	20	59.47	50.00	3.00	1.00	AACACCGCAGACAACTGAGA	
RIGHT PRIMER	3578	20	57.98	40.00	4.00	2.00	ACTTTTCGGGGTAAAATTG	
SEQUENCE SIZE: 5553								
INCLUDED REGION SIZE: 5553								
PRODUCT SIZE: 721, PAIR ANY COMPL: 5.00, PAIR 3' COMPL: 0.00								
LEFT PRIMER	2308	22	56.83	45.45	5.00	1.00	AGAGAGAGATCATCCATCCAGT	
RIGHT PRIMER	2943	20	58.48	45.00	6.00	2.00	TTTCATATATCGGGGCTCCT	
SEQUENCE SIZE: 4901								
INCLUDED REGION SIZE: 4901								
PRODUCT SIZE: 636, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 1.00								
<b>B</b>								

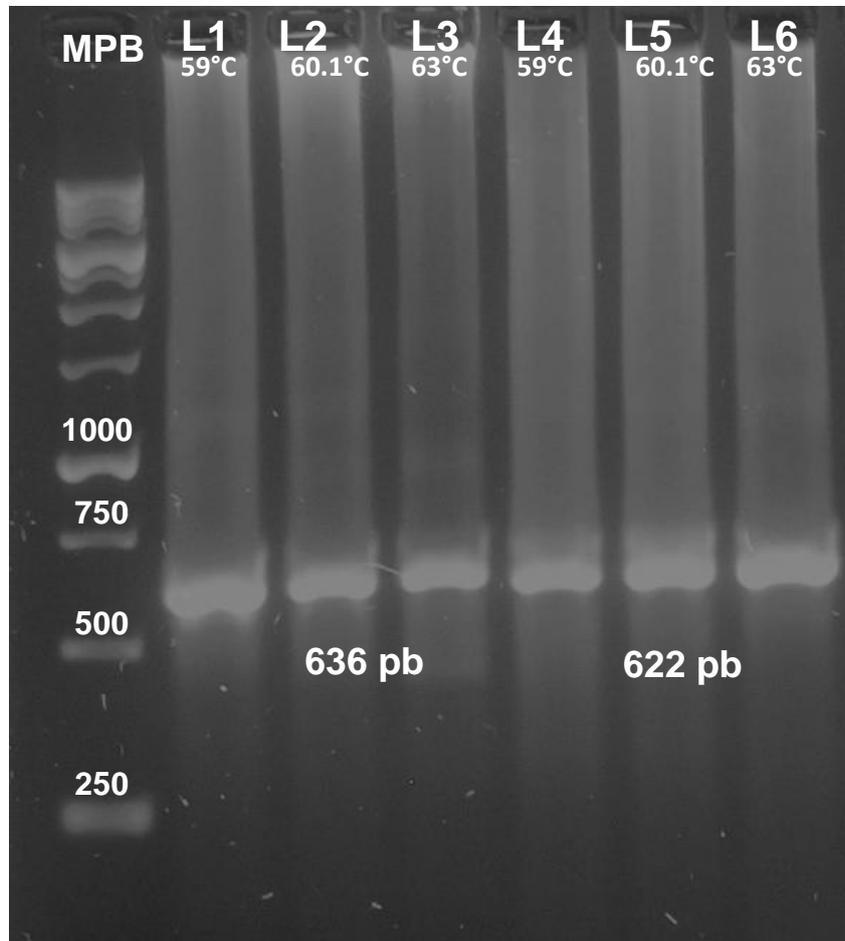
**Figura 8. Secuencias de primers para amplificación de fragmento 1.** (A) pareja de primers para ciclo 1. (B) pareja de primers para reacción anidada. (Captura de pantalla obtenida del programa Primer 3)

No mispriming library specified								<b>A</b>
Using 1-based sequence positions								
OLIGO	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>	
LEFT PRIMER	3403	20	60.14	40.00	6.00	2.00	TTTGGGCGCCATATATTGAT	
RIGHT PRIMER	4169	19	60.22	47.37	8.00	3.00	AGCCATGGCATTGTCAGAA	
SEQUENCE SIZE: 5553								
INCLUDED REGION SIZE: 5553								
PRODUCT SIZE: 767, PAIR ANY COMPL: 5.00, PAIR 3' COMPL: 1.00								
LEFT PRIMER	2917	20	58.62	50.00	4.00	2.00	ACAGATTAGGAGCCCCGATA	
RIGHT PRIMER	3538	20	59.14	45.00	4.00	0.00	TCACAGCATTGTTCCCTGT	
SEQUENCE SIZE: 4901								
INCLUDED REGION SIZE: 4901								
PRODUCT SIZE: 622, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 1.00								
<b>B</b>								

**Figura 9. Secuencias de primers para amplificación de fragmento 2.** (A) pareja de primers para ciclo 1. (B) pareja de primers para reacción anidada. (Captura de pantalla obtenida del programa Primer 3)

## PCR anidada

En la visualización de los productos amplificados se distinguen seis bandas positivas bien definidas correspondientes a los fragmentos 5 y 6 de la VP1 con un peso molecular de 636 pb y 622 pb respectivamente (Figura 10).



**Figura 10. PCR anidado para amplificación de la VP1 fragmento 1 y 2 del PPV5.** (MPB) marcador de pares de bases. (L1-3) producto amplificado del fragmento 1 con un tamaño de 636 pb. (L4-6) producto amplificado del fragmento 2 con un tamaño de 622 pb. La muestras fueron amplificadas a diferentes gradientes de temperatura: 59, 60.1 y 63 °C respectivamente

## Especificidad

Los resultados que se obtuvieron al ingresar las secuencias en el programa Blast comprueban que el fragmento 5 tiene una homología del 100% con distintos PPV5 identificados con los números de acceso MK378346.1, MK378345.1, MK378344.1, MK378343.1, MK378341.1. Lo mismo se puntualiza para el fragmento 6 que tiene una homología del 100% con secuencias del PPV5 identificadas con los números de

acceso MK092461.1, MK092460.1, MK092452.1, MK092440.1 y MK092434.1 (Figura 11).

La matriz de identidad obtuvo valores del 99-100% para las secuencias de PPV5 con respecto a la secuencia analizada, siendo las de EUA (JX896318 y JX896322) las que representan los valores más altos. En cuanto a PPV1 se observa una identidad entre secuencias del 30%, PPV2 de 23-24% y PPV3 entre 25-26%. PPV4 alcanza valores del 29-30%, mientras que PPV6 y PPV7 del 25 y 28-29% respectivamente (Figura 12).

En la predicción de aminoácidos se logró evidenciar una alta homología entre las distintas secuencias de PPV5, observándose una zona con mayor heterogenicidad en el aminoácido 296 en las secuencias identificadas con el número de acceso KX273436 (Polonia), KX352455 (Polonia), KX352457 (Polonia) y KF661535 (China) (Figura 13).

El árbol filogenético construido con secuencias de aminoácidos define 7 clados, los cuales corresponden a cada una de las siete especies de PPVs. La disposición de estos sugiere una semejanza de PPV5 con PPV4 al emerger de una rama común. Por otro lado, aun cuando el árbol obtenido con secuencias de nucleótidos igualmente manifiesta una distribución uniforme entre las especies, se observa una disparidad al agrupar PPV5 con PPV1. Por último cabe mencionar que la secuencia analizada se organiza en una rama diferente a la de los demás PPV5, lo cual propone la posibilidad de albergar una cepa endémica (Figura 14 y 15).

A	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Porcine parvovirus 5 isolate PPV5_VIRES_TJ01_C1 r...</a>	<a href="#">Porcine ...</a>	1175	1175	100%	0.0	100.00%	5177	<a href="#">MK378346.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Porcine parvovirus 5 isolate PPV5_VIRES_SX02_C1 r...</a>	<a href="#">Porcine ...</a>	1175	1175	100%	0.0	100.00%	4673	<a href="#">MK378345.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Porcine parvovirus 5 isolate PPV5_VIRES_SX01_C1 r...</a>	<a href="#">Porcine ...</a>	1175	1175	100%	0.0	100.00%	5369	<a href="#">MK378344.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Porcine parvovirus 5 isolate PPV5_VIRES_SH01_C1 r...</a>	<a href="#">Porcine ...</a>	1175	1175	100%	0.0	100.00%	2878	<a href="#">MK378343.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Porcine parvovirus 5 isolate PPV5_VIRES_SD01_C1 r...</a>	<a href="#">Porcine ...</a>	1175	1175	100%	0.0	100.00%	5129	<a href="#">MK378341.1</a>

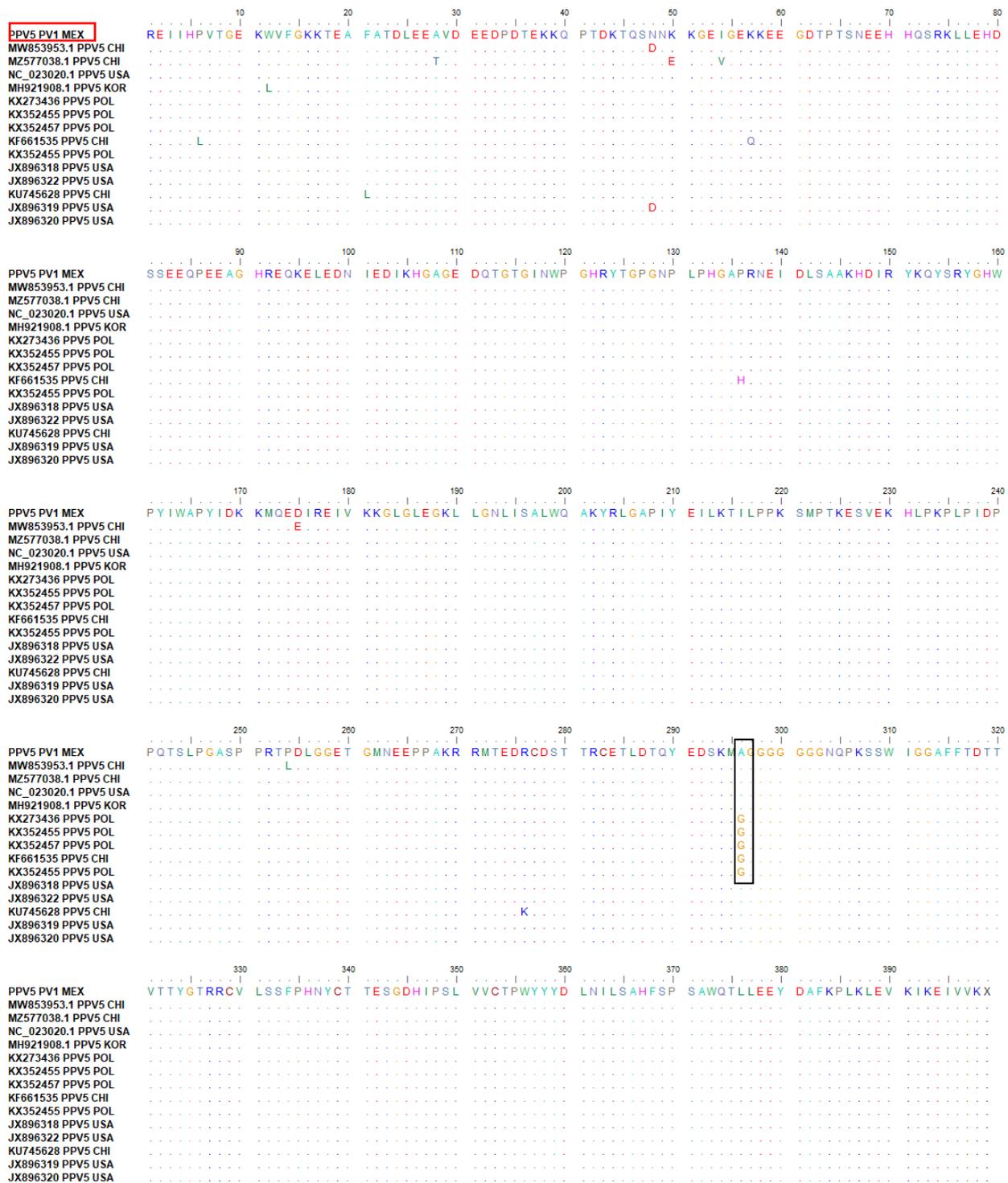
  

B	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Porcine parvovirus 5 isolate PPV5-DSH39 capsid prot...</a>	<a href="#">Porcine ...</a>	1027	1027	100%	0.0	100.00%	3024	<a href="#">MK092461.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Porcine parvovirus 5 isolate PPV5-DSH35 capsid prot...</a>	<a href="#">Porcine ...</a>	1027	1027	100%	0.0	100.00%	3024	<a href="#">MK092460.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Porcine parvovirus 5 isolate PPV5-DJH22, partial gen...</a>	<a href="#">Porcine ...</a>	1027	1027	100%	0.0	100.00%	5051	<a href="#">MK092452.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Porcine parvovirus 5 isolate PPV5-DSH28, partial gen...</a>	<a href="#">Porcine ...</a>	1027	1027	100%	0.0	100.00%	5051	<a href="#">MK092440.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Porcine parvovirus 5 isolate PPV5-DSH18, partial gen...</a>	<a href="#">Porcine ...</a>	1027	1027	100%	0.0	100.00%	5051	<a href="#">MK092434.1</a>

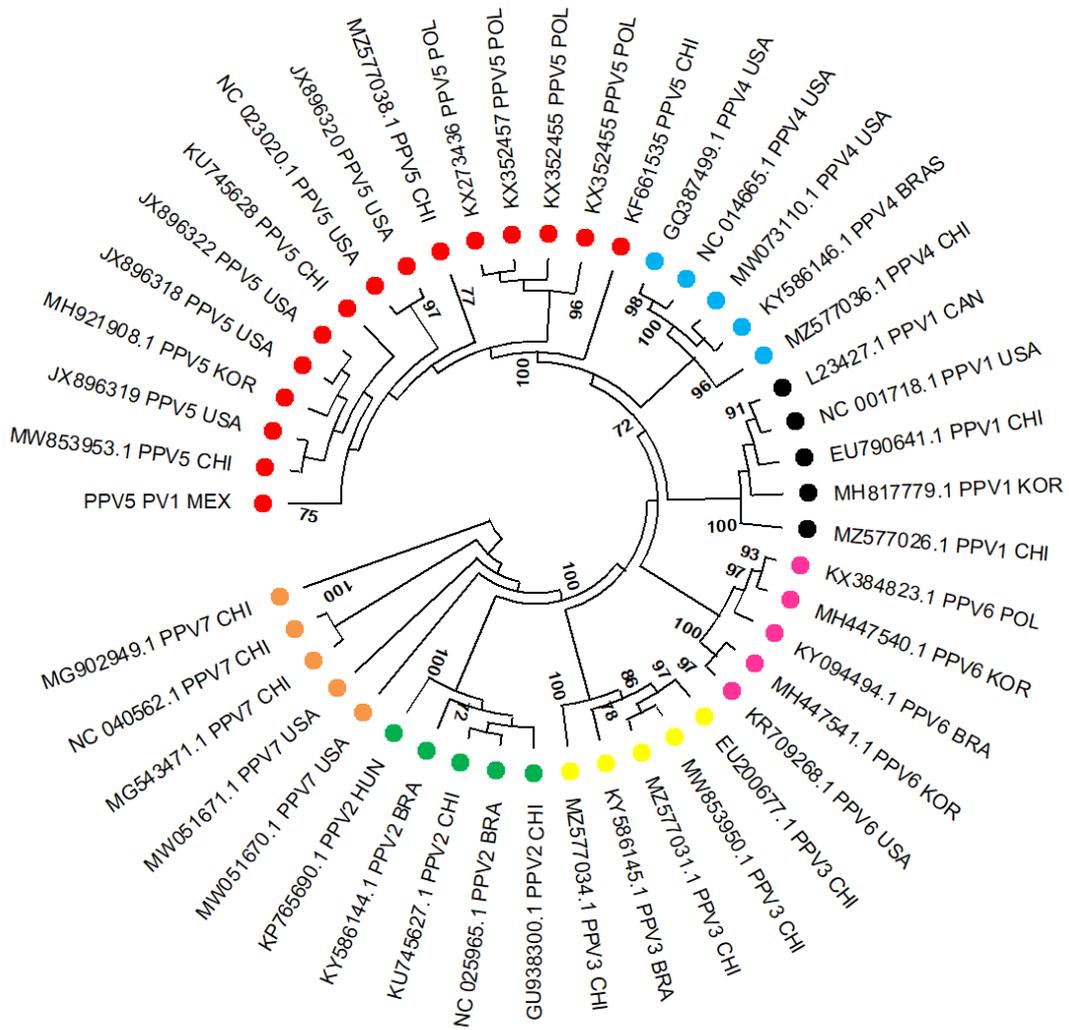
**Figura 11. Especificidad de los fragmentos 1 y 2.** (A) señala cinco secuencias con una homología del 100% para el fragmento 1. (B) señala cinco secuencias con una homología del 100% para el fragmento 2. (Captura de pantalla obtenida del programa Blast)

PPV5 PV1 MEX	ID	PPV3 CHI	0.259
MW853953.1 PPV5 CHI	0.996	KY586145.1 PPV3 BRA	0.259
MZ577038.1 PPV5 CHI	0.996	MW853950.1 PPV3 CHI	0.259
NC_023020.1 PPV5 USA	0.998	MZ577034.1 PPV3 CHI	0.257
MH921908.1 PPV5 KOR	0.998	MZ577031.1 PPV3 CHI	0.260
KX273436 PPV5 POL	0.996	GQ387499.1 PPV4 USA	0.292
KX352455 PPV5 POL	0.996	MW073110.1 PPV4 USA	0.292
KX352457 PPV5 POL	0.996	NC_014665.1 PPV4 USA	0.292
KF661535 PPV5 CHI	0.995	KY586146.1 PPV4 BRAS	0.292
KX352455 PPV5 POL	0.996	MZ577036.1 PPV4 CHI	0.306
JX896318 PPV5 USA	1,000	KX384823.1 PPV6 POL	0.255
JX896322 PPV5 USA	1,000	KY094494.1 PPV6 BRA	0.254
KU745628 PPV5 CHI	0.998	MH447541.1 PPV6 KOR	0.255
JX896319 PPV5 USA	0.998	MH447540.1 PPV6 KOR	0.252
JX896320 PPV5 USA	0.998	KR709268.1 PPV6 USA	0.255
L23427.1 PPV1 CAN	0.308	MG543471.1 PPV7 CHI	0.294
EU790641.1 PPV1 CHI	0.308	MG902949.1 PPV7 CHI	0.287
MH817779.1 PPV1 KOR	0.303	NC_040562.1 PPV7 CHI	0.294
NC_001718.1 PPV1 USA	0.308	MW051671.1 PPV7 USA	0.291
MZ577026.1 PPV1 CHI	0.308	MW051670.1 PPV7 USA	0.286
GU938300.1 PPV2 CHI	0.244		
NC_025965.1 PPV2 BRA	0.237		
KY586144.1 PPV2 BRA	0.241		
KP765690.1 PPV2 HUN	0.242		
KU745627.1 PPV2 CHI	0.239		

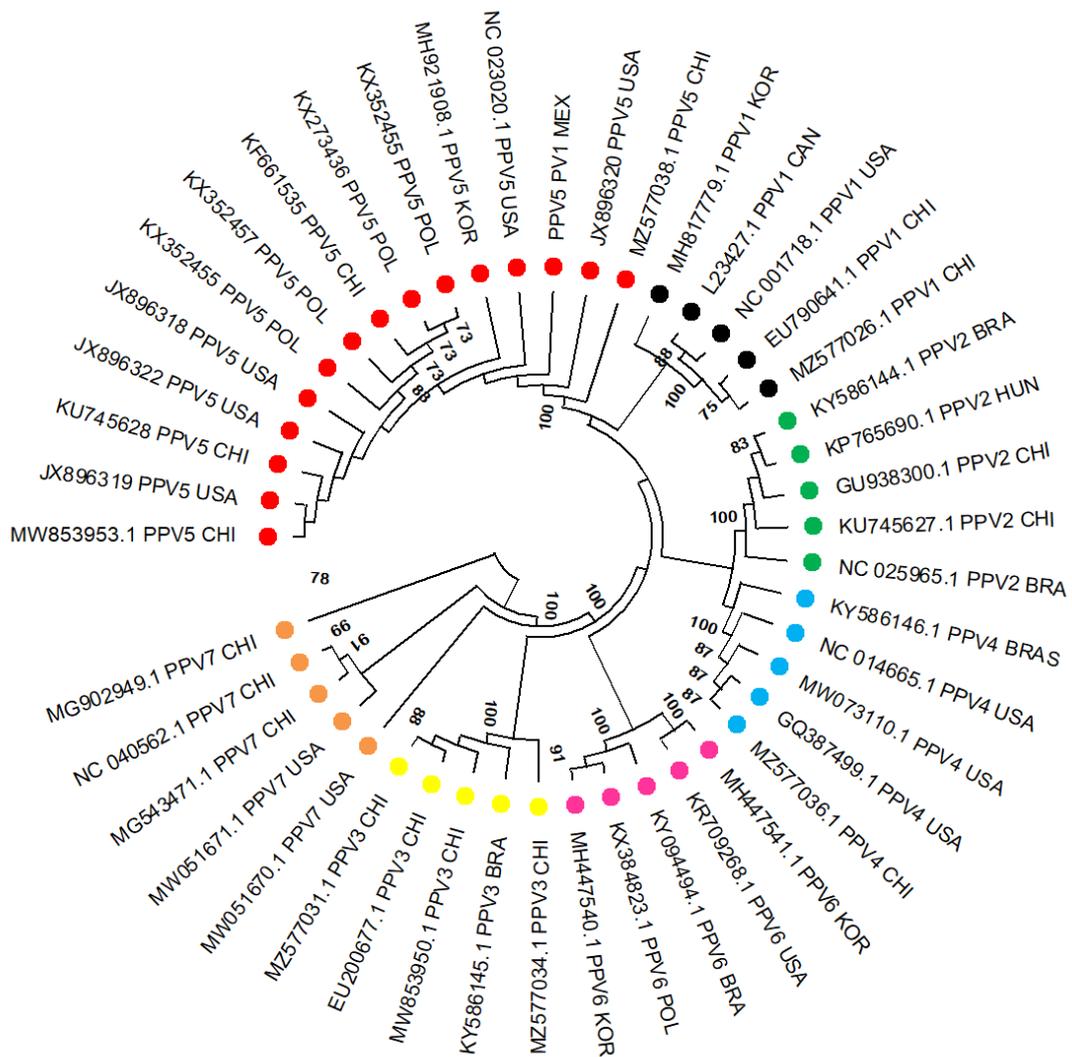
**Figura 12. Matriz de identidad de la ORF2 parcial del PPV5.** Secuencias de diversos PPVs identificadas con su número de acceso del GenBank, la especie de parvovirus a la que pertenecen, y el país de origen. Del lado derecho se encuentra su valor de identidad con respecto a la secuencia analizada, identificada como PPV5 PV1 MEX (recuadro azul). Las secuencias de referencia dadas por el ICTV para los demás PPVs se señalan dentro del recuadro rojo.



**Figura 13. Predicción de aminoácidos de la ORF 2 parcial del PPV5.** Se muestra la secuencia analizada identificada como PPV5 PV1 MEX (recuadro rojo). Las demás secuencias del PPV5 están identificadas con su número de acceso del GenBank y el país de origen. Se observa un cambio representativo en el aminoácido 296 en cinco secuencias al sustituir la alanina por glicina (recuadro negro). (Imagen recuperada del programa Bioedit)



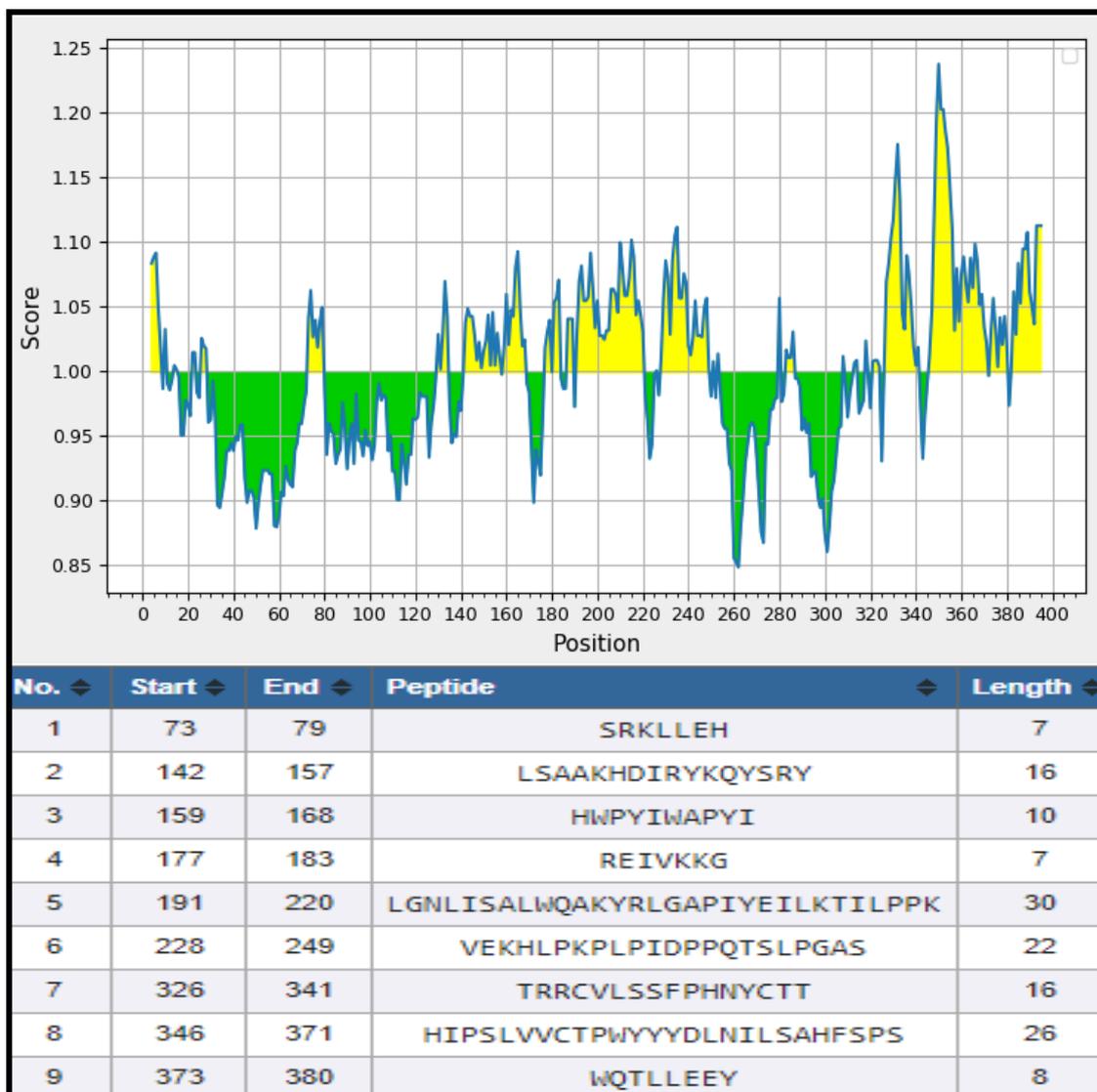
**Figura 14. Árbol filogenético de la ORF2 parcial del PPV5 basado en nucleótidos.** Se muestran las secuencias de diversos PPVs señalados con el número de acceso del GenBank, especie de PPV a la que pertenecen y país de origen. Se observa una distribución de siete clados: ●PPV1 ●PPV2 ●PPV3 ●PPV4 ●PPV5 ●PPV6 ●PPV7. Se conservan valores representativos de identidad genética mayores a 70 (Imagen recuperada de programa Mega).



**Figura 15. Árbol filogenético de la ORF2 parcial del PPV5 basado en aminoácidos.** Se muestran las secuencias de diversos PPVs señalados con el número de acceso del GenBank, especie de PPV a la que pertenecen y país de origen. Se observa una distribución de siete clados: ●PPV1 ●PPV2 ●PPV3 ●PPV4 ●PPV5 ●PPV6 ●PPV7. Se conservan valores representativos de identidad genética mayores a 70 (Imagen recuperada del programa Mega).

## Predicción de epitopes dominantes

Los resultados sugieren nueve sitios potenciales de epitopes dominantes, los cuales corresponden a dos péptidos de 7 aa (SRKLLEH) y (REIVKKG). Uno de 16 aa (LSAAKHDIRYKQYSRY). Otro de 10 aa (HWPYIWAPYI). Uno de 30 aa (LGNLISALWQAKYRLGAPIYEILKTIILPPK). De 16 aa (TRRCVLSSFPHNYCTT). Uno de 22 aa (VEKHLPKPLPIDPPQTSPLPGAS). De 8 aa (WQTLLEEY). Finalmente un péptido de 26 aa (HIPSLVVCTPWYYYDLNILSAHFSPS) el cual representa el valor más alto con un puntaje de 1.2370 (Figura 16).



**Figura 16. Predicción de epitopes dominantes de la ORF2 parcial del PPV5.** Se muestran los péptidos que sugieren epitopes dominantes, su posición, longitud y puntuación (Captura de pantalla obtenida del programa Antibody Epitope Prediction).

## Discusión

La taxonomía actual citada por el ICTV clasifica al PPV1 en el género *Protoparvovirus* (especie *Ungulate protoparvovirus 1*), PPV2 y PPV3 en el género *Tetraparvovirus* (especie *Ungulate tetraparvovirus 3* y *Ungulate tetraparvovirus 2*, respectivamente), PPV4 y PPV6 en el género *Copiparvovirus* (especie *Ungulate copiparvovirus 2* y *Ungulate copiparvovirus 4* respectivamente), mientras que el PPV7 en el género *Chaphamaparvovirus* (especie *Ungulate chaphamaparvovirus 1*). A la fecha el PPV5 aún no está clasificado dentro de la propuesta taxonómica de ICTV (Miłek *et al.*, 2019; Jager *et al.*, 2021).

Parte inicial de este proceso fue la amplificación del sitio de interés. Si bien es cierto que en la actualidad se cuenta con diversas estrategias de diagnóstico, se ha puntualizado que en comparación con métodos como el aislamiento viral y la hibridación *in situ*, la PCR es una técnica simple y sensible que permite la detección confiable de secuencias del genoma viral (Kim y Chae, 2003). También se tiene reportado que en ensayos de PCR en los cuales se ha amplificado la proteína NS1 han obtenido títulos más altos que en la hemaglutinación (Soares *et al.*, 1999). Otra prueba comercial comúnmente utilizada es el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) para el diagnóstico de PPV1 y PPV2, aunque debido a la falta de pruebas de ELISA disponibles para PPV3, PPV4, PPV5 o PPV6 la información aún es limitada (Cui *et al.*, 2017).

La mayoría de trabajos dirigidos a determinar la prevalencia epidemiológica o la evolución genética de los distintos PPVs han hecho uso de la PCR en tiempo real (qPCR) la cual a diferencia de la PCR punto final permite la cuantificación y el análisis al mismo tiempo que se lleva a cabo la amplificación (Singh y Patel, 2016). La PCR anidada se utiliza en situaciones en las que es necesario aumentar la sensibilidad o la especificidad, por ejemplo, cuando se amplifica un miembro particular de una familia de genes polimórficos o cuando se amplifica una copia de ADN que está presente en bajas cantidades (Green y Sambrook, 2019). A pesar de que los trabajos consultados no reportan la cantidad de ADN usado en las pruebas de PCR, aquí se logró una amplificación del producto con solo 50ng de templado. Si bien nuestra técnica de PCR estuvo dirigida para la secuenciación de fragmentos y no para diagnóstico resultó igual de eficiente.

La PCR también está sujeta al sitio genético que se desee amplificar. El gen NS1 codifica una serie de proteínas reguladoras indispensables para la replicación viral. Debido a su mayor nivel de conservación, este gen se utiliza para clasificar los PPVs en diferentes géneros (Mietzsch *et al.*, 2019). Entre tanto, las proteínas de la cápside son responsables de la adsorción y la entrada en la célula huésped, el transporte, la localización intracelular, así como la salida viral y la inducción de la respuesta inmune (Tu *et al.*, 2015). Estas propiedades resultan útiles al momento de usar como blanco los genes VP1 o VP2, ya que su mayor variabilidad genética permite la detección y discriminación entre las diferentes variantes virales (Díaz *et al.*, 2008).

Otro punto a resaltar, es el tipo de muestra usada ya que se ha descrito para el caso de PPV2 que presenta tasas de prevalencia en suero del 35,2% mientras que en pulmón del 42,7% (Opriessnig *et al.*, 2014). Además es bien sabido que los linfonodos se consideran un sitio de replicación principal para el PPV1. Se han obtenido tasas de detección en linfonodos del 78% y en corazón del 55%, lo que indica claramente un papel predominante de estos tejidos en la detección viral (Streck *et al.*, 2013). Otros trabajos mencionan que debido a que el tropismo de los PPVs es similar al del circovirus porcino, su detección se favorece en tejidos linfoides, encontrando tasas del 52% para PPV5 en casos de PMWS (García-Camacho *et al.*, 2020). En el presente trabajo, usando una muestra parafinizada extraída de linfonodos, se amplificaron de manera exitosa 2 productos de 636 pb y 622 pb respectivamente.

Por otra parte, la secuenciación de los fragmentos amplificados se llevo a cabo con el método Sanger. Aunque a la fecha se han desarrollado técnicas como la secuenciación masiva que tiene la ventaja de analizar una mayor longitud de pares de bases y con la cual se ha logrado describir la presencia de nuevas especies de PPVs (Opriessnig *et al.*, 2014; Paim *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2022), el método Sanger sigue siendo superior en la precisión de lectura (Verma *et al.*, 2017). En este sentido, los dos fragmentos secuenciados fueron probados para determinar su especificidad utilizando herramientas bioinformáticas, obteniendo homologías del 100%. Posteriormente usando matrices de identidad se revelaron valores del 99-100% entre las distintas cepas de PPV5. Estos resultados son cercanos a los obtenidos por otros autores donde encontraron similitudes del 97.1-99.5 %. Además, la proteína VP1 de PPV5 mostró identidades de 14.8% con PPV1, 20.6 % con PPV2, y 26.9 % con VPP3. (Xiao, *et al.*, 2013b), indicando una gran divergencia dentro de la proteína de la cápside entre las diferentes especies de PPVs lo cual concuerda a lo obtenido en este trabajo.

Con respecto al análisis filogenético, se cuenta con informes de diversos países. En Estados Unidos, se realizó una caracterización virémica usando muestras de suero por medio de secuenciación masiva, donde la topología del árbol filogenético construido con los nucleótidos del genoma completo mediante el algoritmo Neighbor-joining agrupa en una rama común al PPV4 y PPV5 (Paim *et al.*, 2021). Este hallazgo concuerda con los de otros autores quienes usando el mismo algoritmo pero basándose en los aminoácidos de la NS1 y VP1 igualmente llegaron a la conclusión de que PPV5 y PPV4 comparten el mismo antecesor (Wu *et al.*, 2014). Así también, usando el algoritmo maximum-likelihood, las secuencias de nucleótidos se distribuyen en dos grandes clados, integrando a PPV1 y PPV7 por un lado y PPV2, PPV3, PPV4, PPV5 y PPV6 en otro (Park *et al.*, 2021). Dado que hay una cercana relación entre PPV4, PPV5 y PPV6 se ha sugerido agruparlos dentro del género *Copiparvovirus* (Li *et al.*, 2020; Streck y Truyen, 2020). Las proteínas NS de 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 (Palinski *et al.*, 2016). También debido a la gran similitud con PPV4 y la falta de ORF3 por parte de PPV5 se puede sugerir que este es un intermedio de PPV4 durante la evolución de los parvovirus en cerdos (Xiao, *et al.*, 2013b).

Dicha información se mantiene en paralelo con nuestros resultados. La construcción de arboles filogenéticos con secuencias de nucleótidos obtuvo una relación genética del 72% entre PPV4 y PPV5, agrupándolos en clados contiguos. Sin embargo, al traducirse a aminoácidos se observó discrepancia al agrupar PPV5 y PPV1 en la misma rama pero sin presentar una relación genética representativa mayor al 70%. Lo anterior puede deberse a la baja identidad genómica de la ORF 2 entre PPV4 y PPV5 usando secuencias de aminoácidos la cual se reporta en 54% (Xiao *et al.*, 2013c). Además cabe resaltar que en ambos arboles filogenéticos nuestra secuencia refleja una mayor distancia filogenética con respecto a los demás PPV5. Lo anterior arroja la posibilidad de la presencia de una variedad endémica en el país.

Al examinar la secuencia de estudio con las de PPV5 recuperadas del GenBank se apreció una alta homología, ubicando un solo sitio de mutación en cuatro de ellas, las cuales son originarias de Polonia y China. Sin embargo, se sabe que se necesita un pequeño número de sustituciones de aminoácidos para alterar el tropismo de los PPV, a pesar de su alta homología genética (Garcia-Camacho *et al.*, 2020). Estudios previos han descrito en el PPV1 mutaciones silenciosas en los genes no estructurales mientras

que en los genes VP1 y VP2 la sustitución de nucleótidos cambia la traducción del aminoácido, lo que a su vez afecta a su virulencia y tropismo (Streck *et al.*, 2011; Oh *et al.*, 2017). Otros autores han determinado la evolución genética del genoma de PPV1 en función de presiones selectivas sobre los genes NS1 y VP2. Estos genes están bajo selección purificadora y selección positiva, respectivamente. La tendencia del gen VP2 a mutar puede indicar que los cambios de aminoácidos son favorables para la supervivencia del PPV1 (Hao *et al.*, 2011). Se requieren más estudios para determinar si estas mutaciones son de relevancia en el PPV5.

Para conseguir una respuesta inmunitaria eficaz basta con el reconocimiento de determinados epítopes sin necesidad de conocer la proteína antigénica completa. Dichos epítopes se seleccionan gracias al conocimiento de las secuencias de los aminoácidos de las proteínas y de las estructuras secundarias y terciarias resultantes en su conformación tridimensional, organización de dominios y dinámica de superficie. La secuencia completa del genoma de un patógeno permite conocer potenciales epítopes. Esta estrategia está encaminada al descubrimiento de genes que codifiquen péptidos que se unan ávidamente a los receptores de los linfocitos con el propósito de estimular su respuesta (González-Romo y Picazo, 2015). A fin de proveer datos en relación a esto último, se realizó una predicción de los epítopes dominantes en la secuencia parcial de VP1 en la que se presentaron nueve sitios inmunológicos potenciales, de los cuales uno de ellos (HIPSLVVCTPWYYDLNILSAHFSPS) obtuvo un valor de inmunidad de hasta 1.237, lo cual lo hace un importante candidato antigénico.

En resumen, si bien los datos obtenidos corresponden a una sola fracción del genoma, son de suma importancia para obtener la secuencia completa del PPV5 en México, siendo de los primeros trabajos que abordan este tema en el país. Los estudios realizados hasta el momento apuntan a la inclusión del PPV5 en el género *Copiparvovirus*. La amplificación y análisis de las fracciones restantes resultará benéfica para aclarar el panorama actual del PPV5, su diversidad genética, epidemiología y patogenia.

## Conclusiones

- ✓ Se logró amplificar mediante una PCR anidada dos fragmentos empalmados de 636 y 622 pb para su posterior ensamblaje y obtener como resultado una secuencia de aproximadamente 1200pb.
- ✓ La secuencia parcial de ORF2 demostró tener un alto grado de conservación entre los PPV5.
- ✓ Filogenéticamente se encontró una relación entre PPV5, PPV4 y PPV1, (nts y aa), sin embargo, es necesario el análisis de la secuencia completa para obtener datos conclusivos.
- ✓ La disposición de los clados sugiere la presencia de una especie endémica de PPV5 en México.

## Referencias

1. Carter, J., Saunders, V. (2007). Wiley, editor. 137-146 p
2. Cotmore, S. F., y Tattersall, P. (2013). Parvovirus diversity and DNA damage responses. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(2), a012989. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012989>
3. Cotmore, S. F., y Tattersall, P. (2014). Parvoviruses: Small does not mean simple. *Annual Review of Virology*, 1(1), 517–537. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085444>
4. Cotmore, S. F., Agbandje-mckenna, M., Canuti, M., Chiorini, J. A., Hughes, J., Mietzsch, M., Modha, S., Pintel, D. J., y Qiu, J. (2019). ICTV ICTV Virus Taxonomy Profile : Parvoviridae. *Journal of General Virology*, 100, 367–368. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001212>
5. Cui, J., Biernacka, K., Fan, J., Gerber, P. F., Stadejek, T., y Opriessnig, T. (2017). Circulation of Porcine Parvovirus Types 1 through 6 in Serum Samples Obtained from Six Commercial Polish Pig Farms. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(6), 1945–1952. <https://doi.org/10.1111/tbed.12593>
6. Díaz R., C., Correa, J. J., y Vera A., V. J. (2008). Aspectos moleculares del virus de la parvovirus canina y sus implicaciones en la enfermedad. *Revista de Medicina Veterinaria*, 0(15), 57–65.
7. Díaz, C., Celer, V., y Frébort, I. (2020). The main DNA viruses significantly affecting pig livestock. *Journal of Veterinary Research (Poland)*, 65(1), 15–25. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2021-0001>
8. Fuentealba, N. y Serena, M. (2018). Parvovirus; Universidad Nacional de La Plata; 61-70
9. Garcia-Camacho, L. A., Vargas-Ruiz, A., Marin-Flamand, E., Ramírez-Álvarez, H., y 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>
10. Green, M. R., y Sambrook, J. (2019). Nested polymerase chain reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(2), 175–179. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095182>
11. Hao, X., Lu, Z., Sun, P., Fu, Y., Cao, Y., Li, P., Bai, X., Bao, H., Xie, B., Chen, Y., Li, D., y Liu, Z. (2011). Phylogenetic analysis of porcine parvoviruses from swine samples in China. *Virology Journal*, 8, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-320>
12. Jager, M. C., Tomlinson, J. E., Lopez-Astacio, R. A., Parrish, C. R., y Van de Walle, G. R. (2021). Small but mighty: old and new parvoviruses of veterinary significance. *Virology Journal*, 18(1), 1–29. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01677-y>
13. Kim, J., y Chae, C. (2003). Multiplex nested PCR compared with in situ hybridization for the differentiation of porcine circoviruses and porcine parvovirus from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Canadian Journal*

- of Veterinary Research*, 67(2), 133–137.
14. Kim, S.-C., Kim, J.-H., Kim, J.-Y., Park, G.-S., Jeong, C.-G., y 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), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03236-1>
  15. Li, J., Xiao, Y., Qiu, M., Li, X., Li, S., Lin, H., Li, X., Zhu, J., y Chen, N. (2020). *RESEARCH ARTICLE A Systematic Investigation Unveils High Coinfection Status of.*
  16. Li, J., Xiao, Y., Qiu, M., Li, X., Li, S., Lin, H., Li, X., Zhu, J., y Chen, N. (2021). A Systematic Investigation Unveils High Coinfection Status of Porcine Parvovirus Types 1 through 7 in China from 2016 to 2020. *Microbiology spectrum*, 9(3), e0129421. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.01294-21>
  17. Liu, P., Chen, S., Wang, M., y Cheng, A. (2017). The role of nuclear localization signal in parvovirus life cycle. *Virology Journal*, 14(1), 17–22. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0745-1>
  18. López-Bueno, A., Villarreal, L. P., y Almendral, J. M. (2006). Parvovirus variation for disease: A difference with RNA viruses? *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 299, 349–370. [https://doi.org/10.1007/3-540-26397-7\\_13](https://doi.org/10.1007/3-540-26397-7_13)
  19. Maclachlan, J., y Dubovi, E. J. (2017). *Parvoviridae* (pp. 245–257). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800946-8.00012-X>
  20. Martínez, R., Balladares, R., y Espinosa, S. (2018). Enfermedades que afectan la calidad reproductiva del verraco. Recuperado de <https://bmeditores.mx/porcicultura/enfermedades-que-afectan-la-capacidad-reproductiva-del-verraco-1654/> el 23 de mayo del 2022
  21. Mietzsch, M., Péntzes, J. J., y Agbandje-Mckenna, M. (2019). Twenty-five years of structural parvovirology. *Viruses*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/v11040362>
  22. Miłek, D., Woźniak, A., Guzowska, M., y 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). <https://doi.org/10.3390/v11050474>
  23. Miłek, D., Woźniak, A., Podgórska, K., y 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(November 2019). <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108613>
  24. Ni, J., Qiao, C., Han, X., Han, T., Kang, W., Zi, Z., Cao, Z., Zhai, X., y Cai, X. (2014). Identification and genomic characterization of a novel porcine parvovirus (PPV6) in china. *Virology Journal*, 11(1), 203. <https://doi.org/10.1186/preaccept-1676529513131027>
  25. Nüesch, J. P. F., y Rommelaere, J. (2006). NS1 Interaction with CKII $\alpha$ : Novel Protein Complex Mediating Parvovirus-Induced Cytotoxicity. *Journal of Virology*, 80(10), 4729–4739. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.10.4729-4739.2006>
  26. Oh, W. T., Kim, R. Y., Nguyen, V. G., Chung, H. C., y Park, B. K. (2017). Perspectives on the evolution of porcine parvovirus. *Viruses*, 9(8), 1–13. <https://doi.org/10.3390/v9080196>
  27. Opriessnig, T., Xiao, C. T., Gerber, P. F., y Halbur, P. G. (2014). Identification of recently described porcine parvoviruses in archived North American samples

- from 1996 and association with porcine circovirus associated disease. *Veterinary Microbiology*, 173(1–2), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.06.024>
28. Paim, W. P., Maggioli, M. F., Weber, M. N., Rezabek, G., Narayanan, S., Ramachandran, A., Canal, C. W., y Bauermann, F. V. (2021). Virome characterization in serum of healthy show pigs raised in Oklahoma demonstrated great diversity of ssDNA viruses. *Virology*, 556(October 2020), 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2021.01.006>
  29. Palinski, R. M., Mitra, N., y Hause, B. M. (2016). Discovery of a novel Parvovirinae virus , porcine parvovirus 7 , by metagenomic sequencing of porcine rectal swabs. *Virus Genes*. <https://doi.org/10.1007/s11262-016-1322-1>
  30. Park, G. N., Song, S., Cha, R. M., Choe, S. E., Shin, J., Kim, S. Y., Hyun, B. H., Park, B. K., y An, D. J. (2021). Genetic analysis of porcine parvoviruses detected in South Korean wild boars. *Archives of Virology*, 166(8), 2249–2254. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05106-x>
  31. Parrish, C.R. (2010). Structures and Functions of Parvovirus Capsids and the Process of Cell Infection. In: Johnson, J. (eds) Cell Entry by Non-Enveloped Viruses. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol 343. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/82\\_2010\\_33](https://doi.org/10.1007/82_2010_33)
  32. Paul, P. S., Halbur, P., Janke, B., Joo, H., Nawagitgul, P., Singh, J., y Sorden, S. (2003). Exogenous porcine viruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 278, 125–183. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-55541-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-642-55541-1_6)
  33. Payne, S. (2017). Family Parvoviridae. In *Viruses* (pp. 237–241). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803109-4.00029-5>
  34. Péntzes, J. J., Söderlund-Venermo, M., Canuti, M., Eis-Hübinger, A. M., Hughes, J., Cotmore, S. F., y 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>
  35. Prieto, C., Martínez, F., Segalés, J. (2017). Enfermedades infecciosas del ganado porcino, Servet editorial - Grupo Asís Biomedica S.L. ProQuest Ebook Central.
  36. Rivera, J., De la Luz, J., Gómez, L., Diosdado, F., Escatell, G., Ramírez, E., Velázquez, L., Ramírez, H., Coba, M., Tufiño, C., Macías, M., Carrera, V., Martínez, R., Martínez, M., Santos, G., Herrera, I., Siañez, I., y Zapata, M. (2021). Salud porcina: historia, retos y perspectivas. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 12(Supl. 3), 149-185. Epub 24 de enero de 2022. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v12s3.5879>.
  37. Ros, C., Bayat, N., Wolfisberg, R., y Almendral, J. M. (2017). Protoparvovirus cell entry. *Viruses*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/v9110313>
  38. Simpson, A. A., Hébert, B., Sullivan, G. M., Parrish, C. R., Zádori, Z., Tijssen, P., y Rossmann, M. G. (2002). The structure of porcine parvovirus: Comparison with related viruses. *Journal of Molecular Biology*, 315(5), 1189–1198. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5319>
  39. Singh, R. R., y Patel, K. P. (2016). Chapter 4 Emulsion PCR: Techniques and

- Appl. *Clinical Applications of PCR, Methods in Molecular Biology*, 1392, 33–42. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3360-0>
40. Soares, R. M., Durigon, E. L., Bersano, J. G., y Richtzenhain, L. J. (1999). Detection of porcine parvovirus DNA by the polymerase chain reaction assay using primers to the highly conserved nonstructural protein gene, NS-1. *Journal of Virological Methods*, 78(1–2), 191–198. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(98\)00177-3](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(98)00177-3)
  41. Streck, A., Bonatto, S. L., Homeier, T., Souza, C. K., Gonçalves, K. R., Gava, D., Canal, C. W., & Truyen, U. (2011). High rate of viral evolution in the capsid protein of porcine parvovirus. *Journal of General Virology*, 92(11), 2628–2636. <https://doi.org/10.1099/vir.0.033662-0>
  42. Streck, A. F., Homeier, T., Foerster, T., Fischer, S., y Truyen, U. (2013). Analysis of porcine parvoviruses in tonsils and hearts from healthy pigs reveals high prevalence and genetic diversity in Germany. *Archives of Virology*, 158(6), 1173–1180. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1603-0>
  43. Streck, A. F., Canal, C. W., y Truyen, U. (2015). Molecular epidemiology evolution of porcine parvoviruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 36, 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.10.007>
  44. Streck, A. F., y Truyen, U. (2020). Porcine parvovirus. *Current Issues in Molecular Biology*, 37, 33–45. <https://doi.org/10.21775/CIMB.037.033>
  45. Truyen, U. (2019). Parvoviruses. In *diseases of swine* (pp. 611–621).
  46. Tu, M., Liu, F., Chen, S., Wang, M., & Cheng, A. (2015). Role of capsid proteins in parvoviruses infection. *Virology Journal*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0344-y>
  47. Verma, M., Kulshrestha, S., y Puri, A. (2017). Genome sequencing. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1525). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6622-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6622-6_1)
  48. Wang, J., Liu, Y., Chen, Y., Zhang, T., Wang, A., Wei, Q., Liu, D., Wang, F., & Zhang, G. (2021). Capsid assembly is regulated by amino acid residues asparagine 47 and 48 in the VP2 protein of porcine parvovirus. *Veterinary Microbiology*, 253(December 2020), 108974. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108974>
  49. Wilhelm, S., Zimmermann, P., Selbitz, H. J., y Truyen, U. (2006). Real-time PCR protocol for the detection of porcine parvovirus in field samples. *Journal of Virological Methods*, 134(1–2), 257–260. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.01.004>
  50. Wu, R., Wen, Y., Huang, X., Wen, X., Yan, Q., Huang, Y., Ma, X., y 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>
  51. Xiao, C. T., Gerber, P. F., Giménez-Lirola, L. G., Halbur, P. G., y Opriessnig, T. (2013a). 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>
  52. Xiao, C. T., Giménez-Lirola, L. G., Jiang, Y. H., Halbur, P. G., y Opriessnig, T. (2013b). Characterization of a Novel Porcine Parvovirus Tentatively Designated

- PPV5. *PLoS ONE*, 8(6), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065312>
53. Xiao, C., Halbur, P. G., Opriessnig, T., Tijssen, P., Jm, A., Bergoin, M., y Tw, F. (2013c). *Complete Genome Sequence of a Novel Porcine Parvovirus ( PPV ).* 1, 1–2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00021-12.Copyright>.
54. Gonzalez-Romo, F y Picazo, J. (2015). El desarrollo de nuevas vacunas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 33(8), 557-568, <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.06.013>.
55. Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Rozen M, Rozen SG. Primer3 -new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*2012;40(15):e115.
56. Vita R, Overton JA, Greenbaum JA, Ponomarenko J, Clark JD, Cantrell JR, Wheeler DK, Gabbard JL, Hix D, Sette A, Peters B. The immune epitope database (IEDB) 3.0. *Nucleic Acids Res.* 2014 Oct 9. pii: gku938. [Epub ahead of print] PubMed PMID:25300482
57. Kolaskar A, Tongaonkar P. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett.* 1990 Dec 10;276(1-2):172-4