



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA**

**ESTUDIO DE TIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE
PARVOVIRUS CANINO TIPO 2 (CPV-2) MEDIANTE
LA PROTEÍNA VP2 EN EL ÁREA METROPOLITANA
DEL VALLE DE MÉXICO**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

PRESENTA

KAREN GONZÁLEZ ROJAS

Asesoras:

Dra. Laura Cobos Marín

MMVZ. Adriana Isabel Muñoz Duarte

Ciudad Universitaria, CDMX, junio 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.

DEDICATORIA

Después de todo el tiempo que paso esto va para mis compañeros de toda la infancia y hasta el intento de mi vida adulta a bombón y a muss, hubiera querido que estuvieran aquí, y ser la mejor para ustedes.

A mi tía Sofía que es una asombrosa mujer y mi inspiración ante la vida que nunca se rinde, ojala sea parecida a ti o al menos me acerque a ello, a mi papá que se quedó conmigo tocándole lo mejor y lo peor.

A mi abuela ya no alcanzaste a escuchar esto pero estuviste esperándome mientras llegaba tarde de la universidad, a Lilia que hizo más accesible mi educación y poder lograr ese objetivo.

Por último, a esos pequeños que hacen que me despierte cada día y que no importa lo que escriba nunca lo van a leer, pero siempre están ahí, pumpkin, cherry, barbas, greñas, lucas, milksiana, salem, mazeekin, canela, mi ayanti y aria, que cada uno ha seguido adelante a pesar de que las personas los lastimaran y viven felices con su presente, en especial a mi ayanti ella es el vivo ejemplo de querer vivir sin importar las circunstancias.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesoras que tuvieron demasiada paciencia a la Dra. Laura Cobos Marín, que siempre estuvo al pendiente de todos mis avances y de mi cuidado y en mi desarrollo académico, a MMVZ. Adriana Isabel Muñoz Duarte que no solo fue mi asesora también una fuente de apoyo en esos momentos difíciles e incómodos en quien puedo confiar.

A Rosa Elena Sarmiento Silva y a Montserrat Elemí García Hernández, por ayudarme en la parte de tipificación y secuenciación de la tesis.

A la MVZ. EDV. Liliana M. Valdés Vázquez por la ayuda técnica en la realización de este proyecto

Al MVZ. Pablo Hernández Peralta, me ayudaste mostrándome el mundo de la inmunología cuando me sentía perdida, sin motivación en la carrera o incluso en ese momento de mi vida donde ya no podía más, siempre estaré agradecida.

A mi familia que sé que esta carrera era lo que menos esperaban o querían para mí, pero acá andamos tratando de sobrellevar mi elección.

A mis amigos Pamela, Juan Carlos, Valeria y Armando, mis más grandes amigos sin ustedes la universidad o la vida misma no sería igual siempre han estado para mí, y yo siempre estaré para ustedes,

encontrarlos en mi vida fue inesperado y raro y a pesar de que esta vida adulta nos separa con el tiempo, me encanta saber que siempre estaremos para nosotros, me gusto encontrar una familia en ustedes.

A yolotzin que dimos ese paso juntas de la vida adulta no sabes lo feliz que fui contigo ese año, fue lo mejor que me pudo pasar, que estuvo a mi lado en los experimentos y en las tardes de resultados y en las feas exposiciones que tuve.

Al departamento de inmunología con mis compañeras Marion, Daniela, Laurita, Ajitzi, a los técnicos de laboratorio Jorge y Gerardo que siempre me ayudaron con mis materiales y que compartíamos las mañanas viéndome llegar tarde como siempre.

A mi familia adoptada gracias a Erick me encanta la vida que me han mostrado y lo amables que son conmigo, siempre están apoyándome en las buenas y en las muy malas.

Guillermo te toco los ataques de ansiedad, la presión del tiempo, los desvelos, gracias por estar en esta parte de mi vida, tal vez nos toquen más momentos así en un futuro y lo espero con ansias.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	2
RESUMEN	3
Introducción	4
Clasificación y características de parvovirus canino tipo 2	5
Subtipos	6
PCR y secuenciación	9
Estudios filogenéticos	10
Justificación	11
Hipótesis	11
Objetivo general	12
Objetivos particulares	12
Material y métodos	12
Población de estudio	13
Obtención y conservación de las muestras	13
Extracción de DNA	13
Reacción de PCR	14
Condiciones de la Electroforesis	15
Purificación de productos de PCR	15
Secuenciación y análisis filogenético	16
Resultados	17
Gel de electroforesis	19
Secuenciación	20
Alineación	21
Árbol filogenético	22
Mutaciones	28
Análisis descriptivo	29
Discusión	30
Conclusión	34
Bibliografía	35

ABREVIATURAS

Ácido aspártico	Asp
Ácido desoxirribonucleico	DNA
Ácido glutámico	Glu
Adenina	A
Alanina	Ala
Asparagina	Asn
Citosina	C
Desoxirribonucleótidos	dNTPs
Enzyme linked immunosorbent assay (Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas)	ELISA
Glicina	Gly
Guanina	G
Hemaglutinación	HA
Inmunocromatográfica	IC
International Committee on Taxonomy of Viruses	ICTV
Isoleucina	Ile
Lisina	Lys
Marcos de lectura abiertos	ORF
Panleucopenia viral felina	FPV
Proteína mayor de cápside	VP
Parvovirus canino tipo 2	CPV-2
Reacción en cadena de la polimerasa	PCR
Receptor de transferrina tipo 1	TfR
Serina	Ser
Timina	T
Tris-Acetato-EDTA	TAE
Tris-Borato-EDTA	TBE
Valina	Val

RESUMEN

La parvovirus canina es una enfermedad infecciosa que afecta a perros domésticos de cualquier edad y se caracteriza por tener una morbilidad del 100 % y una mortalidad de 10 % en adultos y 91% en cachorros. Se han descrito tres subtipos de la parvovirus canina por el cambio de aminoácidos en la proteína estructural de la VP2, los cuales son 2a, 2b, y 2c. Los subtipos antes mencionados se encuentran distribuidos a nivel mundial.

En México, en el estado de Guadalajara un estudio realizado por Pedroza Roldan determinó que el subtipo predominante es el 2c. El objetivo de este trabajo, fue encaminado a conocer qué subtipo es el predominante en el Área Metropolitana del Valle de México; para ello se obtuvieron 40 muestras de heces en varias clínicas, a cada muestra se le realizó la extracción de ADN y se procesó mediante la reacción en cadena de polimerasa. De las 40 muestras solamente fue posible secuenciar 18, con las que se realizó el análisis filogenético para el segmento genómico que codifica para la proteína VP2, empleando el programa MEGA X. Las muestras se alinearon por el método Clustal IW y se construyó el árbol filogenético por máxima verosimilitud con el modelo Tamura-Nei model a 1,000 repeticiones. Se determinó que 14 de las 18 muestras correspondieron al subtipo 2c, mientras que las otras cuatro fueron del subtipo 2b. No fue posible determinar alguna relación entre los signos clínicos, hematocrito o cuentas leucocitarias de los perros que tenían la infección con el subtipo 2b y los del 2c.

Introducción

En 1977 en Nueva Zelanda, América y Europa se describieron los primeros casos de un cuadro gastro-entero-hemorrágico en cánidos, y en 1978 se identificó al agente causal como el Parvovirus canino tipo 2 (CPV-2); por lo que a esta enfermedad se le llamó parvovirus canina (PC). Esta afecta a perros domésticos de cualquier edad, pero los cachorros menores a 6 meses son más susceptibles. Se ha reportado una morbilidad del 100% y una mortalidad del 10% en adultos y del 91% en cachorros (1)(2).

La principal vía de contagio es la oronasal por medio de partículas virales en heces y vómito de animales infectados que se diseminan en el ambiente, pero también se ha reportado la transmisión por fómites (3). El periodo de incubación puede ser de tres a diez días, tiempo en el que se da la primera replicación viral en órganos linfoides regionales (4).

En la primera etapa, debido al tropismo de CPV-2 hacia células con alta tasa de proliferación, la replicación se presenta en órganos linfoides como linfonodos mesentéricos y timo, en las células epiteliales de las criptas intestinales, y en los progenitores hematopoyéticos de la médula ósea; posteriormente ocurre una viremia que da como resultado una segunda replicación viral en diferentes órganos (5). Los primeros signos clínicos son: vómito, diarrea, anorexia, fiebre y deshidratación; si el virus provoca necrosis del epitelio de las criptas intestinales se desarrolla una gastroenteritis de tipo mucoide o hemorrágica. En la médula ósea se ha reportado una disminución de los progenitores hematopoyéticos ocasionando anemia, neutropenia y linfopenia, mientras que en el tejido linfoide se

puede observar necrosis que exagera la linfopenia y produce un estado de inmunosupresión; estas alteraciones fisiopatológicas pueden agravar el cuadro clínico y llevar al paciente a sepsis y a la muerte. Además, en cachorros infectados provenientes de madres no vacunadas se produce una miocarditis no supurativa que comienza en el útero y se completa en las primeras dos semanas de vida, provocando insuficiencia cardíaca y necrosis licuefactiva en cerebro, secundaria a hipoxia e isquemia cerebral (6) (7). La excreción viral por heces llega a ser variable y de corta duración las siguientes dos semanas después de la infección, pero el virus puede durar hasta 3 meses en condiciones ambientales extremas (8).

Los anticuerpos maternos juegan un papel central en la presentación de la enfermedad; su transferencia por calostro es de un 50-60% de anticuerpos maternos, y dependiendo del nivel de anticuerpos de la madre los cachorros pueden presentar títulos >1:80, 1:40 o hasta 1:10. Si los títulos de anticuerpos maternos son altos o se realiza la vacunación antes de las 6 semanas estos pueden interferir con el efecto protector y en la manifestación clínica de la enfermedad; así los animales con títulos >1:80 suelen presentarla de manera subclínica y a medida que estos disminuyen (su vida media es de aproximadamente 10 días) pueden aparecer los signos clínicos (9).

Clasificación y características de parvovirus canino tipo 2

El CPV-2, de acuerdo con la clasificación que otorga el Comité internacional de taxonomía viral (ICTV), pertenece al orden *Piccovirales*, a la familia *Parvoviridae*, género *Protoparvovirus*, especie *Protoparvovirus carnívoro 1* (10). Es un virus no envuelto de una sola cadena de ADN en sentido negativo con un diámetro de 18-

26 nm, un peso molecular de 5.2 kb, y de forma icosaédrica simétrica (11). Posee dos marcos de lectura abiertos (ORF): el ORF 1, que codifica para las proteínas no estructurales NS1 y NS2, y el ORF 2 que codifica para las dos proteínas estructurales VP1 (83 kDa) y VP2 (67 kDa). La VP1 participa en el transporte del virus y el ingreso al núcleo célula, la VP2 forma la cápside viral que empaqueta y protege al DNA, contiene los epítomos para la generación de anticuerpos neutralizantes (es más inmunogénica que la VP1) (12); y en ella se localiza el sitio de unión al receptor de transferrina tipo 1 (TfR) (13) (14) que se encuentre en la superficie de la membrana plasmática de la célula blanco. El virus se internaliza en la célula mediante endocitosis por clatrina y una vez dentro los viriones son transportados a través de endosomas tempranos, en donde se acidifica el medio y se facilita la exposición de la porción amino terminal de la proteína viral VP1, permitiendo la liberación de partículas virales al citosol (13).

Subtipos

Evolutivamente el virus de CPV está relacionado con el virus de la Panleucopenia felina (FPV), que fue reportado en 1920, presentando una homología del 99 % con CPV-2 (descrito en 1940) (15).

La adaptación de FPV a nuevos hospedadores no domésticos como zorros, tejones y minks se da por las mutaciones ubicadas en la depresión de la cápside. La primera mutación reportada, y que dio origen a CPV; se generó por un cambio de aminoácidos en la posición 564 de una Serina (Ser) a una Asparagina (Asn), y en la posición 568 de una Glicina (Gly), a una Alanina (Ala); la segunda mutación reportada de FPV se dio en la posición 93 de una Lisina (Lys) a una Asn y la

última posición 323 de un Ácido aspártico (Asp) a una Asn, dando origen a la variante CPV-2 (16)(17) que permitió un cambio de hospedero.

Durante los últimos 20 años, CPV-2 a derivado en tres subtipos por las mutaciones presentadas en los aminoácidos que codifican para la VP2. Estas mutaciones son de gran importancia ya que pueden modificar la facilidad de unión al receptor celular y con ello incidir en la capacidad de infección del virus o su tropismo (3). Por otro lado, los cambios en esta proteína pueden modificar su antigenicidad y tener un efecto en la capacidad del sistema inmune para generar una respuesta protectora y podrían explicar posibles fallas a la vacunación, si las vacunas empleadas no corresponden con los subtipos virales circulantes en la población (18). En un estudio realizado a 36 perros vacunados se menciona que 15 de ellos se identificaron con la variante CPV-2b y 21 con la variante CPV-2c, en estos casos la vacunación fue ineficaz para la protección contra estas variantes.

Dentro de las mutaciones registradas de la VP2, se destaca una en la posición 426, que genera los tres subtipos registrados hasta el momento CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c. La diferencia entre cada una de ellas radica en el cambio de aminoácidos y esto puede modificar la antigenicidad a cada uno los subtipos; por ejemplo: el subtipo a tiene una Asn en el epítipo A y el subtipo b tiene una Asp, permitiendo que el primero sea más antigénico que el b. Otra mutación reportada es en la posición 555, con el cambio de aminoácidos de una Valina (Val), por una Isoleucina (Ile) que confiere menor antigenicidad al subtipo a, la mutación reportada en la posición 426 cambia a un Acido glutámico en el subtipo c (18).

Se han descrito nuevas mutaciones en aminoácidos de la VP2 en las posiciones 267, 297, 324 y 440, ubicados en regiones de alta antigenicidad y en sitios asociados a la unión del receptor de transferrina. Lo anterior ha dado lugar a la aparición de nuevas variantes virales, cuyo estudio es esencial para saber si pueden evadir al sistema inmune y la respuesta a las vacunas tradicionales, facilitando la adaptabilidad y la diversidad que presenta CPV (19). Por ejemplo, se ha reportado que existe una mutación en la posición 305 que le permite recuperar la capacidad de infectar felinos, al igual que la mutación en la posición 87 cambiando los aminoácidos que se encuentran en la cápside viral de los tres subtipos (17).

El predominio de los subtipos de CPV varía dependiendo de las regiones geográficas; por ejemplo: en Asia el subtipo predominante es CPV-2a (19), el CPV-2b predomina en España, Alemania, Corea, Brasil y parte del norte de América, mientras que los primeros reportes de CPV-2c fueron en Italia en el 2000 y se ha llegado a distribuir en parte de América Latina, Europa e India (20). Las tres variantes se han reportado en África, Marruecos, Nigeria, Sudáfrica, Tanzania y Túnez (21) y en el caso de México el estudio realizado por Pedroza *et al.* en Guadalajara mostró que el subtipo predominante es CPV-2c (22).

La diseminación que presenta CPV-2 en las diferentes partes del mundo se ejemplifica debido a la investigación y la elaboración de estudios filogenéticos. Estos han permitido entender la transmisión y distribución de los diferentes genotipos y sugieren que las similitudes que se encuentran entre virus aislados, tanto en caninos como en carnívoros silvestres, permiten que exista una

antigenicidad cruzada (23). Un ejemplo de la distribución de Protoparvovirus canino fue mencionado por Uyangaa, en este estudio se aislaron, procesaron por la técnica de PCR y secuenciaron 42 muestras de la capital de Mongolia, y al compararlas con las reportadas en el Genk Bank se observó que varias de estas secuencias también fueron reportadas en países de Europa, Italia, China, India y Tailandia (20).

PCR y secuenciación

La técnica de PCR es empleada para amplificar regiones específicas de un agente y poder analizar las posibles mutaciones que se presentan en ella. Esta consiste en una reacción enzimática *in vitro* que amplifica una secuencia específica de DNA celular, para obtener millones de copias. La técnica se hace en tres etapas: desnaturalización, hibridación y extensión, esta reacción se realiza en los termocicladores donde se controlan los cambios de temperatura y tiempo. Al final de esta reacción se obtienen los productos de PCR o amplicones, que pueden ser analizados en geles de agarosa o de poliacrilamida (24).

La visualización de los geles de agarosa se realiza mediante la técnica de electroforesis de zona, que consiste en la separación de moléculas a través de una matriz sólida, dependiendo su tamaño y carga eléctrica, este tamaño se ve reflejado por marcadores de peso molecular que son fragmentos de DNA conocidos para calcular el tamaño aproximado de DNA del amplicón. Esto se hace utilizando un buffer que puede ser TAE o TBE, que facilita la migración de los ácidos nucleicos, que tienen carga negativa, al polo positivo. Al finalizar la corrida

de gel la banda se puede observar por tinción con bromuro de etidio que se intercala entre las bases de DNA y es fluorescente en luz ultravioleta (25).

Para reconocer el orden de los nucleótidos en un fragmento de DNA, se utilizan métodos a los que llamamos secuenciación. (26). Una vez obtenidas las secuencias para poder visualizarlas de una forma ordenada y saber de dónde provienen las muestras o si se han reportado anteriormente, se pueden utilizar los estudios filogenéticos y comparar, por medio la homología con otras muestras reportadas al rededor del mundo (27).

Estudios filogenéticos

Las secuencias obtenidas se utilizan, en la mayoría de los casos, para investigar y comparar la evolución que ha ocurrido entre especies. En el caso de CPV-2, la filogenia ayuda a comprender el parentesco entre las muestras estudiadas. Estas filogenias son representaciones o proyecciones en forma de diagrama bidimensional o multidimensional que pueden ser estimadas con diferentes aproximaciones como son máxima parsimonia, máxima verosimilitud, e interferencia bayesiana, dependiendo de los datos que se lleguen a tener o el propósito de cada investigación. En los estudios macro evolutivos se expresan en forma de filogenias que son diagramas en forma de árboles donde se representan relaciones entre cada una de ellas, la raíz representa el origen o ancestro común de lo que se analiza y cada punto de bifurcación (nodo), se conoce como rama y la parte final de las secuencias analizadas se les llama terminales. Este enfoque propone que una vez formados los linajes, ya no intercambian información genética entre sí (27). Los productos de cada una de estas formas de análisis

tienen propiedades diferentes, por lo que pueden ser usados para conocer la tasa de evolución de un linaje, elaborar una escala temporal o entender como ha sido el proceso de cambio (28).

El análisis de la secuenciación ayuda a entender la evolución tanto de una manera molecular como epidemiológica. En otros países ha servido para conocer las variantes circulantes de la parvovirus y demostrar que estos subtipos han desplazado a la variante original de CPV-2 utilizada en la mayoría de las vacunas comerciales actuales. Además, permite analizar las mutaciones presentadas en la VP2, el origen de los subtipos, y la evolución que han tenido de forma local en algunos países y su relación con la situación que se presenta sobre esta enfermedad a nivel mundial (28).

Justificación

El análisis y secuenciación de las muestras recolectadas nos ayudará a conocer las variantes que circulan en el área metropolitana del Valle de México como CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c, para generar información y poder ayudar a crear nuevas herramientas para el control de la enfermedad, ya sea en los ámbitos de medicina preventiva o medicina aplicada a la clínica.

Hipótesis

La variante de CPV-2 que predomina en la población canina del área metropolitana del Valle de México es CPV-2c.

Objetivo general

Identificar las variantes de CPV-2 en muestras de heces de cachorros con parvovirus canina del área metropolitana del Valle de México, mediante la secuenciación de un fragmento de la proteína de cápside VP2.

Objetivos particulares

- Obtener valores hematológicos y muestras de heces de cachorros diagnosticados con parvovirus canino mediante una prueba rápida en hospitales del área metropolitana del Valle de México.
- Confirmar que las muestras sean positivas mediante la técnica de PCR.
- Obtener productos de PCR con la cantidad adecuada para realizar la secuenciación del fragmento de CPV-2 de interés.
- Realizar la secuenciación de los productos de PCR e identificar la variante de CPV-2.
- Realizar un árbol filogenético para conocer el origen y las relaciones filogenéticas de las variantes circulantes en el Valle de México.
- Hacer un análisis descriptivo de los signos clínicos, hematocrito y cuentas leucocitarias de los cachorros en los que se logró determinar el subtipo viral.

Material y métodos

Población de estudio

Se seleccionaron, entre los años 2019-2020, cuarenta pacientes previamente identificados como positivos a CPV-2 por medio de la técnica de Inmunocromatografía provenientes de clínicas y hospitales veterinarios del Valle de México. De estos pacientes se obtuvieron muestras de heces y se midieron sus valores hematológicos.

Obtención y conservación de las muestras

Se colectaron entre 1-5 gr de heces directamente del recto, con un hisopo estéril, se almacenaron en tubos sin anticoagulante con 1 mL de solución salina fisiológica estéril (SSF) y se mantuvieron en cadena de refrigeración para su transporte al Laboratorio de Virología FMVZ-UNAM. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos para obtener los sobrenadantes que fueron colocados en DNAzol (Probiotek) en relación 1:1 para conservarlas a -75°C.

Extracción de DNA

A cada una de las 40 muestras conservadas en DNAzol se le añadieron 10 µl de proteinasa K. Dicha mezcla fue colocada en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se incubó a 56 °C durante 15 minutos en un Termoblock.

Una vez terminado el periodo de incubación se adicionaron 250 µl de etanol al 100%, estas se homogeneizaron y se dejaron reposar 3 minutos, después del tiempo transcurrido se observó una precipitación de ADN, este precipitado fue colocado en tubos Eppendorf nuevos y se adicionó 1 mL de etanol al 75%. Las

muestras se centrifugaron en una centrifuga refrigerada (Eppendorf 5427R) a 12,000 rpm durante 15 minutos, se decantó el sobrenadante y se añadió 1 mL de etanol al 75 %, esto se realizó en una ocasión más; por último, se hidrataron con 50 µl de agua libre de DNAsas.

Reacción de PCR

Para la reacción de PCR se diseñaron los iniciadores para la proteína VP2; Fw 5' GACCAGCTGAGGTTGGTTATAG 3' y Rv 5' GGTGCATTTACATGAAGTCTTGG 3' y que incluyen la región de los nucleótidos de la posición 426, la amplificación se realizó con las concentraciones de reactivos señaladas en el cuadro 1, el producto de amplificación esperado es de 466 pb. La PCR se realizó en el Termociclador MultiGene Optimax. En el cuadro 2 se observan las condiciones de temperatura y tiempo del protocolo, el total de ciclos fue de 30. Como control positivo se empleó el DNA extraído de la vacuna comercial (Vanguard® Plus CPV Zoetis). El volumen de la reacción total de cada una de la mezcla de reacción fue de 50 µL.

Cuadro 1. Reacción de PCR del kit Mix Platinum II PCR MM.

Componentes de la reacción	50 µL rxn
Agua libre de nucleasas	Hasta 50 µL
Platinum II Hot Start PCR Master Mix (2X)	25 µL
10 µM primer Fw	1 µL
10 µM primer Rv	1 µL
DNA	15 µL
Platinum GC Enhancer	8 µL

Cuadro 2. Condiciones del termociclador para la amplificación de CPV-2.

	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineación	Extensión
Temperatura	95°C	95°C	55°C	72°C
Tiempo	3.0 min	0.30 min	0.30 min	0.30 min

Condiciones de la Electroforesis

Se preparó un gel de agarosa de grado molecular al 2 % y en cada pozo se colocó 2.5 µL de buffer de carga y 7.5 µL del producto amplificado. El gel se corrió a 100 volts por 30 minutos. Se empleó el marcador de peso Invitrogen[®], estándar de DNA de 100 pb a una concentración de 0.5 µg/ µL, para corroborar que todas las bandas tuvieran el peso molecular esperado de 466 pb. Cada gel se tiñió con bromuro de etidio para poder visualizar las bandas obtenidas.

PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Para la purificación de bandas se utilizó el kit de Zymoclean gel DNA Recovery[®] siguiendo las pautas del proveedor.

Cuadro 3. Pasos para la purificación con el Kit Zymoclean gel DNA Recovery[®]

1	Agregar 3 veces el peso de la agarosa ADB (Agarose Dissolving Buffer). (100 mg 300 md ADB).
2	Incubar 55 °C por 10 minutos.
3	Transferir el producto a los “Zymo-spin columns” en los tubos colectores.
4	Centrifugar 3,500 rv por 1 minuto.
5	Agregar 200 mg de DNA Wash Buffer.
6	Centrifugar 3,500 rv por 30 segundos y desechar el sobrante.
7	Agregar >6 mg de DNA Elution Buffer a la columna y pasar el sobrenadante a tubos de 1.5 mL.
8	Centrifugar 3,500 rv por 1 minuto

Secuenciación y análisis filogenético

La secuenciación se realizó en el Instituto de Fisiología Celular-UNAM por el método de Sanger. Los resultados obtenidos se analizaron y se limpiaron con el programa BioEdit del formato original ab1, para revisar la viabilidad de la muestra. Cada uno de estos archivos se convirtió en formato FASTA.

Se realizó una muestra consenso del Fw y Rv y se compararon en el GenBank. Se seleccionaron aquellas con un porcentaje superior al 95% usando Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del NCBI, utilizando 10 muestras complementarias del genoma parcial de la VP2, por cada muestra consenso. El análisis filogenético fue elaborado para el segmento genómico que codifica para la proteína VP2, empleando el programa MEGA X. Se alinearon las 18 muestras por el método Clustal IW, para corroborar las similitudes de las secuencias obtenidas como de las reportadas en la NCBI. Una vez alineadas todas las muestras el árbol filogenético se construyó por máxima verosimilitud con el modelo Tamura-Nei model a 1,000 repeticiones.

A continuación, se muestra un diagrama de flujo señalando los pasos que se siguieron en el estudio

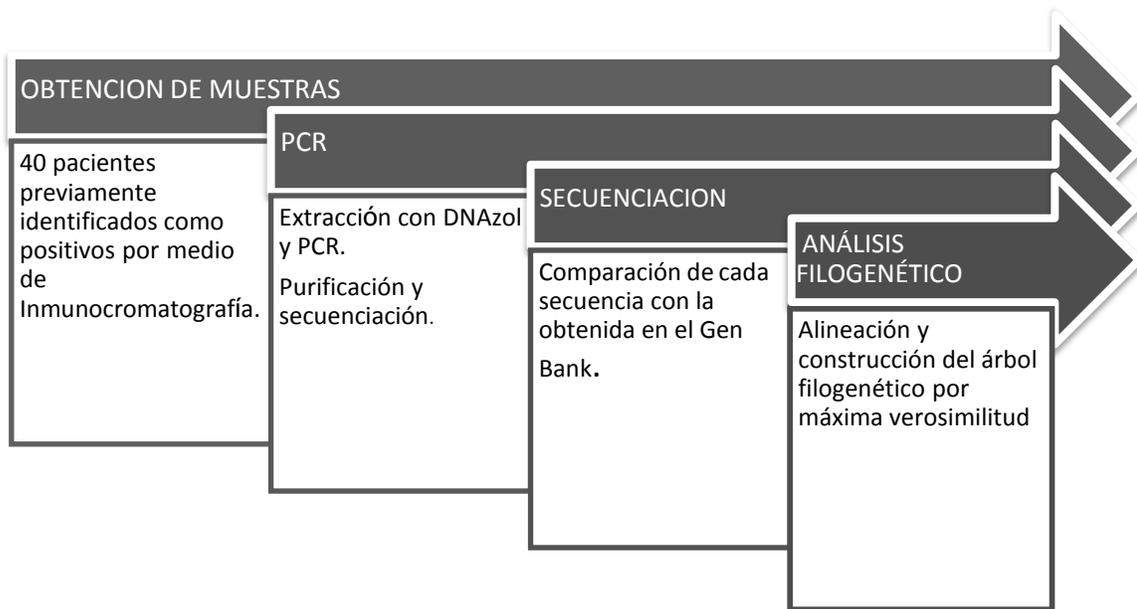


Figura 1. Diagrama de flujo con los pasos que se siguieron en este estudio

Resultados

De las 40 muestras que se obtuvieron de las diferentes clínicas, 29 se consideraron viables y se utilizaron para la cuantificación de los productos de PCR y para la purificación de las bandas de electroforesis por medio del Kit de purificación antes mencionado.

Los resultados de la cuantificación de DNA de las 40 extracciones se observan en el cuadro 5. Las 29 muestras que tenían la mayor concentración fueron amplificadas por PCR.

Cuadro 5. Cuantificación de la extracción de ADN de las 40 muestras de heces obtenidas.

Muestra ID	ng/microlitro	260/280	Muestra ID	ng/microlitro	260/280
Akira	17.3	0.8	Bruna	8.9	3.7
Toby1	23.4	1.6	Roc	54.2	1.1
Hemes	140.2	1.14	Coco	2.3	2.6
Marshall	3.4	1.31	Luna	4.1	1.5
Rosio	31.8	1.4	Lukas	5.3	1.1
Chip1	11.2	1.5	Pumba	4.7	1.4
Everest	14.1	1.5	Laysa	95.9	13.5
Sally	6.6	0.9	Toby2	42.6	1.1
Mía	0.1	0.2	León	21.9	0.9
Mina	58.8	1.1	Doki	35.8	1.3
Tony1	45.9	1.6	Toby3	20.3	1.3
Terry	16.2	1.0	Dolly	31.2	2.9
Chim1	4.3	26.0	Coco	14.4	1.9
Hércules	2.1	1.3	Akira	6.5	1.2
Cone1	14.5	2.2	Chip2	3.4	0.8
Rot	45.4	1.2	Tony B	92	1.1
Tyron B	15.7	1.5	Greta	21.7	1.4
Rayo	18.5	1.6	Winny	19.2	0.8
Oso	1.1	0.4	Dingo	22.1	0.7
4153	0.7	2.4	Chim2	25.3	0.9

Las muestras se corrieron en un segundo gel de electroforesis, se separaron por columnas y se cuantificaron. En el cuadro 6 se muestran las concentraciones obtenidas después de la purificación. Los primers que se utilizaron para la secuenciación se encontraban en una concentración de 10 micromolar y fueron los mismos que se usaron para la reacción de PCR. En los resultados obtenidos se verificó que todas las muestras seleccionadas entraran en el rango que se pide para el método de secuenciación (20-60 ng/microlitro) y aquellas que salieron del rango se les realizó una dilución 1/10.

Cuadro 6. Cuantificación a partir de 1.2 µl en nanodrop de las 29 muestras amplificadas por PCR y purificadas.

Muestras ID	ng/µL	260/280	Muestras ID	ng/µL	260/280
Hemes	23.9	2.7	Oso	20	1.9
Chip1	20.4	2.1	Roc	28.4	1.7
Sally	29	1.6	Lukas	38.6	1.8
Terry	22.6	1.4	Pumba	20	1.8
Marshall	24.7	1.9	Laysa	29.7	1.7
Hercules	22.9	1.7	Toby2 B	70.2	3.4
Mina	20.1	1.6	Leon B	53.5	2.4
Toby1 B	32.3	1.5	Doki B	29.5	5.9
Rosio	20.2	1.8	Toby3 B	53.6	2.6
Tyron B	47.8	1.3	Dolly	85.1	2.1
Cone 1	20.3	1.9	Coco	47.6	29.3
Rot	25.5	2.7	Winy	32.8	1.8
Rayo	119.3	1.9	Dingo	28.3	1.8
Luna	28.4	1.6	Chim2	315.3	1.8
Mia	24.7	1.6			

Gel de electroforesis

Cada uno de los geles de electroforesis, se corrieron con un marcador de peso molecular un control positivo de una vacuna comercial y un control negativo que es agua inyectable como se ejemplifica en la imagen 1, se cortaron las bandas de los geles de electroforesis después de confirmar que cada una estaba en un peso aproximado de 466 pb y se purificaron por columnas.

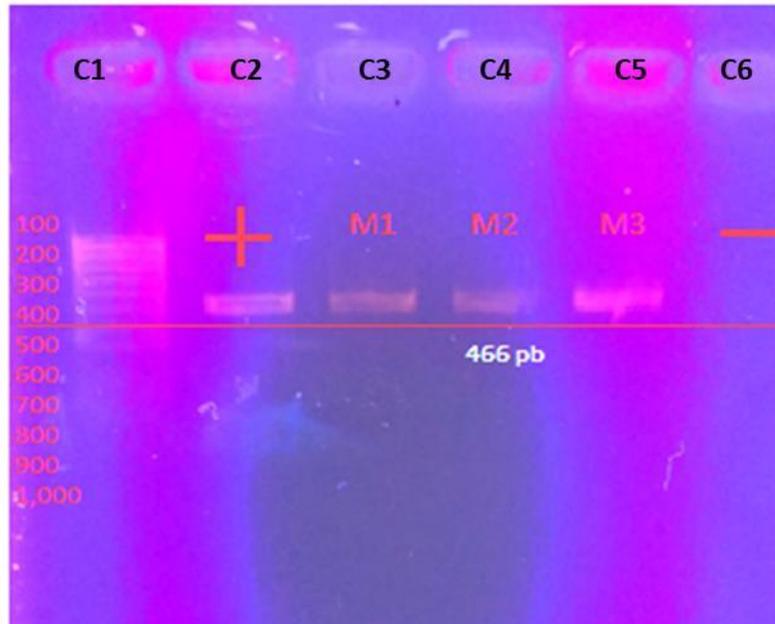


Imagen 1. Gel de electroforesis al 2% de agarosa. En el primer carril (C1) se observan las bandas correspondientes al marcador de peso molecular; en el carril 2 (C2), se observa el control positivo obtenido de una vacuna comercial, en los carriles C3, C4, C5 se corrieron 3 de las muestras que se mandaron a purificar que estaban en un peso aproximado de 466 pb, en el carril C6 se encuentra agua inyectable que se utilizó como control negativo.

Secuenciación

De las 29 muestras secuenciadas, 18 mostraron un porcentaje de alineación superior al 95% usando Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del NCBI y fueron utilizadas para realizar el análisis filogenético. Los números asignados a cada muestra se indican en el cuadro 7.

En la imagen 2 se aprecia un ejemplo del alineamiento de una de las muestras analizadas, mientras que en la imagen 3 se observa la alineación de todas las muestras analizadas.

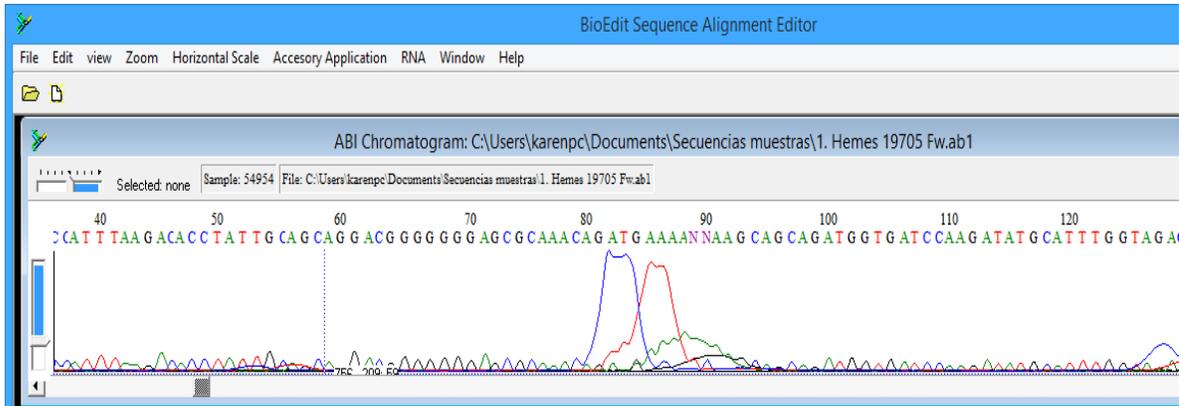


Imagen 2. Alineamiento de la muestra de Hemes mediante el programa BioEdit; En la imagen se muestra la secuencia parcial de Hemes que va de la posición 40 a la posición 128, estas muestras se encuentran en formato ab1, cada letra representando el nucleótido que se encuentra dentro de la secuencia T= Timina, A= Adenina G= Guanina, C= Citosina, que dependiendo la secuencia da el aminoácido que codifica para la proteína VP2. Los picos representados en esta parte de la muestra de Hemes se encuentran en cada una de las muestras por interferencia analítica sin afectar los resultados esperados.



Alineación

Imagen 3. Alineación de las muestras mediante el programa MEGA X. En la imagen se representan las 18 muestras obtenidas de la secuenciación con el consenso del Fw y Rv alineadas y completas, con dos muestras obtenidas en el GenBank de una secuencia

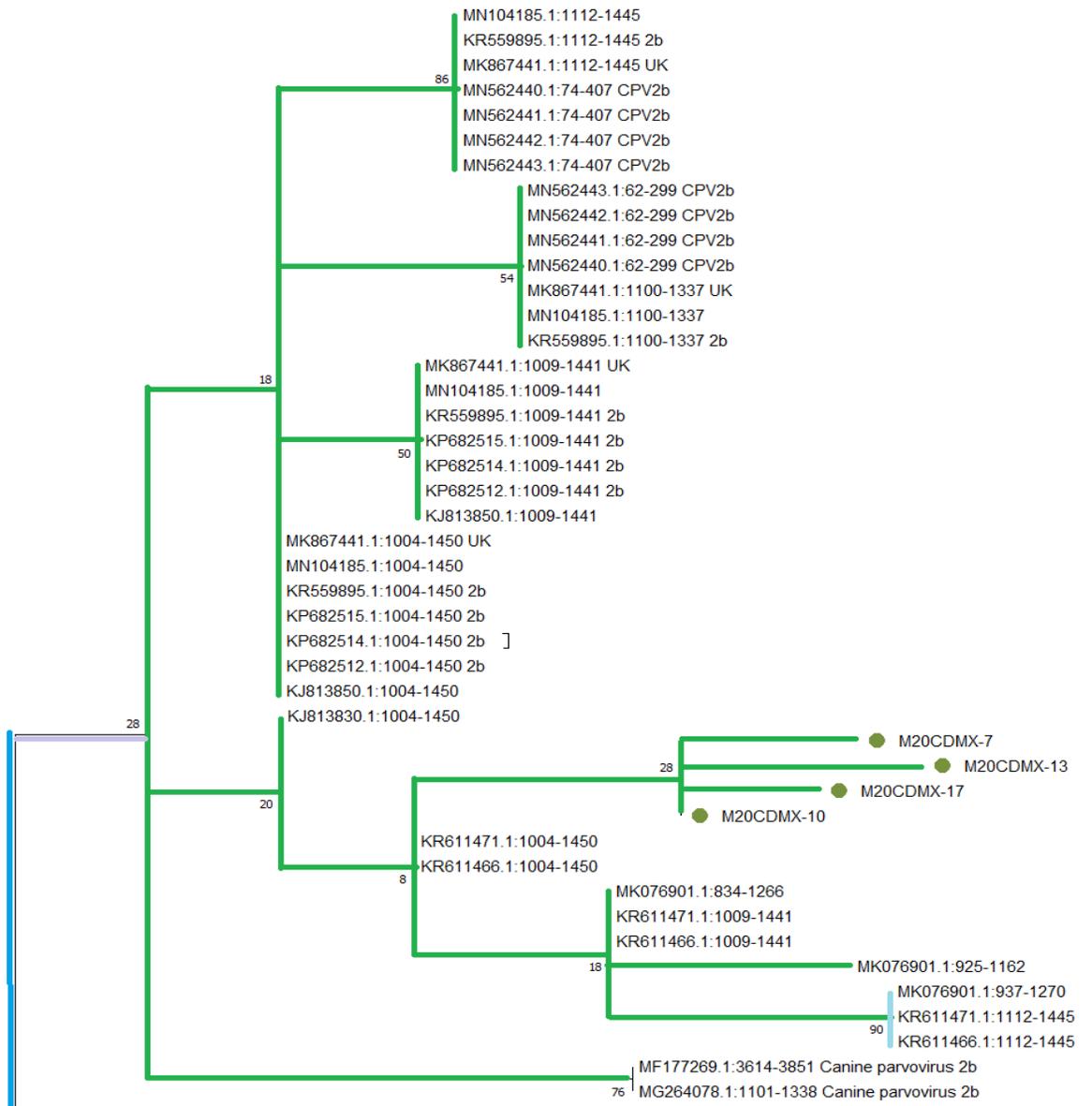
Completa de Protoparvovirus canino, cada color y letra en la imagen representa un nucleótido que codifican para los aminoácidos dentro de la proteína VP2 G= Guanina color morado, A= Adenina color verde, C= Citosina color azul, T= Timina color R.

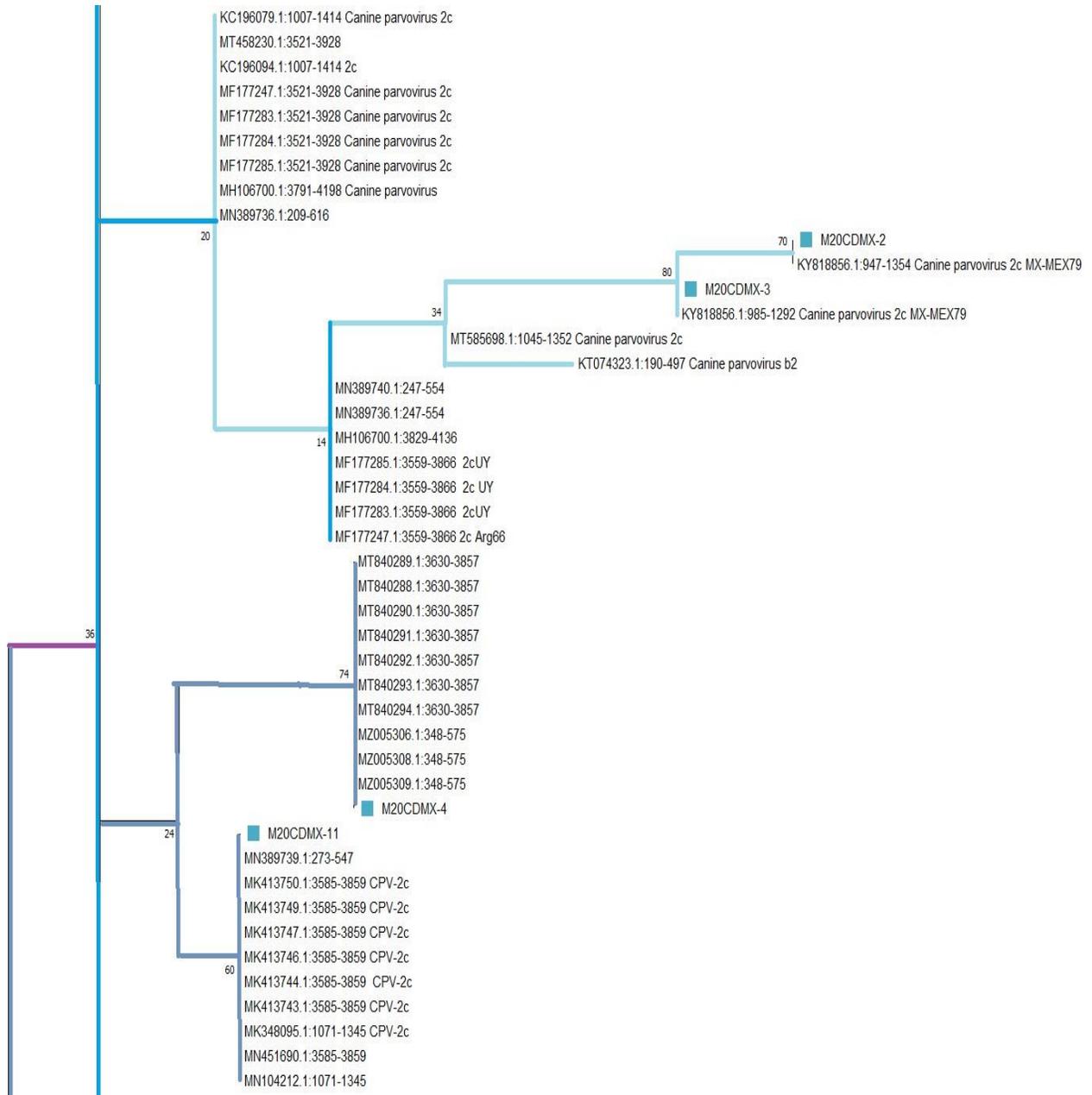
Árbol filogenético

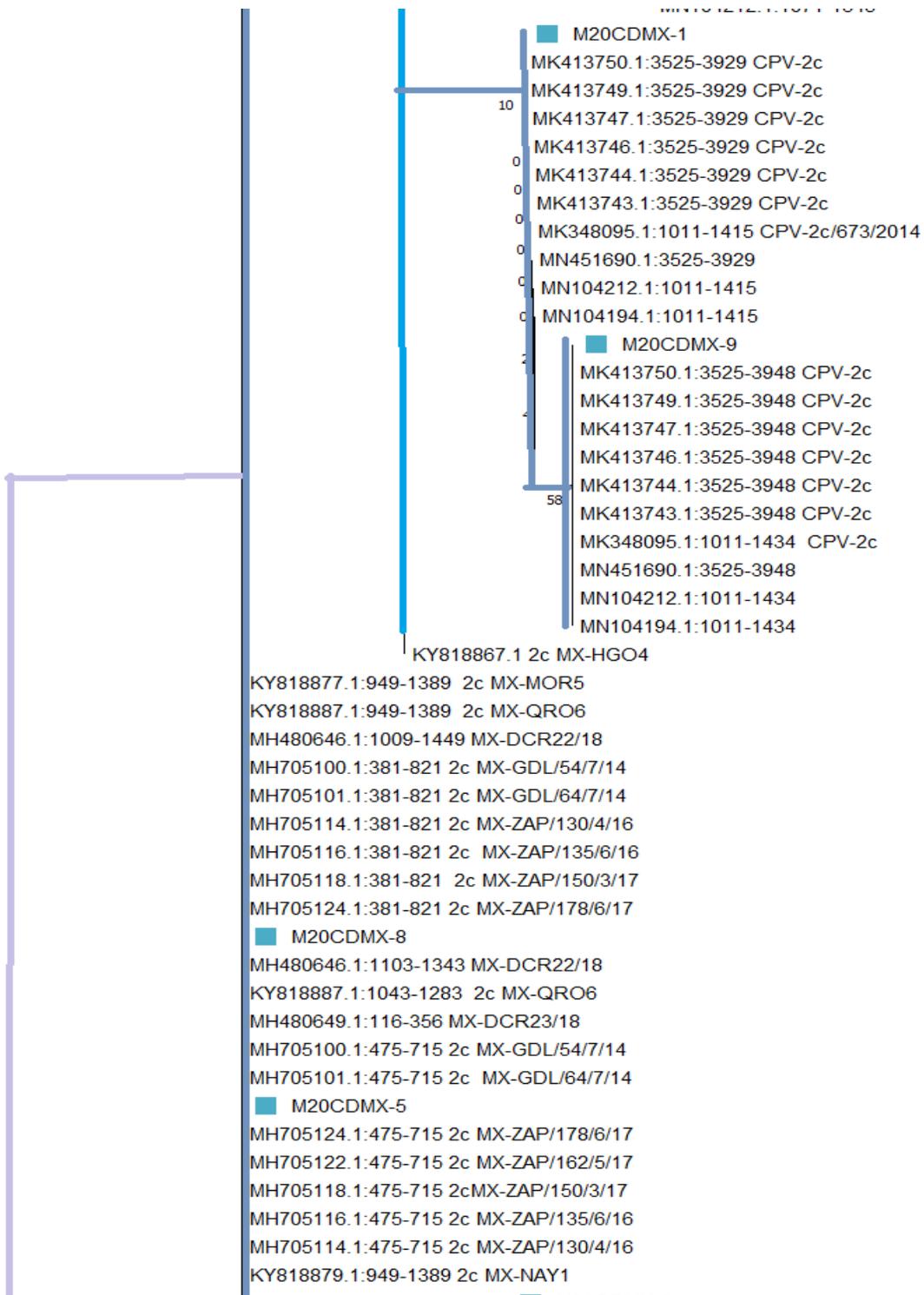
En el siguiente cuadro se observa la identificación de las muestras, dichas identificaciones se utilizaron para identificarlas en la construcción del árbol filogenético, el cual se observa en el figura 2.

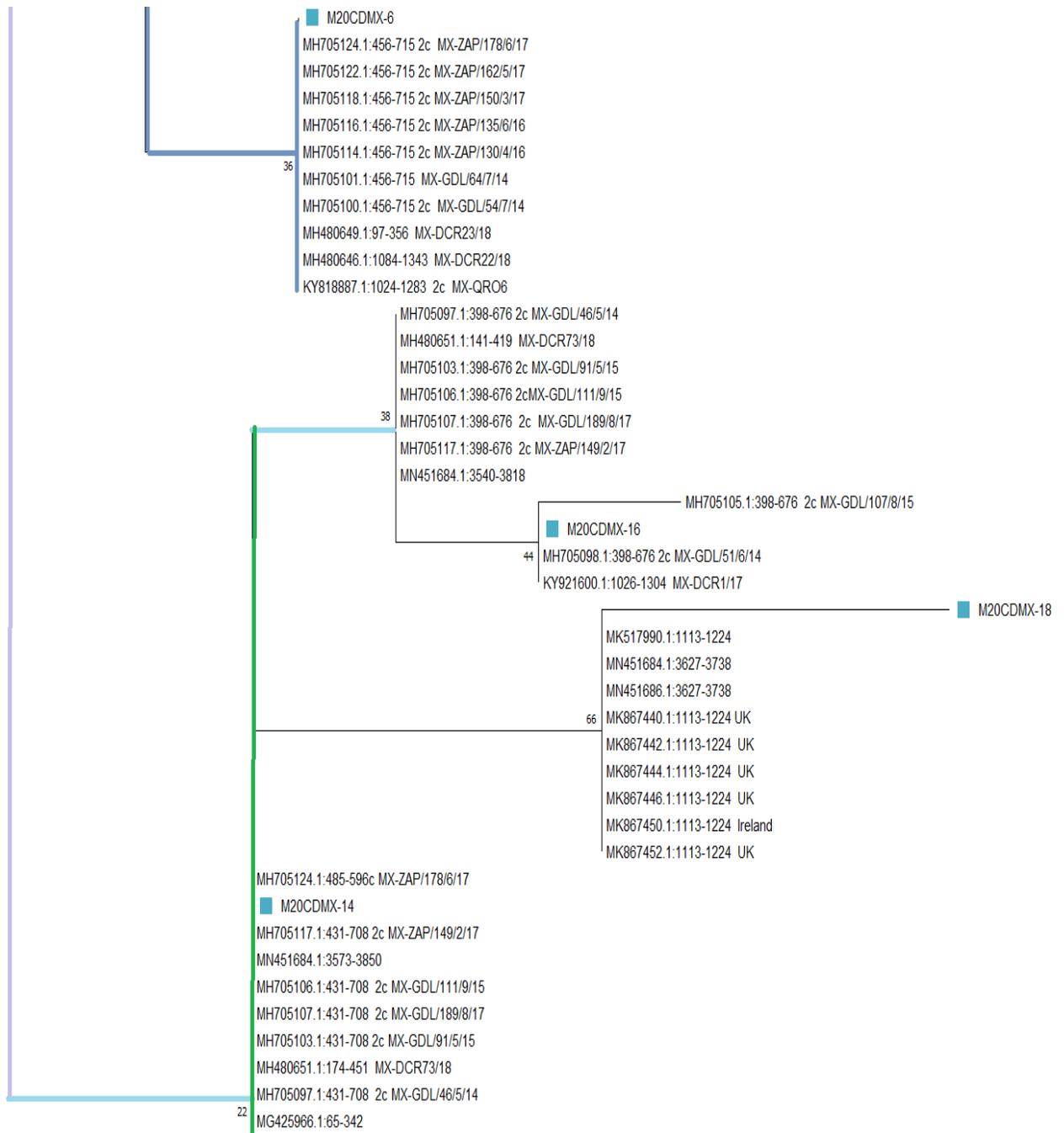
Cuadro 7. Identificación de las muestras para el árbol filogenético

Nombre de la muestra	N° de identificación asignado
Chip consenso	M20CDMX-1
Hemes consenso	M20CDMX-2
Lukas consenso	M20CDMX-3
Luna consenso	M20CDMX-4
Mia consenso	M20CDMX-5
Rayo consenso	M20CDMX-6
Roc consenso	M20CDMX-7
Winnie consenso	M20CDMX-8
Chim consenso	M20CDMX-9
Dingo consenso	M20CDMX-10
Laysa consenso	M20CDMX-11
Pumba consenso	M20CDMX-12
Oso consenso	M20CDMX-13
Rot consenso	M20CDMX-14
Cone consenso	M20CDMX-15
Hercules consenso	M20CDMX-16
Marshall consenso	M20CDMX-17
Sally consenso	M20CDMX-18









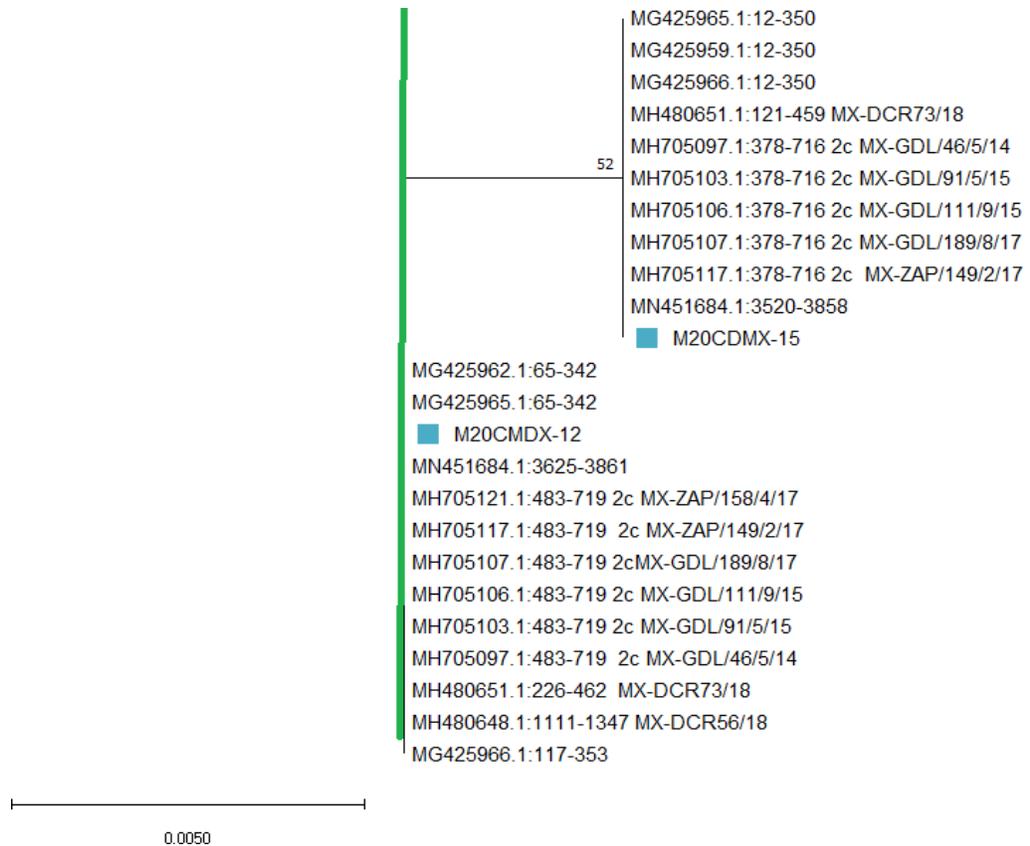


Figura 2. Árbol de Protoparvovirus canino por máxima verosimilitud, basado en los aminoácidos de la proteína estructural de la VP2. Las secuencias señaladas de color azul, representan el subtipo 2c y la relación que tienen cada una de ellas con las muestras obtenidas del GenBank. Las secuencias señaladas de color verde representan el subtipo 2b, relacionadas entre otras muestras reportadas en el Gen Bank, localizadas en el Valle de México. Cada una de estas muestras fue relacionada con un BLAST, para ver la relación con otras muestras de Protoparvovirus canino reportadas.

De las 18 muestras analizadas 4 fueron del subtipo 2b (22%) y 14 el subtipo 2c (78%), por lo que la variante predominante que circula en los pacientes analizados en este estudio corresponde al subtipo 2c. Ver cuadro 8.

Cuadro 8. Subtipos obtenidos en las 18 muestras consenso.

ID MUESTRA	Subtipo	ID MUESTRA	Subtipo
M20CDMX-1	2c	M20CDMX-10	2b
M20CDMX-2	2c	M20CDMX-11	2c
M20CDMX-3	2c	M20CDMX-12	2c
M20CDMX-4	2c	M20CDMX-13	2b
M20CDMX-5	2c	M20CDMX-14	2c
M20CDMX-6	2c	M20CDMX-15	2c
M20CDMX-7	2b	M20CDMX-16	2c
M20CDMX-8	2c	M20CDMX-17	2b
M20CDMX-9	2c	M20CDMX-18	2c

Mutaciones

Se observaron mutaciones en dos muestras del subtipo 2c (M20CDMX-2 y M20CDMX-3): se cambió un Ácido aspártico por una Asparagina en la posición 565 y en cinco de ellas (M20CDMX-2, M20CDMX-3, M20CDMX-12, M20CDMX-14, M20CDMX-15) se observó el cambio de una Treonina a una Alanina en la posición 578. Ver cuadro 9. En los subtipos b se mantuvo la Serina en la misma posición.

Cuadro 9. Mutaciones en los aminoácidos encontradas en el subtipo c

Muestra	N° codon	Aminoácido original	Cambio
M20CDMX-2 M20CDMX-3	565	Asp	Asn
M20CDMX-2 M20CDMX-3 M20CDMX-12 M20CDMX-14 M20CDMX-15	578	Thr	Ala

Análisis descriptivo

Los cuatro pacientes que presentaron la variante 2b fueron machos y tenían un rango de edad de entre 4 y 7 meses de edad, en cuanto a los resultados hematológicos no se encontró una similitud en sus valores ya que cada uno de ellos presentó diferentes rangos en el conteo de hematocrito leucocitos y neutrófilos. De los 14 pacientes que presentaron la variante 2c, 8 son machos y 6 hembras, todos de diferentes razas y con rangos de edad entre los 2 meses y un año de edad. El conteo de leucocitos va de un intervalo de $0.7 - 26.7 \times 10^9/L$ y en cada uno de los pacientes el conteo mostró diferencia entre ellos y un conteo de neutrófilos que tiene un intervalo amplio que va de $0.10 - 23.2 \times 10^9/L$. No fue posible realizar una comparación entre los signos clínicos, hematocrito y valores hematológicos de los perros que tenían la infección con el subtipo 2b y los del 2c, debido a que solamente 4 perros eran del subtipo 2b y no se contaba con todos los valores. Los datos de los 18 perros se muestran en el cuadro 10.

Cuadro 10. Datos de los pacientes, con sus valores hematológicos y el subtipo viral reportado.

ID	Sub.	Raza	Edad (meses)	Sexo	SC	Hematocrito (L/L)	Leucocitos ($\times 10^9/L$)	Neutrófilos ($\times 10^9/L$)
M20CDMX-7	2b	Mestizo	4	M	SD	SD	SD	SD
M20CDMX-10	2b	Pastor Alemán	4	M	V,D	0.46	26.7	23.2
M20CDMX-13	2b	Pug	5	M	SD	0.44	3.2	0
M20CDMX-17	2b	Dogo Alemán	4	M	SD	SD	SD	SD
M20CDMX-1	2c	Chihuahueño	7	M	SD	0.46	0.7	0.1
M20CDMX-2	2c	Labrador Dorado	4	M	V,D	SD	SD	SD
M20CDMX-3	2c	Schnauzer	8	M	V,D	0.45	4.2	2.4
M20CDMX-4	2c	Schnauzer	4	H	SD	0.38	2.1	1.3
M20CDMX-5	2c	Chihuahueño	12	H	SD	0.52	13.8	12.3
M20CDMX-6	2c	Schnauzer	4	M	SD	0.50	2.1	1.3
M20CDMX-8	2c	Cocker Spaniel	2	H	V,D,A	0.38	9.2	7.7
M20CDMX-9	2c	Pastor Alemán	5	M	SD	0.19	22.9	15.1
M20CDMX-11	2c	Mestizo	12	H	GH, F	0.59	0.2	0.1

M20CDMX-12	2c	Akita	3	H	V, A	SD	SD	SD
M20CDMX-14	2c	Mestizo	4	M	SD	0.38	7.2	4.8
M20CDMX-15	2c	Mestizo	5	M	SD	0.38	14.4	11.6
M20CDMX-16	2c	Pitt Bull	2	M	SD	0.42	1.1	0.1
M20CDMX-18	2c	Mestizo	3	H	SD	0.41	79	5.5

M: Macho, H: Hembra, V: Vómito, D: Diarrea, A: Anorexia GH: Gastroenteritis Hemorrágica, F: Fiebre, SD: sin dato, SC: signos clínicos

Discusión

En este estudio se secuenciaron 18 muestras de CPV-2 obtenidas de clínicas y hospitales veterinarios del Valle de México y se determinó que la variante predominante fue la 2c. Lo anterior concuerda con lo reportado por Pedroza-Roldan et al (22), quienes en el 2015 reportaron que la variante 2c predominaba en Guadalajara Jalisco, tras analizar 24 muestras. En el 2018 se realizó otra investigación por Faz Mirna et al (29) a partir de un muestreo en 5 zonas geográficas que abarcaban 13 estados de México (Querétaro, Guanajuato, Nayarit, Hidalgo, Sonora, Aguascalientes, Tamaulipas, Morelos, Baja California Norte, Michoacán, Yucatán, Puebla y Estado de México). En dicho estudio, se analizaron 50 muestras y se encontraron dos variantes: la 2c (78%) y la 2b (22%); en el estudio concluyen que la primera provenía de Europa (Italia y Alemania) y la segunda de Estados Unidos.

Conocer la diversidad de las variantes que circulan en el mundo es relevante, pues distintos estudios han demostrado que las mutaciones generan cambios antigénicos en el virus que modifican su virulencia y con ello la presentación clínica de la enfermedad; además, la protección de ciertas vacunas puede verse disminuida si la variante circulante no coincide con la vacunal. En este sentido, desde que en 1978 se reportó la aparición de CPV-2, provocando cuadros

Gastroentéricos en cachorros, el virus se ha ido modificando: en 1979 surgió la primera variante CPV-2a y años después (1984) la CPV-2b. Estas dos variantes desplazaron a la original, tanto en cachorros como en perros adultos (17).

En el 2000 se reportó en Italia la aparición de una tercera variante CPV-2c que, en la mayoría de los países, ha desplazado a CPV-2a. Esta presenta una mutación entre las posiciones 93 y 300, es altamente contagiosa, y ha logrado logrando una mejor unión al receptor de la célula blanco (16). En Asia todavía se detecta la variante CPV-2a (22), mientras que en África (Nigeria Sudáfrica, Tanzania y Tusiinia) circulan las tres: CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c (18). En otros estudios de América central se también se menciona a la variante 2c como la causante del 54 % a 96% de los casos de CPV-2 (23) y en América latina se han reportado tanto la variante CPV-2b como la CPV-2c (29).

La mutación del virus en su proteína de cápside VP2, ha permitido su adaptación a distintas especies; así, la variante CPV-2 surgió por la mutación en la posición 323 le dio la capacidad de infectar caninos y mutaciones en la posición 87 y 305 pueden recuperar la capacidad de infectar a felinos (17). Además, las mutaciones en la posición 426 son las responsables del surgimiento de nuevas variantes; por lo que identificar cambios en esta región es de suma relevancia.

En este estudio se encontraron mutaciones en dos muestras del subtipo 2c (M20CDMX-2 y M20CDMX-3): se cambió un Ácido aspártico por una Asparagina en la posición 565; y en cinco de ellas (M20CDMX-2, M20CDMX-3, M20CDMX-12, M20CDMX-14, M20CDMX-15) se observó el cambio de una Treonina a una

Alanina en la posición 578. Estas no han sido reportadas en otros artículos, por lo que en futuros trabajos habría que estudiar si estas mutaciones podrían generar cambios en la proteína VP2, en la viremia o alteraciones en la presentación de la enfermedad (lo cual no fue posible realizar, por la cantidad de muestras que se trabajaron en el estudio). Se reporta en Ecuador que la variante CPV-2c; presenta cambios en la posición 514, una de las regiones más antigénicas de la proteína VP2, pero aparentemente ninguna está asociada a interferencia en la función de la cápside viral o a un cambio estructural (31).

Los aislamientos encontrados en nuestro estudio tienen una relación estrecha con muestras que fueron aisladas en otras partes de México y Argentina (ver Figura 2). En el caso de la variante 2b se encontró una homología con muestras aisladas de Inglaterra, pero también ejemplifica una politomia porque no hay una cercanía para saber si están emparentados.

Una excelente forma de controlar las enfermedades infecciosas es con ayuda de la vacunación y en concordancia con la prevalencia de la enfermedad en la zona en donde se encuentre el animal. En el caso de Protoparvovirus canino en algunos programas de vacunación de medicina preventiva se recomienda a los propietarios contemplar una vacunación anual. Sin embargo, pocas veces se hace el análisis sobre si las variantes circulantes coinciden con las cepas vacunales. En el caso de México, casi todas las vacunas comerciales tienen solamente la variante CPV-2b y CPV-2a, excepto Nobivac que contempla la CPV-2c, para su protocolo de vacunación (32); esto es relevante, pues como ya se mencionó la variante predominante en nuestro país es esta última y si los médicos no contemplar

vacunar con biológicos que la incluyan, podría haber una menor protección conferida por la vacunación. En este sentido, en el estudio de Faz Mina (29) se relacionaron las secuencias vacunales reportadas en el Gen Bank con las variantes aisladas en los perros y concluyeron que ninguna de las muestras tiene un 100 % de homología entre ellas o con las cepas de vacunas comerciales distribuidas en México, lo que las hace variantes exclusivas del país. Spibey y Greenwood realizaron una investigación en el año 2007 en Italia en el que comprobaron que existe una antigenicidad cruzada con vacunas de CPV-2 virus atenuado de las variantes a y b, o si la vacuna de Nobivac con la variante CPV-2c confería una protección eficaz; para ello utilizaron perros sanos vacunados entre las 8-10 semanas de edad y desafiados un mes después con la variante CPV-2c, y demostraron que los animales vacunados pueden tener una protección contra la variante CPV-2c que ellos aislaron y que el título de excreción viral por heces es bajo en comparación con los animales no vacunados. Pero también observaron que la mitad de los animales del grupo control no vacunados sobrevivieron, indicando que esta fue por la respuesta inmune del propio animal (30). Por otro lado, en el estudio de la Torre *et al* (31) se encontró que los animales que fueron positivos a la variante 2c no contaban con un cuadro de vacunación o este estaba incompleto, por lo que solamente pudieron relacionar la enfermedad con la falta de medicina preventiva.

La protección conferida por las vacunas también podría estar influenciada por la edad a la vacunación, Prittie menciona la interferencia de los anticuerpos maternos por protocolos de vacunación a temprana edad y propone que esto

Podría ser la causante de que varios de los perros vacunados adquieran Parvovirus canino; otra propuesta es los cuadros de vacunación incompletos y la falta de vacunación en los animales susceptibles por condiciones insalubres (7). Faz Mina y colaboradores también mencionan que el 32% de los perros muestreados fueron vacunados al menos una vez, reportando que la susceptibilidad a Protoparvovirus canino pudo ser una interferencia con los anticuerpos maternos y que esta vacunación no les confiriera una protección adecuada (29).

Finalmente, los cuatro pacientes que presentaron la variante 2b tenían un rango de edad de entre 4 y 7 meses de edad; mientras que los 14 pacientes que presentaron la variante 2c, variaban entre los 2 meses y un año; no se pudo correlacionar ni la edad, ni otras variables (como el hematocrito leucocitos y neutrófilos) con la variante encontrada. Los rangos de edad que presentaron los animales de este estudio coinciden con los reportados por De la Torre et al (31).

Conclusión

Esta investigación nos muestra que entre los años 2019-2020 la variante predominante en el Valle de México es el subtipo 2c, y que estas secuencias tienen una relación estrecha con aislados en otras partes de México y Argentina. En el caso de la variante 2b se encontró una homología con muestras aisladas de Inglaterra, pero también ejemplifica una politomía. Las variantes encontradas mostraron mutaciones en la posición 578 y en la posición 565 que no han sido reportadas en otros artículos.

Prospectiva

Una prospectiva de este estudio sería realizar un mayor número de muestreos para determinar si las mutaciones encontradas son consistentes en México y analizar qué cambios podría generar en la proteína VP2, así como la posible correlación con la presentación de signos clínicos, hallazgos hematológicos o virulencia.

Bibliografía

1. Nandi S, Kumar M. Canine parvovirus: Current perspective. *Indian J Virol.* 2010;21(1):31-44.
2. Kulkarni MB, Deshpande AR, Gaikwad SS, Majee SB, Suryawanshi PR, Awandkar SP. Molecular epidemiology of Canine parvovirus shows CPV-2a genotype circulating in dogs from western India. *Infect Genet Evol.* 2019;75(July):1-7.
3. Decaro N, Desario C, Campolo M, Elia G, Martella V, Ricci D, et al. Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. *J Vet Diagnostic Investig.* 2005;17(2):133-8.
4. Goddard A, Leisewitz A. Canine Parvovirus. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice.* 2010;40(6):1041-1053.
5. Luengo ME, Flores AJ, Gutiérrez JA. Aspectos endoscópico e histopatológico de las gastroenteritis víricas caninas producidas por Parvovirus y Coronavirus. A propósito de 4 casos clínicos. *Col Vet Buenos Aires.* 2002;(July):1-5.

6. Kilian E, Suchodolski JS, Hartmann K, Mueller RS, Wess G, Unterer S. Long-term effects of canine parvovirus infection in dogs. *PLoS One*. 2018;13(3):1-11.
7. Prittie J. Canine parvoviral enteritis: A review of diagnosis, management, and prevention. *J Vet Emerg Crit Care*. 2004;14(3):167-76.
8. Iris Kalli, Leontides LS, Mylonakis ME, Adamama-Moraitou K, Rallis T, Koutinas AF. Factors affecting the occurrence, duration of hospitalization and final outcome in canine parvovirus infection. *Res Vet Sci*. 2010;89(2):174-8.
9. Elia, G., Cavalli, A., Cirone, F., Lorusso, E., Camero, M., Buonavoglia, D., & Tempesta, M. (2005). Antibody Levels and Protection to Canine Parvovirus Type 2. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 52(7-8), 320-322.
10. International committee on taxonomy of viruses ICTV [Internet]. Available from: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>No Title
11. Yu Yongle, Zhang Jianlou, Wang Jigui, Xi Ji, Zhang Xiaomei, Li Peiran, Liu Ying LW. Naturally occurring right terminal hairpin mutation in three genotypes of canine parvovirus (CPV-2a, CPV-2b and CPV-2c) have no effect on their growth characteristics. *Virus Res*. 2019; 261:1-9.
12. Galvis CC, Jimenez-Villegas T, Romero DPR, Velandia A, Taniwaki S, de Souza Silva SO, et al. Molecular diversity of the VP2 of Carnivore protoparvovirus 1 (CPV-2) of fecal samples from Bogotá. *J Vet Sci*. 2022;23(1):1-11.
13. Cotmore SF, Tattersall P. Parvoviral host range and cell entry mechanisms. *Adv Virus Res*. 2007;70:183-232.
14. N. James M, Dubovi EJ. Chapter 12 – Parvoviridae. *Fenner’s Vet Virol*. 2017;245-257.

15. Parrish, Colin R.Voorhees, Ian E.H. Hafenstein, Susan L., Parvoviruses of Carnivores, and the Emergence of Canine Parvovirus (Parvoviridae), 2021 Elsevier Ltd. Vol. 2 683-687.
16. Díaz R. C, Correa JJ, Vera A. VJ. Aspectos moleculares del virus de la parvovirus canina y sus implicaciones en la enfermedad. Rev med vet. 2008;57-65.
17. Carrai M, Decaro N, Van Brusell K, Dall'Ara P, Desario C, Fracasso M, et al. Canine parvovirus is shed infrequently by cats without diarrhoea in multi-cat environments. Vet Microbiol. 2021;261(August).
18. Terzungwe M, Kundu F, Ikejiofor K, Olutayo T, Aondowase A, Aondonenge S, et al. Infection, Genetics and Evolution Genetic diversity of canine parvovirus variants circulating in Nigeria. Infect Genet Evol [Internet]. 2021;94(June):104996.
19. Buonavoglia C, Martella V, Pratella A, Tempesta M, Cavalli A, Buonavoglia D, et al. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. J Gen Virol. 2001;82(12):3021-5.
20. Chang D, Liu Y, Chen Y, Hu X, Burov A, Puzyr A, et al. Study of the immunogenicity of the VP2 protein of canine parvovirus produced using an improved Baculovirus expression system. BMC Vet Res. 2020;16(1):1-9.
21. Apaa TT, Daly JM, Tarlinton RE. Canine parvovirus (CPV-2) variants circulating in Nigerian dogs. 2016;(October).
22. Pedroza-Roldán C, Páez-Magallan V, Charles-Niño C, Elizondo-Quiroga D, Leonel De Cervantes-Mireles R, López-Amezcu MA. Genotyping of Canine parvovirus in western Mexico. J Vet Diagnostic Investig. 2015;27(1):107-11.
23. Organtini LJ, Allison AB, Lukk T, Parrish CR, Hafenstein S. Global Displacement of

- Canine Parvovirus by a Host-Adapted Variant: Structural Comparison between Pandemic Viruses with Distinct Host Ranges. *J Virol.* 2015;89(3):1909-12.
24. Díaz AS, Rentería LF. PCR: reacción en cadena. 2014:53-74.
 25. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad.* 2013;2(2):71-73.
 26. Margarita, Laura, Valdelamar, Márquez, Serrato, Alejandra, Cerritos, René, Secuenciación de fragmentos de ADN, Herramientas moleculares aplicadas a la ecología, 2004 pg: 231-250,
 27. Leopardi-verde CL. Filogenias: conceptos y generalidades Phylogenies: concepts and generalities. 2021;4(11):7-25.
 28. Clegg SR, Coyne KP, Parker J, Dawson S, Godsall SA, Pinchbeck G, et al. Molecular Epidemiology and Phylogeny Reveal Complex Spatial Dynamics in Areas Where Canine Parvovirus Is Endemic. *J Virol.* 2011;85(15):7892-9.
 29. Faz M, Martínez JS, Gómez LB, Quijano-Hernández I, Fajardo R, Del Ángel-Caraza J. Origin, and genetic diversity of canine parvovirus 2c circulating in Mexico. *Arch Virol [Internet].* 2019;164(2):371-9.
 30. Spibey N, Greenwood NM, Sutton D, Chalmers WSK, Tarpey I. Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. 2008; 128:48-55.
 31. De la Torre D, Mafla E, Puga B, Erazo L, Astolfi-Ferreira C, Ferreira AP. Molecular characterization of canine parvovirus variants (CPV-2a, CPV-2b, and CPV-2c) based on the VP2 gene in affected domestic dogs in Ecuador. *Vet World.*

2018;11(4):480-487.

32. Norvirbac, Parvovirus canino, una nueva variante en Argentina: CPV-2c
<https://www.nobivac.cl/offload-downloads/parvovirus-2c-nueva-variante-argentina-pdf/>, Intervet, Shering-Plough animal health