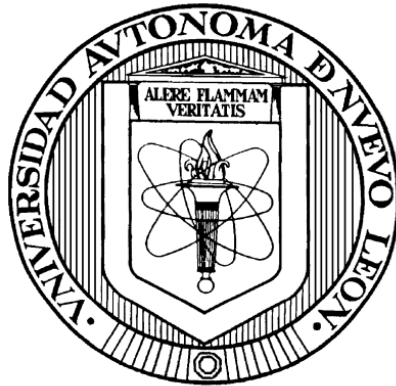


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



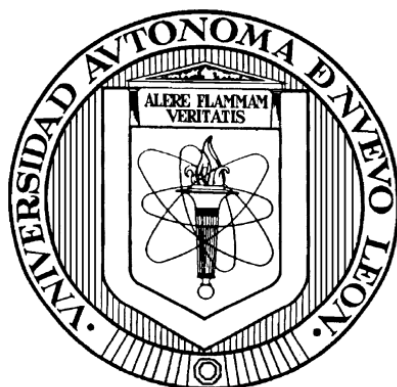
**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE CEPAS DE PARVOVIRUS CANINO
PRESENTES EN EL ÁREA METROPOLITANA DE MONTERREY, NUEVO LEÓN**

**POR
DOMENICA CEDILLO ROSALES**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

NOVIEMBRE, 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA



CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE CEPAS DE PARVOVIRUS CANINO
PRESENTES EN EL ÁREA METROPOLITANA DE MONTERREY, NUEVO LEÓN

POR
DOMENICA CEDILLO ROSALES

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL

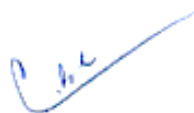
NOVIEMBRE, 2019

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE CEPAS DE PARVOVIRUS CANINO
PRESENTES EN EL ÁREA METROPOLITANA DE MONTERREY, NUEVO LEÓN**

COMITÉ DE TESIS:



DRA. SIBILINA CEDILLO ROSALES
DIRECTORA DE TESIS



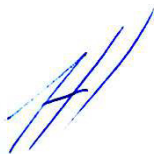
DR. JUAN F. CONTRERAS CORDERO
DIRECTOR EXTERNO DE TESIS



DR. RAMIRO ÁVALOS RAMÍREZ
CODIRECTOR DE TESIS



DR. CÉSAR PEDROZA ROLDÁN
CODIRECTOR EXTERNO DE TESIS



MC. ARMANDO TREJO CHÁVEZ
CODIRECTOR DE TESIS



DRA. MARTHA V. GARZA ZERMEÑO
CODIRECTORA DE TESIS

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE CEPAS DE PARVOVIRUS CANINO
PRESENTES EN EL ÁREA METROPOLITANA DE MONTERREY, NUEVO LEÓN**

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Virología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Sibilina Cedillo Rosales.

DRA. SIBILINA CEDILLO ROSALES

DIRECTORA DE TESIS

DR. RAMIRO ÁVALOS RAMÍREZ

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA VETERINARIA, FMVZ, UANL.

DEDICATORIA

Para mi esposo Rolando Alvarado Coronado y mis hijas hermosas Karol y Domenica.

Dedicada a mis papás Aida y Víctor que siempre están para apoyarme.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por el apoyo brindado durante el tiempo que permanecí en la dependencia realizando por segunda vez mis estudios de posgrado, así como la Facultad de Agronomía, que fue mi segunda casa (espacio de cubículos) donde realicé mucho del trabajo que se ve reflejado en esta tesis.

Agradezco especialmente, a mi Comité de tesis que fue un gran apoyo durante el desarrollo de esta investigación, al Dr. Ramiro por todo el apoyo brindado en el laboratorio, en el salón de clases y como un gran mentor. Un agradecimiento especial a la Dra. Vicky que me apoyo con material de trabajo y muestras, así como los datos obtenidos del Hospital de la FMVZ. Agradezco, además, al Mc. Armando que me apoyo con la parte de patología en este trabajo. Por otro lado, un inmenso agradecimiento a mis codirectores externos el Dr. Juan Francisco Contreras, muchas gracias por el apoyo que recibí de usted. Además, un especial agradecimiento al Dr. Cesar Pedroza Roldan de la UdeG que me apoyo al enseñarme la metodología del PCR-RFLP y permitirme procesar algunas muestras en su departamento; además un especial agradecimiento a todo el personal, colaboradores y tesisistas del Dr. Cesar que me hicieron la estancia más placentera y enriquecedora. Por último, quiero agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Sibilina Cedillo Rosales, por el apoyo brindado no solo en este trabajo, sino a cada momento de la vida.

Agradecer, además, a todos mis compañeros de generación (Mimi, Chapis, Cata, Elena, Denisse, Alvin, Gustavo y Lalo) que me permitieron crecer con ellos académicamente, pero a la vez formar lazos de amistad que conservaré por siempre, y a los cuales dedico este escrito.

Por último, no puedo olvidar al personal de apoyo de los laboratorios de Virología y Genética (Lesly y Cynthia), que me enseñaron a manejar las técnicas que aquí realice y que me apoyaron con el trabajo de laboratorio, pero sobre todo por hacer el ambiente muy agradable y por brindarme su amistad, chicas muchas gracias. Y al Dr. Jaime, compañero de trabajo en el laboratorio de Genética, que siempre nos animó a seguir adelante.

Para todos aquellos que hicieron y hacen posible este trabajo, muchas gracias.

Este trabajo de tesis ha sido financiado a través de diversas vías:

Becas para estudios de Maestría (Posgrado) del CONACYT.

Beca de Movilidad CONACYT.

Programa de Apoyo y Fortalecimiento de la Investigación (PAFI) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, convocatoria 2018.

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA.....	xvii
RESUMEN	xix
ABSTRACT	xx
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 OBJETIVOS DEL ESTUDIO.....	2
1.1.1 OBJETIVO GENERAL.....	2
1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
1.2 HIPÓTESIS.....	3
2 LITERATURA REVISADA.....	4
2.1 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN DEL PARVOVIRUS CANINO	4

2.2	TAXONOMÍA DEL PARVOVIRUS CANINO.....	7
2.3	ESTRUCTURA DEL VIRIÓN DE CPV.....	7
2.4	GENOMA Y PROTEÍNAS CODIFICADAS DE CPV.....	9
2.5	MECANISMOS DE INFECCIÓN Y REPLICACIÓN DE CPV	11
2.6	LA PARVOVIROSIS CANINA.....	14
2.6.1	HALLAZGOS A LA EXAMINACIÓN CLÍNICA.....	14
2.6.2	HALLAZGOS EN LOS EXÁMENES DE LABORATORIO	15
2.6.3	FORMAS DE PRESENTACIÓN DE LA PARVOVIROSIS CANINA.....	16
2.6.4	FACTORES DE RIESGO DE LA PARVOVIROSIS CANINA.....	16
2.7	MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE LA PARVOVIROSIS CANINA.....	18
2.7.1	DIAGNÓSTICO CLÍNICO.....	18
2.7.2	AISLAMIENTO VIRAL DEL CPV.....	18
2.7.3	DETECCIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES.....	19
2.7.4	DETECCIÓN DE ANTÍGENO DE CPV	20
2.7.5	HALLAZGOS A LA PATOLOGÍA.....	20
2.7.6	PRUEBAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE PARVOVIRUS CANINO	21
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	24

3.1	MATERIAL BIOLÓGICO, ESTUCHES COMERCIALES Y SOLUCIONES UTILIZADAS.....	24
3.2	LUGAR DE PROCESAMIENTO DE MUESTRAS y EQUIPOS DE LABORATORIO.....	28
3.3	ÁREA DE MUESTREO.....	28
3.4	TIPO DE MUESTRA Y PROCESAMIENTO INICIAL DE LA MISMA	29
3.5	AMPLIFICACIÓN DEL ADN DE CPV POR MEDIO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	30
3.5.1	OLIGONUCLEÓTIDOS PARA GEN DE LA PROTEÍNA VP2	30
3.5.2	EXTRACCIÓN DE ADN DE MUESTRAS.....	31
3.5.3	CONTROLES POSITIVOS Y NEGATIVOS PARA PCR DEL GEN DE LA PROTEÍNA VP2 DEL CPV.....	33
3.5.4	PCR Y PCR ANIDADO PARA EL GEN DE LA PROTEÍNA VP2	34
3.5.5	POLIMORFISMO DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP-PCR).....	35
3.5.6	ELECTROFORESIS.....	36
3.5.7	PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR A PARTIR DE GELES DE AGAROSA Y SECUENCIACIÓN.....	37
3.6	ANÁLISIS FILOGENÉTICOS.....	38
3.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	39

4	RESULTADOS.....	42
4.1	LUGAR DE REALIZACIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS...	42
4.2	ÁREA DE MUESTREO.....	43
4.3	TIPO Y CARACTERÍSTICAS DE LOS CANINOS Y DE MUESTRAS ANALIZADAS	44
4.4	AMPLIFICACIÓN DEL ADN DE CPV POR MEDIO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	47
4.4.1	DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA EL GEN DE LA PROTEÍNA VP2 DE CPV.....	47
4.5	PCR Y PCR ANIDADO PARA EL GEN DE LA PROTEÍNA VP2 DE CPV ..	48
4.6	RESULTADOS DEL PCR- RFLP PARA PARVOVIRUS CANINO	53
4.7	SECUENCIACIÓN DE UN SEGMENTO DE 1779 PB AMPLIFICADO POR PCR DEL CPV.....	61
4.8	RESULTADO DE ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DEL GEN DE LA PROTEÍNA VP2 DEL CPV.....	62
4.9	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS RESULTADOS.....	73
5	DISCUSIÓN	76
6	CONCLUSIONES	89
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
8	ANEXOS	106

8.1	ANEXO 1. CUESTIONARIO EPIDEMIOLÓGICO	106
8.2	ANEXO 2. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS OBTENIDOS CON LAS MUESTRAS DE CANINOS CON DIAGNÓSTICO DE PARVOVIRUS.....	108
8.3	ANEXO 3. DESCRIPCIÓN DE PRUEBAS DE INMUNOCROMATOGRAFÍA PARA LA DETECCIÓN DE ANTÍGENO DE PARVOVIRUS CANINO UTILIZADAS EN MONTERREY Y SU ÁREA METROPOLITANA.....	120
8.4	ANEXO 5. ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LA PROTEÍNA VP2 DE LOS VIRUS FPV Y CPV.....	127

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Consumibles y reactivos del estuche comercial "Multi-source Genomic ADN kit".	25
Tabla 2. Contenido del estuche comercial de "PCR SuperMix".....	26
Tabla 3. Contenido del estuche comercial de "PureLink Quick Gel Extract Kit".	26
Tabla 4. Equipo de laboratorio utilizado para el desarrollo de esta investigación	28
Tabla 5. Contenido de la Reacción de PCR para la amplificación de un segmento del gen de la proteína VP2 del CPV.	34
Tabla 6. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos del gen de la proteína de VP2 de FPV/CPV publicadas en GenBank utilizadas en los análisis genéticos.....	40
Tabla 7. Municipio de procedencia de las muestras analizadas.....	43
Tabla 8. Características y número de muestras a analizar en este estudio.....	46
Tabla 9. Oligonucleótidos diseñados para el PCR y PCR anidado para amplificar el gen de la proteína VP2 de cepas de Parvovirus canino.	49
Tabla 10. Patrones de Polimorfismos de longitud de fragmentos del producto de	60
Tabla 11. Secuencias genéticas de CPV de Monterrey y su área metropolitana reportadas en el GenBank de la Plataforma NCBI.....	63
Tabla 12. Secuencias genéticas de CPV de Monterrey y su área metropolitana que serán reportadas en el GenBank de la Plataforma NCBI.....	63

Tabla 13. Porcentaje de similaridad y divergencia basado en 1073 nucleótidos de la proteína VP2 entre cepas de CPV	66
Tabla 14. Porcentaje de similaridad y divergencia basado en 567 aminoácidos deducidos de la proteína VP2 entre cepas de CPV	70
Tabla 15. Tabla de las sustituciones de aminoácidos en la proteína VP2 presentes en los subtipos de CPV del área metropolitana de Monterrey, N.L.	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución del CPV-2 observando la sustitución de aminoácidos presentes en cada subtipo CPV-2, CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c.....	6
Figura 2. Estructura del Virión del Parvovirus canino..	8
Figura 3. Estructura del Genoma y Proteínas Codificadas del CPV.....	9
Figura 4. Resultado de la electroforesis de los productos de PCR del gen de la proteína VP2 de CPV.....	50
Figura 5. Resultados de la electroforesis del PCR anidado para un fragmento de la proteína VP2 del CPV.....	51
Figura 6. Electroforesis de los productos de PCR anidado del gen de la proteína estructural VP2 del Parvovirus canino..	52
Figura 7. Muestras de 104 caninos con problemas digestivos.	53
Figura 8. Patrones de corte de la Enzima Mbo II en un fragmento de ADN de 1779 del genoma de CPV, determinados con el programa SeqBuilder del software ADNstar v.15.	56

Figura 9. Patrones de corte de la Enzima Mbo II en un fragmento de ADN de 1779 pb y de 1042 pb del genoma de CPV, determinados con el programa SeqBuilder del software ADNstar v.15.	57
Figura 10. Patrones de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción del fragmento de 1779 pb del genoma de CPV con la enzima Mbo II. 9.....	58
Figura 11. Patrones de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción del fragmento de 1042 pb del genoma de CPV con la enzima Mbo II I. S.	58
Figura 12. Digestión del fragmento de 1779 pb del gen de la proteína VP2 del CPV con enzima MboII de las muestras procesadas.....	61
Figura 13. Análisis filogenético basado en un fragmento de ADN del gen de la proteína VP2 de cepas de CPV del área metropolitana de Monterrey.....	68
Figura 13. Análisis filogenético basado en 567 aminoácidos del gen de la proteína VP2 de cepas de CPV del área metropolitana de Monterrey. CPV2	75

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

%	Porcentaje (porciento)
A	Alanina
°C	Grados centígrados
CMV	Canine minute virus
CPE	Efecto citopático, " <i>Cytopathic effect or cytopathogenic effect</i> "
CPV	Parvovirus canino, " <i>Canine Parvovirus</i> "
D	Ácido aspártico
dATP	Desoxiadenosina-5'-trifosfato
dCTP	Desoxicitocina-5'-trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina-5'-trifosfato
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
dTTP	Desoxitimidina-5'-trifosfato
DIC ₅₀	Dosis infectiva de cultivo celular al 50%
ADN	Ácido desoxirribonucleico, " <i>deoxyribonucleic acid</i> "
E	Ácido glutámico
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima, " <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> "
G	Glicina
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
FPV	Virus de la Panleucopenia felina, " <i>Feline panleukopenia virus</i> "
h	Hora
HCl	Ácido clorhídrico
I	Isoleucina
K	Lisina
kb	Kilobases
KCl	Cloruro de potasio
L	Leucina
M	Metionina
MEV	Virus de la enteritis del mink, " <i>Mink enteritis virus</i> "
MDCK	Línea celular de células de riñón de canino, " <i>Madin-Darby Canine Kidney</i> "
mg	miligramos
µg	microgramos
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	minutos
ml	mililitros
µl	microlitros
mM	milimolar

μM	micromolar
N	Asparagina
NaOH	Hidróxido de sodio
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica, " <i>National Center for Biotechnology Information</i> "
N.L.	Nuevo León
No. Cat.	Número de catálogo
NS	Proteína no estructural, " <i>non-structural protein</i> "
N-terminal	Sección amino terminal de una proteína
OIE	Organización mundial de sanidad animal
ORF	Marco de lectura abierto, " <i>open reading frame</i> "
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa, " <i>Polymerase chain reaction</i> "
pb	<i>Pares de bases</i>
PK	<i>Proteinasa K</i>
pH	Potencial de hidrógeno
R	Arginina
RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción, " <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> "
rpm	<i>Revoluciones por minuto</i>
RPV	Virus de la enteritis del mapache, " <i>Raccoon parvovirus</i> "
S	Serina
seg	segundos
T	Treonina
TfR	Receptor de transferrina, " <i>transferrin receptor</i> "
U	unidades
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
VP2	Proteína de la cápside de CPV
V	Valina
Y	Tirosina

RESUMEN

El *Parvovirus canino* (CPV) es uno de los patógenos de mayor importancia en caninos jóvenes, causando severos cuadros de gastroenteritis hemorrágicas, con altas tasas de morbilidad y mortalidad. A nivel mundial se han descrito diferentes subtipos genéticos de CPV (2, 2a, 2b y 2c) no obstante en México los estudios al respecto son escasos. El objetivo de este estudio fue caracterizar el subtipo de CPV presente en caninos de Monterrey y su área metropolitana. Para ello se analizaron 104 muestras (heces y muestras de tejidos) de caninos con problemas gastroentéricos mediante PCR y PCR anidado basado en la amplificación de un segmento de 1779 pb del gen de la proteína VP2. Se encontró que el 99.0% (103/104) de las muestras analizadas resultaron positivas para el gen VP2 del CPV. La diferenciación del subtipo de CPV fue llevada a cabo mediante análisis de RFLP a partir de 93 muestras positivas. El subtipo CPV2c fue detectado en el 82.8% (77/93) de los casos mientras el 1.0% (1/93) mostró patrones de RFLP del subtipo CPV2b. En el 16.1% (15/93) no fue posible establecer el subtipo por este método. Análisis de secuencia nucleotídica y filogenéticos del gen VP2 fueron realizados a partir de 23 muestras PCR-RFLP positivas y de 2 cepas vacunales. Los análisis filogenéticos de las muestras nos indican que el subtipo CPV2c está presente y circula en una alta frecuencia en caninos con alteraciones gastro-entéricas del área metropolitana de Monterrey, N.L. y que las cepas del CPV2c son genéticamente distintas a los subtipos incluidos en las vacunas comerciales empleadas comúnmente en esta zona. Así mismo, mediante los análisis genéticos se evidenció que los subtipos del CPV2c se distribuyen con grupos detectados en USA, Europa y México. Interesantemente, se detectó un grupo filogenético único separado del resto de los grupos previamente reportados en el subtipo CPV2c. Por otro lado, no se pudo establecer asociación ($p < 0.5\%$) entre la sintomatología clínica, edad, raza, procedencia o protocolo de vacunación y con el subtipo del CPV detectado.

PALABRAS CLAVES: Parvovirus canino (CPV); PCR-RFLP; análisis genéticos; CPV2c; CPV2b.

ABSTRACT

Canine Parvovirus (CPV) is one of the most important pathogens in dogs, causing severe cases of hemorrhagic gastroenteritis, with high morbidity and mortality rates and presents genetic subtypes (CPV2, CPV2a, CPV2b, and CPV2c). The objective of this study was to characterize the CPV-subtypes present in canines of Monterrey and its metropolitan area. For this, 104 samples (feces and tissue samples) of canines with gastroenteritis were analyzed by PCR and nested PCR based on the amplification of a 1779 bp segment of the VP2 protein gene. It was found that 99.0% (103/104) of the analyzed samples were CPV positive by PCR and nested PCR. Differentiation of the subtype of CPV was carried out by PCR-RFLP analysis from 93 CPV positive samples. The CPV2c subtype was detected in 82.8% (77/93) of the cases, while 1.0% (1/93) showed CPV2b RFLP patterns. In 16.1% (15/93) it was not possible to establish the subtype by this method. Genetic analysis of the VP2 gene were performed from 23 CPV PCR-RFLP positive samples and 2 vaccine strains. Phylogenetic analyses of the samples indicate that the CPV2c subtype is present and circulates in a high frequency in canines with gastroenteric alterations in the metropolitan area of Monterrey, N.L. and that the CPV2c strains are genetically distinct from the subtypes included in commercial vaccines commonly used in this area. Likewise, by means of the genetic analyses, it was evidenced that the subtypes of the CPV2c are distributed with groups detected in the USA, Europe, and Mexico. Interestingly, a single phylogenetic group separated from the rest of the groups previously reported in subtype CPV2c was detected. In addition, it was not possible to establish an association ($p < 0.5\%$) between the clinical symptomatology, age, race, origin or vaccination protocol with the CPV-subtype detected.

KEYWORDS: Canine parvovirus (CPV); PCR-RFLP; genetic analyses; CPV2c; CPV2b.

1 INTRODUCCIÓN

El *Parvovirus canino* (CPV) es el patógeno más común en la población canina que provoca gastroenteritis hemorrágica y miocarditis en cachorros menores de un año, presentando cuadros muy severos de anorexia, deshidratación, inapetencia, vómito, diarrea con sangre y muy frecuentemente la muerte. La parvovirus canina se encuentra dentro del grupo de las enfermedades en pequeñas especies más importante a nivel mundial. El Parvovirus canino pertenece a la familia *Parvoviridae*, subfamilia *Parvovirinae*, género *Protoparvovirus* y especie *Protoparvovirus carnívoro tipo 1*. Los viriones están formados por ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla (ssDNA) de cerca de 5.2 Kb y cápside formada por las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3. El CPV presenta una divergencia genética de cerca del 2%, la cual se traduce a una variabilidad antigénica debido a la sustitución de aminoácidos en las proteínas de la cápside. En base a esta variabilidad genética y antigénica el CPV se ha dividido en los subtipos 2, 2a, 2b y 2c. La distribución de las variantes antigénicas de CPV en la población canina difiere a nivel mundial. La variante más reciente, el CPV2c ha sido detectada en Asia (Vietnam, China), Europa (España, Alemania, Italia, Reino Unido) América del Sur (Brasil, Argentina, Colombia), América del Norte (USA). En México se han realizado pocos estudios sobre la presentación de las variantes existentes de CPV2 en poblaciones caninas urbanas y rurales. En un estudio realizado en Jalisco se encontró que la variante más común que circula en la población canina

es la CPV 2c. Recientemente, la alta circulación de CPV2c se confirmó en varios estados de la república mexicana con excepción de Nuevo León. Así mismo, se ha propuesto que el subtipo genético del CPV está relacionado con la forma clínica de la parvovirus. Por otro lado, estudios recientes sugieren que las cepas vacunales probablemente no protegen a los caninos contra todos los subtipos, por lo que han incluido varios subtipos en algunas vacunas.

Por lo tanto, es importante determinar las variantes genéticas del CPV que circulan en caninos en Monterrey y su área metropolitana en Nuevo León, y si estas variantes son distintas genéticamente a las cepas incluidas en las vacunas de mayor uso en la zona y finalmente correlación la posible asociación de las variantes genéticas circulantes con la presentación clínica de la parvovirus canina.

1.1 OBJETIVOS DEL ESTUDIO

1.1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar los subtipos genéticos del Parvovirus canino que circulan en el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León, a través PCR-RFLP y de análisis genéticos de secuencias del gen de la proteína VP2 para establecer si existe relación con las cepas vacunales más frecuentemente usadas en el área de estudio, así como con las formas de presentación de la parvovirus en caninos.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Diagnosticar el CPV mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando muestras clínicas de caninos con problemas digestivos
- b. Caracterizar las cepas de CPV presentes en Monterrey y su área metropolitana a través de PCR-RFLP de un fragmento de 1779 pb del gen de la proteína VP2.
- c. Secuenciar el gen de la proteína VP2 de casos positivos a CPV a la prueba de PCR.
- d. Establecer los subtipos de CPV presentes en el área metropolitana de Monterrey y su relación genética con las vacunas más usadas para este virus.
- e. Establecer si existe una correlación entre el cuadro clínico, el subtipo presente y los protocolos de vacunación de CPV.

1.2 HIPÓTESIS

En caninos con trastornos gastroentéricos del área metropolitana de Monterrey N.L., circulan subtipos genéticos de *Parvovirus canino* que son distintos a las cepas incluidas en las vacunas comerciales de mayor uso en la zona.

2 LITERATURA REVISADA

2.1 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN DEL PARVOVIRUS CANINO

El parvovirus canino tipo 2 fue aislado e identificado en el año 1978, en una pandemia en caninos, caracterizada por gastroenteritis hemorrágicas y/o miocarditis en cachorros (Parrish et al., 1988; Thomson and Gagnon, 1978), al cual se le denominó CPV-2, diferenciándolo del CPV-1 (CMV, *Canine minute virus*), ya que este último no infectaba neonatos o cachorros y no presentaba gastroenteritis o miocarditis (Bastianello, 1981; Macartney et al., 1984).

Estudios genéticos y antigénicos apoyan la teoría que el CPV 2, surgió y es una variante del Virus de la Panleucopenia Felina (FPV) (Parrish et al., 1982; Reed et al., 1988; Zhou et al. 2017). Con una divergencia genética muy baja (2%) entre CPV2 y FPV, se pudieren detectar mutaciones puntuales presentes en el gen de la proteína de la cápside VP2 que generaron cambios en 6 aminoácidos (80 (K/R), 93 (K/N), 103 (V/A), 323 (D/N), 564 (N/S), 568 (A/G)) para dar origen al CPV2 (Hueffer and Parrish, 2003a). Las mutaciones más relevantes fueron las que generaron el cambio de aminoácidos en las posiciones 93 y 323 y provocando la incapacidad de infectar células felinas (Barbis et al., 1992; Hueffer et al. 2003). Algunos autores señalan que el proceso ocurrió como una adaptación gradual, donde las mutaciones puntuales en el genoma generaron un cambio en aminoácidos (Hueffer et al., 2003). CPV-2 se diseminó rápidamente por todo el mundo entre 1978 y 1979 generando una gran

pandemia (Hoelzer and Parrish, 2008). En un lapso de un año fue caracterizado otro subtipo, CPV-2a, donde el cambio del aminoácido 300 (A/G) aumento la afinidad del virión por el receptor de la transferrina (TfR, Tansferrin receptor) en el canino (Hueffer et al., 2003), aumentando la capacidad infectiva en esta especie y dándole la capacidad de infectar también felinos, además cambios en otros 4 aminoácido (87 (M/L), 101 (I/T), y el 305 (D/Y) y el 555 (V/I)) (Miranda and Thompson, 2016; Truyen et al., 1996; Weichert et al., 1998). Otro de los cambios observados son en el aminoácido en la posición 297 de VP2, la cual está relacionado con la estabilidad de la cápside o en la interacción con el receptor TfR debido a su proximidad física con los residuos que controlan dicha interacción (298 y 300) (Hoelzer et al., 2008b).

En 1984 surge una nueva variante antigénica conocida como CPV 2b, en este subtipo observaron 2 sustituciones adicionales de nucleótidos que generaron cambios de aminoácidos (Parrish et al., 1991). El cambio relevante ocurrió en el codón que codifica para el aminoácido en la posición 426(N/D) y 555 (I/V) de la proteína VP2 (Martella et al., 2006). En 2000 se describió la variedad antigénica CPV-2c en Italia que se diseminó por todo el mundo rápidamente (Buonavoglia et al., 2000). En el subtipo CPV.2c solo se presentó un cambio de aminoácido en la posición 426 (Asn/Glu), generando una potencialización en la infección o evasión de la respuesta inmune (Decaro and Buonavoglia, 2012). En la figura 1 se resumen las substituciones de los aminoácidos que permitieron la aparición de los subtipos CPV 2, 2a, 2b y 2c.

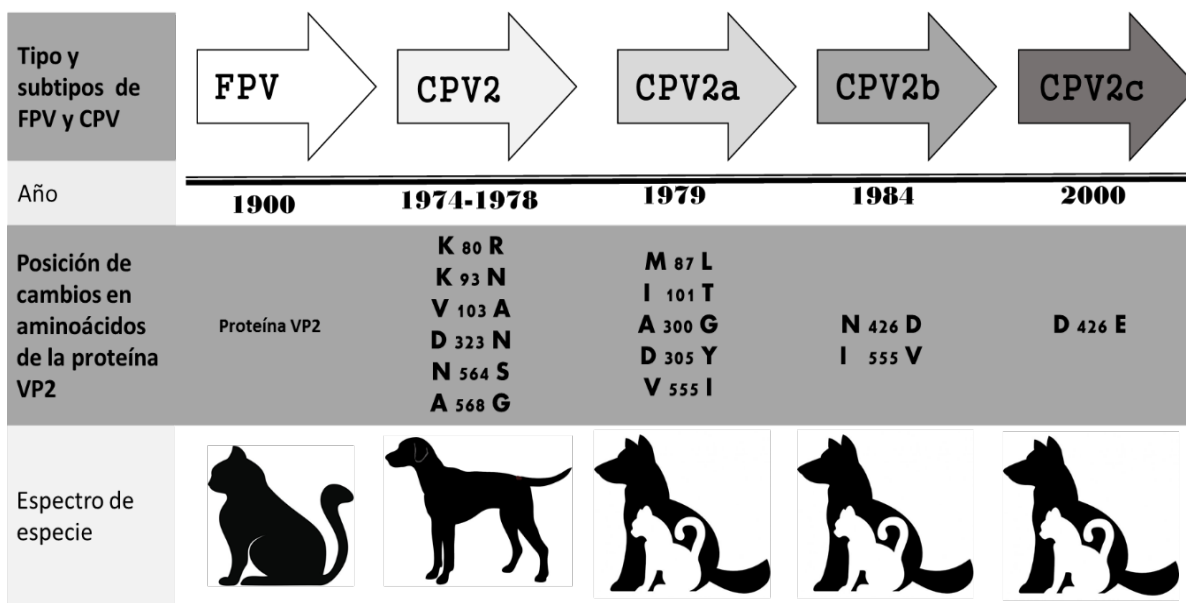


Figura 1. Evolución del CPV-2 observando la sustitución de aminoácidos presentes en cada subtipo CPV-2, CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c. FPV, Virus de Panleucopenia Felina; CPV, Parvovirus canino; A, alanina; D, ácido aspártico; E, ácido glutámico; I, isoleucina; K, lisina; L, leucina; M, metionina; N, asparagina; R, arginina; S, serina; T, treonina; V, valina; Y, tirosina, (Thompson et al., 2016).

La distribución del subtipo CPV 2 en la población canina difiere a nivel mundial. Existen datos que indican que el subtipo 2a está presente principalmente en Francia, Taiwán e Italia (Decaro et al., 2007; Sagazio et al., 1998); el subtipo CPV 2b distribuido en países como Brasil, Colombia, USA, Japón, Australia, Sudáfrica (Castro et al., 2011; Duque-García et al., 2017; Pereira et al., 2000). El subtipo que apareció al final fue CPV 2c detectado en Vietnam, España, América del sur, América del Norte y Reino Unido, España, China, India, Taiwán, Suecia (Chiang et al., 2016; Decaro et al., 2006; Hong et al., 2007; Kapil et al., 2007; Nandi et al., 2010; Sutton et al., 2013). En México existen pocos reportes publicados sobre los subtipos y distribución del CPV, un estudio

publicado fue realizado en Guadalajara (Pedroza-Roldan et al., 2015), además de un estudio realizado en el centro y sur de México en donde la variante que circula en ambos casos con mayor frecuencia en la población canina fue la CPV 2c (Faz et al., 2018).

2.2 TAXONOMÍA DEL PARVOVIRUS CANINO

El *Parvovirus canino* (CPV) en conjunto con el *Virus de la Panleucopenia Felina* (FPV); el *Virus de la Enteritis del Mink* (MEV) y el *Parvovirus del mapache* (RPV) pertenece a la especie *Protoparvovirus carnívoro tipo I* del género *Protoparvovirus* en la subfamilia *Parvovirinae* dentro de la familia *Parvoviridae* (Tijssen et al., 2011).

2.3 ESTRUCTURA DEL VIRIÓN DE CPV

El virión de CPV tiene un diámetro de 25 nm, está compuesto por una cápside esférica y un genoma de ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla (ssADN) de cerca de 5.2 kilobases (kb) (Decaro and Buonavoglia, 2012; Tijssen et al., 2011). La cápside está compuesta por 60 monómeros de las proteínas VP1, VP2 y VP3, de las cuales la proteína VP2 es altamente antigénica y muy importante en los procesos de infección viral, estando relacionada con el rango del hospedero y el tropismo celular del virus (Hueffer and Parrish, 2003b; Zhao et al., 2014; Zienius et al., 2016). El 60 % de la composición proteica es de las proteínas estructurales, donde se diferencian la proteína VP1 de la VP2 por una adición de dominio N-terminal. La proteína VP2

representa el 90 % de la cápside y es responsable de interacciones de virus con el huésped y del espectro de virus con respecto del huésped, así mismo, es responsable de la patogenicidad del virus para el huésped y la proteína VP3 se forma por división de la proteína VP2 ocasionada por proteasas del huésped (Decaro and Buonavoglia, 2012; Elia et al., 2012; McElligott et al., 2011).

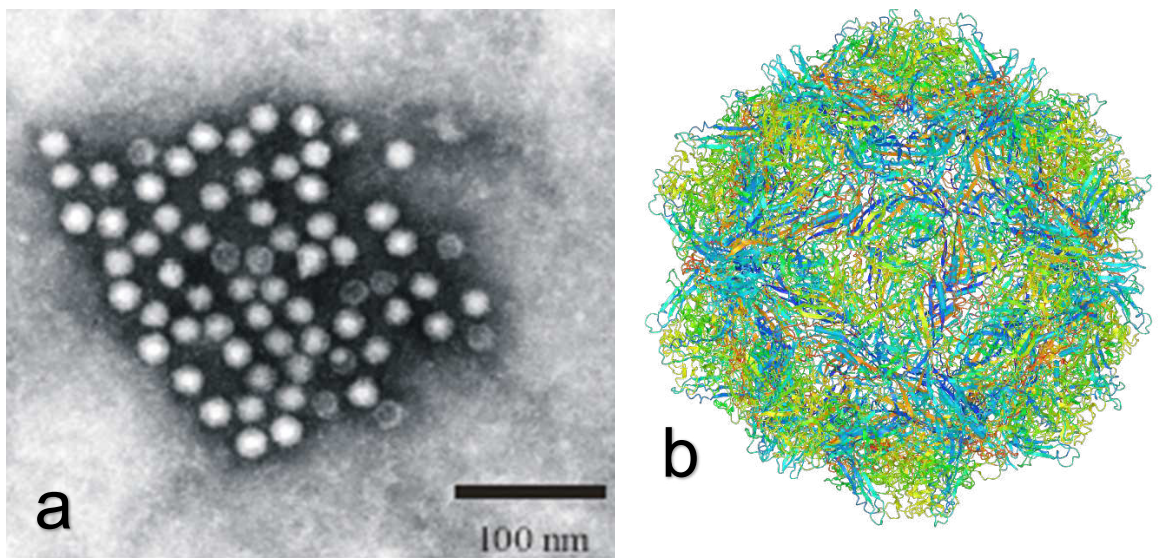
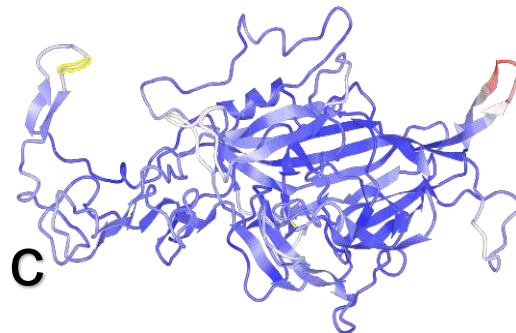


Figura 2. Estructura del Virión del Parvovirus canino. En las figuras se puede observar la estructura del virión de CPV. **a.** Partículas virales de CPV al microscopio electrónico de transmisión (fotografía cedida por Dr. Matthias König). **b.** Representación gráfica de una cápside de CPV (60 monómeros de VP1, VP2 y VP3). **c.** Representación gráfica en modelo de listo de la proteína VP2, donde los aminoácidos 299, 300, 301 se encuentran señalados con amarillo. (Wu and Rossmann, 1993).



2.4 GENOMA Y PROTEÍNAS CODIFICADAS DE CPV

El genoma del CPV es una cadena sencilla de ácido desoxirribonucleico (ssADN) de 5.2 kb., posee dos marcos de lectura abiertos (ORF, *Open Reading Frame*), el ORF 1 codifica para las proteínas no estructurales NS1 y NS2, mientras que el ORF 2 codifica para las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3 (Fig. 3) (Tijssen et al., 2011).

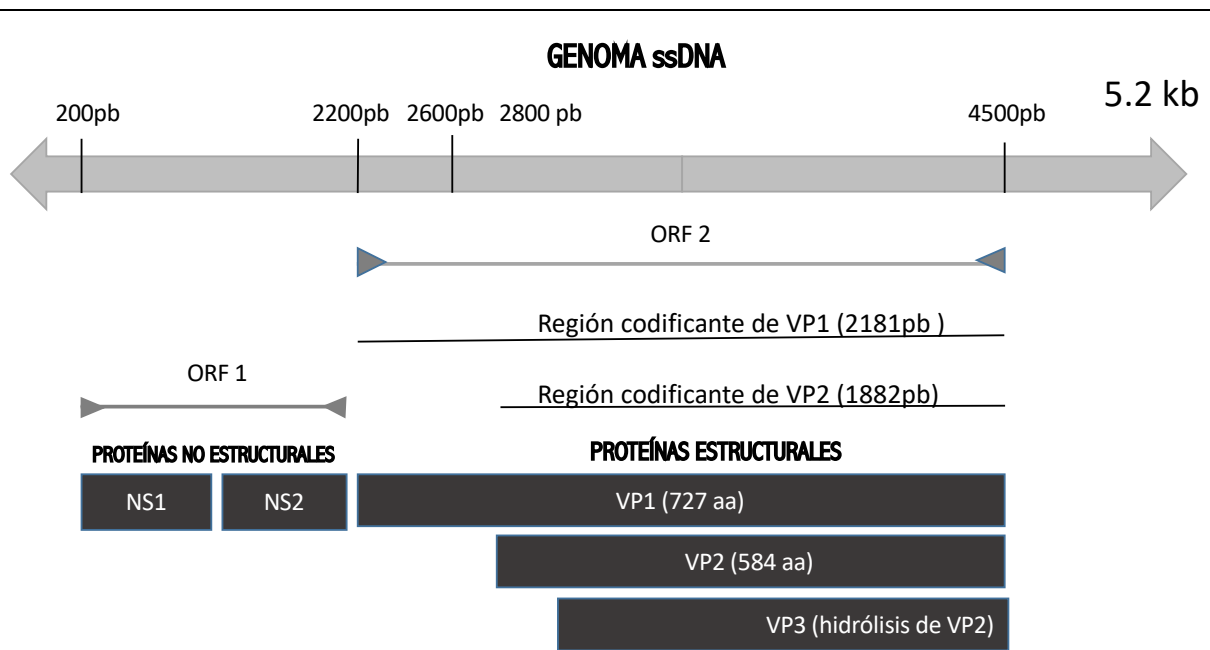


Figura 3. Estructura del Genoma y Proteínas Codificadas del CPV. El genoma de CPV es una cadena sencilla de ADN de cerca de 5.2 kb, posee dos marcos de lectura abierta (*Open Reading Frame* (ORF), el primero codifica para las proteínas no estructurales (NS1 y NS2) y el segundo ORF codifica para las proteínas estructurales VP1 (2181 pb, 721aa), VP2 (1882 pb, 584aa) y a VP3 se origina de la hidrólisis del VP2.

La proteína NS1 es una fosfoproteína nuclear que ayuda a iniciar la Replicación del virus y como activador de los promotores virales durante la expresión proteica. Tiene diversas actividades durante el ciclo viral tales como la regulación de la transcripción,

unión de ATPasa e hidrólisis, actividad endonucleasa, oligomerización y ADN helicasa (Ihalainen et al., 2007).

La NS2 está implicada en la generación de efecto citotóxico, pero su rol no está bien comprendido como la proteína NS1, en donde difiere de su porción carboxilo-terminal derivándose del corte y empalme diferencial, generando un marco de lectura diferente (Hoelzer et al., 2008a). Esta proteína participa en la replicación viral y es necesaria para la producción de partículas virales, además de regular la expresión génica así como el tráfico hacia el núcleo (Tijssen et al., 2011).

Las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3 se encuentran codificadas a partir del nucleótido 2200 al 4500 del genoma viral, con un tamaño en longitud de 2300 pares de bases (pb) (Figura 2b y c). Estas proteínas forman la cápside, proporcionando la estabilidad del genoma viral, responsable del tropismo celular y rango hospedero (Hueffer and Parrish, 2003b).

La proteína VP1 codificada por un gen de 2181 nucleótidos y 721 aminoácidos, es uno de los componentes de la cápside viral (Ros et al., 2006). Es indispensable para la efectividad del virión ya que contiene una serie de elementos, como el dominio de fosfolipasa, esencial para el tráfico intracelular (Suikkanen et al., 2002).

La proteína VP2 codificada por un gen de 1882 nucleótidos y 584 aminoácidos, constituye el 90% de la cápside viral y su función es principalmente estructural, interacciona con el receptor celular de TfR y con receptores de ácido siálico,

permitiendo el ingreso del virus a la célula hospedera. Además, en el gen para esta proteína se encuentran las mutaciones puntuales que generan cambios en los aminoácidos gracias a los cuales se les clasifica a los subtipos de CPV (Wu and Rossmann, 1993).

La proteína VP3 se genera cuando el virión ingresa a la célula, mediante su procesamiento proteolítico. Esta proteína es la de menor concentración en la partícula viral. Un estudio realizado *in vitro* determino que la proteína VP3 se genera únicamente en presencia de partículas virales completas (Nandi and Kumar, 2010).

2.5 MECANISMOS DE INFECCIÓN Y REPLICACIÓN DE CPV

La vía de transmisión es oro-nasal, se ha determinado que esta infección se da por contacto directo de caninos susceptibles expuestos con materia fecal y aerosoles (Martella et al., 2006). La excreción de las partículas virales puede llegar alcanzar 1×10^9 viriones durante la fase aguda de la enfermedad (Pollock and Coyne, 1993). La presentación entérica desde la infección hasta los primeros síntomas es de 7 a 14 días, aunque se han detectado periodos de incubación cortos hasta de 4 días. La excreción los viriones puede ser hasta 2 semanas y son altamente infectivos. Se caracterizan por ser altamente estables a pH, temperatura, detergentes, desinfectantes y solventes, esto prolonga su tiempo de infectividad durante meses (Goddard, 2010).

El tropismo celular está dado por la presencia o ausencia de receptores celulares. El parvovirus canino tiene una actividad linfotrópica, por lo que al entrar al organismo invade tejido linfoide, siendo los sitios primarios de replicación, ganglios retrofaríngeos y mesentéricos (células que tienen una alta tasa de división celular) (Pollock and Coyne, 1993).

Una vez replicados en tejidos linfoides, la infección se generaliza, iniciando una viremia, a través del torrente sanguíneo se dirigen a los órganos como bazo, hígado, corazón e intestino (órganos blancos por su tasa de división celular) (Roy V H Pollock and Coyne, 1993). Después de la generación de la viremia el CPV invade epitelios que recubre cavidad oral, esófago, intestino delgado; médula ósea y el tejido linfoide (timo y los ganglios linfáticos) (Goddard, 2010). Aunque el virus tiene su vía de entrada oro-nasal y las lesiones más frecuentes son encontradas en intestinos, la infección en intestino se da por torrente circulatorio (Goddard, 2010).

Los siguientes 3-4 días se replican en órganos que contienen células que se dividen rápidamente, tales como médula ósea y células intestinales, generando cuerpos de inclusión grandes de tinción eosinofílicas (Decaro and Buonavoglia, 2012). En médula ósea destruye células jóvenes del sistema inmune por consiguiente anula los mecanismos de defensa (Nandi et al., 2010), provocando una linfopenia aguda, generalmente asociada con una neutropenia. En cachorros de 2-3 semanas de edad el CPV puede replicarse en células cardiacas provocando una muerte súbita (Decaro and Buonavoglia, 2012).

Donde se genera un daño extremo es en el intestino delgado, aquí encontramos las criptas que son las que producen las vellosidades, las cuales se ven deformadas o destruidas, dando lugar a diarrea hemorrágica (hematoquecia) ((Nandi and Kumar, 2010). Aquí se observa nula absorción de nutrientes esenciales para el mantenimiento homeostático del organismo. Uno de los factores asociados con la infección de CPV es el estrés, ya sean específico como la infestación con algún parasito o infección bacteriemia; o de tipo no específicos como los del destete que predisponen a los perros a la enfermedad clínica aumentando la actividad de las mucosas (Goddard, 2010; Pollock and Coyne, 1993). Al momento del destete, los enterocitos en las criptas intestinales tienen una actividad mitótica mayor debido a cambios en la flora bacteriana y la dieta, siendo más susceptibles al tropismo viral por su facilidad de dividir rápidamente las células (Goddard, 2010). Parvovirus infecta el epitelio germinal de la cripta intestinal, causando destrucción epitelial y colapso de las vellosidades, dando como resultado, la rotación celular normal se vea alterada dando lugar a la lesión patológica característica de las vellosidades acortadas y atróficas (Pollock and Coyne, 1993).

Cuando la madre gestante se infecta con CPV después de la segunda semana de gestación, el cachorro puede desarrollar miocarditis congénita que puede resultar en infartos cardiacos súbitos o en falla cardiaca congestiva. Este genera inflamación en las células cardiacas provocando el incremento de basófilos y cuerpos de inclusión

viral en el tejido provocando degeneración y necrosis (Hayes y Russell, 1979; Lenghaus et al., 1980; Sankareswaran et al., 2011; Sime et al., 2015).

También se ha detectado hipoplasia cerebelar en algunos casos de infecciones de cachorros en útero, sin embargo estas lesiones son más comunes en gatitos infectados con FPV (Schatzberg et al., 2003). Signos neurológicos pueden presentarse como complicación de las enteritis o miocarditis, como resultado de hipoxia, hemorragias intracraneales, trombosis o hipoglucemia (Schatzberg et al., 2003).

2.6 LA PARVOVIROSIS CANINA

2.6.1 HALLAZGOS A LA EXAMINACIÓN CLÍNICA

Cachorros con enteritis por CPV generalmente presentan fiebre (hasta 41°C), inapetencia, vómito, debilidad, letargia, deshidratación, dolor y rigidez abdominal a la palpación, se puede observar evidencia de diarrea en el perineo o cuando se toma la temperatura con un termómetro rectal, la cual puede ser de tipo hemorrágico. Por la alta motilidad, inclusive se puede presentar intususcepción que se puede sentir como una masa rígida tubular a la palpación, la cual es confirmada por medio de placas radiográficas con medio de contraste, además de un ultrasonido (Mylokani et al., 2016). Se puede observar también, palidez de mucosas con un retardado llenado capilar y en algunos caninos cuando el cuadro es muy severo y no se han atendido, se puede presentar hipotermia (Kalli et al., 2010).

2.6.2 HALLAZGOS EN LOS EXÁMENES DE LABORATORIO

Las anormalidades que se presentan en la biometría hemática nos son solo específicas de la parvovirus, pero puede ayudar para llegar a un diagnóstico definitivo. Las principales anormalidades que se pueden presentar en esta prueba son: leucopenia, neutropenia y linfopenia. Se puede presentar anemia cuando el canino tiene hematoquecia (Mylokani et al., 2016; Kalli et al., 2010). Los cambios hematológicos son ampliamente señalados por la destrucción de células progenitoras hematopoyéticas de los diversos tipos de leucocitos en la médula ósea y otros órganos linfo-proliferativos tales como el timo, los ganglios linfáticos y el bazo. Un estudio del 2010 mostró que la falta de citopenia, específicamente el recuento total de leucocitos y linfocitos tenía un valor predictivo positivo de 100% de supervivencia 24 horas después de la admisión. Se observó un aumento en el recuento de los linfocitos 24 horas después de la admisión en los cachorros que se recuperaron (Goddard, 2010).

En las bioquímicas sanguíneas de caninos con parvovirus se presentan frecuentemente hipoproteinemia, hipoglucemia e hipoalbuminemia. Anormalidades en la concentración de electrolitos como: hiponatremia, hipocloremia e hipocalcemia. Cuando el canino está muy deshidratado puede generarse azotemia pre-renal. Si se da la bacteriemia en cachorros puede presentarse alteraciones en el perfil enzimático hepático e hiperbilirrubinemia (Mylokani et al., 2016).

2.6.3 FORMAS DE PRESENTACIÓN DE LA PARVOVIROSIS CANINA

La forma entérica es la más común, se observa gastroenteritis hemorrágica en cachorros menores de un año y se cree que esta presentación está relacionada con la baja cantidad de anticuerpos maternos que estén presentes al momento de la infección. Los signos clínicos presentes después del periodo de incubación (3-7 días) son: anorexia, depresión, vómitos diarrea acuosa o con sangre, deshidratación, fiebre y en una alta proporción de los casos la muerte (Decaro and Buonavoglia, 2012).

La forma cardíaca se presenta en cachorros menores de 2 meses, estos son infectados en el útero o en las primeras semanas de vida, donde se presenta generalmente la muerte por infarto. Los signos clínicos más comunes son taquicardia, respiración abdominal, sonidos bronqueo-alveolares marcados (Prittie and Medicine, 2004). En algunos casos sobrevive la fase aguda, pero desarrollan alteraciones cardíacas secundarias que finalmente los llevan a la muerte. Se recomienda que todo cachorro con signos respiratorios anormales se debe sospechar de esta forma cardíaca de parvovirus canina. (Sime et al., 2015).

2.6.4 FACTORES DE RIESGO DE LA PARVOVIROSIS CANINA.

Durante las primeras semanas de vida los cachorros son protegidos por los anticuerpos maternos (obtenidos por la madre cuando ha sido vacunada o ha sobrevivido a una infección natural). Estudios de inmunidad pasiva realizados en cachorros sugieren que la vida media de los anticuerpos obtenidos a través del calostro

puede proteger al recién nacido hasta por un mes y medio, a medida que estos disminuyen los cachorros se vuelven susceptibles a la infección (Pollock and Coyne, 1993).

Los factores de riesgo que predisponen a infecciones por parvovirus canino son: la falta de inmunidad pasiva, falta de inmunización a través de adecuados protocolos de vacunación, las parasitosis intestinales, condiciones de hacinamiento e inadecuada limpieza y factores de estrés (Prittie and Medicine, 2004). Algunos estudios de prevalencia y factores de riesgo de la parvovirus canina explican que ciertas razas son predisponentes para contraer y presentar una forma clínica más severa como: el Rottweiler, Pincher alemán, Pitbull americano, Labrador Retriever y el Pastor alemán (Goddard, 2010). Las razones de la susceptibilidad no están claras. Se ha considerado que uno de los motivos de mayor incidencia en estas razas podría ser que estas razas son populares entre la población. Se han considerado también otros factores como el estado inmunológico de los cachorros, el grado de desnutrición y la falta de protocolos de vacunación, el tipo de vacuna administrada, la carga viral presente en la vacuna y la producción adecuada en el cachorro de anticuerpos neutralizantes que generan las vacunas (Goddard, 2010; Prittie and Medicine, 2004).

2.7 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE LA PARVOVIROSIS CANINA

2.7.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO

El diagnóstico clínico de la parvovirus entérica solo por la sintomatología clínica no es posible, ya que los signos clínicos no son específicos de esta enfermedad. Los diagnósticos diferenciales son muy variados, desde infecciones por protozoos como la giardiasis, infecciones bacterianas como salmonelosis, algunas intoxicaciones, intususcepciones, entre otras (E. Mylokani et al., 2016). El apoyo del clínico con los hallazgos clínico-patológicos (una linfopenia marcada) y la ausencia de formas parasitarias en los exámenes coproparasitológicos pueden sugerir la presencia de CPV (Mylokani et al., 2016; Pollock and Coyne, 1993).

Para confirmar el diagnóstico presuntivo de la parvovirus canina se requiere el uso de pruebas confirmatorias que detecten el virus, antígenos virales, genoma viral o anticuerpos específicos contra la partícula viral. Así mismo, se puede confirmar a la muerte a través de los hallazgos patológicos e inmunohistoquímica para detectar antígenos específicos en los tejidos del CPV.

2.7.2 AISLAMIENTO VIRAL DEL CPV

El CPV puede ser aislado en líneas celulares de riñón de canino (MDCK, *Madin-Darby Canine Kidney*), este virus cuando se inocula en una monocapa de estas células y se incuba causa un efecto citopático (CPE). Este efecto es causado por la alta tasa de

replicación viral, causa lisis celular y puede causar formación de sincitios, este efecto puede aparecer después de 24 horas en las monocapas infectadas y con cepas altamente virulentas en 16 horas. Sin embargo, el solo efecto de CPE no es único de este virus, por lo que la fijación de estas células y la prueba de inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa con anticuerpos específicos anti-parvovirus pueden confirmar la presencia de infección por CPV en las células de las placas citopáticas. El sobrenadante o la monocapa celular se puede analizar también para la detección de genoma del CPV a través de PCR (Khatri et al., 2017; Studdert et al., 1983).

2.7.3 DETECCIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES

El diagnóstico confirmatorio se puede realizar a través de la identificación de partículas virales de las heces mediante el microscopio electrónico, ya que en caso de la enteritis por CPV se excretan grandes cantidades de partículas virales. En este método diagnóstico se pueden usar anticuerpos anti-parvovirus en una incubación previa con la muestra para aglutinar las partículas virales y se puedan identificar de mejor manera en la muestra (Fig. 1a) (Mylokanis et al., 2016), siendo este junto con el aislamiento viral y el PCR la prueba de oro (gold standard method) para la detección del virus.

Los viriones del CPV tienen la propiedad de aglutinar o realizar hemadsorción de células, específicamente glóbulos rojos de cobayo. Por lo que la incubación de muestras diluidas de este virus con eritrocitos puede orientar el diagnóstico para identificar a el virus de CPV (Mathys et al., 1983).

Otro método de detección indirecta de las partículas virales es la inhibición de la hemaglutinación. En esta prueba se utilizan anticuerpos específicos para parvovirus que al incubarlos con la muestra se aglutinan y evitan que al momento de agregar los eritrocitos los aglutine o exista la hemadsorción (Studdert et al., 1983).

2.7.4 DETECCIÓN DE ANTÍGENO DE CPV

Existen varios métodos para la detección de antígeno en muestras clínicas o tejidos. En muestras clínicas se pueden utilizar las ELISAS o las inmunocromatografías, estas últimas son las más usadas por los clínicos para hacer el diagnóstico de CPV, este se basa en la identificación de partículas virales por medio de anticuerpos anti-parvovirus, estas pruebas son económicas y tienen una alta especificidad, sin embargo, dependiendo de la marca comercial es su sensibilidad siendo muy variada comparadas con la prueba de oro (aislamiento) o pruebas moleculares (Decaro et al., 2013). La sensibilidad de estas pruebas varía dependiendo de la marca utilizada.

2.7.5 HALLAZGOS A LA PATOLOGÍA

Los hallazgos macroscópicos a la necropsia en la enteritis por parvovirus canino son adelgazamiento y decoloración de los intestinos con hemorragia serosa, nódulos linfáticos abdominales agrandados y edematosos. Se puede presentar hemorragias en ganglios linfático, y pared intestinal. El lumen intestinal puede tener contenido líquido de tipo sanguinolento (Meunier et al., 1981). En casos de miocarditis por parvovirus se pueden observar áreas pálidas en tejido cardíaco (Ford et al., 2017).

Entre los hallazgos microscópicos más importantes en la enteritis por parvovirus se encuentran la necrosis de las células epiteliales de las criptas intestinales, además de una necrosis y depresión linfoide generalizada (Vural and Alcigir, 2011). Las criptas del intestino se pueden encontrar dilatadas, distendidas, con moco y detritus celulares, se puede observar proliferación de las células epiteliales de las criptas. Las vellosidades intestinales pueden estar más cortas, colapsadas, con discreta a severa inflamación de tipo fibrinosa y hemorrágica (Meunier et al., 1985). Entre los hallazgos microscópicos en miocarditis por parvovirus se pueden encontrar necrosis y degeneración de miocitos cardiacos, se puede observar infiltración inflamatoria linfocítica, en algunos casos se puede presentar fibrosis miocardial (Ford et al., 2017). Se puede observar además, depresión de células mieloides en médula ósea y raramente leucoencefalomalasia en sistema nervioso central. En todas estas células se pueden presentar las inclusiones intracitoplasmáticas, especialmente en enterocitos del intestino (Haligur et al., 2009).

2.7.6 PRUEBAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE PARVOVIRUS CANINO

Los métodos de diagnóstico más sensibles y que representan un patrón de referencia son los que se realizan a través de la detección del ADN; estos son capaces de detectar y algunos de diferenciar las cepas de campo de las vacunales en CPV (Decaro et al., 2006).

Entre estos métodos se encuentra la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*), la cual, amplifica y detecta el ADN específico de CPV, previamente extraído de las muestras. Posteriormente, este ADN amplificado se separa en un gel de agarosa, se tiñe y fotodocumenta (Senda et al., 1995). El gen de la proteína VP2 ha sido uno de los fragmentos genómicos blanco de esta prueba. Aunado al PCR se ha desarrollado el RFLP-PCR, una variante de este método, donde se utiliza una enzima de restricción para digerir el producto de PCR amplificado. Este método se ha usado para diferenciar entre subtipos vacunales y sobre todo el subtipo CPV2c utilizando la enzima de restricción *Mbo II* (Buonavoglia et al., 2001).

Otra variante de esta técnica es el PCR cuantitativo (qPCR), donde se estima en la fase logarítmica de la amplificación el número de partículas originales en la muestra, en esta variante se detecta la amplificación de la muestra en tiempo real gracias a la utilización de fluorocromos específicos que son detectados por el termociclador y que proyecta el resultado en forma de gráfico en tiempo real y no se necesitan procesos adicionales para visualizar los resultados (elimina geles, tinciones y fotodocumentación). Este método es más sensible y se pueden detectar múltiples patógenos cuando se utilizan sondas marcadas (Streck et al., 2013).

Con el abaratamiento de los métodos moleculares ha sido cada vez más accesible las técnicas de secuenciación de los ácidos nucleicos. Esto ha permitido que en todo el mundo se realice la secuenciación del genoma completo del CPV o bien de secuencias parciales, como las del gen de la proteína VP2, y se comparta con el resto de la

comunidad científica a través de plataformas de edición, análisis y depósito de secuencias como el banco de genes (*GenBank*) de Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, *National Center for Biotechnology Information*). A la fecha existen en este sitio 3999 secuencias de CPV, de las cuales 89 son secuencias del genoma completo de algunas cepas de este virus y el resto son secuencias parciales. Una gran proporción de estas son de los genes de las proteínas VP1, VP2. Actualmente se divide el CPV en subtipos CPV2, CPV 2a, CPV2b y CPV2c en base a la divergencia que se presenta en el gen de la proteína VP2 y los cambios de aminoácidos dicha proteína (Nandi et al., 2013).

3 MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO, ESTUCHES COMERCIALES Y SOLUCIONES UTILIZADAS

El material biológico que se utilizó para esta investigación es el siguiente:

- Vacuna Novibac Puppy DP (Vacuna de virus vivo combinado, cada dosis contiene al menos de 10^5 dosis infectiva de cultivo celular al 50% (DICC₅₀) del Virus del Distemper Canino cepa Ondersterpoort y al menos $10^{7,0}$ DICC₅₀ de Parvovirus canino cepa C154).
- Vacuna CANIGEN® MHA2 Puppy (Vacuna de virus vivo atenuado, cada dosis contiene al menos $10^5 - 10^7$ DICC₅₀ del virus de Parvovirus canino cepa (CPV 780926), Adenovirus canino tipo 2 (cepa Manhattan) $10^4 - 10^6$ DICC₅₀ y Virus Distemper canino (cepa Lederle) $10^3 - 10^5$ DICC₅₀).
- Vacuna Parvomune Holland (Vacuna virus vivo modificado de la Cepa Cornell).
- Enzima de restricción Mbo II (2 unidades por microlitro)

Los estuches comerciales utilizados para este trabajo de investigación fueron los siguientes:

El estuche comercial "Multi-source Genomic ADN kit para 50 preparaciones (Select-kit, Bioselec). Los reactivos consumibles y reactivos incluidos en el kit se enlistan en la tabla 1.

Tabla 1. Consumibles y reactivos del estuche comercial "Multi-source Genomic ADN kit".

NOMBRE DEL REACTIVO O CONSUMIBLE	CONTENIDO DEL ESTUCHE PARA 50 PREPARACIONES	PREPARACIÓN PREVIA PARA SU USO
Columnas miniprap	50 piezas	ninguna
Microtubos de 1.5 ml	50 piezas	ninguna
Microtubos de 2 ml	100 piezas	ninguna
RNase A	60 µl (50mg/ml)	ninguna
Buffer lysis A (lisis celular)	9 ml de solución	ninguna
Proteinasa K	18 mg (liofilizada)	Resuspender proteinasa K (PK) en el buffer para la PK.
PK Buffer	1.2 ml de solución	
Buffer lisis B (precipitación de proteínas)	25 ml de solución	ninguna
Buffer de lavado A	30 ml de solución	ninguna
Buffer de lavado B concentrado	24 ml de solución	Se agregan X ml de etanol (96-100%) al buffer concentrado
Buffer de elución	12 ml (2.5 mM Tris-HCl, pH 8.5)	ninguna
Instructivo	1 manual	-

Otro estuche comercial que se utilizó para la Reacción en Cadena de la Polimerasa fue PCR SuperMix (No. Cat.10572014, Invitrogen™). Este SuperMix cuenta con los siguientes reactivos:

Tabla 2. Contenido del estuche comercial de "PCR SuperMix".

NOMBRE DEL REACTIVO O CONSUMIBLE	CONTENIDO
Contiene 4 viales de 1,125 ml cada uno de 1.1 X PCR SuperMix para 100 reacciones. El contenido de los viales es el siguiente:	
Tris-HCl	22 mM, pH 8.4
KCl	55 mM
MgCl ₂	1.65 mM
dGTP	220 μM
dCTP	220 μM
dATP	220 μM
dTTP	220 μM
Taq Polimerasa recombinante	22 U/ml
Estabilizadores	No especificado

Para la purificación de ADN a partir de geles de agarosa se utilizó el estuche comercial PureLink Quick Gel Extract Kit (No. Cat. K210012, Invitrogen™). Los reactivos de este estuche comercial se enlistan en la tabla 3.

Tabla 3. Contenido del estuche comercial de "PureLink Quick Gel Extract Kit".

NOMBRE DEL REACTIVO O CONSUMIBLE	CONTENIDO	PREPARACIÓN PREVIA PARA SU USO
Estuche comercial para 50 reacciones		
Gel Solubilization Buffer (L3)	2 × 90 ml	ninguna
Wash Buffer (W1)	16 ml	Agregar 64 ml de Etanol al 100% o 96%
Elution Buffer (E5); (10 mM Tris-HCl, pH 8.5)	15 ml	ninguna
Quick Gel Extraction Columns in Wash Tubes	50 each	ninguna
Recovery Tubes	50 each	ninguna

Así mismo se prepararon las siguientes soluciones para llevar a cabo la metodología de este estudio:

- **Solución 1X SB (0.225% de ácido bórico, 0.04% de NaOH).** Se agrega 2.25 gramos de ácido bórico (Jalmek) y 0.4 gramos de NaOH (Jalmek), diluir y aforar a 1 litro. La solución se puede preparar a 20X y después diluirse al 1X para su uso.
- **Gel de 1.5 % Agarosa (Agarose LE-500, Axygen).** Se pesan 1.5 gramos de agarosa de grado molecular, se aforan hasta 100 ml con buffer 1X SB, se calienta la solución con un agitador magnético hasta que la agarosa se solubiliza, la agarosa se puede disolver también al microondas. La agarosa se vierte en el molde y se le coloca el peine para formar los pocillos donde se cargarán las muestras. Se deja solidificar para su uso a temperatura ambiente.
- **Solución 6X azul de bromofenol.** Pesar 25 mg. de azul de bromofenol (Bromophenol Blue, No.Cat. 115-39-9, Sigma-Aldrich), agregar 3 ml de glicerol (Glycerol, No.Cat. G5516-100ML, Sigma-Aldrich) y aforar a 10 ml con de agua para PCR (Water, PCR Reagent, No.Cat. W1754, Sigma-Aldrich)
- **3X GelRed® Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X** de la marca Biotium, el cual, se diluyó 1:3,300 en 0.1 M NaCl previamente.

3.2 LUGAR DE PROCESAMIENTO DE MUESTRAS y EQUIPOS DE LABORATORIO

El procesamiento de las muestras se realizó con el equipo encontrado en los Departamentos de Virología y Genética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL, este equipo se enlista en la tabla 1.

Tabla 4. Equipo de laboratorio utilizado para el desarrollo de esta investigación

NOMBRE DEL EQUIPO DE LABORATORIO
<ul style="list-style-type: none">• Báscula Digital, (Denver Instrument APX-200)• Placa térmica (Labnet Internacional)• Cabina para PCR, (UVP UV SteriizingPCR)• Campana de flujo laminar clase II (ThermoScientific)• Cámaras de electroforesis (Labnet International)• Centrifuga refrigerada, (Labnet HERMLE)• Homogenizador, (DaiggerVortexxGenie 2)• Refrigerador (Torrey)• Termociclador (Axigen)• Ultracongelador de -20 °C (Torrey)• Ultracongelador -70 °C (ThermoScientific)• Espectrofotómetro (

3.3 ÁREA DE MUESTREO

Para coleccionar las muestras se seleccionaron clínicas veterinarias de los diferentes municipios que integran el área metropolitana de Monterrey, N.L. Las clínicas incluidas fueron de los municipios de San Nicolás de los Garza, Apodaca, San Pedro, Monterrey, Salinas Victoria y Santa Catarina que aceptaron participar en este estudio. Para ello se les entregaron a los clínicos material para la colección de la muestra y una encuesta para recolectar los datos más importantes (historial clínico, de los caninos seleccionados para este estudio.

3.4 TIPO DE MUESTRA Y PROCESAMIENTO INICIAL DE LA MISMA

El tipo de muestra utilizado en esta investigación fue materia fecal o heces de caninos que presentaron un cuadro clínico sugerente de infección por CPV y preferentemente que dieron positivo a la prueba de rápida de inmunocromatografía. La muestra clínica fue tomada con un hisopo estéril, así mismo, en algunos casos se recolectaron heces, en ambos casos la muestra fue almacenada en un tubo cónico (Axigen) de 15 ml, en el primer caso se le agregaron 2-3 ml de solución salina fisiológica al hisopo para mantenerlo húmedo y en el segundo caso solo se almacenó la muestra en refrigeración no más de 24 h a 4°C hasta su recolección en la clínica. Las muestras se transportaron en frío (con refrigerantes) al laboratorio para extraer los ácidos nucleicos. El resto de la muestra fue conservado a -20°C hasta su uso.

Una vez en el laboratorio, los tubos cónicos con las muestras de hisopos de heces fueron agitados (mediante bortex) para desprender la muestra del algodón del hisopo, el hisopo se presionó contra las paredes del tubo y este se desechó al contenedor de RPBI. El tubo con la solución salina se centrifugó a 4000 rpm por 2 minutos y se guardaron en microtubos de 1.5 ml -20°C hasta ser procesado (OIE, 2012).

Para procesar heces tomadas como muestra, se pesó un 1 mg de materia fecal y se diluyó en 1 ml de solución salina fisiológica, se agitó en el bortex y se centrifugó

a 4000 rpm por 2 minutos, posteriormente se tomó el sobrenadante y se almacenó a -20°C hasta ser procesado (OIE, 2012).

En caso de deceso del canino, y cuando fue posible, se practicó estudios de patología e histopatología obteniéndose tejidos selectos para el análisis. Las muestras seleccionadas de intestino, ganglios linfáticos y corazón se colocaron en formalina bufferada al 10% para histopatología y en congelación a -20°C, por separado, hasta su envío y procesamiento en el laboratorio (Haligur et al., 2009).

Una vez en el laboratorio, cerca de un gramo de tejido fue congelado en nitrógeno líquido y se maceró en 2-3 ml de Solución salina fisiológica con la ayuda de un mortero. El macerado se transfirió a un tubo de 5 ml y se centrifugó por 4 min. a 5000 rpm. El sobrenadante se transfirió a tubos de 5 ml y se conservaron hasta su uso a -20°C.

3.5 AMPLIFICACIÓN DEL ADN DE CPV POR MEDIO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

3.5.1 OLIGONUCLEÓTIDOS PARA GEN DE LA PROTEÍNA VP2

Para amplificar el segmento del genoma de CPV que codifica para la proteína VP2, fue realizado un diseño de oligonucleótidos en base a las secuencias genéticas completas de los distintos subtipos de CPV (89) publicadas en el banco de genes (GenBank) de la plataforma del Centro Nacional de Información en Biotecnología (NCBI), mediante el uso del programa Primer Select del software ADNSTAR v.15.

Previo al diseño de los oligonucleótidos se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias seleccionadas para encontrar las regiones conservadas antes del inicio y después del final del gen de la proteína VP2. Los alineamientos múltiples de secuencias se realizaron con el programa MegAlign del software ADNSTAR v.15, mediante el uso del algoritmo Clustal W. Una vez identificadas las regiones conservadas se alimentó el programa Primer Select con dichos datos para el diseño de los oligonucleótidos. La especificidad de los nucleótidos fue comprobada por el programa Primer-blast de la plataforma Centro Nacional de Información en Biotecnología (NCBI) (Ye, et al., 2012). Por otro lado, se utilizaron los oligonucleótidos F y R diseñados por Pedroza y colaboradores (2015).

Los oligonucleótidos seleccionados fueron enviados para su síntesis a la empresa Eurofins/Genomics.

3.5.2 EXTRACCIÓN DE ADN DE MUESTRAS

El ADN viral se purificó a partir de estas muestras clínicas procesadas inicialmente y guardadas a -20°C mediante el estuche comercial “Multi-source Genomic ADN kit para 50 preparaciones (Select-kit, Bioelec) siguiendo las instrucciones del fabricante y se describe a continuación el procedimiento.

3.5.2.1 Extracción del ADN a partir de hisopado rectal o muestra de heces

La extracción de ADN total de la muestra fue realizada a partir de la solución

obtenida del hisopo o del sobrenadante de la muestra de heces como se describe a continuación: se colocaron en un microtubo de 1.5 ml, 350 μ l de la muestra, 0.8 μ l de RNasa A (50 mg/ml), 8 μ l de la solución de Proteinasa K (15 μ g/ μ l) y 150 μ l de Buffer lisis A (lisis celular), se mezcló vigorosamente la muestra con ayuda de un agitador vortex y se incubó el microtubo a 56°C durante 15 min. en una placa térmica. Una vez transcurrido en periodo de incubación, se centrifugó el microtubo a 12000 rpm por un minuto para llevar el contenido del microtubo a la parte inferior del mismo. Posteriormente se agregaron 350 μ l de Buffer lisis B (precipitar proteínas), se mezclaron vigorosamente por 30 seg. y se centrifugó el tubo por 10 min. a 12000 rpm. a temperatura ambiente para formar un pellet con los detritus celulares. En un tubo de recolección de 2 ml fue colocada una columna miniprap proporcionada en el estuche comercial, a la cual se agregaron 700 μ l del sobrenadante clarificado del microtubo de 1.5 ml, la columna con el sobrenadante se centrifugó a 12,000 rpm durante un minuto. Del tubo de recolección de 2 ml fue descartado el filtrado, conservándose la columna, y si el volumen de la muestra era superior a 700 μ l, los tres pasos anteriores se repitieron. Se agregaron posteriormente 500 μ l del Buffer de lavado A la columna, posteriormente se centrifugó la columna a 12,000 rpm durante un minuto. El filtrado obtenido fue desechado. Del buffer de lavado B se añadieron 700 μ l a la columna y fue centrifugada a 12000 rpm durante un minuto en donde fue desechado su sobrenadante (este paso se realizó 2 veces). Por último, centrifuga nuevamente la

columna a 12000 rpm por un minuto más para eliminar todo rastro de buffer de lavado B.

La columna se transfirió a un tubo estéril de 1.5 ml (proporcionado en el estuche), para la elución del ADN unido a la columna, para ello se añadieron 100 µl de Buffer de elución (previamente precalentado a 56°C para una mayor eficiencia en la elución) al centro de la membrana, la columna y solución se incubaron por 1 minuto a temperatura ambiente, y finalmente se centrifugó la muestra a 12,000 rpm por un minuto. La columna fue desechada y el filtrado con el ADN se conservó a -20°C hasta su uso.

3.5.2.2 Extracción de ADN total de la muestra a partir de tejidos

El procedimiento para la extracción de ADN total de muestras de tejidos se realizó en forma similar a la extracción de ADN a partir de hisopo. Aquí también se tomaron 350 µl de la solución de la muestra de tejido previamente procesada (ver en punto 3.4 Tipo de muestra u procesamiento inicial de la misma) y el procedimiento se realizó como se ha descrito anteriormente para los hisopos rectales.

3.5.3 CONTROLES POSITIVOS Y NEGATIVOS PARA PCR DEL GEN DE LA PROTEÍNA VP2 DEL CPV

Como control positivo se utilizó el ADN extraído por el método descrito en el punto anterior a partir de 350 µl de la vacuna Virbac Parvigen monovalente (Parvovirus

Canino vivo cepa atenuada Cornell CVP/780916, 10^5 - 10^7 DICC₅₀). Para el control negativo se utilizó agua estéril.

3.5.4 PCR Y PCR ANIDADO PARA EL GEN DE LA PROTEÍNA VP2

Para realizar el PCR que amplifica el gen de la proteína VP2 se utilizó el estuche comercial PCR SuperMix (No. Cat.10572014, Invitrogen™), cuyo contenido se describe en la tabla 3. Para realizar la PCR se siguieron las instrucciones del fabricante. La reacción de PCR se realizó a un volumen de 25 µl donde los componentes y la concentración de estos, en la reacción se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Contenido de la Reacción de PCR para la amplificación de un segmento del gen de la proteína VP2 del CPV.

Nombre y concentración del reactivo	Volumen por reacción
Volumen por de reacción 25 µl	
1.1 X PCR SuperMix	22.0 µl
50 µM de oligonucleótido codificante	0.5 µl
50 µM de oligonucleótido reversa	0.5 µl
ADN de muestra	2.0 µl

La preparación de las reacciones se realizó en microtubos de 1.5 como un premix (acorde a cada no. de reacciones en la corrida, más una reacción extra), esto es 22.0 µl de 1.1 X PCR SuperMix, y 0.5 µl de cada oligonucleótido al 50 µM por reacción. En microtubos de 0.2 ml se colocaron 23 µl de este premix y 2 µl del ADN de la muestra. La reacción se amplificó en un termociclador de la marca Axygen, con las siguientes condiciones de amplificación para el PCR: un ciclo inicial

(desnaturalización a 92°C - 3 min. y 4°C por 30 seg.); 30 ciclos (desnaturalización a 92 °C – 30 seg.; alineamiento de oligonucleótidos de 60 °C – 30seg.; y extensión de 72°C – 1 min.) y un ciclo final (extensión final de 72°C – 10 min. y 4°C-1 min.). Las muestras fueron guardadas a -20°C.

Por otro lado, se realizó otro PCR basándonos en los oligonucleótidos utilizados por Pedroza y colaboradores para amplificar un segmento de 1042 pb (Pedroza-Roldan et al., 2015). Para la amplificación de fragmento (1042 pb) del gen de la proteína VP2 del *Parvovirus canino* mediante una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se utilizaron los oligonucleótidos F y R (Pedroza-Roldan et al., 2015). Para lo cual se preparó un Premix (2µl Buffer-PCR 10x, 0.5µl dNTP's 10(µM), 1µl (25 picomoles) Oligos F y R, 2.5µl MgCl₂, 11.5µl agua destilada y 3µl el ADN de las muestras). Se realizó un programa en un termociclador de un ciclo único de desnaturalización inicial de 94°C -5 min., posteriormente 30 ciclos (94°C – 30 seg., 60°C - 30 seg., 72°C - 1 min.) y un ciclo final (extensión final de 72°C -10 min y 4°C para la estabilización de los fragmentos).

3.5.5 POLIMORFISMO DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP-PCR).

Para establecer los patrones de corte que realizaba la enzima de restricción Mbo II en el gen de la proteína de VP2 se utilizó el programa Megalign del Software

ADNstar versión 15 tanto para el fragmento de 1042pb amplificado por Pedroza y col como para el fragmento amplificado en este estudio de 1779 pb y que son mayores que el establecido en el protocolo original de Buonavoglia (Buonavoglia et al., 2001; Pedroza-Roldán et al., 2015).

La digestión del fragmento amplificado por PCR, se llevó a cabo en un volumen de reacción de 10 µl de los siguientes reactivos 5 µl del fragmento amplificado de 1042 pb y de 1779 pb, 1 U de enzima de restricción Mbo II, 1 µl de tampón CutSmart 10X y 3µl de agua libre de endonucleasas. La reacción se incubó a 37 °C durante 1 hora, posteriormente se inactivo la enzima a 65 °C durante 15 minutos. Las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa 1.5%, después se registró el patrón de corte del amplicón de 1779 pb a través de un fotodocumentador.

3.5.6 ELECTROFORESIS

Los productos obtenidos del PCR y del RFLP-PCR de las muestras y los controles positivos y negativos, así como los marcadores de peso molecular fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% diluido en buffer SB 1X (Brody and Kern, 2004). Previo a la carga de las muestras en el gel de agarosa se mezclaron 3 µl de la muestra de PCR y/o RFLP, 3 µl de 6X azul de bromofenol (25 mg de azul de bromofenol, 3 ml glicerol aforado a 10 ml con agua destilada) y 3 µl de 3 X Gel Red (GelRed® Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X de la marca Biotium, el cual, se diluyó 1:3,300 en 0.1 M NaCl previamente) (Huang et al., 2010). La

electroforesis se realizó en una cámara de electroforesis (labnet Internacional), utilizando 90 voltios por 90 min. Después de la electroforesis el gel fue observado en un transiluminador (longitud de onda de 302-311 nm) y la imagen capturada por un fotodocumentador para su posterior análisis.

3.5.7 PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR A PARTIR DE GELES DE AGAROSA Y SECUENCIACIÓN.

Para realizar la secuenciación de los productos de PCR se realizó una electroforesis como se describe en la sección anterior, posteriormente se recortó el segmento del gel con el fragmento de 1779pb en un transiluminador de rayos UV, los fragmentos se colocaron en microtubos de 2 ml previamente pesado y se determinó el peso total del gel de agarosa seleccionado. Una vez establecido el peso del gel que no debe exceder los 400 mg, se agregaron 3 volúmenes (1.2 ml) del Buffer de solubilización del gel (L3), las reacciones se incubaron a 50°C en una placa térmica (Labnet Internacional) por 10 min., mezclando cada 3 min para homogenizar la muestra. Una vez disuelto el gel se agregó un volumen (400 µl) de isopropanol al 100% e incubaron 5 min. adicionales. Se colocó una columna de extracción (Quick Gel Extraction Column) en un tubo de lavado (Wash Tubes) de 2 ml proporcionados en el estuche comercial. Se agregaron 750 µl del gel disuelto en la columna y se centrifugó por 1 min. a 12000 rpm. Una vez centrifugado se eliminó el filtrado del tubo de lavado y se agregó el resto del gel disuelto y se repitió el proceso. Posteriormente, se agregaron a la columna 500 µl de buffer de lavado (Wash Buffer

(W1)), se centrifugó a 12000 rpm. por 1 min. y se eliminó el filtrado. A continuación, se centrifugó nuevamente la columna a 12000 rpm. por 2 min. para eliminar los restos de buffer W1 y etanol, el tubo de lavado con el filtrado se desechó y se colocó la columna en un microtubo estéril (Recovery Tubes) de 1.5 ml, a esta columna se le adicionaron 50 µl de buffer de elución (Elution Buffer (E5)) en el centro de esta, se incubó 1 min. a temperatura ambiente y finalmente se centrifugó a 12000 rpm. La columna se eliminó y el ADN purificado, se realizó un gel de electroforesis para comprobar su presencia y su pureza, así mismo se cuantificó en un espectrofotómetro a 260/280 nm. El resto del ADN se almacenó a -20°C hasta su uso.

Una vez comprobada la pureza y concentración del ADN de los segmentos amplificados, las muestras con una entre 20 y 30 ng/µl (concentración ideal (30-60 ng/µl) para la secuenciación de fragmentos mayores a 1000pb) fueron empaquetadas y enviadas a la empresa Macrogen, en USA para su secuenciación.

3.6 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Una vez obtenidas las secuencias de la empresa Macrogen, USA, se editaron mediante el programa EditSeq Pro del Software ADNstar versión 15, para obtener la secuencia consenso.

Para realizar los análisis genéticos se utilizó el programa MegaAlign Pro del software ADNstar v.15, el cual por medio del algoritmo ClustalW, realizó los

alineamientos múltiples de las secuencias obtenidas, así como de las secuencias de referencia obtenidas del banco de genes (GenBank) del Centro Nacional de Información en Biotecnología (National Center of Biotechnology Information (NCBI)) (Tabla 6).

Las comparaciones de los pares de bases y el grado de divergencia genética (distancias genéticas) fueron obtenidas a partir de los alineamientos, mediante el método Kimura de doble Parámetro (Kimura, 1980).

Los árboles filogenéticos fueron elaborados con la ayuda del método Neighbour-Joining, a partir de la matriz de divergencia (Saitou and Nei, 1987). Para un soporte estadístico de las agrupaciones en las secuencias de los árboles filogenéticos fue utilizado un análisis con un "Bootstrap" de mil repeticiones (Felsenstein, 1985, 1981).

3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para obtener los datos epidemiológicos de las muestras se realizó una encuesta (Anexo 1), en la cual se recopiló información referente a la edad, sexo, raza, protocolo de vacunación, así como la signología, tratamientos previos y pruebas de laboratorio adicionales.

Tabla 6. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos del gen de la proteína de VP2 de FPV/CPV publicadas en GenBank utilizadas en los análisis genéticos.

NOMBRE DE CEPA	NO. ACCESO DE LA SEC. NUCLEOTÍDICA	NO. ACCESO DE LA SEC. DE AMINOÁCIDOS	ESPECIE DE ORIGEN	LUGAR DE ORIGEN	BIBLIOGRAFÍA
CPV2c-MX-AGC4	KY818849	AVL92767	canino	Aguascalientes, Mx.	Faz et al., 2019
CPV2c-MX-BCN6	KY818850	AVL92768	canino	Baja California Norte, Mx.	
CPV2b-MX-BCN9	KY818853	AVL92771	canino	Baja California Norte, Mx.	
CPV2c-MX-GTO3	KY818861	AVL92779	canino	Guanajuato, Mx.	
CPV2c-MX-HGO6	KY818865	AVL92783	canino	Hidalgo, Mx.	
CPV2c-MX-MEX82	KY818857	AVL92775	canino	Estado de México, Mx.	
CPV2c-MX-MICH3	KY818871	AVL92789	canino	Michoacán, Mx.	
CPV2c-MX-MOR2	KY818874	AVL92792	canino	Morelos, Mx.	
CPV2c-MX-MOR6	KY818878	AVL92796	canino	Morelos, Mx.	
CPV2c-MX-NAY4	KY818880	AVL92798	canino	Nayarit, Mx.	
CPV2c-MX-NAY8	KY818883	AVL92801	canino	Nayarit, Mx.	
CPV2c-MX-PUE1	KY818884	AVL92802	canino	Puebla, Mx.	
CPV2c-MX-QRO6	KY818887	AVL92805	canino	Querétaro, Mx.	
CPV2c-MX-SON1	KY818889	AVL92807	canino	Sonora, Mx.	
CPV2c-MX-TAM1	KY818890	AVL92808	canino	Tamaulipas, Mx.	
CPV2c-MX-TAM7	KY818894	AVL92812	canino	Tamaulipas, Mx.	
CPV2c-MX-YUC1	KY818895	AVL92813	canino	Yucatán, Mx.	
CPV2c-56/00	FJ222821	ACL27783	canino	Italia	Decaro et al., 2009
CPV2b-SAH	FJ222822	ACL27784	vacuna ¹	Italia	
CPV2b-29/97	FJ222823	ACL27785	canino	Italia	
CPV2-388/05-3	FJ222824	ACL27786	canino	Italia	
CPV2c-110/07-27	FJ005236	ACL27701	canino	Estados Unidos	
CPV2c-128/08	FJ005246	ACL27711	canino	España	
CPV2c-195/08	FJ005247	ACL27712	canino	Bélgica	
CPV2c-219/08-5	FJ005249	ACL27714	canino	Italia	
CPV2a-96/08	FJ005252	ACL27717	canino	Italia	
CPV2a-100/08	FJ005259	ACL27724	canino	Italia	
CPV2b-G82/97	FJ005260	ACL27725	canino	Alemania	
CPV2b-G162/97	FJ005261	ACL27726	canino	Alemania	
CPV2c-G7/97	FJ005196	ACL27661	canino	Alemania	
CPV2a-recUY364	KM457139	AIW67636	canino	Uruguay	Pérez et al., 2014
CPV2a-UY245	KM457132	AIW67608	canino	Uruguay	Hingonekar et al., 2012 ²
CPV2-vac2	JN625220	AEX97170	vacuna	(estudio realizado en) India	
CPV2-vac3	JN625221	AEX97171	vacuna	(estudio realizado en) India	
CPV2-vac4	JN625222	AEX97172	vacuna	(estudio realizado en) India	
CPV2-vac5	JN625223	AEX97173	vacuna	(estudio realizado en) India	
CPV2-vac6	JN625224	AEX97174	vacuna	(estudio realizado en) India	
CPV2a-Sho-nan	AB128923	BAD05015	canino	Japón	Hirayama et al., 2005
Merial vaccine	FJ011097	ACM48326	vacuna	(estudio realizado en) Taiwan	Juo, S.D., and Lin, M.Y., 2008 ³
Pfizer/vaccine/06	EU914139	ACG68731	vacuna	Estados Unidos	Liu et al, 2012 ⁴
FPV-1	JX048608	AFO12257	gato	Taiwan	Lie et al., 2013 ⁵
FPV-GD (12/09/YGP)	KC473946	AGJ81125	gato	China	

¹ Cepa vacunal Duramune DAPPI+LC (Fort Dodge Animal Health). ² Hingonekar, N.R., Patel, N.A., Tripathi, A.K., Joshi, C.G. and Jhala, M.K. 2012. Canine parvovirus isolate vac2-5 VP2 gene, complete cds. Acc.No. JN625220-JN625224. Sin publicar. ³ Juo, S.D. and Lin, M.Y. 2008. Canine parvovirus strains Merial/vaccine/06 and Pfizer/vaccine/06 viral protein 2 gene, complete cds. Acc.No. FJ011097 y EU914139. Sin publicar. ⁴ Liu, B.T., Tang, Z.X., Ren, C.B., Yin, Y.W. and Zhang, X.Z. 2012. Feline parvovirus isolate FPV-1 VP2 protein (VP2) gene, complete cds. Acc.No. JX048608. Sin publicar. ⁵ Liu, B.T., Tang, Z.X., Ren, C.B., Yin, Y.W. and Zhang, X.Z. 2013. Feline parvovirus isolate FPV-GD(12/09/YGP) VP2 gene, complete cds. Acc.No. KC473946. Sin publicar.

Utilizando los datos de positividad a la prueba de inmunocromatografía se comparó esta técnica con la de PCR utilizando una tabla de contingencia de 2X2, así como el valor predictivo de un resultado positivo/negativo, así como, la fiabilidad o eficiencia de esta prueba, utilizando el software WinEpi, diagnóstico: evaluación de prueba, con un nivel de confianza de 95%.

Para conocer si la asociación entre las variables cualitativas (edad, sexo, tipo de presentación clínica, protocolo de vacunación), con los subtipos de CPV se utilizó la prueba no paramétrica de Chi-cuadrado (Software WinEpi, Epi Info).

4 RESULTADOS.

4.1 LUGAR DE REALIZACIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

Las muestras fueron procesadas en los Departamentos de Virología y Genética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL. Aquí se realizó la extracción del ADN, estandarización de PCR y PCR anidado, RFLP-PCR, la electroforesis y documentación de las muestras, la preparación de los fragmentos de genoma amplificados por PCR para su secuenciación, así como el empaquetamiento de las muestras para el envío para su secuenciación.

Así mismo, parte de muestras (1-30) se procesaron por PCR y PCR-RFLP en colaboración con el Dr. Pedroza Roldán, en el Laboratorio de Genética Molecular e Inmunología del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara.

La secuenciación de las muestras se realizó por una empresa ubicada en Maryland, USA, denominada Macrogen, USA. El análisis de las secuencias y la caracterización genética de las mismas se realizó en el Departamento de Virología de la FMVZ, de la UANL.

4.2 ÁREA DE MUESTREO.

En este proyecto participaron clínicas veterinarias de los siguientes municipios: Apodaca, Monterrey, Salinas Victoria, San Nicolás de los Garza, San Pedro.

El total de muestras analizadas por municipio fueron las siguientes: del municipio de Apodaca se analizaron 4 muestras, del municipio de Monterrey fueron 2 muestras, para el municipio de Salinas Victoria se analizaron en este estudio 52 muestras, 7 muestras procedieron del municipio de San Nicolás de los Garza, 10 fueron tomadas en el municipio de San Pedro Garza García, de Escobedo fueron procesadas 15 muestras, de Santiago se procesó una muestra y por último, en 13 muestras no se llenó la encuesta y no se estableció el lugar de procedencia (Tabla 7).

Tabla 7. Municipio de procedencia de las muestras analizadas.

MUNICIPIO DE PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS	NÚMERO DE MUESTRAS POR MUNICIPIO	PORCENTAJE DE MUESTRAS POR MUNICIPIO
<i>Apodaca</i>	4	4%
<i>Monterrey</i>	2	2%
<i>Salinas Victoria</i>	52	50%
<i>San Nicolás de los Garza</i>	7	7%
<i>San Pedro Garza García</i>	10	10%
<i>Escobedo</i>	15	14%
<i>Santiago</i>	1	1%
<i>Sin lugar de procedencia</i>	13	12%
Total	104	100

4.3 TIPO Y CARACTERÍSTICAS DE LOS CANINOS Y DE MUESTRAS ANALIZADAS

Todos los caninos fueron ingresados a las clínicas con cuadros gastroentéricos y cuyos clínicos tenían como diagnóstico presuntivo parvovirus canina.

Para establecer el diagnóstico definitivo, los clínicos utilizaron pruebas comerciales para la detección de antígeno de Parvovirus en heces (inmunocromatografía o snap) en el 81% de las muestras (84/103 muestras positivas), confirmándose este diagnóstico a través de este método solo en el 75% de los casos (78/103 muestras positivas) resultando 6 muestras negativas por esta prueba. Sin embargo, de 6 muestras negativas a SNAP, 5 muestras fueron positivas a PCR (1) y PCR anidado (4).

Se compararon los resultados obtenidos de las dos pruebas utilizadas para el diagnóstico de Parvovirus canino (SNAP y PCR), a través del cálculo del valor de kappa para estimar el grado de concordancia entre dos pruebas diagnósticas con un nivel de confianza del 95% (con el programa WinEpi).

Obteniendo como resultado un grado de concordancia débil (kappa es igual a 0.271), con un grado de concordancia en porcentaje del 94% entre pruebas, la especificidad del 100% y la sensibilidad del SNAP de 94% comparada con el PCR

PCR

		+	-	Total	
IC	+	78	0	78	84
	-	5	1	6	
	Total	83	1	79	

84

Grado de concordancia de pruebas: 94% (79/84)

Sensibilidad de IC comparado con PCR: 94% (78/83)

Especificidad de la prueba: 100% (1/1)

Por otro lado, se utilizaron distintas marcas comerciales de las pruebas de SNAP para detectar antígeno de Parvovirus canino en heces. En el 44% (37/84) de las muestras se utilizó la IC “Canine Parvovirus test Kit de la marca ApetCare”, en el 32% (27/84) fue utilizada la “Rapid CPV Ag Test Kit Anigen de BioNote Inc”, en el 12% (10/84) fue usada la IC “Uranotest Parvo-corona (UranoVet)”, comercializada en México por Norvet y en el 10% se utilizó la Prueba SNAP Parvo de la marca IDEXX y solo en una fue desconocida la marca comercial.

La marca comercial con mayor cantidad de falsos negativos y que fueron positivas a PCR y PCR anidado fue el Rapid CPV Ag Test Kit Anigen de BioNote Inc (4 muestras), mientras que para ApetCare resultó una muestra negativa pero que fue confirmada como positiva por PCR. En las restantes marcas, los resultados de la prueba rápida para antígeno concordaron con los del PCR.

En total, se analizaron 104 muestras clínicas, de las cuales, 42% (43/104) presentaron diarrea sanguinolenta, el 33% (34/104) presento diarreas no

sanguinolentas (heces mucoides y con tonalidades “mostaza”), el 18% (19/104) presentaron signos como inapetencia y vómito recurrentes, sin diarrea, por último, en el 7% (7/104) de los casos no se obtuvieron datos del estado clínico o inmunización de los caninos (Tabla 8).

De los datos tomados de la encuesta encontramos que el 8% (8/103) de las muestras analizadas de los caninos, presentaron el protocolo de vacunación completo.

Por otro lado, las edades de los caninos analizadas en este estudio fueron menores a 1 año, a excepción de un canino con protocolo completo de vacunación y de 3 años (Anexo 1).

Tabla 8. Características y cantidad de las heces para detectar CPV en caninos del área metropolitana de Monterrey, N.L.

CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA		ANALIZADAS	PORCENTAJE
Diarrea	<i>Heces mucoides y con tonalidades mostaza</i>	10	9.7
	<i>Heces mucoides y con tonalidades mostaza y emesis</i>	24	23.3
	<i>Hemorrágica</i>	10	9.7
	<i>Hemorrágica y emesis</i>	33	32.0
Sin Diarrea	<i>Inapetencia, emesis</i>	19	18.4
Sin datos		7	6.8
Total		103	100

4.4 AMPLIFICACIÓN DEL ADN DE CPV POR MEDIO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

4.4.1 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA EL GEN DE LA PROTEÍNA VP2 DE CPV.

Para el diseño de los oligonucleótidos para el gen de la proteína VP2 se realizó un alineamiento múltiple de 70 secuencias completas de Parvovirus canino, disponibles en el GenBank (alineamiento no incluido), se descartaron de estas las secuencias que fueran 100% idénticas y en base a este alineamiento múltiple se localizó el marco de lectura abierto que codifica para la proteína VP2, que se encontró en el nucleótido 2783pb – 4540pb. La ubicación del gen de la proteína VP2, así como de los oligonucleótidos seleccionados se estableció en base a la secuencia completa de Parvovirus canino (Canine parvovirus, complete genome), depositada en el banco de genes (Genbank) de la plataforma de N.C.B.I., con número de acceso NC_001539. Se diseñaron 4 pares de oligonucleótidos para amplificar un segmento de 1799pb (secuencia del gen de la proteína VP2) y 3 segmentos de 390pb, 527 pb y 745 pb (secuencias parciales del gen de la proteína VP2). El nombre, la secuencia, localización, Tm de los oligonucleótidos y el tamaño del segmento que amplifican se muestran en la tabla 9. Por último, la especificidad de los oligonucleótidos fue comprobada por el programa Primer-blast de la plataforma NCBI (Ye et al., 2012).

4.5 PCR Y PCR ANIDADO PARA EL GEN DE LA PROTEÍNA VP2 DE CPV

El protocolo de PCR y PCR anidado para el gen de la proteína VP2 se estandarizó bajo las condiciones del Departamento de Virología Veterinaria de la UANL, usando la vacuna comercial Virbac Parvigen monovalente (Parvovirus Canino vivo cepa atenuada Cornell CVP/780916, 10^5 - 10^7 DICC₅₀) y una muestra fecal de cachorros con problemas digestivo positiva a la prueba de inmunocromatográfica específica para *Parvovirus canino*. Utilizando el estuche comercial PCR SuperMix y siguiendo las especificaciones del fabricante, se utilizó las cantidades y concentración de reactivos que se muestran en la tabla 5 por cada reacción.

Para establecer la temperatura óptima de alineamiento de los oligonucleótidos se realizó un gradiente de temperatura de 57°C, 58°C, 59°C, 60°C y 61°C, obteniendo la temperatura de alineamiento óptima de 60°C, como se predijo con los programas Primer Select y Primer blast (descrita en materiales y métodos).

Las condiciones de amplificación para el PCR que se establecieron en esta estandarización fueron las siguientes:

- un ciclo inicial (desnaturalización a 92°C - 3 min. y 4°C por 30 seg.);
- 30 ciclos (desnaturalización a 92 °C – 30 seg.; alineamiento de oligonucleótidos de 60 °C – 30seg.; extensión de 72°C – 1 min.) y
- un ciclo final (extensión final de 72°C – 10 min. y 4°C-1 min.).

Tabla 9. Oligonucleótidos diseñados para el PCR y PCR anidado para amplificar el gen de la proteína VP2 de cepas de Parvovirus canino.

NOMBRE	SECUENCIA	SENTIDO	LOCALIZACIÓN	Tm	TAMAÑO DEL FRAGMENTO AMPLIFICADO
CPV2747F	GCCGGTGCAGGACAAGTAAA	Codificante (forward)	2747	62.4	390pb
CPV3137R	CCCAAGCATTTCATCAACCA	Reversa	3137	60.6	
CPV3124F	TGCAAATGCTTGGGGAGTTTG	Codificante (forward)	3124	60.6	527pb
CPV3651R	GGTGGTAAGCCCAATGCTCT	Reversa	3651	62.4	
CPV3633F	GAGCATTGGGCTTACCACCA	Codificante (Forward)	3633	62.4	745pb
CPV4378R	ACCTTCCACCAAATCTGAGT	Reversa	4378	59.2	
CPV2748F	CCGGTGCAGGACAAGTAAAAAG	Codificante (Forward)	2748	62.7	1779pb
CPV4527	CTAGGTGCTAGTTGAGATTTTTCAT	Reversa	4527	59.7	

La ubicación de los oligonucleótidos se estableció en base a la secuencia completa de Parvovirus canino (Canine parvovirus, complete genome) del Genbank/N.C.B.I., con número de acces NC_001539.

La figura 4 muestra el segmento amplificado de un tamaño de 1779pb y separado por electroforesis de un PCR para la proteína VP2 del CPV.

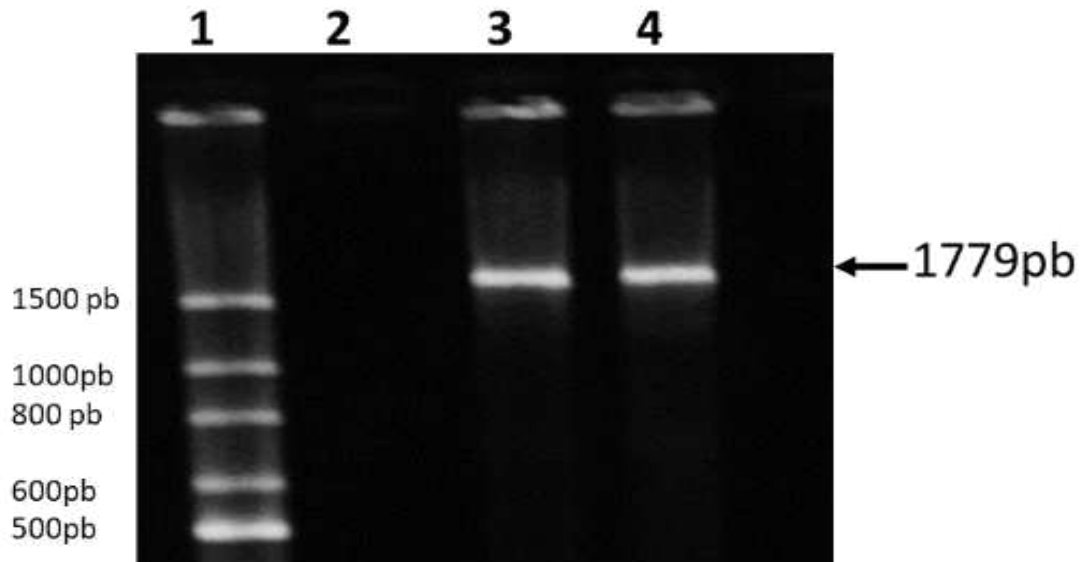


Figura 4. Resultado de la electroforesis de los productos de PCR del gen de la proteína VP2 de CPV. Se realizó un PCR con los oligonucleótidos CPV2748F y CPV4527R que amplificaron un producto de 1779pb con un programa de PCR de 30 ciclos (Desnaturalización: 95°C-30 seg., Alineamiento: 60°C-30 seg. y Extensión: 72°C-1 min.) **Carril 1.** Marcador de Peso Molecular; **Carril 2.** Control Negativo (H₂O para PCR); **Carril 3.** Vacuna Virbac monovalente; **Carril 4.** ADN de muestra de cachorro positivo a inmunocromatografía a CPV.

Por otro lado, en una estancia de investigación realizada en el Laboratorios de Genética Molecular e Inmunología del centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara a cargo del Dr. Cesar Pedroza Roldán, en donde realizamos técnicas moleculares (PCR-RFLP) para la diferenciación

de cepas de *Parvovirus canino*, se realizó un PCR que amplificó un fragmento de 1042 pb del gen de la proteína estructural VP2 (Fig.5).

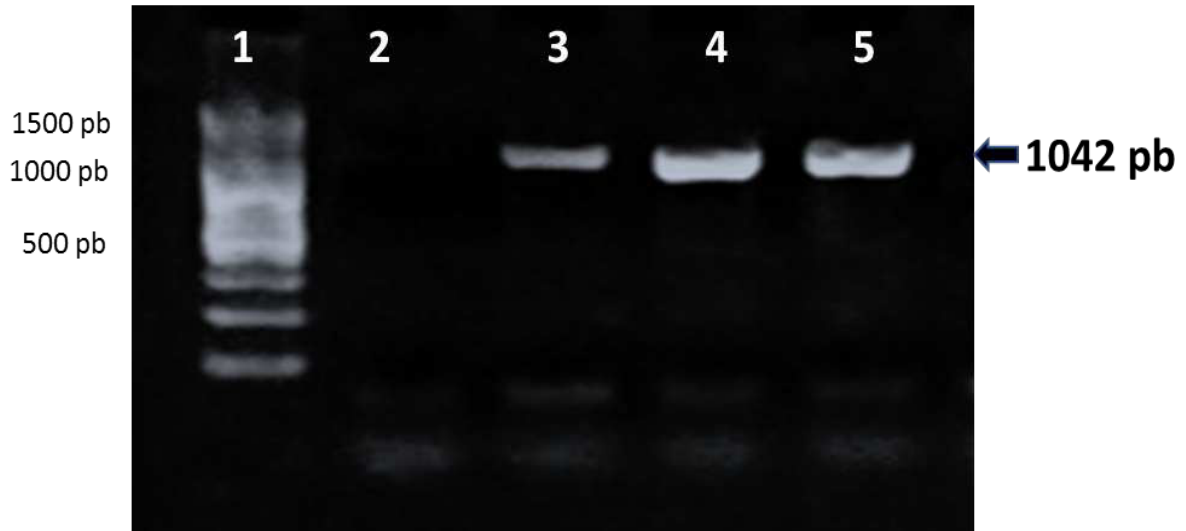


Figura 5. Resultados de la electroforesis del PCR anidado para un fragmento de la proteína VP2 del CPV. Se realizó un PCR con los oligonucleótidos F y R con un producto de PCR de 1042 pb. En la imagen podemos observar el marcador de peso molecular (carril 1), control negativo (carril 2), muestra de cachorros del Hospital de Guadalajara (carril 3), control positivo vacuna Holland (carril 4) y la muestra tomada en Nuevo León (carril 5).

Para el PCR anidado se utilizaron los oligonucleótidos CPV3633F y CPV4378R localizados en el último tercio del gen de la proteína VP2 y que amplificaron un segmento de ADN de 745 pb. Las condiciones de temperatura y tiempos para PCR se establecieron y fueron los mismo que para el PCR. Los resultados de la electroforesis del PCR anidado se muestran en la figura 6.

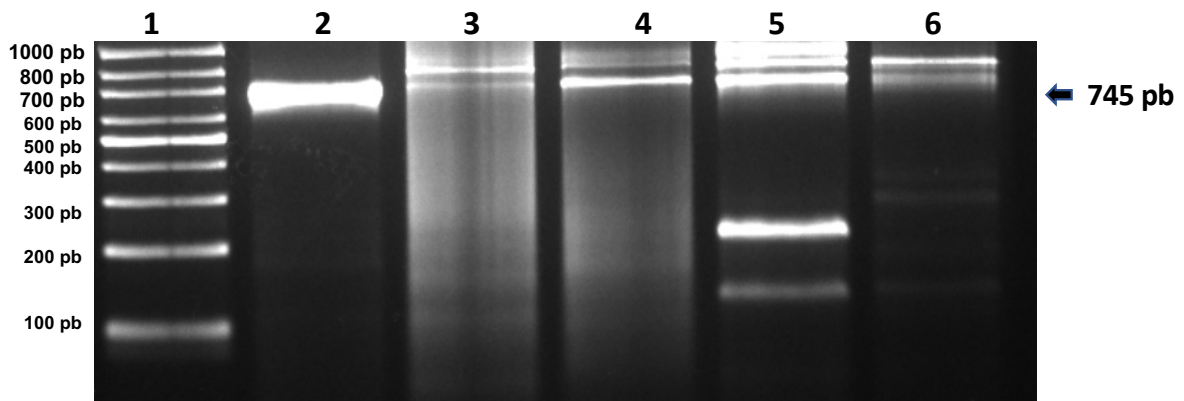


Figura 6. Electroforesis de los productos de PCR anidada del gen de la proteína estructural VP2 del Parvovirus canino. Se realizó un PCR con los oligonucleótidos CPV3633F y CPV4378R que amplificaron un producto de 745 pb con un programa de PCR de 30 ciclos (Desnaturalización: 95°C-30 seg., Alineamiento: 60°C-30 seg. y Extensión: 72°C-1 min.) **Carril 1.** Marcador de Peso Molecular; **Carril 2.** Control positivo Vacuna Virbac monovalente; **Carril 3-6.** ADN de muestra positivas a PCR anidado para CPV.

De las 104 muestras analizadas 99 fueron positivas al PCR y 4 en el PCR anidado. La única muestra negativa fue positiva a inmunocromatografía (Anigen), corrida nuevamente con una de la marca IDEXX siendo negativa a esta última y a la prueba de PCR y PCR anidada, dando una positividad al PCR para CPV de 99% (103/104) figura 7.

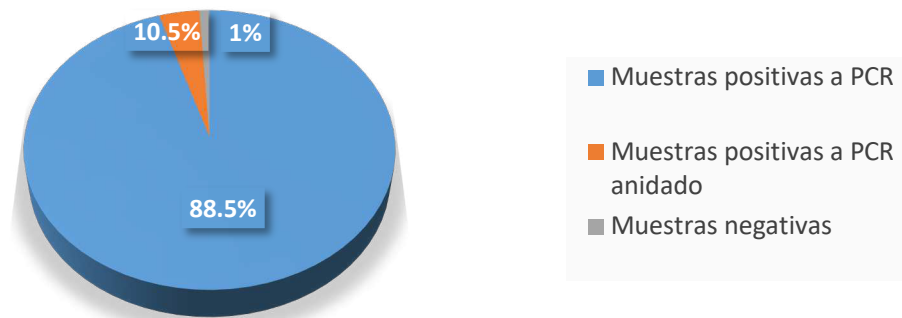


Figura 7. Muestras de 104 caninos con problemas digestivos. En este estudio, 92 muestras fueron positivas a PCR, 11 muestras fueron positivas a PCR anidado y una muestra resultó negativa a PCR y PCR anidado.

4.6 RESULTADOS DEL PCR- RFLP PARA PARVOVIRUS CANINO

Durante el análisis de digestión *in silico* con la enzima *Mbo II* realizada con el programa SeqBuilder del software ADNstar v. 15. se estableció el patrón de corte de esta, en dos segmentos de PCR amplificados, uno establecido en este trabajo de investigación de 1779pb con el cual se trabajaron 98 muestras y otro trabajado con Pedroza y colaboradores de 1042pb (Pedroza-Roldan et al., 2015) y con el cual se trabajaron 30 muestras.

Los patrones de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción de PCR fueron constantes para las cepas vacunales CPV2, ya que solo presentaron dos sitios

de restricción para el fragmento de 1779 pb en las posiciones 293 y 1272 de este, estableciendo para estos subtipos 3 segmentos (293 pb, 979 pb y 507 pb) (Fig. 10, carril 4). Por otro lado, la cepa caracterizada como CPV2b mostró 3 sitios de corte en las posiciones 215, 293 y 1272, dando un patrón de polimorfismo de 215pb, 78pb, 979pb y 507pb. Mientras que para las cepas CPV2c variaron los sitios de restricción de la enzima *Mbo II* desde 2, 3 y 4 sitios de restricción. Los fragmentos que presentaron el sitio de restricción en dos posiciones (293 pb y 1328 pb) dieron como resultado tres fragmentos de 293 pb, 1035 pb y 451 pb (Fig.10, carril 2). Algunas cepas presentaron 3 sitios de restricción en la base 215, 293 y 1328, para dar un patrón de polimorfismo de 215pb, 78pb, 1035pb y 451 pb (Fig. 10, carril 3). Aquellos que presentaban 3 sitios de restricción en la posición de los nucleótidos 293, 1272 y 1328 dieron un patrón de polimorfismo de 4 fragmentos con tamaños de 293 pb, 979 pb, 56 pb y 451 pb (Fig.10, carril 5). Por otro lado, algunas cepas de CPV2c presentaron 4 sitios de restricción para la enzima *Mbo II*, pero en las bases 215, 293, 1272 y 1328 del segmento de ADN amplificado de 1779 pb, dando un polimorfismo de 5 segmento (215 pb, 78 pb, 979pb, 56pb y 451 pb) (Fig. 10, carril 6).

Para el fragmento de 1042 pb del PCR establecido por Pedroza (Pedroza-Roldan et al., 2015) posicionado entre las bases 3384 y 4425 de la secuencia de CPV, se obtuvieron 3 patrones de polimorfismo de longitud de fragmentos. Uno de los patrones solo presentó un sitio de restricción para la enzima *Mbo II* en la base 634 del fragmento amplificado, dando como resultado dos segmentos, uno de 634 pb y otro de 408 pb,

dicho patrón obtenido con las cepas del tipo CPV2, CPV2a y CPV2b tanto por el programa utilizado (Fig. 9) como por el PCR-RFLP de las muestras procesadas con el Dr. Pedroza (Fig. 11). El segundo patrón de polimorfismo que se obtuvo en aquellas cepas donde se encontró solo un sitio de restricción, pero en la base 690, dando un patrón de dos fragmentos, pero de 690pb y de 352 pb que se obtuvo en las cepas CPV2c. Por último, en cepas reportadas por Pedroza y colaboradores como CPV2c (Pedroza-Roldan et al., 2015) se encontraron algunas secuencias que tenían dos sitios de restricción para la enzima *Mbo II* ubicados en las posiciones 634 y 690, estableciéndose un patrón de tres segmentos de distinta longitud (634 pb, 56pb y 352 pb). Cabe mencionar que el sitio de restricción en la base 690 estuvo presente solo en las cepas del subtipo CPV2c dando un fragmento característico de 352 pb para dicho subtipo (Fig. 9 y 11).

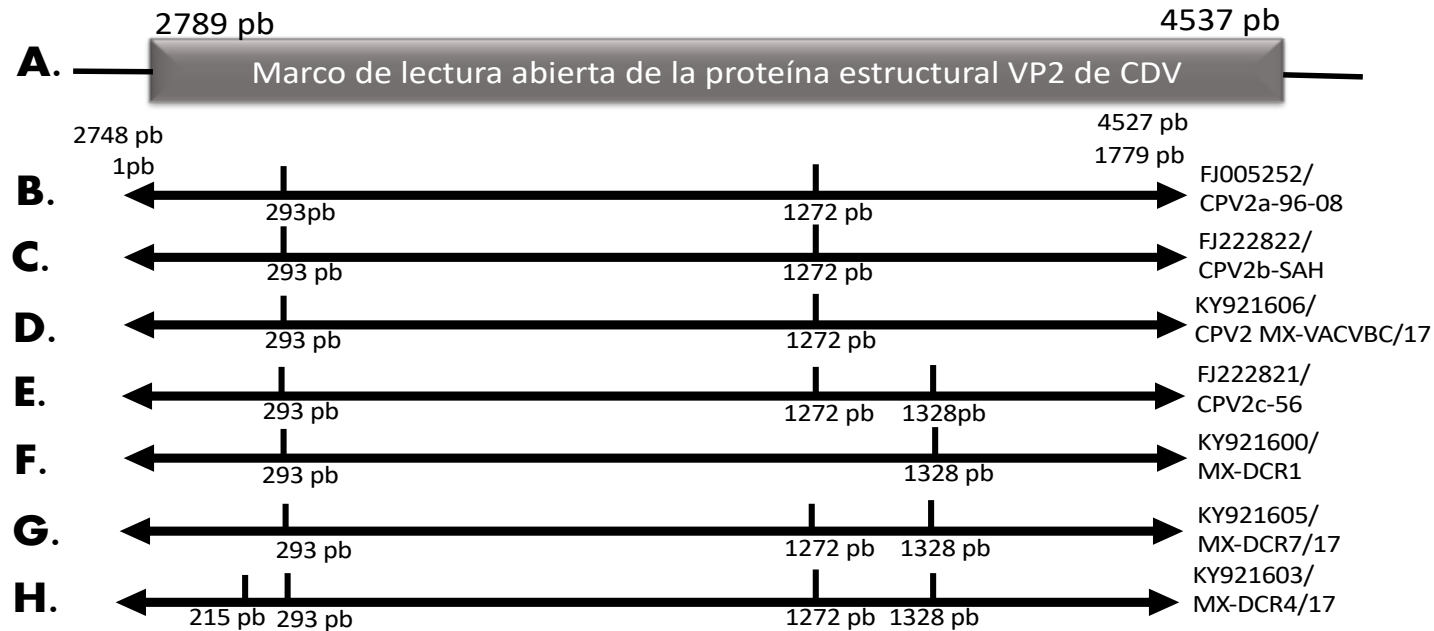


Figura 8. Patrones de corte de la Enzima Mbo II en un fragmento de ADN de 1779 del genoma de CPV, determinados con el programa SeqBuilder del software ADNstar v.15. En la figura se pueden apreciar la posición de los fragmentos de ADN amplificados por PCR y la posición de estos en el genoma de CPV, así como la posición los sitios de restricción predichos por el programa para la enzima *Mbo II*. **A.** Representan un segmento del genoma del CP2 de la base 2748 a la 4600, se puede observar además la base del genoma donde inicia y termina el marco de lectura abierta para la proteína estructural de la cápside VP2 (2789-4537 pb). **B-H.** Representa el segmento de 1779 pb amplificado a través del PCR establecido en este trabajo de investigación al realizar un alineamiento con las secuencias CPV2 MX-VACVBC/17 (KY921606), CPV2a.96.08 (FJ005252), CPV2b-SAH (FJ222822), CPV2c-56 (FJ222821), CPV2c MX-DCR1 (KY921600), CPV2c MX-DCR4 (KY921603), CPV2c MX-DCR7 (KY921605), encontradas entre las bases 2748.- 4527. **B-D.** Representan los subtipos CPV2a, CPV2b y CPV2 respectivamente, los cuales poseen dos sitios de corte en la base 293 y la 1272. **E-H.** Representan las Cepas PV2c con distintos polimorfismos de restricción con la enzima *Mbo II*, donde el sitio de restricción en la base 1328 se presenta solo en el Subtipo CPV2c y es característico de este. **E.** Representa el segmento de 1779 pb de las secuencias de CPV2c-56 (FJ222821) y CPV2c MX-DCR7/17 (KY921605) que presenta 3 sitios de restricción en la base 293, la 1272 y la 1328. **F.** Por otro lado, la cepa CPV2c MX-DCR1 (KY921600) presenta solo 2 sitios de restricción en las posiciones 293 y 1328. **H.** La cepa CPV2c MX-DCR4/17 presentó 4 sitios de restricción en las bases 215, 293, 1272 y 1328.

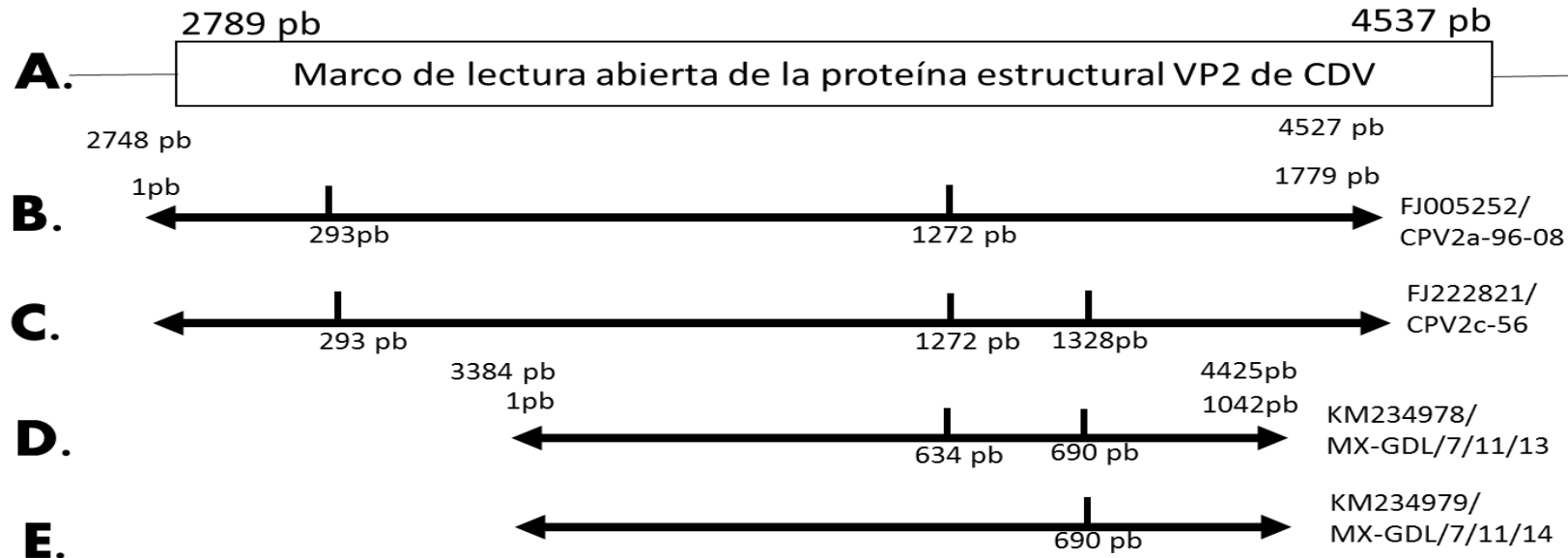


Figura 9. Patrones de corte de la Enzima Mbo II en un fragmento de ADN de 1779 pb y de 1042 pb del genoma de CPV, determinados con el programa SeqBuilder del software ADNstar v.15. En la figura se pueden apreciar la posición de los fragmentos de ADN amplificados por PCR y la posición de estos en el genoma de CPV., así como la posición de los cortes predichos por el programa para la enzima *Mbo II*. **A.** Representa un segmento del genoma del CP2 de la base 2748 a la 4600, se puede observar además la base del genoma donde inicia y termina el marco de lectura abierta para la proteína estructural de la cápside VP2 (2789-4537 pb). **B.** Representa el segmento de 1779 pb amplificado a través del PCR establecido en este trabajo de investigación al realizar un alineamiento con la secuencia CPV2a.96.08, reportadas en el banco de genes (FJ005252) cuya posición se encuentra entre las bases 2748-4527, la cual presenta dos sitios de corte en la base 293 y la 1272). **C.** Representa el segmento de 1779 pb amplificado a través de una secuencia de CPV2c-56, reportadas en el banco de genes (FJ222821), la cual presenta 3 sitios de corte en la base 293, la 1272 y la 1328, presentándose en las cepas de subtipo CPV2c el corte en la posición 1238. **D.** Representa el segmento de 1042 pb amplificado por el PCR diseñado por Pedroza y colaboradores, secuencia MX-GLD/7/11/13 reportadas en el banco de genes (KM234978), cuya posición se encuentra entre las bases 3384 y 4425, la cual presenta 2 sitios de corte en la base 634 y 690, presentándose en las cepas de subtipo CPV2c el corte en la posición 690 en este producto de PCR. **E.** Representa otro segmento de 1042 pb amplificado por el PCR diseñado por Pedroza y colaboradores, secuencia MX-GLD/7/11/13 reportadas en el banco de genes (KM234979), la cual solo presenta un sitio de corte en la base 690, presentándose característica de las cepas de subtipo CPV2c .

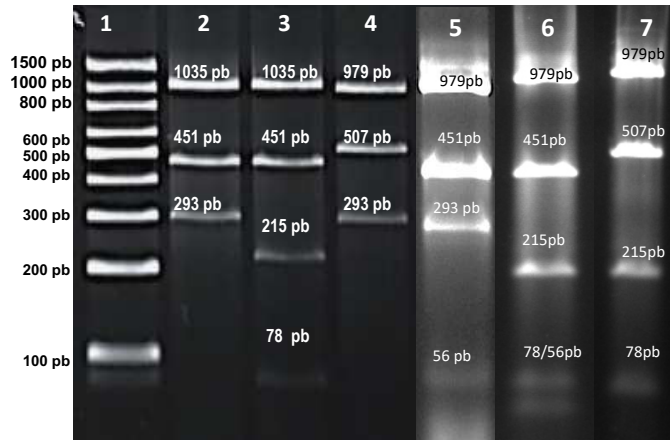


Figura 10. Patrones de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción del fragmento de 1779 pb del genoma de CPV con la enzima *Mbo II*. El control de la vacuna que representa el subtipo CPV2 presenta un polimorfismo de fragmentos con una longitud de 293pb, 507 pb y 979 pb (**carril 4**), la muestra CPV2b tiene un patrón de polimorfismo de 979 pb/507 pb/215 pb/78 pb (**carril 7**), mientras que las muestras del subtipo CPV2c presentan distintos tipos de polimorfismo de fragmentos en su longitud (293 pb/451 pb/1035 pb; 78 pb/215 pb/451 pb/1035 pb; 979 pb/451 pb/293 pb/56 pb y 979 pb/451 pb/215 pb/78 pb/56 pb) (**carriles 2,3,5 y 6**), en estos patrones de polimorfismo el segmento que representa las cepas del tipo CPV2c es el de 451pb. **Carril 1.** Marcadores de Peso molecular. **Carril 2.** Muestra 63, **Carril 3.** Muestra 64, **Carril 4.** Muestra Control positivo de Subtipo CPV2 (vacuna Virbac), **Carril 5.** Muestra 51, **Carril 6.** Muestra 48 , **Carril 7.** Muestra 59.

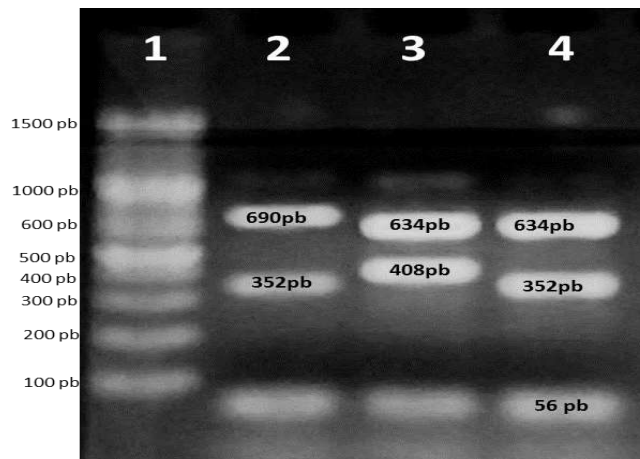


Figura 11. Patrones de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción del fragmento de 1042 pb del genoma de CPV con la enzima *Mbo II*. Se puede el patrón de polimorfismo con la enzima *Mbo II* de 634pb/408pb descrito por el subtipo CPV2, CPV2a, CP2b y los patrones de polimorfismo de fragmento de una longitud de 690pb/352 pb y 634pb/352pb/56pb para el subtipo CPV2c donde el fragmento de 352pb es característico de este subtipo. **Carril 1.** Marcador de peso molecular. **Carril 2.** Muestra de Guadalajara, **Carril 3.** el control positivo vacuna Holland, **Carril 4.** Muestra tomada en Nuevo León.

Como se demostró tanto en los estudios de predicción de sitios de corte con la enzima *Mbo II* con el programa SeqBuilder del software v.15 de los sitios para los segmentos de 1042pb y de 1779pb de los PCR para CPV establecidos por Pedroza y colaboradores (Pedroza-Roldán et al., 2015) y en esta investigación, las cepas o variantes genéticas del subtipo CPV2c presentan patrones de polimorfismos de fragmentos con distintas longitudes, siendo para estas constante solo el fragmento de 451 pb en el producto de PCR de 1779pb y una banda de 352pb para el producto de PCR de 1042 pb (Pedroza-Roldán et al., 2015).

A través de PCR-RFLP se caracterizaron 93 muestras que fueron positivas al PCR, de estas, 83% (77/93) presentaron los distintos patrones de polimorfismo señalado para el subtipo CPV2c (Fig. 10, 11 y 12), el 1% (1/93) presentó una banda correspondiente a los subtipos CPV2, 2^a, 2b; por último, en el 16% (15/93) no se pudo determinar el subtipo debido a que la cantidad de ADN en las bandas, resultado de la digestión, no fue suficiente para poder observarlas en la fotografía de la electroforesis. Así mismo, no se pudo establecer el subtipo por este método en las 11 muestras que solo dieron positivo al PCR anidado.

De este total de muestras se analizadas por PCR-RFLP, en 62 se utilizó el producto de amplificación de 1779pb, pudiendo observar hasta 6 patrones distintos de polimorfismo, el patrón más frecuente fue el patrón con un 47% (29/62) fue el de 3

bandas (293pb, 451pb, 1035pb), seguido de un patrón de cuatro bandas (78pb, 215pb, 451pb y 1035pb) con el 21% (13/62), el 13% (8/62) presentó un patrón de 5 bandas (56 pb, 78 pb, 215 pb, 451 pb, 979 pb), además un 14.5% (9/62) presentó 4 bandas (56pb, 293pb, 451pb, 979pb), todas las anteriores con el fragmento de 415pb correspondiente al tipo CPV2c. Por otro lado, solo se encontró el 1.5% (1/62) que correspondió con el subtipo CPV2b al momento de realizar la secuenciación y dos (4%) que correspondieron a las cepas vacunales CPV2. La tabla 10 muestra el total de muestras y los patrones de polimorfismo que se obtuvieron al hacer la digestión del fragmento de 1779 pb amplificado por PCR con la enzima Mbo II. La figura 12 muestra algunas de las muestras con distintos patrones de polimorfismo estudiadas en esta investigación.

Tabla 10. Patrones de Polimorfismos de longitud de fragmentos del producto de PCR de 1779 pb.

Tipo de RFLP del fragmento de 1779pb	Subtipo	Número de muestras
3 bandas (293pb, 507 pb , 979pb)	CPV2 vacunas	2
4 bandas (78pb, 215pb, 507pb , 979pb).	CPV2b	1
3 bandas (293pb, 451pb , 1035pb)	CPV2c	29
4 bandas (78pb, 215pb, 451pb y 1035pb)	CPV2c	13
4 bandas (56pb, 293pb, 451pb, 979pb)	CPV2c	9
5 bandas (56 pb, 78 pb, 215 pb, 451 pb , 979 pb)	CPV2c	8
Total, de muestras		62

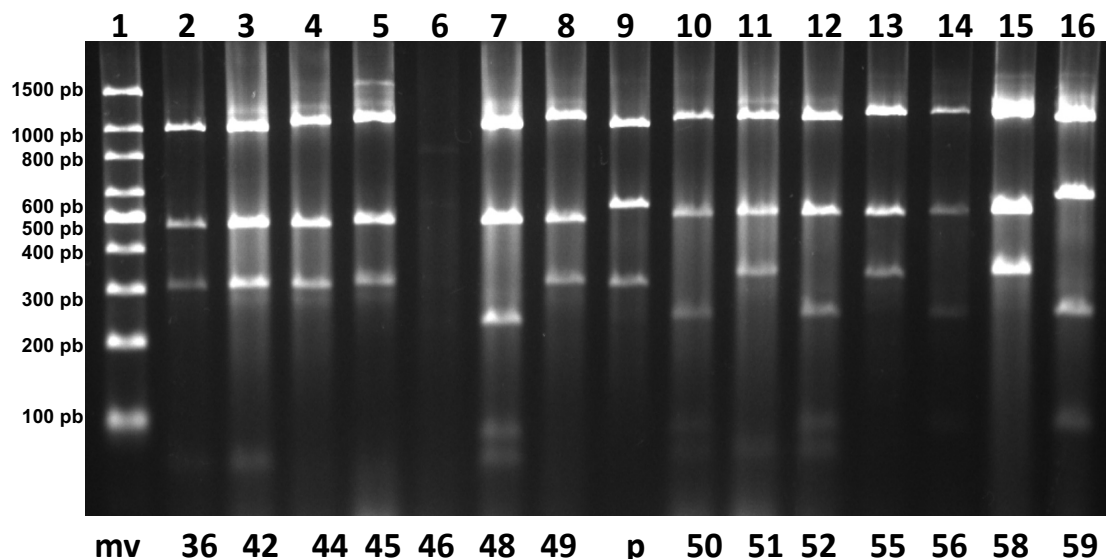


Figura 12. Digestión del fragmento de 1779 pb del gen de la proteína VP2 del CPV con enzima Mbo II de las muestras procesadas. El control de la vacuna que representa el subtipo CPV2 presenta un polimorfismo de fragmentos con una longitud de 293pb/507 pb/979 pb, mientras que las muestras del subtipo CPV2c presentan distintos en esta imagen dos tipos de polimorfismo de fragmentos en su longitud (293pb/451pb/1035pb; 78pb/215pb/451pb/1035pb; 56pb/78pb/215 pb/451 pb./979 pb), y para la Ceba CPV2c (muestra 59) presentó un patrón de polimorfismo de 78pb/215pb/507pb /979pb. En estos patrones de polimorfismo el segmento que representa las cepas del tipo CPV2c es el de 451pb. **Carril 2.** Muestra 36, **Carril 3.** Muestra 42, **Carril 4.** Muestra 44, **Carril 5.** Muestra 45, **Carril 6.** Muestra 46, **Carril 7.** Muestra 48, **Carril 8.** Muestra 49, **Carril 9.** Control positivo de Subtipo CPV2 (vacuna Virbac), **Carril 10.** Muestra 50, **Carril 11.** Muestra 51, **Carril 12.** Muestra 52, **Carril 13.** Muestra 55, **Carril 14.** Muestra 56, **Carril 15.** Muestra 58 y **Carril 16.** Muestra 59, patrón de polimorfismo para CPV2, 2^a, 2b. (78pb, 215, 507pb, 979pb, donde la representativa de).

4.7 SECUENCIACIÓN DE UN SEGMENTO DE 1779 PB AMPLIFICADO POR PCR DEL CPV

De un total de 104 muestras, procesadas por PCR y 93 muestras caracterizadas por PCR-RFLP, se mandaron secuenciar 27 muestras seleccionadas en base a los distintos patrones de polimorfismo resultado del PCR-RFLP para el subtipo CPV2c,

una que obtuvo un patrón del subtipo (CPV2, CPV2a y CPV2) así como 2 vacunas usadas con mayor frecuencia por los clínicos de la zona (Virbac y Novibac).

De estos, fragmentos amplificados y purificados de 1779 pb, se enviaron entre 20 y 35 ng/μl para su secuenciación. En las secuencias MX-DCR1/17, MX-DCR2/17, MX-DCR3/17, MX-DCR4/17, MX-DCR6/17, MX-DCR7/17, MX-DCR22/18, MX-DCR41/18 y MX-DCR56/18, MX-DCR59/19, MX-DCR82/18, MX-DCR118/19, así como para las secuencias de las vacunas MX-VACVBC/17 y MX-VACNBVC/17 se obtuvieron alrededor de 1200 pb en promedio con los oligonucleótidos codificante y reversa. Mediante la edición de estas, se obtuvieron 1703 pb del gen de la proteína VP2, siendo una secuencia parcial (1703/1748 pb). De estas 27 muestras solo en 14 se obtuvieron las secuencias completas; en 11 muestras se reportaron (MX-DCR23/18, MX-DCR66/18, MX-DCR73/18 y MX-DCR80/18) o se reportarán (MX-DCR17/19, MX-DCR34/19, MX-DCR39/19, MX-DCR49/19, MX-DCR50/19, MX-DCR64/19 y MX-DCR71/19) fragmentos más pequeños (555-1000 pb) al banco de genes (GenBank) de la plataforma del NCBI (Tab.11 y 12).

4.8 RESULTADO DE ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DEL GEN DE LA PROTEÍNA VP2 DEL CPV.

El análisis de las secuencias ya reportadas mostró una similaridad del 98.2% (1672/1703) al 99.7% (1697/1703) entre los nucleótidos en el gen de la proteína VP2

entre cepas encontradas en Monterrey y su área metropolitana, incluyendo las dos vacunas que fueron secuenciadas.

Tabla 11. Secuencias genéticas de CPV de Monterrey y su área metropolitana reportadas en el GenBank de la Plataforma NCBI

NO. MUESTRA	NO. ACCESO DE LA SEC. NUCLEOTÍDICA	NO. ACCESO DE LA SEC. DE AMINOÁCIDOS	SEXO	ESPECIE/ RAZA	EDAD	VACUNAS	MARCA	MUNICIPIO
MX-DCR1/17	KY921600	AVP71831	Macho	Beagle	5m	Si	---	San Pedro
MX-DCR2/17	KY921601	AVP71832	Hembra	Labrador	5m	Si	---	San Pedro
MX-DCR3/17	KY921602	AVP71833	Macho	Pastor Belga	2.5m	No	---	Monterrey
MX-DCR4/17	KY921603	AVP71834	Macho	Mestizo	2m	No	---	San Pedro
MX-DCR6/17	KY921604	AVP71835	Hembra	Shi Tzu	4m	No	---	Salinas Victoria
MX-DCR7/17	KY921605	AVP71836	Macho	Criollo	3m	No	---	Salinas Victoria
MX-DCR22/18	MH480646	QBG05546	Hembra	Pitbull	2.5m	No	---	Salinas Victoria
MX-DCR23/18	MH480649	QBG05549	Macho	Chihuahua	6m	No	---	Salinas Victoria
MX-DCR41/18	MH480647	QBG05547	Macho	Criollo	4m	No	---	Salinas Victoria
MX-DCR56/18	MH480648	QBG05548	Macho	Canis Latrans	4m	No	---	Apodaca
MX-DCR66/18	MH480650	QBG05550	Macho	Chihuahua	3m	No	---	Salinas Victoria
MX-DCR73/18	MH480651	QBG05551	Macho	Pastor Alemán	10m	No	---	Escobedo
MX-DCR80/18	MH480652	QBG05552	Hembra	Blue Heeler	6m	No	---	San Nicolas
MX-VACVBC/17	KY921606	AVP71837	Vacuna Virbac	Monovalente	---	CPV 780926	Virbac	---
MX-VACNBVC/ 17	KY921607	AVP71838	Vacuna Novibac	Monovalente	---	Cepa C154	Lapisa	---

Tabla 12. Secuencias genéticas de CPV de Monterrey y su área metropolitana que serán reportadas en el GenBank de la Plataforma NCBI

NO. MUESTRA	NO. ACCESO DE LA SEC. NUCLEOTÍDICA	NO. ACCESO DE LA SEC. DE AMINOÁCIDOS	SEXO	ESPECIE/ RAZA	EDAD	VACUNAS	MARCA	MUNICIPIO
MX-DCR59/19	Pendiente de registro	Pendiente de registro	Macho	Chihuahua	10m	No	---	San Pedro
MX-DCR118/19	Pendiente de registro	Pendiente de registro						San Nicolás
MX-DCR17/19	Pendiente de registro	Pendiente de registro	Macho	Cocker spaniel	5m	No	---	Salinas Victoria
MX-DCR39/19,	Pendiente de registro	Pendiente de registro	Hembra	Criolla	3m	No	---	Salinas Victoria
MX-DCR50/19,	Pendiente de registro	Pendiente de registro	Macho	Criollo	6m	No	---	Escobedo
MX-DCR64/19 y	Pendiente de registro	Pendiente de registro	Macho	French Poodle	6m	No	---	San Pedro

La divergencia en nucleótidos fue de 1.8-0.3% que corresponde a una variación en de 31 a 6 pares de bases en las secuencias reportadas. Donde el porcentaje de similitud más baja se dio entre la secuencia de MX-DCR4 y la MX-DCR56 (98.2%; diferencia en 31 pb), esta última aislada de un coyote; por otro lado, la más alta entre las secuencias MX-DCR6 y MX-DCR2 (99.7%; diferencia en 3 pb) (consultar tabla 13).

Basados en la matriz de divergencia a partir de nucleótidos de la proteína VP2 se realizó un árbol filogenético como se describe en material y métodos, comparando las cepas secuenciadas en este estudio con las reportadas en el GenBank en otros estudios y las cepas utilizadas del GenBank, el número de acceso y los autores se pueden consultar en la tabla 16 en la sección de materiales y métodos. En este árbol se puede apreciar dos ramas principales, una para las cepas de *Parvovirus felino* (FPV) y otro para las cepas de *Parvovirus canino* (CPV). Así mismo, se puede observar que existen en el grupo de CPV una clara división para aquellas cepas correspondientes a los subtipos CPV2, donde se incluyen cepas vacunales que se utilizan en México y el mundo, aquí se agrupan las cepas vacunales secuenciadas en este estudio (Vaccine-vbc y Vaccine-nbcv), siendo estas las más usadas en los protocolos de vacunación en esta área. Por otro lado, mientras que para los subtipos CPV2a y CPV2c se forman dos grupos para cada subtipo, para el subtipo CPV2c se derivan a partir de una sola bifurcación, sin embargo se dividen en 5 grupos. Nuestras cepas caracterizadas se agrupan en 3 de estos cuatro grupos. MX-DCR7 y MXDCR41 se agrupan con cepas de Europa (España, Bélgica, Italia y Alemania), en tanto que

MX-DCR3, MX-DCR4, MX-DCR59 y MX-DCR118 forman un segundo grupo, por otro lado, MX-DCR22 y MX-DCR82 se agrupan con cepas de CPV2c caracterizadas recientemente en los estados de Querétaro, Hidalgo y Nayarit (Faz, et al., 2019). Además, las cepas MX-DCR1, MX-DCR2, MX-DCR6 y MX-DCR56 se agrupa con una cepa originaria de Estados Unidos. Por último, se puede observar que la mayoría de las cepas mexicanas caracterizadas recientemente se encuentran en un grupo, donde se incluyen cepas de Tamaulipas, Guanajuato, Sonora, Michoacán, Aguascalientes, Baja California Norte, Morelos, Puebla y Yucatán. Por otro lado, aunque en base a la secuencia de nucleótidos las cepas MX-DCR59 estimada en este estudio y la MX-BCN9 (Faz et al, 2019) caracterizada en un estudio previo, según el árbol filogenético las ubica en el subtipo CPV2c, sin embargo, en la posición 426 se presenta el aminoácido característico de la Cepa CPV2b (D), y no el característico para el subtipo CPV2c D₄₂₆E (Tabla 15).

Por otro lado, se analizaron también una secuencia de aminoácidos (567 aminoácidos) de la proteína VP2, deducido a partir de la secuencia de nucleótidos obtenidas en este estudio y se compararon con cepas de referencia del Genbank de Parvovirus Felino (FPV) y los subtipos de CPV2, 2a, 2b y 2c (Tabla 6, 11 y 12), encontrando sustituciones de aminoácidos entre especies y subtipos. En la tabla 14 se muestra la matriz de similitud y divergencia de un segmento de 567 aminoácidos de la proteína VP2 de cepas de CPV establecidas en este trabajo y las reportadas en el Gen Bank (Tabla 6, 11 y 12).

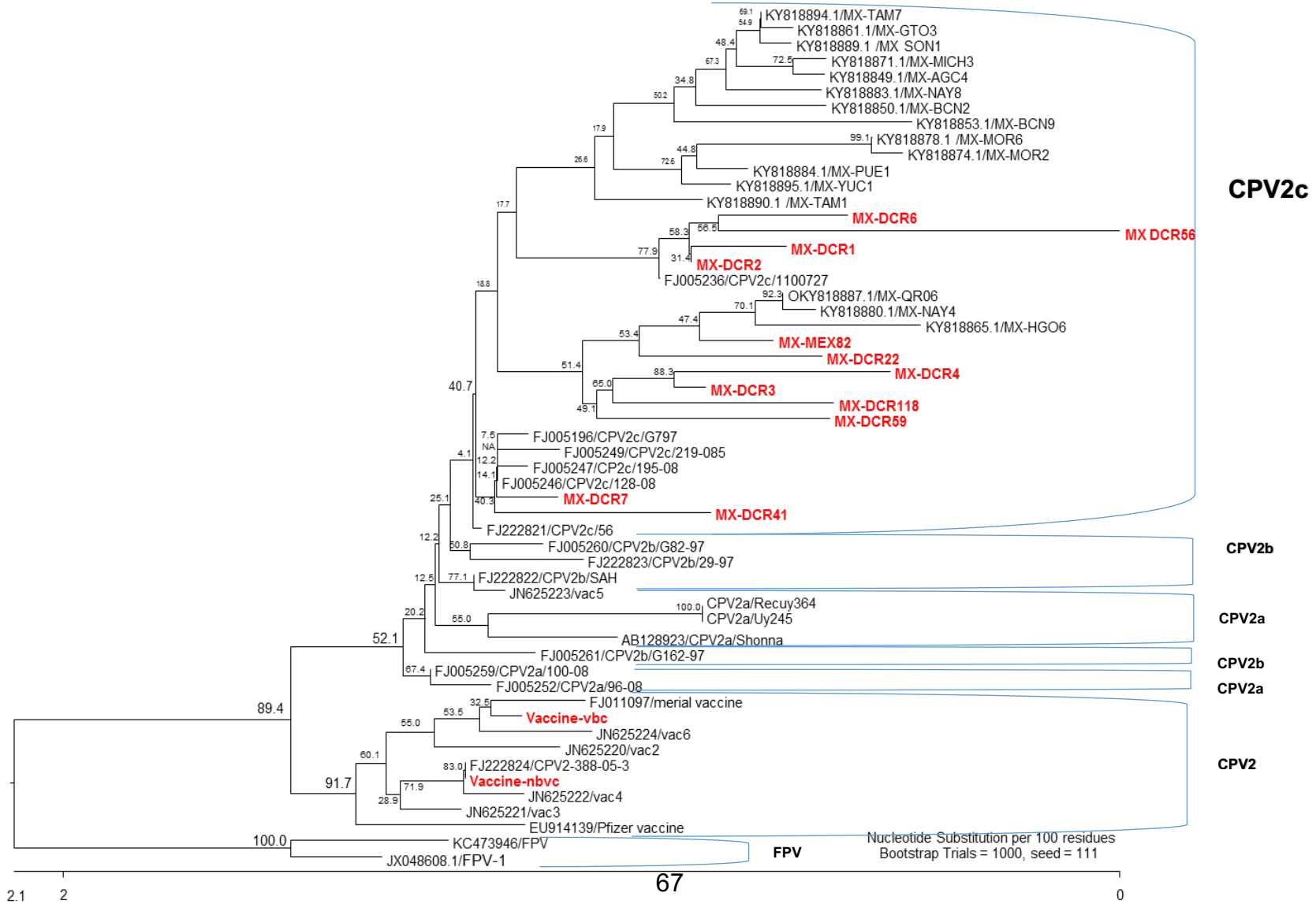


Figura 13. Análisis filogenético basado en un fragmento de ADN del gen de la proteína VP2 de cepas de CPV del área metropolitana de Monterrey. Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias con el algoritmo Clustal W del programa MegaAlign Pro del software ADNstar v.15 con secuencias realizadas en este estudio (color rojo) y las reportadas en el GenBank (identificadas con número de acceso del GenBank/subtipo/cepa). Las comparaciones de los pares de bases y el grado de divergencia genética se realizaron con el método Kimura 2-Parametro (Kimura, 1980), a partir de esta última se realizó con la ayuda del método Neighbour-Joining (Saitou and Nei, 1987) el árbol filogenético, para determinar el soporte estadístico de las agrupaciones se utilizó un análisis con un "Bootstrap" de mil repeticiones (Felsenstein, 1985, 1981). Las cepas de CPV caracterizadas del área metropolitana se agrupan con cepas reportadas en el GenBank dentro del subtipo CPV2c (color rojo) en tres grupos, con otras secuencias reportadas en México y en otras regiones de Latinoamérica y Europa. La cepa CPV2b-MX-DCR59 al igual que la MX-BCN9, aunque son del tipo CPV2b se agrupan en la topología del árbol dentro junto con otras del subtipo CPV2c. Las cepas vacunales se agruparon dentro del Subtipo CPV2. La distancia entre cepas y subtipos es proporcional al largo de las ramificaciones y los números en la bifurcación indican la robustez estadística de la topología del árbol filogenético. **CPV**, Parvovirus canino; **CPV2**, Parvovirus canino subtipo 2; **CPV2a**, Parvovirus canino subtipo 2a; **CPV2b**, Parvovirus canino subtipo 2b; **CPV2c**, Parvovirus canino subtipo 2c; **FPV**, Parvovirus felino.

En ella podemos observar que el porcentaje de similitud va del 97.1% hasta el 100%. Como se puede observar en la tabla 12, con las secuencias utilizadas para el análisis filogenético se pudieron encontrar entre cepas silvestre de FPV, CPV y vacunas cambios de aminoácidos hasta en 45 posiciones diferentes en la secuencia de aminoácidos deducida a partir de las secuencias de nucleótidos del gen de la proteína VP2 utilizada para el análisis filogenético.

Los cambios de aminoácidos en las secuencias analizadas en este estudio fueron en las posiciones 23, 44, 56, 66, 89, 87, 94, 101, 103, 105, 139, 144, 157, 178, 179, 186, 219, 232, 246, 258, 267, 270, 271, 274, 297, 300, 301, 305, 316, 321, 322, 323, 324, 350, 352, 375, 386 395, 417, 419, 426, 440, 455, 463, 564 y 568 (Tab. 15).

Estos datos fueron utilizados para establecer un alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de la proteína VP2, establecer la divergencia (Tabla 14 y 15) y en base a esta tabla elaborar el árbol filogenético, como se describe en materiales y métodos, arrojando como resultado una división similar a la obtenida de los estudios realizados con las secuencias de nucleótidos del gen para esta proteína y se puede ofrecer como se puede observar en la figura 13.

Tabla 15. Tabla de las sustituciones de aminoácidos en la proteína VP2 presentes en los subtipos de CPV del área metropolitana de Monterrey, N.L.

Subtipos FPV/CPV	Número de posición y tipo de aminoácido presente en las secuencias analizadas.																							
	23	44	56	66	80	87	93	101	103	105	139	144	148	157	178	179	186	219	232	246	258	267	270	271
FPV	S	T	N	S	K	M	K	T	V	I	V	E	V	A	D	S	T	I	V	I	G	F	C	K
CPV2	S	T	N	S	R	M ³	N	I ⁴	A	I ⁵	V	E	V	A	D	S	T	V ⁶	I	I	G	F	C	K
MX-VBC	S	A ¹	N	S	R	M	N	I	A	I	V	E	V	A	D	S	T	I	I	I	G	F	C ⁹	R ¹⁰
MX-NBVC	S	T	N	S	R	M	N	I	A	I	V	E	V	A	D	S	T	V	I	I	G	F	C	K
CPV 2a	S	T	N	S	R	L	N	T	A	I	V	E	V	A	D	S	T	I	I	I	G	F/Y ⁸	C	K
CPV 2b	S/F	T	N	S	R	L	N	T	A	I	V	E	V	A	D	S	T	I	I	I	G	F	C	K
CPV 2c	S	T	N	S	R	L	N	T	A	I	V	E	V	A	D	S	T	I	I	I	G	F	C	K
MX-DCR-1	S	T	N	S	R	L	N	T	A	I	V	E	V	A	D	S	T	I	I	I	G	F	C	K
MX-DCR-2	S	T	N	S	R	L	N	T	A	I	V	E	V	A	D	S	T	I	I	I	G	F	C	K
MX-DCR-3	S	T	D ²	S	R	L	N	T	A	I	V	E	V	A	D	S	T	I	I	I	G	F	C	K
MX-DCR-4	S	T	D	R	R	L	N	T	A	I	V	E	V	A	H	S	T	I	I	N ⁷	C	F	C	K
MX-DCR-6	S	T	N	S	R	L	N	T	A	I	I	E	V	A	D	S	T	I	I	I	G	F	C	K
MX-DCR-7	S	T	N	S	R	L	N	T	A	I	V	E	V	A	D	S	T	I	I	I	G	F	C	K
MX-DCR22	S	T	D	S	R	L	N	T	A	I	V	E	V	A	D	S	T	I	I	I	G	F	C	K
MX-DCR41	S	T	N	S	R	L	N	T	A	I	V	Q	V	A	H	R	T	I	I	I	G	F	C	K
MX-DCR56	S	T	N	R	R	L	N	T	A	I	V	Q	G	A	H	R	P	I	I	I	G	F	C	K
MX-DCR66	S	T	N	S	R	L	N	T	A	I	V	E	V	A	D	S	T	I	I	I	G	F	C	K
MX-DCR73	S	T	N	S	R	L	N	T	A	I	V	E	V	A	D	S	T	I	I	I	G	F	C	K
MX-DCR80	S	T	N	S	R	L	N	T	A	I	V	E	V	A	D	S	T	I	I	I	G	F	C	K
MX-DCR59	S	T	D	S	R	L	N	T	A	I	V	E	V	A	D	S	T	I	I	I	G	F	C	K
MX-DCR118	S	T	D	S	R	L	N	T	A	I	V	E	V	T	D	S	T	I	I	I	G	F	C	K

¹Cambio en los aminoácidos inferidos a partir de las secuencias de nucleótidos del gen de la VP2 de vacunas reportadas en el Gen Bank: Vacuna Pfizer; Vacuna Merial; Vac 3, Vac 4, Vac 6. ² Cambios observados en las cepas mexicanas: MX-QRO6, MX-NAY4, MX-HGO6, MX-MEX82, MX-BCN2.^{3,4} Cambio no observado en vacunas reportadas a excepción de la Vac 5. ⁵ Cambio en Vac 5 de I₁₀₅T. ⁶Vacuna Pfizer, No.Acc. EU914139, presenta una I₂₁₉K; Vac 4 presenta un cambio I₂₁₉V. ⁷Cambio I₂₄₆N presente también en cepa MX-PUE1, cepa MX-MICH3 presenta cambio I₂₄₆F. ⁹ Vacuna Pfizer presenta cambio C₂₇₀V. ¹⁰Cambio K₂₇₁R presente además en secuencias de aminoácidos VP2 reportadas de vacunas Merial, Vac 2 y Vac 6.

Continua en siguiente hoja...

Número de posición y tipo de aminoácido presente en las secuencias analizadas.																								
Subtipos FPV/CPV	274	297	300	301	305	316	321	322	323	324	350	352	375	386	395	417	419	426	440	455	463	564	568	
FPV	R	S	A	T	D	V	N	T	D	Y	Q/R	P	D	Q	P	N	N	N	T	T	V	N	A	
CPV2	R	S	A	T	D	V	N	T	N	Y	Q	P	N	K	P	N	N	N	T	T	V	S	G	
MX-VBC	R	S ¹¹	A ¹³	T ¹⁴	D ¹⁵	I ¹⁶	N ¹⁷	T	N	Y	Q	P	N ²¹	Q	P	N ²³	N	N ²⁴	T	T ²⁶	V ²⁷	S	G	
MX-NBVC	R	S	A	T	D	V	N	T	N	Y	Q	P	N	K ²²	P	N	N	N	T	T	V	S	G	
CPV 2a	R	A	G	T	Y	V	N	T	N	Y/I ¹⁹	Q	P	D	Q	P	N	N	N	T/A ²⁵	T	V	S	G	
CPV 2b	R	A/S ¹²	G	T	Y	V	N	T	N	Y	Q	P	D	Q	P	N	N	N	D	T	T	V	S	G
CPV 2c	R	A	G	T	Y	V	N	T	N	Y	Q	P	D	Q	P	N	N	N	E	T	T	V	S	G
MX-DCR-1	R	A	G	T	Y	V	N	T	N	Y	Q	P ²⁰	D	Q	P	N	N	N	E	A	T	V	S	G
MX-DCR-2	R	A	G	T	Y	V	N	T	N	Y	Q	P	D	Q	P	N	N	N	E	A	T	V	S	G
MX-DCR-3	R	A	G	T	Y	V	N	T	N	Y	Q	P	D	Q	P	N	N	N	E	T	T	V	S	G
MX-DCR-4	R	A	G	T	Y	V	N	P ¹⁸	N	Y	Q	P	D	Q	P	N	N	N	E	T	T	V	S	G
MX-DCR-6	T	A	G	T	Y	V	N	T	N	Y	Q	P	D	Q	R	N	N	N	E	A	T	V	S	G
MX-DCR-7	R	A	G	T	Y	V	N	T	N	Y	Q	P	D	Q	P	N	N	N	E	T	T	V	S	G
MX-DCR22	R	A	G	T	Y	V	N	T	N	Y	Q	P	D	Q	P	N	N	N	E	T	T	V	S	G
MX-DCR41	R	A	G	T	Y	V	N	T	N	Y	Q	P	D	Q	P	N	N	N	E	T	T	V	S	G
MX-DCR56	R	A	G	T	Y	V	N	T	N	Y	Q	P	D	Q	P	N	N	N	E	A	T	V	S	G
MX-DCR66	R	A	G	T	Y	V	N	T	N	Y	Q	P	D	Q	P	N	N	N	E	T	T	V	S	G
MX-DCR73	R	A	G	T	Y	V	N	T	N	Y	Q	P	D	Q	P	N	N	N	E	T	T	V	S	G
MX-DCR80	R	A	G	T	Y	V	N	T	N	Y	Q	P	D	Q	P	N	N	N	E	T	T	V	S	G
MX-DCR59	R	A	G	T	Y	V	N	T	N	Y	Q	P	D	Q	P	N	N	S	D	T	T	V	S	G
MX-DCR118	R	A	G	T	Y	V	N	T	N	Y	Q	P	D	Q	P	N	N	N	E	T	T	V	S	G

¹¹ Cambio de aminoácido en Vac 5 en posición S₁₀₅A. ¹² Algunas cepas de CPV2b en esta posición presentan A/S. ¹³ La vacuna Vac 5 presenta cambio A₃₀₀G y Vac 6 A₃₀₀D. ¹⁴ Vac 6 presenta cambios T₃₀₁I. ¹⁵ Vac 5 presenta cambios D₃₀₅Y. ¹⁶ Vacunas Merial, Vac 2 y Vac 6 presentan cambio V₃₁₆L. ¹⁷ Se presenta cambios N₃₂₁K en algunas CPV2b-SAH y Vac5. ¹⁸ Las cepas mexicanas MX-BCN2 y MX-BCN9 presentan cambio T₃₂₂S. ¹⁹ Algunas cepas uruguayas presentan cambio Y₃₂₄I. ²⁰ Cepa mexicana MX-MEX82 presenta cambio P₃₅₂A. ²¹ Cepas vacunales incluidas en este estudio presentan cambio D₃₇₅N a excepción de la Vac 5 que presenta un D. ²² Cepa Vac 4 presenta cambio Q₃₉₅K y cepas vacuna Pfizer Q₃₉₅R. ²³ Cepas Vac 3 y 4 presentan cambio N₄₁₇K. ²⁴ Vacuna Vac 5 y MX-BCN tiene cambio N₄₂₆D. ²⁵ Algunas cepas CPV2a de Uruguay poseen cambio T₄₄₀A, así como las cepas CPV2c mexicanas, MX-TAM7, MX-SON1, MX-NAY8, MX-MICH3, MX-GTO3, MX-BCN2, MX-AGC4. ²⁶ Vac 6 presenta cambio T₄₅₅A. ²⁷ Vac 2 presenta cambio V₄₆₃L. FPV, Virus de Panleucopenia Felina; CPV, Parvovirus canino; CPV2, CPV2a, CPV2b y CPV2c, subtipos de Parvovirus canino; MX-VBC y MX-NBVC, secuencias de aminoácidos de cepas vacunales de CPV usadas en Monterrey, N.L.; MX-DCR-1-118, secuencia de aminoácidos de muestras de CPV de Monterrey y su área metropolitana. A, alanina; C, Cisteína; D, ácido aspártico; E, ácido glutámico; G, glicina; H, histidina; I, isoleucina; K, lisina; L, leucina; M, metionina; N, asparagina; P, prolina; R, arginina; S, serina; T, treonina; V, valina; Y, tirosina.

4.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS RESULTADOS

No se pudo establecer una asociación entre las variables cualitativas de edad, sexo, tipo de presentación clínica o protocolo de vacunación con la presencia del virus CPV o con los subtipos CPV2c y CPV2b, ya que, por una parte solo una muestra fue negativa, debido a que los animales que se muestrearon presentaban problemas digestivos, por otra parte, solo se presentó en una muestra el subtipo CPV2b y las variables cualitativas de los caninos de esta muestra fueron similares las que se presentaron en otros caninos que presentaron el tipo CPV2c.

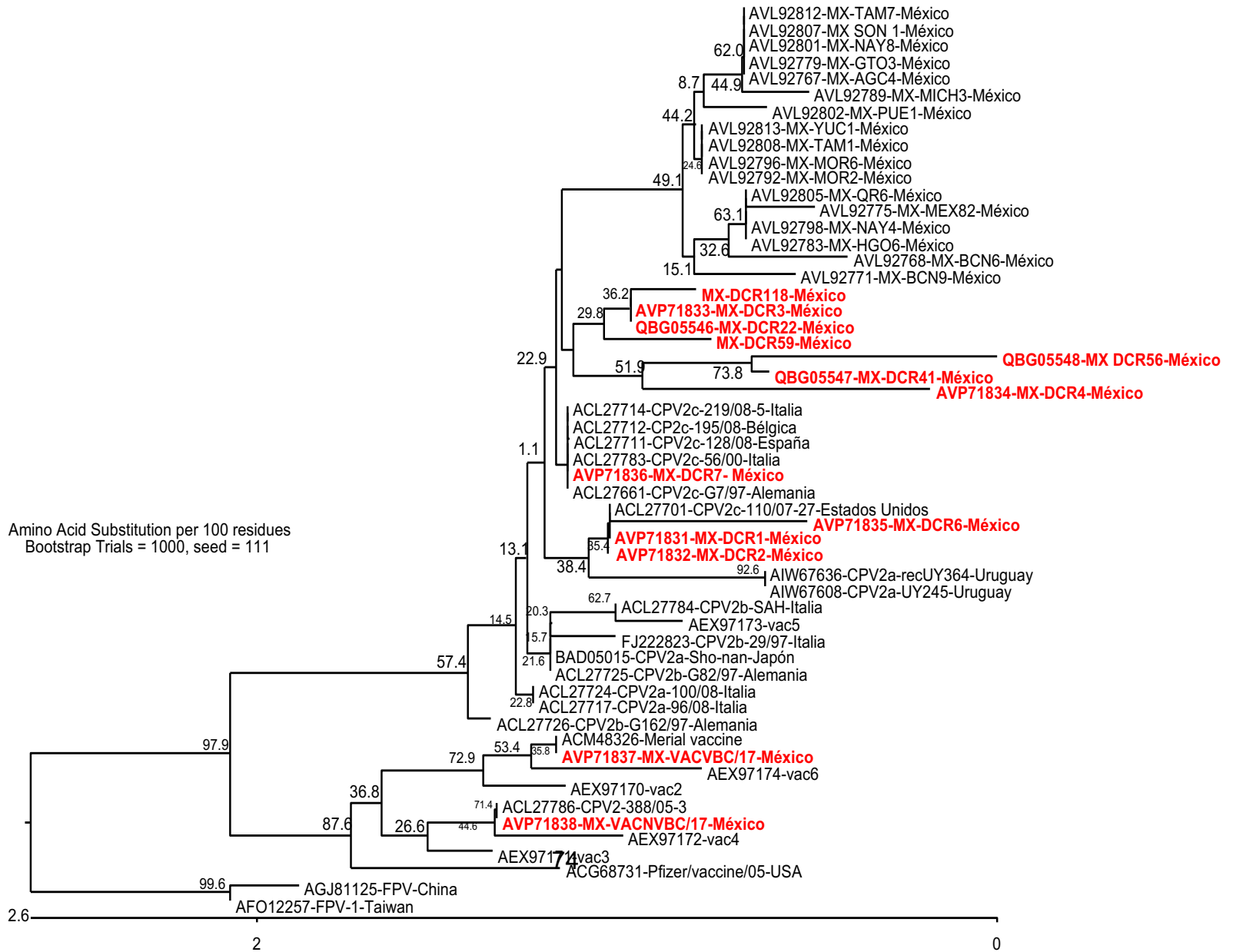


Figura 14. Análisis filogenético basado en 567 aminoácidos del gen de la proteína VP2 de cepas de CPV del área metropolitana de Monterrey. Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias con el algoritmo Clustal W del programa MegaAlign Pro del software ADNstar versión 15 con secuencias realizadas en este estudio (color rojo) y las reportadas en el GenBank (identificadas con número de acceso del GenBank-subtipo- cepa-país de origen). El grado de divergencia genética se realizó con el método Kimura 2-Parametro (Kimura, 1980), a partir de esta última se realizó con la ayuda del método Neighbour-Joining (Saitou and Nei, 1987) el árbol filogenético, para determinar el soporte estadístico se utilizó un análisis con un “Bootstrap” de mil repeticiones (Felsenstein, 1985, 1981). Las cepas de CPV caracterizadas del área metropolitana se agrupan con cepas reportadas en el GenBank dentro del subtipo CPV2c, CPV2b y CPV2 (color rojo), con otras secuencias reportadas en México y en otras regiones de América y Europa. Las cepas vacunales se agruparon dentro del Subtipo CPV2. Los números en la bifurcación indican la robustez estadística de la topología del árbol filogenético. El largo de la rama es proporcional a la distancia existente entre cepas de CPV. **CPV**, Parvovirus canino; **CPV2**, Parvovirus canino subtipo 2; **CPV2a**, Parvovirus canino subtipo 2a; **CPV2b**, Parvovirus canino subtipo 2b; **CPV2c**, Parvovirus canino subtipo 2c; **FPV**, Parvovirus felino.

5 DISCUSIÓN

La parvovirus es una de las enfermedades digestivas en canino más importante a nivel mundial, con altas tasas de morbilidad y de letalidad (Mylakanis et al. 2016). En Monterrey y su área metropolitana ocupa una de las primeras razones de consulta en caninos con protocolos de vacunación incompleta o sin vacaciones, después de las parasitosis (comunicación personal de veterinarios de clínicas participantes en el estudio).

Al momento, en el área metropolitana de Monterrey, N.L., no se han realizado estudios para establecer la prevalencia, incidencia o las variantes genéticas de Parvovirus canino que prevalecen y circulan en poblaciones caninas del área, como se han realizado en otros estados del país (Pedroza et al., 2014; Faz et al., 2019).

En este estudio participaron MVZ que ejercen en clínicas del área metropolitana de Monterrey, de los municipios de Apodaca, Salinas Victoria, San Nicolás de los Garza, San Pedro Garza García, General Escobedo, Santiago y Monterrey, quienes recolectaron las muestras y los datos epidemiológicos mediante una encuesta, tomando un total de 104 muestras que fueron remitidas al laboratorio de Virología Veterinaria de la UANL.

Para los caninos muestreados, después de descartar parasitosis, el diagnóstico presuntivo que realizaron los médicos veterinarios fue parvovirus. Para establecer el

diagnóstico definitivo, los clínicos utilizaron pruebas comerciales para la detección de antígeno de Parvovirus en heces (inmunocromatografía o snap) en el 81% de las muestras (84/103 muestras positivas), confirmándose este diagnóstico a través de este método solo en el 75% de los casos (78/103 muestras positivas) resultando 6 muestras negativas por esta prueba. Sin embargo, de 6 muestras negativas a SNAP, 5 muestras fueron positivas a PCR (1) y PCR anidado (4).

Al comparar estos resultados y establecer la concordancia entre las dos pruebas (SNAP y PCR) se determinó que fue del 94%, la especificidad del 100% y la sensibilidad del SNAP comparada con el PCR de 94%, reafirmando en este estudio lo descrito por otros investigadores donde compararon estas dos pruebas y cuya sensibilidad del SNAP vs. PCR resulto más baja que en nuestro estudio, de un 15.8%-26.3% (Schmitz et al., 2009) al 56.16% (Desario et al., 2005). Con respecto a esto, en este estudio las muestras que resultaron negativas al SNAP fueron positivas a PCR (1) y a PCR anidado (4), lo que sugiere que la cantidad de viriones presentes era bajo en las muestras, esto concuerda con los resultados obtenidos por otros investigadores que concluyeron que la prueba de SNAP tiene menor sensibilidad que el PCR, debido a la baja presencia de antígeno en heces en algunos caninos o la presencia de anticuerpos en tracto digestivo que pueden neutralizar las partículas virales (Desario et al., 2005; Schmitz et al., 2009).

Por otro lado, las marcas comerciales de las pruebas de SNAP para Parvovirus que se usaron fueron: 44% (37/84) Canine Parvovirus test Kit de la marca ApetCare, 32%

(27/84) fueron Rapid CPV Ag Test Kit Anigen de BioNote Inc., 12% (10/84) fueron Uranotest Parvo-corona (UranoVet) y comercializada en México por Norvet y 10% Prueba SNAP Parvo de la marca IDEXX y solo en una fue desconocida la marca comercial. La marca comercial con mayor cantidad de falsos negativos y que fueron positivas a PCR y PCR anidado fue el Rapid CPV Ag Test Kit Anigen de BioNote Inc (4 muestras), mientras que para ApetCare resultó una muestra negativa pero que fue confirmada como positiva por PCR. Analizando la información estas marcas comerciales de inmunocromatografías para antígeno de Parvovirus se pudo observar que la prueba comercial de Rapid CPV Ag Test Kit Anigen de BioNote Inc fue la que detectaba menor cantidad de antígeno en heces (10^4 DICC₅₀ /0.1ml). Este resultado concuerda con lo sugerido por Decaro y colaboradores (2013) que señalan que la sensibilidad de las pruebas que detectan antígeno depende de varios factores, entre ellas, la cantidad de antígeno presente en la muestra y, por otro lado, la marca comercial, y que, comparadas con el PCR, la inmunomicroscopía electrónica, y el aislamiento la IC es menos sensible.

Con respecto a los datos obtenidos de las encuestas sobre la sintomatología, solo el 42% de los caninos presentó una diarrea hemorrágica abundante y el 32% presentaba además emesis, mientras que el 33% presentaron diarrea, pero de tipo mucoide, con tonalidades mostaza, de las cuales el 23 % presentó además emesis. Por otro lado, solo el 18% presento emesis e inapetencia, esto concuerda con estudios realizados en otros países donde los caninos diagnosticados con parvovirus presentaban

sintomatología muy variada, desde diarrea hemorrágica, emesis, diarrea mucoide mostaza a café e inapetencia.

En este estudio, 102 muestras fueron obtenidas a partir de cachorros menores a un año, que no presentaban vacunación o que presentaban protocolos de vacunación incompletos y que fueron positivos a parvovirus canino, por otro lado, solo se presentó un caso de parvovirosis en un canino de 3 años con protocolo de vacunación completa y un canino de 1.5 años. Lo que concuerda con lo reportado en otras investigaciones, donde se ha descrito que la edad más frecuente en la que se infectan los caninos con parvovirus son las primeras etapas de vida de este, sobre todos aquellos cachorros que no adquirieron inmunidad pasiva suficiente o que se encuentran en el hueco inmunológico (entre la pérdida de la inmunidad materna (1-1.5 meses de vida) y la adquirida por inmunidad por vacunación), esto comprende los primeros 3-4 meses de vida (Pollock and Coyne, 1993).

Por otro lado, solo el 8% de las muestras fueron a partir de caninos que presentaron protocolo completo de vacunación con cepas de vacunas pertenecientes a la variante CPV2, si bien el porcentaje de caninos que presentaron fallas en la vacunación es menor, las causas de la no protección en estos caninos no se pudieron establecer en este estudio, la mayoría de los caninos eran menores de 1 año (3 de estos tenían 5 meses, y uno de 4, 5, 6 y 9 meses respectivamente). De estos caninos murió uno de 5 meses y el de 4 meses. Con respecto a este tema, se realizó un estudio en Australia, donde examinan casos de fallas en los protocolos de vacunación y la adquisición de

parvovirus, este estudio concluyó que el tipo de cepa vacunal no estaba relacionada con la falla en la vacunación, pero si la edad en la que iniciaba (entre 10 a 12 semanas) o terminaba el protocolo de vacunación antes de las (16 semanas), siendo este un factor de riesgo para adquirir la parvovirus a pesar de la vacunación (Altman et al., 2017). En base a la edad a la que se debe iniciar el protocolo de vacunación, algunos autores concuerdan en que además de la edad, la inmunidad materna adquirida a través del calostro también es determinante en la falla de la vacunación, ya que a esta los anticuerpos capturan las partículas virales vacunales y no se estimula lo suficientemente adecuado para establecer inmunidad específica (Decaro and Buonavoglia, 2012b).

Como ya se mencionó anteriormente, en este estudio se tomaron solo muestras de animales con problemas gastrointestinales sugerentes de parvovirus, por lo que el 99% (103/104) de las muestras fueron positivas a parvovirus canino por PCR y PCR anidado, aquí se amplificó un segmento de 1779 pb que incluían un segmento de 1703 pb de la proteína VP2. En la mayoría de estas la secreción de viriones en heces fue suficiente para detectarla al PCR, mientras que en un 4% se necesitó realizar PCR anidado. Esto corrobora lo descrito por otros autores que establecen que después de los 7 días la infección, la secreción del virus en heces es abundante y que puede ser detectada por múltiples pruebas, entre ellas la PCR que es altamente sensible (Decaro et al., 2013).

Además del diagnóstico específico realizado mediante PCR y en colaboración con el Dr. Pedroza Roldán se realizó el protocolo modificado de Buonavoglia (Buonavoglia et al., 2001) con la finalidad de diferenciar las cepas CPV2c de los subtipos CPV2, CPV2a y CPV2b mediante PCR-RFLP, utilizando la enzima de restricción *Mbo II*. Esta enzima corta en un sitio de restricción en el nucleótido 1328 del segmento de 1779 pb amplificada en el protocolo de este estudio y en la base 690 correspondiente al segmento de 1042 pb amplificada en el estudio de Pedroza y colaboradores y que corresponde al cambio de aminoácido D₄₂₆E específica del subtipo CPV2c (Pedroza-Roldan et al., 2015). Con este protocolo de PCR-RFLP modificado, se lograron caracterizar 77/93 muestras como del subtipo CPV2c, mientras que solo 1 presentó la banda correspondiente al subtipo (CPV2, CPV2a y CPV2b) y así como las vacunas utilizadas como control de CPV2. Interesantemente, las cepas establecidas como CPV2c presentaron además del sitio de restricción característico para el CPV2c, otros sitios de restricción, dando un patrón de polimorfismo de 3,4 y 5 bandas, donde la banda de 451pb se presentó en todas las cepas de CPV2c y fue característico de estas, mientras que para el subtipo CPV2 se presentaron 3 bandas y para el CPV2b se presentaron 4 bandas donde la banda de 507pb fue distintiva para estas cepas (Tabla10 y Fig. 8-12). Esta metodología se ha usado para realizar un tamizaje previo a la secuenciación en estudios epidemiológicos de CPV2 obteniendo siempre la diferenciación del subtipo CPV2c de los demás subtipos (Duque-García et al., 2017; Saei and Dastmalchi, 2017; Pérez et al., 2007; Pintos et al., 2011).

A través de este método no se pudo realizar la diferenciación entre los subtipos CPV2, CPV2a o CPV2b y al igual que en otras investigaciones la diferenciación se estableció a través de la secuenciación y análisis genéticos (Decaro et al., 2006; Miranda et al., 2016).

En este estudio se eligieron 27 muestras con distintos patrones de polimorfismo, así como con mayor cantidad de producto de PCR amplificado, de las cuales se pudieron obtener en 14 de ellas un fragmento de 1703 pb del gen de la proteína VP2, siendo una secuencia parcial (1703/1748 pb) de esta proteína ubicada en la región 5' de la secuencia de nucleótidos; por otro lado, en 11 solo se obtuvieron secuencias parciales donde se pudo identificar el subtipo CPV2c y en 2 de ellas no se pudo caracterizar el subtipo presente en la muestra por la calidad de la secuencia. Por este método se logró corroborar los resultados establecidos mediante PCR-RFLP para las cepas del subtipo CPV2c y establecer que la cepa con patrón de los subtipos (CPV2, CPV2a y CPV2b) pertenecía al subtipo CPV2b, mientras que las vacunas fueron caracterizadas como del tipo CPV2.

Al realizar los análisis genéticos, comparando las cepas secuenciadas con cepas depositadas en el GenBank y provenientes de distintos países del mundo (Tab.6) (cepas publicadas en el GenBank solamente). Se utilizaron 2 cepas de Parvovirus felino que se pueden observar como un grupo separado de las cepas de Parvovirus caninos. Las cepas secuenciadas en este estudio se distribuyeron en 5 filogrupos. La vacuna monovalente de la marca comercial Virbac, cepa 780926 (MX-VACVBC/17

(KY921606)) y la vacuna monovalente Novibac, , cepa C154 de la marca comercial Lapisa (MX-VACNBVC/ 17, (KY921607)) se agruparon con otras vacunas pertenecientes al subtipo CPV2 descritas en estudios previos por Hingonekar y colaboradores en la India en 2018, Hiroyama y colaboradores en el 2005 y Juo y Lin en 2008.

Por otro lado, Las cepas MX-DCR41 y MX-DCR7 se agruparon con cepas europeas de España, Bélgica, Italia y Alemania (Decaro et al., 2009). Mientras que las cepas MX-DCR4, MX-DCR3 MX-DCR118 fueron segregadas en un grupo separado del CPV2c. En tanto las cepas MX-DCR22 se agrupó con cepas mexicanas de Querétaro, Nayarit, Hidalgo y Edo. de México (Faz et al., 2018). Por otro lado, las cepas MX-DCR6, MX-DCR1, MX-DCR2 y MX-DCR56 se agruparon con una cepa originaria de USA (Cepa 110/07/27) (Decaro et al., 2009). En tanto el resto de las cepas mexicanas analizadas por Faz (2018) se agruparon en 3 clústeres separados como se observa en la figura 13. Esto demuestra que las cepas que circulan en el área Metropolitana de Nuevo León son genéticamente diferentes a las presentes en el resto de la República Mexicana y su procedencia podría ser de distintos orígenes (Estados Unidos, Europa y del mismo México) y que han evolucionado en forma separada, cuando las comparamos con las presentes en el resto de la República Mexicana (Faz et al., 2018; Pedroza-Roldan et al., 2015)

Interesantemente, la cepa MX-DCR59 cuya secuencia fue generada en este trabajo y la cepa MX-BCN9 (Faz et al., 2018) en el análisis genético basado en 1703 pb del gen

de la proteína VP2 se agrupan con cepas de la variante CPV2c, y cuando se analiza el cambio en el aminoácido que genera el aminoácido en la posición 426 presentan el aminoácido D correspondiente al subtipo CPV2b. Por otro lado, al igual que en los estudios realizados por otros investigadores en México (Faz et al., 2018; Pedroza-Roldan et al., 2015), en este estudio no se encontró ninguna cepa caracterizada como CPV2 o CPV2a.

Para establecer si las diferencias en los nucleótidos se reflejaban en los aminoácidos de la proteína se infirió la secuencia de aminoácidos (567 aa) de la proteína VP2 y en base a esta se realizó un árbol filogenético, en el cual, no se encontró variación la agrupación de las cepas anteriormente descritas en base a nucleótidos (datos no mostrados).

Por otro lado, se analizaron los cambios de aminoácidos en las cepas secuenciadas en este trabajo y las reportadas por otros autores en cepas de FPV, CPV2, CPV2a, CPV2b y CPV2c, encontrándose diferencia en hasta 45 posiciones como se describe en la sección de resultados. Con respecto a esto, Thompson y colaboradores establecen en su artículo del 2016, los cambios que se han observado en los aminoácidos de la proteína VP2 y que ha generado la aparición del Parvovirus canino y sus subtipos CPV2, 2^a, 2b y 2c a partir del Parvovirus felino (FPV). La evolución del FPV al CPV2 representó 6 cambios de aminoácidos; del CPV2 al CPV2a con cambios en 5 aminoácidos; presentando 2 cambios del CPV2a al CPV2b y por último un solo cambio del CPV2b al CPV2c (Fig. 1).

Las cepas vacunales secuenciadas en este estudio se agruparon con cepas caracterizadas como CPV2 y otras cepas vacunales. La secuencia de aminoácidos AVP71837-MX-VACVBC/17 (correspondiente a la vacuna Virbac Parvigen monovalente (Parvovirus Canino vivo cepa atenuada Cornell CVP/780916, 10^5 - 10^7 DICC₅₀), se agrupo con la secuencia de la cepa reportada como ACM48326- Merial vaccine con una similaridad del 100% (567 aa), en tanto que la secuencia de aminoácidos AVP71838-MX-VACNVBC/17 (vacuna PCV viva atenuada, cepa de C154, 10^7 DICC₅₀) presentó una similaridad del 100% en su secuencia de 567 aminoácidos con la cepa AC2776-CPV2-388/05 de origen canino y aislada en Italia (Fig. 13).

Por otro lado, se encontraron en las cepas de campo y en las vacunas de una hasta siete sustituciones de aminoácidos adicionales a las reportadas para el subtipo CPV2 y 2c. Las cepas MX-DCR-1 y MX-DCR-2 presentaron una sustitución adicional en la posición T₄₄₀A. La cepa MX-DCR-3 presentó un cambio, también en la posición N₅₆D, este se observó en otras 5 cepas de CPV2c mexicanas analizadas recientemente (Faz et al., 2019). La MX-DCR-4 presentó sustituciones en las posiciones N₅₆D, S₆₆R, D₁₇₈H, I₂₄₆N (cambio encontrado también en las cepas mexicanas reportadas recientemente MX-PUE1, MX-MICH3), G₂₅₈C y en la posición T₃₂₂P. La cepa MX-DCR-6 presentó 4 sustituciones adicionales a las encontradas en el subtipo CPV2c en la posición V₁₃₉I, R₂₇₄T, P₃₉₅R y T₄₄₀A, en donde solo una de las posiciones fue reportada en el Genbank, la cual fue la 440. Este cambio, en la posición 440 se encontró en

CPV2a de Uruguay, así como las cepas CPV2c mexicanas, MX-TAM7, MX-SON1, MX-NAY8, MX-MICH3, MX-GTO3, MX-BCN2, MX-AGC4 previamente reportadas (Faz el al., 2019). Por otro lado, la cepa MX-DCR22 solo presentó una sustitución de aminoácido adicional en la posición N₅₆D. Además, la cepa MX-DCR41 presentó 3 cambios adicionales en los aminoácidos de las posiciones E₁₄₄Q, D₁₇₈H, S₁₇₉R. Así mismo, la cepa MX-DCR56 aislada de un coyote fue la que presentó más cambios adicionales a las CPV2c (7) en los aminoácidos de las posiciones S₆₆R, E₁₄₄Q, V₁₄₈G, D₁₇₈H, S₁₇₉R, T₁₈₆P, T₄₄₀A. Por otro lado, la cepa CPV2c MX-DCR118 presentó también cambios en la posición N₅₆D, A₁₅₇T. Por último, la cepa MX-DCR59 presentó cambios en los aminoácidos correspondientes a CPV2b además de 2 cambios adicionales en los aminoácidos N₅₆D y N₄₁₉S, además del cambio de N₄₂₆D característico de este subtipo 2b (Tab.15).

Por otro lado, las secuencias de aminoácidos de las cepas MX-DCR1 (No. acceso AVP71831) y de MX-DCR2 (No. acceso AVP71832) presentó el 100% (567 aa) de similaridad con la cepa aislada en Estados Unidos 110/07-27 (No. Acceso ACL27701) (Decaro et al., 2009) y junto con la cepa MX-DCR6 (No. acceso AVP71835) que presenta una similaridad del 99.5% (564) en la secuencia de aminoácidos con los anteriormente mencionados y formando un grupo dentro del subtipo CPV2c (Fig. 13 y Tabla 15). En otro grupo dentro del subtipo CPV2c se encuentran ubicadas cepas de Europa (219/0-5 de Italia, 195/08 de Bélgica, 120/08 de España, 56/00 de Italia) (Decaro et al., 2009) y la cepa MX-DCR7 (No. acceso AVP71836) que presentan una

similaridad del 100% en la secuencia de aminoácidos (Fig. 13 y Tab. 15). En el árbol filogenético basado en aminoácidos se puede observar, otro grupo dentro del CPV2c formado las cepas MX-DCR4 (No. acceso AVP71834), MX-DCR41 (No. acceso QBG05547) y la cepa MX-DCR56 (No. acceso QBG05548) que son las que cuentan con una mayor divergencia genética o menor similaridad (98.4%-99.3%) entre sí, aquí se incluye la cepa obtenida de un coyote (MX-DCR56) que es la que presenta mayores cambios de aminoácidos con respecto a las cepas CPV2c (Fig. 13, Tabla 15). Otro grupo dentro de subtipo CPV2c lo formaron las cepas MX-DCR3 y MX-DCR22 (100% de similaridad entre ellos) y la cepa MX-DCR118 (99.6%). En este grupo se puede observar también a la cepa MX-DCR59, sin embargo, por el tipo de aminoácidos que presenta según Thompson se clasificaría como CPV2b (Thompson et al., 2016), el mismo caso se presenta con la cepa MX-BCN9 recién reportada en otro estudio (Fig. 13) (Faz et al., 2019). Por último, podemos observar un grupo dentro del subtipo CPV2c que contiene 16 cepas mexicanas reportadas recientemente y que se agrupan juntas (Faz et al., 2019).

Con estos resultados avalamos lo sugerido por Faz y colaboradores en el 2018, que sugieren que las cepas mexicanas evolucionaron en distintas regiones generando una diversidad genética y antigénica en la República Mexicana diferente a la existente en otras regiones del mundo (Faz et al., 2018) y por otro lado, confirmamos que las cepas que circulan en Monterrey y su área metropolitana pertenecen en al subtipo CPV2c a excepción de una cepa que pertenece al subtipo CPV2b y son diferentes a las cepas

incluidas en las vacunas de mayor frecuencia de uso en las clínicas del área metropolitana de Monterrey N.L.

6 CONCLUSIONES

Como resultado de este estudio podemos concluir que el CPV uno de los agentes etiológicos más importantes en problemas gastroentéricos que se presentan a consulta en clínicas veterinarias del área metropolitana de Monterrey.

Para corroborar el diagnóstico de la infección por Parvovirus canino los clínicos cuentan métodos inmunocromatográficos comerciales (snap) para detectar antígeno del CPV de diferentes marcas. La sensibilidad de estos métodos comparado con PCR y qPCR es menor, sin embargo, son más rápidas, accesibles y de fácil ejecución por parte de los clínicos.

Por otro lado, los caninos que presentaron cuadros de parvovirus fueron en su mayoría animales no vacunados, menores de 5 meses, lo que corrobora lo descrito por otros investigadores que señalan que las vacunas protegen generalmente contra las distintas variantes de Parvovirus canino y que la edad más frecuente para la infección con este virus son los primeros 4 meses de vida, donde no se ha logrado una adecuada inmunidad por vacunación.

Además, podemos concluir que el PCR y PCR anidado que se estableció en este estudio es específico y muestra una mayor sensibilidad comparada con las pruebas inmunocromatográficas comerciales que se utilizan con mayor frecuencia en el área metropolitana de Monterrey N.L.; por lo que su uso puede ser aplicado para mejorar la

precisión diagnóstica en casos de gastroenteritis hemorrágica y coadyuvar al tratamiento clínico específico contra parvovirus.

Por otro lado, se puede utilizar el PCR-RFLP modificado de Pedroza y colaboradores (2015) utilizando el fragmento de 1779pb y la enzima *Mbo II* para diferenciar el subtipo CPV2c de otros subtipos (CPV2, CPV2a, CPV2b), siendo este subtipo el prevalente en esta área. Así mismo, será necesario cuando la cepa presente un patrón diferente al CPV2c realizar la completa caracterización a través de secuenciación y análisis genéticos. Este protocolo puede diferenciar las cepas vacunales del subtipo CPV2c por lo que sería muy útil en caso de que se requiera conocer si CPV causal pertenece a cepas de campo o vacunales o para valorar la eficacia clínica de las vacunas ante la presencia o no de sintomatología sugerente de parvovirus canina.

El subtipo predominante de CPV en los problemas gastroentéricos de caninos que se presentan a consulta y diagnosticados como parvovirus en el área metropolitana de Monterrey N.L. es el CPV2c y en una muy baja proporción el CPV2b.

Algunas cepas del CPV son similares genética a cepas europeas, de Estados Unidos y de México. Sin embargo, algunas de ellas se segregan en grupos separados que sugieren un proceso evolutivo distinto en la zona estudiada y que probablemente sea diferente a los ocurrido en otras áreas de la República Mexicana, Latinoamérica y el mundo.

Acorde a lo observado, se acepta la hipótesis que afirma que los subtipos de CPV identificados en Monterrey y su área metropolitana (CPV2c, CPV2b), tanto por patrón de PCR-RFLP y secuencia de nucleótidos, son distintos a los que contienen las vacunas más usadas en esta zona (CPV2).

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altman, K.D., Kelman, M., Ward, M.P., 2017. Are vaccine strain, type or administration protocol risk factors for canine parvovirus vaccine failure? *Vet. Microbiol.* doi:10.1016/j.vetmic.2017.08.019.

Atalay Vural, S., Alcigir, G., 2011. Histopathological and immunohistological findings in canine parvoviral infection: diagnosis application. *Rev. Med. Vet. (Toulouse)*.

Barbis, D.P., Chang, S.F., Parrish, C.R., 1992. Mutations adjacent to the dimple of the canine parvovirus capsid structure affect sialic acid binding. *Virology.* doi:10.1016/0042-6822(92)90192-R.

Bastianello, S.S., 1981. Canine parvovirus myocarditis: clinical signs and pathological lesions encountered in natural cases. *J S Afr Vet Assoc.* Jun;52(2):105-8.

Brody, J.R., Kern, S.E., 2004. Sodium boric acid: A Tris-free, cooler conductive medium for ADN electrophoresis. *Biotechniques.* doi:10.1677/ERC-09-0222.

Buonavoglia, C., Martella, V., Pratella, A., Tempesta, M., Cavalli, A., Buonavoglia, D., Bozzo, G., Elia, G., Decaro, N., Carmichael, L., 2001. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *J. Gen. Virol.* doi:10.1099/0022-1317-82-12-3021.

Buonavoglia, D., Cavalli, a, Pratelli, a, Martella, V., Greco, G., Tempesta, M.,

- Buonavoglia, C., 2000. Antigenic analysis of canine parvovirus strains isolated in Italy. *New Microbiol.* 23, 93–6.
- Castro, T.X., Costa, E.M., Leite, J.P., Labarthe, N. V., Cubel Garcia, R.C.N., 2011. Monitoring of canine parvovirus (CPV) strains detected in vaccinated puppies in Brazil. *Res. Vet. Sci.* doi:10.1016/j.rvsc.2010.06.005.
- Chiang, S.Y., Wu, H.Y., Chiou, M.T., Chang, M.C., Lin, C.N., 2016. Identification of a novel canine parvovirus type 2c in Taiwan. *Virolog. J.* doi:10.1186/s12985-016-0620-5.
- Decaro, N., Buonavoglia, C., 2012. Canine parvovirus-A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet. Microbiol.* 155, 1–12. doi:10.1016/j.vetmic.2011.09.007.
- Decaro, N., Desario, C., Addie, D.D., Martella, V., Vieira, M.J., Elia, G., Zicola, A., Davis, C., Thompson, G., Thiry, E., Truyen, U., Buonavoglia, C., 2007. Molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* doi:10.3201/eid1308.070505.
- Decaro, N., Desario, C., Billi, M., Lorusso, E., Colaianni, M.L., Colao, V., Elia, G., Ventrella, G., Kusi, I., Bo, S., Buonavoglia, C., 2013. Evaluation of an in-clinic assay for the diagnosis of canine parvovirus. *Vet. J.* 198, 504–7. doi:10.1016/j.tvjl.2013.08.032.

Decaro, N., Desario, C., Billi, M., Lorusso, E., Colaianni, M.L., Colao, V., Terlizzi, M., Elisa, G., Ventrella, G., Bo, S., Buonavoglia, C., 2013. Validation of the witness parvo test for the diagnosis of canine parvovirus infection, in: World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians.

Decaro, N., Desario, C., Parisi, A., Martella, V., Lorusso, A., Miccolupo, A., Mari, V., Colaianni, M.L., Cavalli, A., Di Trani, L., Buonavoglia, C., 2009. Genetic analysis of canine parvovirus type 2c. *Virology*. doi:10.1016/j.virol.2008.12.016.

Decaro, Nicola, Elia, G., Desario, C., Roperto, S., Martella, V., Campolo, M., Lorusso, A., Cavalli, A., Buonavoglia, C., 2006a. A minor groove binder probe real-time PCR assay for discrimination between type 2-based vaccines and field strains of canine parvovirus. *J. Virol. Methods* 136, 65–70. doi:10.1016/j.jviromet.2006.03.030.

Decaro, Nicola, Elia, G., Martella, V., Campolo, M., Desario, C., Camero, M., Cirone, F., Lorusso, E., Lucente, M.S., Narcisi, D., Scalia, P., Buonavoglia, C., 2006b. Characterisation of the canine parvovirus type 2 variants using minor groove binder probe technology. *J. Virol. Methods*. doi:10.1016/j.jviromet.2005.10.026.

Decaro, N., Martella, V., Desario, C., Bellacicco, A.L., Camero, M., Manna, L., D'Aloja, D., Buonavoglia, C., 2006. First detection of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain. *J. Vet. Med. Ser. B Infect. Dis. Vet. Public Heal.* doi:10.1111/j.1439-0450.2006.00974.x.

- Duque-García, Y., Echeverri-Zuluaga, M., Trejos-Suarez, J., Ruiz-Saenz, J., 2017. Prevalence and molecular epidemiology of Canine parvovirus 2 in diarrheic dogs in Colombia, South America: A possible new CPV-2a is emerging? *Vet. Microbiol.* doi:10.1016/j.vetmic.2016.12.039.
- E. Mylokani, M., Kalli, I., S. Rallis, T., 2016. Canine parvoviral enteritis: an update on the clinical diagnosis, treatment, and prevention. *Vet. Med. Res. Reports.* doi:https://doi.org/10.2147/VMRR.S80971.
- Elia, G., Desario, C., Pezzoni, G., Camero, M., Brocchi, E., Decaro, N., Martella, V., Buonavoglia, C., 2012. Recombinant ELISA using baculovirus-expressed VP2 for detection of antibodies against canine parvovirus. *J. Virol. Methods* 184, 98–102. doi:10.1016/j.jviromet.2012.05.025.
- Faz, M., Martinez, J.S., Gomez, L.B., Quijano-Hernandez, I., Fajardo, R., Del Angel-Caraza, J., 2018. Origin and genetic diversity of canine parvovirus 2c circulating in Mexico. *Arch. Virol.* doi:10.1007/s00705-018-4072-7.
- Felsenstein, J., 1985. Phylogenies and the Comparative Method. *Am. Nat* 125, 3–147. doi:10.1086/284325.
- Felsenstein, J., 1981. Evolutionary trees from ADN sequences: A maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17, 368–376. doi:10.1007/BF01734359.
- Ford, J., McEndaffer, L., Renshaw, R., Molesan, A., Kelly, K., 2017. Parvovirus

Infection Is Associated With Myocarditis and Myocardial Fibrosis in Young Dogs.
Vet. Pathol. doi:10.1177/0300985817725387.

Goddard, A., 2010. Canine Parvovirus. Vet. Clin. NA Small Anim. Pract. 40, 1041–1053. doi:10.1016/j.cvsm.2010.07.007.

Haligur, M., Ozmen, O., Sezer, K., Sahinduran, S., 2009. Clinical, pathological and immunohistochemical findings in diarrheic dogs and evaluation of canine parvoviral and coronaviral enteritis. J. Anim. Vet. Adv. 8(4):720-725.

Hayes MA, Russell RG, B. LA, 1979. Sudden death in young dogs with myocarditis caused by parvovirus. Diabetologia. doi:10.1007/s00125-004-1663-5.

Hoelzer, K., Parrish, C.R., 2008. Evolution and Variation of the Parvoviruses, in: Origin and Evolution of Viruses. doi:10.1016/B978-0-12-374153-0.00017-5.

Hoelzer, K., Shackelton, L.A., Holmes, E.C., Parrish, C.R., 2008a. Within-host genetic diversity of endemic and emerging parvoviruses of dogs and cats. J. Virol. 82, 11096–105. doi:10.1128/JVI.01003-08.

Hoelzer, K., Shackelton, L.A., Parrish, C.R., Holmes, E.C., 2008b. Phylogenetic analysis reveals the emergence, evolution and dispersal of carnivore parvoviruses. J. Gen. Virol. 89, 2280–2289. doi:10.1099/vir.0.2008/002055-0.

Hong, C., Decaro, N., Desario, C., Tanner, P., Pardo, M.C., Sanchez, S., Buonavoglia,

- C., Saliki, J.T., 2007. Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 19, 535–539. doi:10.1177/104063870701900512.
- Huang, Q., Baum, L., Fu, W.L., 2010. Simple and practical staining of ADN with GelRed in agarose gel electrophoresis. *Clin. Lab.*
- Hueffer, K., Parker, J.S.L., Weichert, W.S., Geisel, R.E., Sgro, J., Parrish, C.R., 2003. The Natural Host Range Shift and Subsequent Evolution of Canine Parvovirus Resulted from Virus-Specific Binding to the Canine Transferrin Receptor The Natural Host Range Shift and Subsequent Evolution of Canine Parvovirus Resulted from Virus-Specific Bind. *J. Virol.* 77, 1718–1726. doi:10.1128/JVI.77.3.1718.
- Hueffer, K., Parrish, C.R., 2003. Parvovirus host range, cell tropism and evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* doi:10.1016/S1369-5274(03)00083-3.
- Ihalainen, T.O., Niskanen, E.A., Jylhävä, J., Turpeinen, T., Rinne, J., Timonen, J., Vihinen-Ranta, M., 2007. Dynamics and interactions of parvoviral NS1 protein in the nucleus. *Cell. Microbiol.* 9, 1946–1959. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.00926.x.
- Kalli, I., Leontides, L.S., Mylonakis, M.E., Adamama-Moraitou, K., Rallis, T., Koutinas, A.F., 2010. Factors affecting the occurrence, duration of hospitalization and final outcome in canine parvovirus infection. *Res. Vet. Sci.*

doi:10.1016/j.rvsc.2010.02.013.

Kapil, S., Cooper, E., Lamm, C., Murray, B., Rezabek, G., Johnston, L., Campbell, G., Johnson, B., 2007. Canine parvovirus types 2c and 2b circulating in north American dogs in 2006 and 2007. *J. Clin. Microbiol.* doi:10.1128/JCM.01300-07.

Khatri, R., Poonam, Mohan, H., Minakshi, CS, P., 2017. Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis and Treatment of Canine Parvovirus Disease in Dogs: A Mini Review. *J. Vet. Sci. Med. Diagn.* doi:10.4172/2325-9590.1000233.

Kimura, M., 1980. Journal of Molecular Evolution A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. *J. Mol. Evol* 16, 111–120. doi:10.1007/BF01731581.

Lenghaus, C., Studdert, M.J., Finnie, J.W., 1980. Acute and chronic canine parvovirus myocarditis following intrauterine inoculation. *Aust. Vet. J.* 56(10):465-8. doi:10.1111/j.1751-0813.1980.tb02555.x.

Macartney, L., McCandlish, I.A.P., Thompson, H., Cornwell, H.J.C., 1984. Canine parvovirus enteritis 2: Pathogenesis. *Vet. Rec.* 15(18):453-60. doi:10.1136/vr.115.18.453.

Martella, V., Decaro, N., Buonavoglia, C., 2006. Evolution of CPV-2 and impicance for antigenic/genetic characterization. *Virus Genes* 33, 11–13. doi:10.1007/s11262-005-0034-8

- Mathys, A., Mueller, R., Pedersen, N.C., Theilen, G.H., 1983. Comparison of hemagglutination and competitive enzyme-linked immunosorbent assay procedures for detecting canine parvovirus in feces. *Am. J. Vet. Res.*
- McElligott, S., Collins, P.J., Sleator, R.D., Martella, V., Decaro, N., Buonavoglia, C., O'Shea, H., 2011. Detection and genetic characterization of canine parvoviruses and coronaviruses in Southern Ireland. *Arch. Virol.* 156, 495–503. doi:10.1007/s00705-010-0861-3
- Meunier, P.C., Cooper, B.J., Appel, M.J., Slauson, D.O., 1985. Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: the importance of viremia. *Vet. Pathol.* 44(1):152-4. doi:10.1177/030098588502200110
- Meunier, P.C., Glickman, L.T., Appel, M.J., Shin, S.J., 1981. Canine parvovirus in a commercial kennel: epidemiologic and pathologic findings. *Cornell Vet.* 71, 96–110.
- Miranda, C., Parrish, C.R., Thompson, G., 2016. Epidemiological evolution of canine parvovirus in the Portuguese domestic dog population. *Vet. Microbiol.* 183:37-42 doi:10.1016/j.vetmic.2015.11.037
- Miranda, C., Thompson, G., 2016. Canine parvovirus in vaccinated dogs: A field study. *Vet. Rec.* 178(16):397. doi:10.1136/vr.103508
- Nandi, S., Chidri, S., Kumar, M., Chauhan, R.S., 2010. Occurrence of canine parvovirus

type 2c in the dogs with haemorrhagic enteritis in India. *Res. Vet. Sci.* 88(1):169-71. doi:10.1016/j.rvsc.2009.05.018

Nandi, S., Kumar, M., 2010. Canine parvovirus: Current perspective. *Indian J. Virol.* 21, 31–44. doi:10.1007/s13337-010-0007-y

Nandi, S., Kumar, M., Mohapatra, T.K., Ravishankar, C., 2013. Emergence of canine parvovirus - 2 variants and its impact on vaccination. *World Appl. Sci. J.* 23(10):1366-1376. doi:10.5829/idosi.wasj.2013.23.10.1823

OIE, 2012. Manual de animales terrestres, in: OIE (Ed.), . Paris, Francia.

Parrish, C.R., Aquadro, C.F., Strassheim, M.L., Evermann, J.F., Sgro, J.Y., Mohammed, H.O., 1991. Rapid antigenic-type replacement and ADN sequence evolution of canine parvovirus. *J. Virol.* 65, 6544–52.

Parrish, C.R., Carmichael, L.E., Antczak, D.F., 1982. Antigenic relationships between canine parvovirus type 2, feline panleukopenia virus and mink enteritis virus using conventional antisera and monoclonal antibodies. *Arch. Virol.* 72(4):267-78. doi:10.1007/BF01315223

Parrish, C.R., Have, P., Foreyt, W.J., Evermann, J.F., Senda, M., Carmichael, L.E., 1988. The global spread and replacement of canine parvovirus strains. *J. Gen. Virol.* 69, 1111–1116. doi:10.1099/0022-1317-69-5-1111.

- Pedroza-Roldán, C., Páez-Magallan, V., Charles-Niño, C., Elizondo-Quiroga, D., Leonel De Cervantes-Mireles, R., López-Amezcuca, M.A., 2015. Genotyping of Canine parvovirus in western Mexico. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 27(1):107-11. doi:10.1177/1040638714559969.
- Pereira, C.A.D., Monezi, T.A., Mehnert, D.U., D'Angelo, M., Durigon, E.L., 2000. Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. *Vet. Microbiol.* 75(2):127-33. doi:10.1016/S0378-1135(00)00214-5.
- Pérez, R., Francia, L., Romero, V., Maya, L., López, I., Hernández, M., 2007. First detection of canine parvovirus type 2c in South America. *Vet. Microbiol.* 124(1-2):147-52. doi:10.1016/j.vetmic.2007.04.028.
- Pintos, A.B., Cecilia, I., Negro, B., li, L., Reolon, E.E., li, B., Beatriz, M., Barthe, B., Ramón, J., Rodonz, A., 2011. Isolation and characterization of canine parvovirus type 2c circulating in Uruguay. *Ciência Rural.* 41(8): 1436-1440. doi:10.1590/S0103-84782011005000098.
- Pollock, R. V.H., Coyne, M.J., 1993. Canine parvovirus. *Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract.* 40(6):1041-53. doi:10.1016/S0195-5616(93)50305-4.
- Prittie, J., Medicine, D.I., 2004. Canine parvoviral enteritis : a review of diagnosis , management , and prevention 14, 167–176.

- Reed, A., Jones, E. V, Miller, T.J., 1988. Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. *J. Virol.* 62(1): 266–276.
- Ros, C., Baltzer, C., Mani, B., Kempf, C., 2006. Parvovirus uncoating in vitro reveals a mechanism of ADN release without capsid disassembly and striking differences in encapsidated ADN stability. *Virology* 345, 137–147. doi:10.1016/j.virol.2005.09.030
- Saei, D., Dastmalchi Saei, C., 2017. Molecular characterization of canine parvovirus (CPV) antigenic variants from healthy and diarrheic dogs in Urmia region, Iran. *Iran. J. Vet. Med. Iran J Vet Med.* 11(1): 9-19.
- Sagazio, P., Tempesta, M., Buonavoglia, D., Cirone, F., Buonavoglia, C., 1998. Antigenic characterization of canine parvovirus strains isolated in Italy. *J. Virol. Methods.* 73(2):197-200. doi:10.1016/S0166-0934(98)00055-X
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–25. doi:citeulike-article-id:93683
- Sankareswaran, M., Jayashree, S., Karthika, S., Sentila, R., Michael, A., 2011. Generation and characterization of chicken egg yolk antibodies against canine parvovirus-2 infection. *J. Chem. Pharm. Res.* 3(6):772-779.
- Schatzberg, S.J., Haley, N.J., Barr, S.C., Parrish, C., Steingold, S., Summers, B.A.,

- DeLahunta, A., Kornegay, J.N., Sharp, N.J.H., 2003. Polymerase Chain Reaction (PCR) Amplification of Parvoviral ADN from the Brains of Dogs and Cats with Cerebellar Hypoplasia. *J. Vet. Intern. Med.* 17(4):538-44. doi:10.1892/0891-6640(2003)017<0538:PCRPAO>2.3.CO;2
- Senda, M., Parrish, C.R., Harasawa, R., Gamoh, K., Muramatsu, M., Hirayama, N., Itoh, O., 1995. Detection by PCR of wild-type canine parvovirus which contaminates dog vaccines. *J. Clin. Microbiol.* 33(1): 110–113.
- Sime, T.A., Powell, L.L., Schildt, J.C., Olson, E.J., 2015. Parvoviral myocarditis in a 5-week-old Dachshund. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* 25, 765–769. doi:10.1111/vec.12347
- Streck, A.F., Ruster, D., Truyen, U., Homeier, T., 2013. An updated TaqMan real-time PCR for canine and feline parvoviruses..*J. Virol. Methods.* 193(1):6-8. doi:10.1016/j.jviromet.2013.04.025.
- Studdert, M.J., Oda, C., Riegl, C.A., Roston, R.P., 1983. Aspects of the diagnosis, pathogenesis and epidemiology of canine parvovirus. *Aust. Vet. J.* 60(7):197-200. doi:10.1111/j.1751-0813.1983.tb09581.x.
- Suikkanen, S., Sääjärvi, K., Hirsimäki, J., Vällilehto, O., Reunanen, H., Vihinen-Ranta, M., Vuento, M., 2002. Role of recycling endosomes and lysosomes in dynein-dependent entry of canine parvovirus. *J. Virol.* 76, 4401–11.

doi:10.1128/JVI.76.9.4401-4411.2002

Sutton, D., Vinberg, C., Gustafsson, A., Pearce, J., Greenwood, N., 2013. Canine parvovirus type 2c identified from an outbreak of severe gastroenteritis in a litter in Sweden. *Acta Vet. Scand.* 60(7):197-200. doi:10.1186/1751-0147-55-64.

Thomson, G.W., Gagnon, A.N., 1978. Canine gastroenteritis associated with a parvovirus-like agent. *Can. Vet. J.* 1978 Dec; 19(12): 346.

Tijssen P. , Agbandje-McKenna, P. , Almendral, P. , Bergoin, P. , Flegel, P. , Hedman, P. , Kleinschmidt, P. , Li P. , Pintel D. J. , Tatter-sall, P., 2011. Family Parvoviridae in virus taxonomy., in: King A. M. Q. , Lefkowitz E. , Adams M. J., C.E.B. (Ed.), In Ninth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Elsevier/Academic, London, pp. 405–425.

Truyen, U., Evermann, J.F., Vieler, E., Parrish, C.R., 1996. Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range. *Virology.* 1996 Jan 15;215(2):186-9. doi:10.1006/viro.1996.0021.

Weichert, W.S., Parker, J.S.L., Wahid, A.T.M., Chang, S.F., Meier, E., Parrish, C.R., 1998. Assaying for structural variation in the parvovirus capsid and its role in infection. *Virology.* Oct 10;250(1):106-17. doi:10.1006/viro.1998.9352.

Wu, H., Rossmann, M.G., 1993. The canine parvovirus empty capsid structure. *J. Mol. Biol.* 1993 Sep 20;233(2):231-44. doi:http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1993.1502.

- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., R., 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. S., & Madden, T. L. BMC bioinformatics, 13 13, 134. doi:doi:10.1186/1471-2105-13-134.
- Zhao, J., Zhang, H., Bai, X., Martella, V., Hu, B., Sun, Y., Zhu, C., Zhang, L., Liu, H., Xu, S., Shao, X., Wu, W., Yan, X., 2014. Emergence of canine distemper virus strains with two amino acid substitutions in the haemagglutinin protein, detected from vaccinated carnivores in North-Eastern China in 2012-2013. Vet. J. 2014 Apr;200(1):191-4. doi:10.1016/j.tvjl.2014.01.028.
- Zhou, P., Zeng, W., Zhang, X., Li, S., 2017. The genetic evolution of canine parvovirus - A new perspective. PLoS One. 2017 Mar 31;12(3):e0175035. doi:10.1371/journal.pone.0175035.
- Zienius, D., Lelešius, R., Kavaliauskis, H., Stankevičius, A., Šalomskas, A., 2016. Phylogenetic characterization of Canine Parvovirus VP2 partial sequences from symptomatic dogs samples. Pol. J. Vet. Sci. 19, 187–196. doi:10.1515/pjvs-2016-0023.

8 ANEXOS

8.1 ANEXO 1. CUESTIONARIO EPIDEMIOLÓGICO

Marque con una X en donde corresponda y conteste lo que se le pide.

Nombre del dueño: _____				
Nombre perro: _____		Sexo: _____		Raza: _____
Edad: _____		Clínica de procedencia: _____		
Teléfono clínica: _____		Municipio de origen: _____		
	SI	NO	TIPO	DÍAS CON SÍNTOMA
Diarrea				
Vómito				
Deshidratación				
Pérdida de consciencia				
Muerte				
Otros				
Comentarios				
INMUNIZACIÓN				
	SI	NO	Tipo de vacuna utilizada y marca comercial	Dosis aplicadas, intervalo de aplicación, edad inicio calendario
Tiene vacunas				
Comentarios				
	SI	NO	Marca comercial de desparasitante	Dosis aplicadas, intervalo de aplicación, edad inicio
DESPARASITACIONES				
Comentarios				
DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTOS				
	SI	NO	Diagnóstico presuntivo	Pruebas de laboratorio realizadas y resultados sobresalientes de las pruebas
Diagnóstico presuntivo				
Se utilizó snap para CPV y otros virus			Marca de prueba y Resultado	
Comentarios				
TIPO DE MUESTRA TOMADA, MEDIO DE TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN				



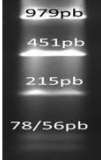




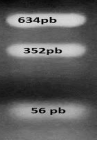
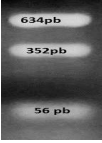
SCR | NÚMERO DE ENCUESTA: _____ CORRESPONDE A MUESTRA NO. _____

ANEXO 2

DATOS EPIDEMIOLÓGICOS OBTENIDOS CON LAS MUESTRAS DE CANINOS CON DIAGNÓSTICO DE PARVOVIRUS

8.2 ANEXO 2. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS OBTENIDOS CON LAS MUESTRAS DE CANINOS CON DIAGNÓSTICO DE PARVOVIRUS

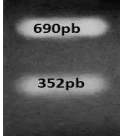

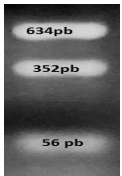
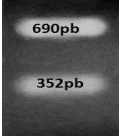
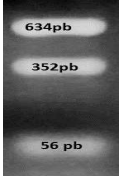
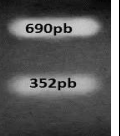
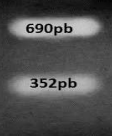


DATOS	NÚMERO DE MUESTRA									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	12
Nombre	Chicharito	Matilda	TOM	Rocky	Muñeca	Bruno	Dangy	Nano	S/N	Grace
Sexo	Macho	Hembra	Macho	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Macho	Hembra
Raza	Beagle	Labrador	Pastor Ingles	Criollo	American bully	Criollo	Pitbull	Dashound	Shihtzu	Mastín Napolitano
Edad	5m	5m	2.5m	2m	3m	3m	3m	1año 5m	6m	4m
Procedencia	San pedro	San Pedro	Monterrey	San Pedro	Apodaca	Salinas Victoria	Salinas Victoria	San Nicolás	Salinas Victoria	San Pedro
Signos	Vómito	Vómito	Vómito	Vómito	Vómito	Vómito	Vómito	Vómito	Vómito	Vómito
Diarrea	Si	si	no	si	si	si	si	si	si	si
tipo Diarrea	Hematoquecia	Hematoquecia	No aplica	Mucoide	Hematoquecia	Hematoquecia	Hematoquecia	Hematoquecia	Hematoquecia	Verdosa
Protocolo vacunación completo	si	si	no	no	no	no	no	no	no	si
TX Interferón/ inmunoestimulante	no	no	no	Desconocido	No	no	Virbagen omega	no	Virbagen omega	no
Muerte	no	si	no	Desconocido	Desconocido	no	no	no	no	no
Coinfección parasitaria	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
Realizó SNAP	si	si	si	no	no	si	si	si	si	si
Marca SNAP	IDEXX	IDEXX	Anigen	No aplica	No aplica	ApetCare	ApetCare	Anigen	Anigen	Anigen/ IDEXX
CPV positivo a SNAP	si	si	si	No aplica	No aplica	si	si	si	si	si/no*
PCR positivo	si	si	si	si	si	si	si	si	si	no
Tipo de CPV por PCR-RFLP	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c	No aplica

Patrón de bandeos por PCR-RFLP										
Secuencia/tipo CPV	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c	Se realizó, sin resultados	CPV2c	CPV2c	Se realizó, sin resultados	Se realizó, sin resultados	No aplica


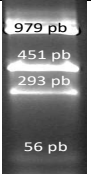
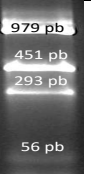



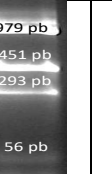
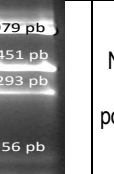
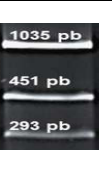
DATOS	NÚMERO DE MUESTRA									
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Nombre	Nena	Gorda	Jerry	Bombón	Milo	Rusa	Cordobés	Lituania	Cachorro	Dipci
Sexo	Hembra	hembra	Macho	Macho	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra
Raza	Boston Terrier	pitbull	Chihuahua	Pitbull	Cocker Spaniel	Gran Danés	Gran Danés	Gran Danés	Blue Heeler	Pitbull
Edad	5m	3.5m	3.5m	3m	5m	6m	6m	6m	2m	2.5m
Procedencia	Escobedo	Escobedo	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	HVPE, Escobedo	HVPE, Escobedo	HVPE, Escobedo	Salinas Victoria	Salinas Victoria
Signos	Vómito	Vómito	Vómito	Vómito	Vómito	Vómito	Vómito	Vómito	Vómito	Vómito
Diarrea	si	si	no	si	no	si	si	si	si	si
tipo Diarrea	Hematoquecia	Hematoquecia	No aplica	Hematoquecia	No aplica	Hematoquecia	Hematoquecia	Hematoquecia	Amarilla	Amarilla
Protocolo vacunación completo	no	no	no	no	no	si	no	no	no	no
TX Interferón/ inmunostimulante	no	no	Virbagen omega	Virbagen omega	Virbagen omega	Zilexis	Zilexis	Zilexis	Virbagen omega	Virbagen omega
Muerte	no	Desconocido	no	si	no	no	no	no	si	no
Coinfección parasitaria	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
Realizó SNAP	no	si	si	si	si	si	si	si	si	si
Marca SNAP	No aplica	Anigen	ApetCare	ApetCare	ApetCare	Anigen	Anigen	Anigen	Norvet	ApetCare
CPV positivo a SNAP	No aplica	si	si	si	si	si	si	si	si	si
PCR positivo	Si PCR anidado	si	si	si	si	si	si	si	si	si
Tipo de CPV por PCR-RFLP	No aplica	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c

Patrón de bandeado por PCR-RFLP	No se realizó porque fue positivo a PCR anidado									
Secuencia/ tipo CPV	No se realizó	No se realizó	No se realizó	No se realizó	CPV2c	No se realizó	No se realizó	No se realizó	No se realizó	CPV2c


DATOS	NÚMERO DE MUESTRA									
	23	24	25	26	27	28	29	30	33	34
Nombre	Choco	Oso	Bombón	Satán	Rayo	Puchi	Coqueta	Cachorro	S/N	Doker
Sexo	Macho	Macho	Macho	Macho	Macho	Macho	Hembra	Macho	Macho	Macho
Raza	Cocker spaniel	Criollo	Chihuahua	Pitbull	Pastor belga	Pitbull	Pitbull	Pitubull	Dash hound	Schnauzer
Edad	2m	3m	6m	5m	3m	3m	2.5m	3m	3m	3m
Procedencia	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria
Signos	no	Vómito	Vómito	Vómito	no	no	Vómito	Vómito	Vómito	Vómito
Diarrea	si	si	si	no	si	si	si	si	no	si
Tipo Diarrea	Café	Café	Hematoquecia	No aplica	Hematoquecia	Amarilla	Café	Hematoquecia	No aplica	Hematoquecia
Protocolo vacunación completo	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
TX Interferón/ inmunostimulante	Virbagen omega	Virbagen omega	Virbagen omega	Virbagen omega	Virbagen omega	Virbagen omega	no	no	Virbagen omega	Virbagen omega
Muerte	no	no	si	no	si	si	si	si	no	no
Coinfecciones parasitarias	Coccidias	no	no	no	no	no	no	no	no	no
Realizó SNAP	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
Marca SNAP	ApetCare	Apetcare	Norvet	Norvet	Norvet	Anigen	Anigen	Anigen	ApetCare	Norvet
CPV positivo a SNAP	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
PCR positivo	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
Tipo de CPV por PCR-RFLP	CPV2c	CPV2c		CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c

Patrón de bandeos por PCR-RFLP			No se observó patrón de polimorfismo							
Secuencia/tipo CPV	CPV2c	No se realizó	No se realizó	No se realizó	No se realizó	No se realizó	No se realizó	No se realizó	No se realizó	Se realizó sin resultados



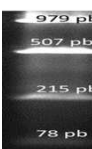




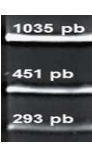
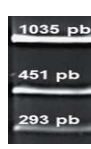
DATOS	NÚMERO DE MUESTRA									
	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
Nombre	Kira	Fonky	Tita	Luna	Princesa	Gorda	Beethoven	Pelusa	Nikita	Lipanto
Sexo	Hembra	Macho	Hembra	Hembra	Hembra	Hembra	Macho	Hembra	Hembra	Macho
Raza	Husky	Poodle	Criollo	Pitbull	Criolla	Criolla	Criollo	Pastor Belga	Criolla	Dóberman
Edad	5m	3m	4m	4m	3m	4.5m	4m	3m	3m	9m
Procedencia	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria
Signos	no	Vómito	Vómito	Vómito	Vómito	Vómito	no	Vómito	Vómito	Vómito
Diarrea	si	si	si	no	no	si	si	si	si	si
Tipo Diarrea	Hematoqueciosa	Hematoqueciosa	Café	No aplica	No aplica	Hematoqueciosa	Café	Verde	Mostaza	Hematoqueciosa
Protocolo vacunación completo	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
TX Interferón/inmunoestimulante	Virbagen omega	Virbagen omega	Virbagen omega	Virbagen omega	Virbagen omega	Virbagen omega	no	Virbagen omega	Virbagen omega	Virbagen omega
Muerte	si	si	no	no	no	no	no	no	no	no
Coinfección parasitaria	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
Realizó SNAP	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
Marca SNAP	ApetCare	Anigen	Anigen	Norvet	Norvet	ApetCare	ApetCare	ApetCare	Norvet	Anigen

CPV positivo a SNAP	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
PCR positivo	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
Tipo de CPV por PCR-RFLP	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c	No aplica	CPV2c
Patrón de bandeo por PCR-RFLP									No se realizó porque fue positivo a PCR anidado	
Secuencia/tipo CPV	No se realizó	No se realizó	No se realizó	No se realizó	CPV2c	No se realizó	CPV2c	No se realizó	No se realizó	No se realizó


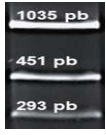






DATOS	NÚMERO DE MUESTRA									
	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
Nombre	Penqui	Yanqui	Ruffo	Bolo	Negro	Momo	Greasy	Lobo	Chuly	Coyote1
Sexo	Macho	Macho	Macho	Macho	Macho	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Hembra
Raza	Chihuahua	Criollo	Husky	chihuahua	Pastor alemán	Criollo	Pitbull	Criollo	Chihuahua	No aplica
Edad	2.5m	3m	4m	5m	3m	6m	3m	3m	2m	4m
Procedencia	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	San Pedro	San Pedro	Escobedo	Escobedo	Escobedo	San Pedro	Apodaca
Signos	no	Vómito	Vómito	Vómito	Vómito	Vómito	Vómito	no	Vómito	no
Diarrea	si	si	no	si	si	si	si	si	si	si
Tipo Diarrea	Hematoquecia	Amarilla	No aplica	Amarilla	Hematoquecia	Amarilla	Café	Café	Hematoquecia	Hematoquecia
Protocolo vacunación completo	no	no	si	no	no	no	no	no	no	no
TX Interferón / inmunoestimulante	Virbagen omega	Virbagen omega	Virbagen omega	no	no	Zilexis	no	no	Inmunest	no
Muerte	si	no	si	no	si	si	no	si	no	si
Coinfección parasitaria	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
Realizó SNAP	si	si	si	si	si	si	si	si	no	si
Marca SNAP	Anigen	ApetCare	ApetCare	IDEXX	IDEXX	Norvet	IDEXX	Norvet	No aplica	Anigen
CPV positivo a SNAP	si	si	si	si	si	si	si	si	No aplica	no

PCR positivo	si	si	Si PCR anidado	si	si	si	si	si	Si PCR anidado	si
Tipo de CPV por PCR-RFLP	CPV2c	No se observó el patrón	No aplica	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c	No aplica	CPV2c
Patrón de bandeo por PCR-RFLP		No se observó el patrón	No se realizó porque fue positivo a PCR anidado						No se realizó porque fue positivo a PCR anidado	
Secuencia/tipo CPV	No se realizó	No se realizó	No se realizó	No se realizó	Se realizó sin resultados	CPV2c	No se realizó	No se realizó	No se realizó	Se realizó, sin resultados



DATOS	NÚMERO DE MUESTRA									
	55	56	59	62	63	64	65	66	67	68
Nombre	Coyote2	Coyote3	Chalino	Rony	Luna	Bruno	Tyson	Spike	Taco	Drako
Sexo	Macho	Macho	Macho	Macho	Hembra	Macho	Macho	Macho	Macho	Macho
Raza	No aplica	No aplica	Chihuahua	Pastor alemán	Shitzu	Poodle	Pitbull	Chihuahua	Criollo	Criollo
Edad	4m	4m	10m	2m	2m	6m	2m	3m	3m	4m
Procedencia	Apodaca	Apodaca	San Pedro	Escobedo	Escobedo	San Pedro	San Pedro	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria
Signos	Vómito	Vómito	Vómito	vomito	vomito	no	vomito	no	vomito	vomito
Diarrea	no	no	si	si	si	si	si	si	si	si
Tipo Diarrea	No aplica	No aplica	Hematoquecia	Hematoquecia	Oscura	Hematoquecia	Hematoquecia	amarilla	amarilla	Hematoquecia
Protocolo vacunación completo	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
TX Interferón / inmunestimulante	no	no	no	no	no	no	no	Virbagen omega	Virbagen omega	Virbagen omega
Muerte	no	no	no	Desconocido	Desconocido	no	no	si	no	no
Coinfección parasitaria	no	no	no	no	no	no	Gardia	no	no	no
Realizó SNAP	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
Marca SNAP	Anigen	Anigen	IDEXX	Anigen	Anigen	IDEXX	IDEXX	ApetCare	ApetCare	ApetCare
CPV positivo a SNAP	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
PCR positivo	si	si	si	Si PCR anidado	si	si	si	si	si	si

Tipo de CPV por PCR-RFLP	CPV2c	CPV2c	CPV2b	No aplica	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c
Patrón de bandeo por PCR-RFLP				No se realizó porque fue positivo a PCR anidado						
Secuencia/tipo CPV	Se realizó, sin resultados	CPV2c	CPV2b	No se realizó	No se realizó	CPV2c	No se realizó	CPV2c	No se realizó	No se realizó

DATOS	NÚMERO DE MUESTRA									
	69	70	71	72	73	74	75	78	80	81
Nombre	Dolly	Rocko	Estrella	Akira	Manotas	Julieta	Frodo	Chuchis	S/N	S/N
Sexo	Hembra	Macho	Hembra	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Hembra	Hembra
Raza	Pug	Pastor Belga	Bull terrier	Pitbull	Pastor Alemán	Pomerania	Pomerania	Criollo	Blue Heeler	Blue Heeler
Edad	4m	4m	5m	4m	10m	3m	3 años	3m	6m	6m
Procedencia	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Escobedo	San Nicolás	San Nicolás	Escobedo	San Nicolás	San Nicolás
Signos	Vómito	no	no	Vómito	Vómito	no	no	Vómito	no	no
Diarrea	si	si	si	no	si	si	no	si	no	no
Tipo Diarrea	Hematoquecia	Hematoquecia	Café	No aplica	Hematoquecia	mucoide	No aplica	Hematoquecia	No aplica	No aplica
Protocolo vacunación completo	no	no	no	no	no	no	si	no	no	no
TX Interferón / inmunoestimulante	Virbagen omega	Virbagen omega	Virbagen omega	Virbagen omega	no	no	no	Zilexis	no	no
Muerte	Desconocido	no	no	no	Desconocido	no	no	no	si	si
Coinfección parasitaria	no	no	Giardia	no	no	no	no	no	no	no
Realizó SNAP	si	si	si	si	si	si	no	si	no	no
Marca SNAP	ApetCare	ApetCare	ApetCare	ApetCare	Anigen	Anigen	No aplica	Anigen	No aplica	No aplica
CPV positivo a SNAP	si	si	si	si	si	no	No aplica	si	No aplica	No aplica
PCR positivo	si	si	si	si	si	Si PCR anidado	Si PCR anidado	si	si	si

Tipo de CPV por PCR-RFLP	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c	No aplica	No aplica	CPV2c	CPV2c	CPV2c
Patrón de bandeo por PCR-RFLP						No se realizó porque fue positivo a PCR anidado	No se realizó porque fue positivo a PCR anidado			
Secuencia/tipo CPV	No se realizó	No se realizó	No se realizó	No se realizó	CPV2c	No se realizó	No se realizó	No se realizó	CPV2c	No se realizó




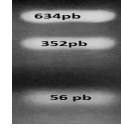
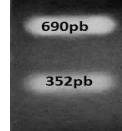

DATOS	NÚMERO DE MUESTRA									
	82	84	85	87	88	89	90	91	92	93
Nombre	S/N	LILO	Maya	Aikman	Kimbo	Antharon	Antar	Cuchufleta	Dino	Roko
Sexo	Hembra	Hembra	Hembra	Macho	Macho	Macho	Macho	Hembra	Macho	Macho
Raza	Blue Heeler	Bulldog Frances	Criollo	Rottweiler	Pitbull	Pastor Suizo	Pomerana	Criollo	Criollo	Pug/Bulldog
Edad	6m	5m	8m	7m	9m	3.5m	2m	4m	4m	3m
Procedencia	San Nicolás	Santiago	Escobedo	Escobedo	Escobedo	Monterrey	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria
Signos	no	Vómito	no	no	Vómito	si	no	no	si	si
Diarrea	no	si	si	si	si	si	si	si	si	no
Tipo Diarrea	No aplica	Hematoquecia	mucoide	Hematoquecia	Café	Hematoquecia	Mucosa, amarilla	Verde, amarilla	Amarillenta	No aplica
Protocolo vacunación completo	no	si	no	no	si	no	no	no	no	no
TX Interferón / inmunoestimulante	no	no	no	no	no	no	Virbagen omega	Virbagen omega	Virbagen omega	Virbagen omega
Muerte	si	no	no	no	no	no	no	no	no	no
Coinfección parasitaria	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
Realizó SNAP	no	si	si	si	si	si	si	si	si	si
Marca SNAP	No aplica	Anigen	Anigen	Anigen	Anigen	Anigen	Apet Care	Apet Care	Apet Care	Apet Care
CPV positivo a SNAP	No aplica	no	si	no	si	si	si	si	si	si

PCR positivo	si	Si PCR anidado	si	Si PCR anidado	Si PCR anidado	si	si	si	si	si
Tipo de CPV por PCR-RFLP	CPV2c	No aplica	CPV2c	No aplica	No aplica	No se observó el patrón	No se observó el patrón	No se observó el patrón	No se observó el patrón	No se observó el patrón
Patrón de bandeo por PCR-RFLP		No se realizó porque fue positivo a PCR anidado		No se realizó porque fue positivo a PCR anidado	No se realizó porque fue positivo a PCR anidado	No se observó el patrón	No se observó el patrón	No se observó el patrón	No se observó el patrón	No se observó el patrón
Secuencia/tipo CPV	No se realizó	No se realizó	Se realizó, sin resultados	No se realizó	No se realizó	Se realizó, sin resultados	No se realizó	No se realizó	No se realizó	No se realizó





DATOS	NÚMERO DE MUESTRA									
	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103
Nombre	Hanny	Luna	Yuky	Talía	Lucas	Roy	Ojitos	Tribi	Belcam	Toti
Sexo	Hembra	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Macho	Macho	Macho	Macho	Macho
Raza	Pug	Pitbull	Criollo	Pastor Belga	Chihuahua	Labrador	Pug	Pastor Belga	Husky	Pitbull
Edad	4m	3m	6m	2m	2m	3m	3m	3m	2m	3m
Procedencia	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria	Salinas Victoria
Signos	no	Vómito	Vómito	no	no	Vómito	Vómito	Vómito	Vómito	Vómito
Diarrea	no	si	si	si	si	si	si	si	si	no
Tipo Diarrea	No aplica	Hematoquecia	No especifica	Hematoquecia	Blanquecina	Hematoquecia	Amarillenta	Hematoquecia	Hematoquecia	No aplica
Protocolo vacunación completo	no	no	Desconocido	no	no	no	no	no	no	no
TX Interferón / inmuoestimulante	Virbagen omega	no	Virbagen omega	Virbagen omega	Virbagen omega	Virbagen omega	Virbagen omega	Virbagen omega	Virbagen omega	Virbagen omega
Muerte	no	Desconocido	No	No	No	No	No	No	No	Desconocido
Coinfección parasitaria	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
Realizó SNAP	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
Marca SNAP	Apet Care	Apet Care	Apet Care	Apet Care	Apet Care	Apet Care	Apet Care	Apet Care	Apet Care	Apet Care
CPV positivo a SNAP	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
PCR positivo	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si

Tipo de CPV por PCR-RFLP	No se observó el patrón	No se observó el patrón	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c	No se observó el patrón	No se observó el patrón	CPV2c
Patrón de bandeo por PCR-RFLP	No se observó el patrón	No se observó el patrón						No se observó el patrón	No se observó el patrón	
Secuencia/tipo CPV	No se realizó	No se realizó	No se realizó	No se realizó	No se realizó	No se realizó	No se realizó	No se realizó	No se realizó	No se realizó

DATOS	NÚMERO DE MUESTRA									
	104	118	10	11	31	32	57	58	60	62
Nombre	Pam	Hans	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos
Sexo	Hembra	Macho								
Raza	Pomerania	Doberman sepia								
Edad	2m	3m								
Procedencia	Salinas Victoria	San Nicolás								
Signos	no	Depresión e inapetencia								
Diarrea	no	no								
Tipo Diarrea	No aplica	No aplica								
Protocolo vacunación completo	no	no								
TX Interferón / inmunoestimulante	no	no								
Muerte	no	no								
Coinfección parasitaria	no	no								
Realizó SNAP	si	si								
Marca SNAP	Apet Care	Dato desconocido								

CPV positivo a SNAP	no	si									
PCR positivo	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	
Tipo de CPV por PCR-RFLP	No se observó el patrón	No se observó el patrón	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c	CPV2c	No se observó el patrón	No aplica
Patrón de bandeo por PCR-RFLP	No se observó el patrón	No se observó el patrón							No se observó el patrón	No se realizó porque fue positivo a PCR anidado	
Secuencia/tipo CPV	No se realizó	CPV2c	No se realizó	No se realizó	No se realizó	No se realizó	No se realizó	No se realizó	No se realizó	No se realizó	

DATOS	NÚMERO DE MUESTRA				
	76	77	79	83	86
Nombre	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos
Sexo					
Raza					
Edad					
Procedencia					
Signos					
Diarrea					
Tipo Diarrea					
Protocolo vacunación completo					
TX Interferón / inmunoestimulante					
Muerte					
Coinfección parasitaria					
Realizó SNAP					

Marca SNAP					
CPV positivo a SNAP					
PCR positivo	si	si	si		Si
Tipo de CPV por PCR-RFLP	CPV2c	CPV2c	CPV2c	No se observó el patrón	CPV2c
Patrón de bandeo por PCR-RFLP				No se observó el patrón	
Secuencia/tipo CPV	No se realizó	No se realizó	No se realizó	No se realizó	No se realizó

8.3 ANEXO 3. DESCRIPCIÓN DE PRUEBAS DE INMUNOCROMATOGRAFÍA PARA LA DETECCIÓN DE ANTÍGENO DE PARVOVIRUS CANINO UTILIZADAS EN MONTERREY Y SU ÁREA METROPOLITANA.

SNAP Canine Parvovirus Antigen Test Kit (IDEXX Laboratories, Inc.)¹

This page contains information on SNAP Canine Parvovirus Antigen Test Kit for **veterinary use**.

The information provided typically includes the following:

SNAP Canine Parvovirus Antigen Test Kit Indications

Warnings and cautions for SNAP Canine Parvovirus Antigen Test Kit

Direction and dosage information for SNAP Canine Parvovirus Antigen Test Kit

SNAP Canine Parvovirus Antigen Test Kit

This treatment applies to the following species

Dogs

Company: Idexx Labs.

Canine Parvovirus Antigen Test Kit

For veterinary use only.

SNAP* Parvo

The SNAP Canine Parvovirus Antigen Test Kit is a rapid enzyme immunoassay for the detection of canine parvovirus (CPV) antigen in canine feces. This test detects a surface protein antigen of CPV (including intact virus particles) shed in the feces of CPV-infected dogs.

Kit components

Item	Reagents	Quantity
1	Swabs with anti-parvovirus: HRPO conjugate (Preserved with gentamicin and ProClin™ 150)	5
2	SNAP devices	5
Reagents contained in each device:		
	Wash solution (preserved with ProClin™ 150)	0.4 mL
	Substrate solution	0.6 mL

Storage

- Store at 2-25°C until the expiration date.
- All components must be at room temperature (18-25°C) before running the test. Do not heat. This will take at least 30 minutes depending upon the temperature of your laboratory.

Precautions and Warnings

- Do not mix components from kits with different lot numbers.
- Properly dispose of contaminated materials and disinfect work areas.
- Do not use a SNAP device that has been activated prior to the addition of sample.
- The sampling swab is not designed to be used rectally.

¹ Información obtenida del folleto incluida en el “SNAP Canine Parvovirus Antigen Test Kit”

- Lubricants may reduce test sensitivity by reducing the volume of feces tested.
- **WARNING:** Conjugate - H316/P332+P313/EUH208. Causes mild skin irritation. If skin irritation occurs: Get medical advice/attention. Contains ProClin™ 150. May produce an allergic reaction.

Sample Information

- Samples must be at room temperature (18-25°C) before beginning the test procedure.
- Canine fecal matter is required for this test. Swabs are provided for sampling.
- Fecal samples can be stored at 2-8°C for 24 hours. If longer storage is required, samples should be frozen.

Invalid Results

- **Negative control (safeguard against false-positives)** - If color in the negative control spot is equal to or darker than the color in the sample spot, the result is invalid, and the sample should be retested.
- **No color development** - If the positive control does not develop color, repeat the test.
- **Background** - If the sample is allowed to flow past the activation circle, background color may result. Some background color is normal. However, if colored background obscures the test result, repeat the test.

Sensitivity and specificity

Comparison test	Sample size Kit/reference					Sample type	Relative sensitivity and specificity 95% confidence limit	Kappa statistic
	+/+	- /+	+/-	-/-	Total			
Hemagglutination	48	0	0	25	73	Feces	Sen., 100% (95% CL 94%-100%) Spec., 100% (95% CL 89%-100%)	1.0
Probe	126	0	2	103	231	Feces	Sen., 100% (95% CL 98%-100%) Spec., 98% (95% CL 93%-99.8%)	0.98

CL = Confidence limit

The shed window for CPV is typically highest day 4 to day 7 post-infection and usually correlates with the onset of clinical signs. In puppies with moderate maternal antibody levels, viral shedding may be delayed by 1-2 days relative to the onset of clinical signs. Virus shedding begins to wane by day 8-10 (post infection). It is important, therefore, to collect feces for viral detection at the onset of clinical illness and if negative for CPV, retest in 1-2 days.¹

Parvo vaccine cross-reactivity-In a study of 64 dogs vaccinated with six different modified live CPV-2 vaccines, the SNAP Parvovirus Antigen Test Kit did not detect CPV-2 in their feces.

A population of 64 beagles with low or no antibody to canine parvovirus-2 (CPV-2) were vaccinated with one of five different combination vaccines (Duramune® Max 5, Ft. Dodge Animal Health; Progard® 5, Intervet; Vanguard® Plus 5L, Pfizer Animal Health; Recombitek® C4, Merial; Galaxy® DA 2PPv, Schering-Plough Animal Health) or one monovalent product (NeoPar® NEOTECH LLC) containing modified live CPV-2 vaccine. Fecal samples were collected on day 0 and on one or more of the following days: 3, 4, 5, 6 and 7 post-vaccination. All samples were tested for CPV-2 using the SNAP Parvovirus Antigen Test Kit. No cross-reactivity was detected.

IDEXX Technical Support

USA/Canada: 1 800 248 2483 • idexx.com

Australia: 1300 44 33 99 • idexx.com.au

Europe: idexx.eu

References

DeCaro, N. et al. "Maternally-derived antibodies in pups and protection from canine parvovirus infection." *Biologicals*. 2005; (33): 261-267.

U.S. Vet. License No. 313

Product Code 5024.03

*SNAP is a trademark or registered trademark of IDEXX Laboratories, Inc. or its affiliates in the United States and/or other countries.

Patent information: idexx.com/patents.

© 2018 IDEXX Laboratories, Inc. All rights reserved.

IDEXX, One IDEXX Drive, Westbrook, Maine 04092 USA

idexx.com

06-03913-16

CPN: 1116047.13

Anigen Rapid CPV Ag Test Kit de BioNote Inc.2

■ Principio

El kit de prueba rápido Anigen para CPV Ag es un inmunoensayo cromatográfico para la detección cualitativa de antígeno de Parvovirus canino en heces caninas. El kit de prueba rápido Anigen para CPV Ag es presenta la palabra "T" y "C" como línea del test y línea de control, en la superficie del dispositivo. Ambas, la línea de prueba y la línea de control no son visibles en la ventana de resultados antes de aplicar las muestras. La línea de control es utilizada para procedimientos de control. En la ventana de resultados aparecerá una línea de color purpura si existe suficiente antígeno Parvovirus en la muestra La línea de control debe aparecer siempre si el procedimiento es realizado apropiadamente y los reactivos de la prueba la prueba es realizada correctamente y los reactivos del control de la prueba están funcionando bien. En la ventana de resultados aparecerá una línea de la prueba de color purpura si existe suficiente antígeno de Parvovirus en la muestra. En la banda de la prueba, se utilizan anticuerpos de Parvovirus Canino especialmente seleccionados como materiales de captura y como material de detección. Ello permite al kit de test rápido Anigen Rapid CPV Ag identificar antígenos de Parvovirus canina en heces caninas con un alto grado de exactitud.

■ Materiales provistos (10 tests/kit)

- 1) Diez (10) kit de test rápido Anigen CPV Ag
- 2) Diez (10) tubos para muestras que contienen buffer diluyente de la prueba
- 3) Diez (10) hisopos de recolección de muestra
- 4) Diez (10) goteros desechables
- 5) Una (1) hoja de instrucciones de uso

■ Precauciones

- 1) Exclusivo para uso de diagnóstico veterinario.
- 2) Para mejores resultados, se requiere seguir estrictamente las instrucciones
- 3) Todas las muestras deben manipularse como material potencialmente infeccioso
- 4) No abra ni extraiga el kit de test de sus bolsas individuales selladas herméticamente hasta inmediatamente antes de usarlas.
- 5) No use el kit si la bolsa está dañada o el sello hermético está roto.
- 6) No reutilice el kit.
- 7) Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de efectuar la prueba.
- 8) No usar los reactivos después de la fecha de vencimiento descrita en la etiqueta.
- 9) Los componentes en este kit han sido sometidos a prueba de control de calidad como unidad de lote estándar.
- 10) No mezcle componentes de 3 diferentes números de lote.

■ Almacenamiento y Estabilidad

El kit puede almacenarse a temperatura ambiente (2-30° C) o refrigerado. El kit es estable hasta la fecha de vencimiento que aparece marcada en la etiqueta del empaque. NO CONGELE EL KIT. No se debe almacenar bajo la luz solar directa.

■ Recolección y Preparación de muestras

- 1) Para este test, deben usarse muestra de heces caninas.
- 2) Las muestras deben ser evaluadas inmediatamente como sean tomadas.

■ Procedimiento del test

- 1) Recolecte las muestras de heces caninas usando un hisopo.
- 2) Inserte el hisopo en el tubo para muestras que contiene 1 mL de diluyente de la prueba.
- 3) Mezcle la muestra del hisopo con el diluyente de la prueba en el pozo de extracción.
- 4) Remueva el dispositivo de prueba de las bolsas de papel aluminio y colóquelo en una superficie plana y seca.
- 5) Usando el gotero desechable provisto, recoja las muestras del tubo de muestra donde se extrajeron y se mezclaron.
- 6) Agregue cuatro (4) gotas en el orificio de la muestra usando el gotero desechable. El diluyente mezclado de la prueba debe agregarse con exactitud, de manera suave, gota a gota.

² Información obtenida del folleto incluida en el "Anigen Rapid CPV Ag Test Kit"

7) Al inicio de la prueba, se apreciará un color púrpura que se desplaza por la ventana de resultados en el centro del dispositivo de la prueba. Si la migración no aparece después de 1 minuto, agregue una gota más del diluyente mezclado de la prueba en el pozo de muestra.

8) Para mejores resultados. Realice el test en 5 muestras de heces diarreicas en el criadero.

9) Interprete los resultados del test en 5 ~ 10 minutos. No los interprete después de 20 minutos.

■ Interpretación del test

En la sección izquierda de la ventana de resultados aparecerá una banda de color para indicar que el test está funcionando correctamente; es la banda de control. La sección derecha de la ventana de resultados indica los resultados del test. Si aparece una banda de color diferente en la sección derecha de la ventana de resultados, es la banda del test.

1) Resultado Negativo La presencia de solo una banda en la ventana de resultados indica un resultado negativo.

2) Resultado Positivo La presencia de dos bandas de color ("T" y "C") en la ventana de resultados, sin importar cual aparezca primero, indica un resultado positivo.

3) Resultado Inválido Si la banda púrpura no aparece en la ventana de resultados después de haber realizado el test, el resultado es considerado inválido.

Es posible que no se hayan seguido las instrucciones correctamente o el test pudo haberse deteriorado. Se recomienda volver a realizar el test para dicha muestra.

■ Limitaciones del test

Aunque el test rápido Anigen para CPV Ag es muy seguro, puede ocurrir una baja incidencia de resultados falsos. Si se obtienen resultados cuestionables, se deben realizar otras pruebas clínicamente disponibles. Como sucede con todos los test diagnósticos, un diagnóstico clínico definitivo no debe basarse en los resultados de un solo test, sino que debe decidirlo un veterinario después de haber evaluado todos los hallazgos clínicos y de laboratorio. El límite de detección de este test es aproximadamente $10^{4.0}$ TCID₅₀/0.1ml.

Doc. No. : I1101-3E

Uranotest Parvo-corona (UranoVet) y comercializada en México por Norvet 3

Purpose:

Simultaneous detection of the parvovirus (CPV) and canine coronavirus (CCV) antigen

Sample: Faeces

Technical basis

The URANOTEST PARVO-CORONA diagnostic kit is based on the immunochromatographic technique and is designed for the qualitative detection of Canine Parvovirus (CPV) and Canine Coronavirus (CCV) in faeces. The test has a double structure; it contains two single tests: a strip for CPV antigen detection and a strip for CCV antigen detection. Each test consists of several overlapped membranes. On one of the membranes, there are a test line (T line) and control line (C line). The lines are not visible before applying the sample. After applying the sample in the appropriate sample well, migration begins by capillarity action through the membrane. If the result is negative, one purple colour band appears in the C area. This line, called control line, always appears, as it is a control line indicating that the test has successfully performed. If the test result is positive, in addition to the control line, a second line will form in the test area (Test line).

Materials supplied

- 1 - Double test devices individually packaged in aluminium pouch.
- 2 - Tubes with buffer solution for sample dilution.
- 3 - Swabs for sample collection.
- 4 - Disposable pipettes.
- 5 - Instructions for use.

Precautions

- 1 - For veterinary use only.
- 2 - Wear disposable gloves when handling the samples. All samples should be treated as potentially infectious. Wash and disinfect hands after handling. Avoid aerosol formation when dispensing the sample.
- 3 - To obtain good results, it is important to add the correct sample volume.
- 4 - Open the device just before use.
- 5 - All reagents must be at room temperature before performing the test.
- 6 - Do not use the test if the envelope is damaged or broken.
- 7 - Do not re-use.
- 8 - Do not use reagents after the expiry date.
- 9 - The quality of each component of the kit has been individually assessed for each batch. Do not mix components or reagents from kits with different batch numbers.

Preservation and stability

The kit must be stored at a temperature between 2 and 30°C. Under these conditions, we can guarantee the stability until the expiry date printed on the box and on the individual pouch.

The kit has been developed to be stored at room temperature. Although it also can be stored in the refrigerator, we recommend store it at room temperature to avoid the need to wait for reagents to reach the room temperature. DO NOT FREEZE. Do not exposure to direct sunlight.

Taking samples

The sample may be collected directly from the rectus using the provided swab. The sufficient amount of sample to carry out properly the test is shown in the picture. Introduce the swab into the tube containing the diluent and press it against the tube walls in order to release the sample that could contain the virus. Shake the tube in order to ensure a good homogenisation.

Interpreting results

- 1 - Negative result There is one single line (control line) in the C-zone in the result window, both in the Parvovirus determination zone and in the Coronavirus determination zone.

³ Información obtenida del folleto incluida en el “Uranotest Parvo-corona (UranoVet) y comercializada en México por Norvet”

2 - Positive result for Parvovirus and Coronavirus simultaneously Two lines appear on both result windows. The test is positive to Parvovirus when two lines appear on the result window (T and C line) of the test device. In the same way, the test is positive to Coronavirus when two lines appear on the result window of the test device. Whichever line appears first, the result is considered positive.

3 - Positive result for Parvovirus Two lines appear on the result window of the Parvovirus test device (T and C lines), but only a single line appear on the result window of Coronavirus test device (C line).

4 - Positive result for Coronavirus Two lines appear on the result window of the Coronavirus test device (T and C lines), but only a single line appear on the result window of Parvovirus test device (C line).

5 - Invalid result The test is invalid if not coloured line appears at the Control area (C) even if a coloured line appears in the Test area (T). The reason may be due to incorrect handling or using a damaged test.

Limitations of the technique

Even though the URANOTEST Parvo-Corona diagnostic kit shows high sensitivity and specificity, cannot be excluded a low incidence of false positive or negative results. As any other laboratory procedure, the definitive clinical diagnosis cannot be based only on the test result. It must be based on an ensemble of clinical and laboratory procedures. If there is any doubt, repeat the test and/or contrast with other diagnostic methods.

Sensitivity: Parvovirus 100% versus hemagglutination. Coronavirus 94 % versus RT-PCR.

Specificity: Parvovirus 99% versus hemagglutination. Coronavirus 97 % versus RT-PCR.

Reading time: 5 - 10 minutes.

Presentation: Individual boxes with 1 test/ 5-test boxes.

Features: Early detection of virus in faeces, even before the appearance of symptomatology. Detects the new CPV2c strain. Does not detect antigens of vaccination origin.

No crossed reactions with distemper virus, infectious hepatitis, parainfluenza and intestinal parasites.

High sensitivity: detection limits at $10^{3.0}$ TCID₅₀ /ml of parvovirus antigen and $10^{3.0}$ TCID₅₀ /ml of coronavirus antigen.

Last revision: August 2016

TXT-4010EN-02

Rapid Canine Parvovirus Ag CPV Test de marca ApetCare TM4

Detalles rápidos

Lugar del origen: Hubei, China
Marca: APETCARE
Número de Modelo: CPV-AG001
Propiedades: Diagnóstico e inyección
Nombre del producto: El parvovirus ag prueba
El uso de: Detección de
Característica: Dispositivo Animal
De almacenamiento de: 4-30
Especimen: Las heces

Prueba:

El kit es un inmunoensayo cromatográfico de fase sólida con método sándwich directo. Un anticuerpo monoclonal es para captura.

KIT de Composición:

1. 10 bolsas cada una que contiene un paso + cassette CPV Ag con ventosa y desecante
2. 10 tubos con tampón de extracción de muestra
3. 10 bastoncillos de un solo paquete
4. Una Instrucción para usar.

Almacenamiento y vida útil:

Almacenado a temperatura ambiente (2-30 °C). No congelar La vida útil es de 2 años. No guardes bajo la luz solar directa.

Procedimiento de ensayo:

1. Recoger heces del suelo con hisopo o simplemente sacar heces directamente del recto.
2. inserta el hisopo en el tubo diluido y agita lo suficiente.
3. coloca el casete de prueba en un escritorio o en el suelo y deja caer 3 gotas del espécimen diluido en la ventana de prueba "S". La solución púrpura fluirá lateralmente al lado contrario.
4. lee el resultado de la prueba después de unos 5-10 minutos. El resultado no es válido si se lee después de 10 minutos.

Interpretación de los resultados:

La presencia de una sola banda dentro de la ventana de resultados indica un resultado negativo. La presencia de dos bandas de color ("T" y "C") dentro de la ventana de resultados, no importa qué banda aparezca primero indica un resultado positivo. Si la banda de control no es visible dentro de la ventana de resultado, el resultado se considera no válido.

Nota especial:

1. dirígete al distribuidor para cambiar si el kit está fuera de la vida útil o está roto.
2. Este kit es para uso de pantalla rápida en el sitio, el resultado es solo para referencia, no para diagnóstico.

⁴ Información obtenida del folleto incluida en el "Rapid Canine Parvovirus Ag CPV Test de marca ApetCare™"

MX-TAM7 KY818894.1.seq	-----TGSGNGSGGGGGGGSGGVGISTGTFFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYR	178
MX-YUC1 KY818895.1 .seq	-----TGSGNGSGGGGGGGSGGVGISTGTFFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYR	178
MX-TAM1 KY818890.1.seq	-----TGSGNGSGGGGGGGSGGVGISTGTFFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYR	178
MX SON 1 KY818889.1.seq	-----TGSGNGSGGGGGGGSGGVGISTGTFFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYR	178
MX-QR6 OKY818887.1.seq	-----TGSGNGSGGGGGGGSGGVGISTGTFFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYR	178
MX-PUE1KY818884.1.seq	-----TGSGNGSGGGGGGGSGGVGISTGTFFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYR	178
MX-NAY8 KY818883.1.seq	-----TGSGNGSGGGGGGGSGGVGISTGTFFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYR	178
MX-NAY4 KY818880.1.seq	-----TGSGNGSGGGGGGGSGGVGISTGTFFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYR	178
MX-MOR6 KY818878.1.seq	-----TGSGNGSGGGGGGGSGGVGISTGTFFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYR	178
MX-MOR2 KY818874.1.seq	-----TGSGNGSGGGGGGGSGGVGISTGTFFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYR	178
MX-MICH3 KY818871.1.seq	-----TGSGNGSGGGGGGGSGGVGISTGTFFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYR	178
MX-HGO6 KY818865.1.seq	-----TGSGNGSGGGGGGGSGGVGISTGTFFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYR	178
MX-GTO3 KY818861.1.seq	-----TGSGNGSGGGGGGGSGGVGISTGTFFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYR	178
MX-MEX82 KY818857.1.seq	-----TGSGNGSGGGGGGGSGGVGISTGTFFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYR	178
MX-BCN9 KY818853.1.seq	-----TGSGNGSGGGGGGGSGGVGISTGTFFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYR	178
MX-BCN2 KY818850.1 .seq	-----TGSGNGSGGGGGGGSGGVGISTGTFFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYR	178
MX-AGC4 KY818849.1.seq	-----TGSGNGSGGGGGGGSGGVGISTGTFFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYR	178
59.seq	MSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGGGGGGSGGVGISTGTFFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYR	238
118.seq	MSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGGGGGGSGGVGISTGTFFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYR	238
MX-DCR6.seq	MSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGGGGGGSGGVGISTGTFFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYR	238
MX-DCR3.seq	MSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGGGGGGSGGVGISTGTFFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYR	238
MX-DCR4.seq	MSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGGGGGGSGGVGISTGTFFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYR	238
MX DCR56 MH480648.1 .seq	MSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGGGGGGSGGVGISTGTFFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYR	238
MX-DCR41 MH480647.1.seq	MSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGGGGGGSGGVGISTGTFFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYR	238
MX-DCR22 MH480646.1.seq	MSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGGGGGGSGGVGISTGTFFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYR	238

Majority

RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWLSVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 90 100 110 120 130 140 150 160
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

FPV KC473946.seq	RVVVNNMDKTAVKGNMALDDTHVQIVTPWLSVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478
FPV-1 JX048608.1.seq	RVVVNNMDKTAVKGNMALDDTHVQIVTPWLSVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478
FJ222824-CPV2-388-05-3.seq	RVVVNNMDKTAVNGNMALDDIHAQIVTPWLSVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478
EU914139_vaccine_Pfizer.seq	RVVVNNMDKTAVNGNMALDDIHAQIVTPWLSVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478
JN625220_vac2.seq	RVVVNNMDKTAVNGNMALDDIHAQIVTPWLSVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478
JN625221_vac3.seq	RVVVNNMDKTAVNGNMALDDIHAQIVTPWLSVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478
JN625222_vac4.seq	RVVVNNMDKTAVNGNMALDDIHAQIVTPWLSVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478
JN625223_vac5.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWLSVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478
JN625224_vac6.seq	RVVVNNMDKTAVNGNMALDDIHAQIVTPWLSVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478

FJ011097_merial_vaccine.seq	RVVVNNMDKTAVNGNMALDDDIHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478
vaccine-vbc.seq	RVVVNNMDKTAVNGNMALDDDIHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478
vaccine-nbvc.seq	RVVVNNMDKTAVNGNMALDDDIHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478
AB128923-CPV2a-shonna.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478
FJ005259-CPV2a-100-08.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478
FJ005252-CPV2a-96-08.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478
CPV2a_recuy364.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478
CPV2a_uy245.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478
FJ005261-CPV2b-G162-97.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478
FJ005260-CPV2b-G82-97.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478
FJ222822-CPV2b-SAH.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478
FJ222823-CPV2b-29-97.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478
FJ005236-CPV2c-1100727.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478
MX-DCR1.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478
MX-DCR2.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	480
FJ005196-CPV2c-G797.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478
FJ005249-CPV2c-219-085.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478
FJ005247-CP2c-195-08.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478
FJ005246-CPV2c-128-08.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478
FJ222821-CPV2c-56.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478
MX-DCR7.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478
MX-TAM7 KY818894.1.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	418
MX-YUC1 KY818895.1 .seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	418
MX-TAM1 KY818890.1.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	418
MX SON 1 KY818889.1.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	418
MX-QR6 OKY818887.1.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	418
MX-PUE1KY818884.1.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	418
MX-NAY8 KY818883.1.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	418
MX-NAY4 KY818880.1.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	418
MX-MOR6 KY818878.1.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	418
MX-MOR2 KY818874.1.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	418
MX-MICH3 KY818871.1.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	418
MX-HGO6 KY818865.1.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	418
MX-GTO3 KY818861.1.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	418
MX-MEX82 KY818857.1.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	418
MX-BCN9 KY818853.1.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	418
MX-BCN2 KY818850.1 .seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	418
MX-AGC4 KY818849.1.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	418
59.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478
118.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESTQP	478

MX-DCR6.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLISFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478
MX-DCR3.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478
MX-DCR4.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478
MX-DCR56 MH480648.1.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQQIFNGVLKTVSESATQP	478
MX-DCR41 MH480647.1.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQQIFNVVLKTVSESATQP	478
MX-DCR22 MH480646.1.seq	RVVVNNLDKTAVNGNMALDDTHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQP	478

Majority

PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTDPPD
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 170 180 190 200 210 220 230 240
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

FPV KC473946.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIVYHGTDPPD	718
FPV-1 JX048608.1.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIVYHGTDPPD	718
FJ222824-CPV2-388-05-3.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLVPSHTGTSGTPTNIYHGTDPPD	718
EU914139_vaccine_Pfizer.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLKPSHTGTSGTPTNIYHGTDPPD	718
JN625220_vac2.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTDPPD	718
JN625221_vac3.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTDPPD	718
JN625222_vac4.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLVPSHTGTSGTPTNIYHGTDPPD	718
JN625223_vac5.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTDPPD	718
JN625224_vac6.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTDPPD	718
FJ011097_merial_vaccine.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTDPPD	718
vaccine-vbc.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTDPPD	718
vaccine-nbvc.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLVPSHTGTSGTPTNIYHGTDPPD	718
AB128923-CPV2a-shonna.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTDPPD	718
FJ005259-CPV2a-100-08.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTDPPD	718
FJ005252-CPV2a-96-08.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTDPPD	718
CPV2a_recuy364.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTDPPD	718
CPV2a_uy245.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTDPPD	718
FJ005261-CPV2b-G162-97.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTDPPD	718
FJ005260-CPV2b-G82-97.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTDPPD	718
FJ222822-CPV2b-SAH.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTDPPD	718
FJ222823-CPV2b-29-97.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTDPPD	718
FJ005236-CPV2c-1100727.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTDPPD	718
MX-DCR1.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTDPPD	718
MX-DCR2.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTDPPD	720
FJ005196_CPV2c-G797.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTDPPD	718
FJ005249-CPV2c-219-085.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTDPPD	718
FJ005247-CP2c-195-08.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTDPPD	718
FJ005246-CPV2c-128-08.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTDPPD	718
FJ222821-CPV2c-56.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTDPPD	718

MX-DCR7.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTGTSPTPTNIYHGTDPPD	718
MX-TAM7 KY818894.1.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTGTSPTPTNIYHGTDPPD	658
MX-YUC1 KY818895.1 .seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTGTSPTPTNIYHGTDPPD	658
MX-TAM1 KY818890.1.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTGTSPTPTNIYHGTDPPD	658
MX SON 1 KY818889.1.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTGTSPTPTNIYHGTDPPD	658
MX-QR6 OKY818887.1.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTGTSPTPTNIYHGTDPPD	658
MX-PUE1KY818884.1.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTGTSPTPTNIYHGTDPPD	658
MX-NAY8 KY818883.1.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTGTSPTPTNIYHGTDPPD	658
MX-NAY4 KY818880.1.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTGTSPTPTNIYHGTDPPD	658
MX-MOR6 KY818878.1.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTGTSPTPTNIYHGTDPPD	658
MX-MOR2 KY818874.1.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTGTSPTPTNIYHGTDPPD	658
MX-MICH3 KY818871.1.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTGTSPTPTNIYHGTDPPD	658
MX-HG06 KY818865.1.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTGTSPTPTNIYHGTDPPD	658
MX-GTO3 KY818861.1.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTGTSPTPTNIYHGTDPPD	658
MX-MEX82 KY818857.1.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTGTSPTPTNIYHGTDPPD	658
MX-BCN9 KY818853.1.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTGTSPTPTNIYHGTDPPD	658
MX-BCN2 KY818850.1 .seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTGTSPTPTNIYHGTDPPD	658
MX-AGC4 KY818849.1.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTGTSPTPTNIYHGTDPPD	658
59.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTGTSPTPTNIYHGTDPPD	718
118.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTGTSPTPTNIYHGTDPPD	718
MX-DCR6.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTGTSPTPTNIYHGTDPPD	718
MX-DCR3.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTGTSPTPTNIYHGTDPPD	718
MX-DCR4.seq	PTKVYNNDLTASLMVALHSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTGTSPTPTNIYHGTDPPD	718
MX DCR56 MH480648.1 .seq	PTKVYNNDLTASLMVALHRNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTGTSPTPTNIYHGTDPPD	718
MX-DCR41 MH480647.1.seq	PTKVYNNDLTASLMVALHRNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTGTSPTPTNIYHGTDPPD	718
MX-DCR22 MH480646.1.seq	PTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFPAAMRSETLGFYPWKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTGTSPTPTNIYHGTDPPD	718

Majority

VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCRLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 250 260 270 280 290 300 310 320
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

FPV KC473946.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCRLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEGATNFGDIGVQQDKRRGVTQMG	958
FPV-1 JX048608.1.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCRLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEGATNFGDIGVQQDKRRGVTQMG	958
FJ222824-CPV2-388-05-3.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCRLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEGATNFGDIGVQQDKRRGVTQMG	958
EU914139_vaccine_Pfizer.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDVKPCRLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEGATNFGDIGVQQDKRRGVTQMG	958
JN625220_vac2.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCRCPRLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEGATNFGDIGVQQDKRRGITQMG	958
JN625221_vac3.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCRLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEGATNFGDIGVQQDKRRGVTQMG	958
JN625222_vac4.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCRLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEGATNFGDIGVQQDKRRGVTQMG	958
JN625223_vac5.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCRLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	958
JN625224_vac6.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCRCPRLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEGATNFGDIGVQQDKRRGITQMG	958

FJ011097_merial_vaccine.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEGATNFGDIGVQQDKRRGITQMG	958
vaccine-vbc.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEGATNFGDIGVQQDKRRGITQMG	958
vaccine-nbvc.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEGATNFGDIGVQQDKRRGITQMG	958
AB128923-CPV2a-shonna.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	958
FJ005259-CPV2a-100-08.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	958
FJ005252-CPV2a-96-08.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	958
CPV2a_recuy364.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	958
CPV2a_uy245.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	958
FJ005261-CPV2b-G162-97.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	958
FJ005260-CPV2b-G82-97.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	958
FJ222822-CPV2b-SAH.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	958
FJ222823-CPV2b-29-97.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	958
FJ005236-CPV2c-1100727.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	958
MX-DCR1.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	958
MX-DCR2.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	960
FJ005196-CPV2c-G797.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	958
FJ005249-CPV2c-219-085.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	958
FJ005247-CP2c-195-08.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	958
FJ005246-CPV2c-128-08.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	958
FJ222821-CPV2c-56.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	958
MX-DCR7.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	958
MX-TAM7 KY818894.1.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	898
MX-YUC1 KY818895.1 .seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	898
MX-TAM1 KY818890.1.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	898
MX SON 1 KY818889.1.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	898
MX-QR6 OKY818887.1.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	898
MX-PUE1KY818884.1.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	898
MX-NAY8 KY818883.1.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	898
MX-NAY4 KY818880.1.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	898
MX-MOR6 KY818878.1.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	898
MX-MOR2 KY818874.1.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	898
MX-MICH3 KY818871.1.seq	VQFYTFENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	898
MX-HGO6 KY818865.1.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	898
MX-GTO3 KY818861.1.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	898
MX-MEX82 KY818857.1.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	898
MX-BCN9 KY818853.1.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	898
MX-BCN2 KY818850.1 .seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	898
MX-AGC4 KY818849.1.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	898
59.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	958
118.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTTTTFDCRPCRLLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	958

MX-DCR6.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	958
MX-DCR3.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	958
MX-DCR4.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	958
MX DCR56 MH480648.1 .seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	958
MX-DCR41 MH480647.1.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	958
MX-DCR22 MH480646.1.seq	VQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQAEAGGTNFGYIGVQQDKRRGVTQMG	958

Majority

NTNYITEATIMRPAEVGYSAPYYSEASTQGPFKTPIAAGRGAQTDENQAADGDPYAFGRQHGQKTTTTGETPERFITY
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 330 340 350 360 370 380 390 400
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

FPV KC473946.seq	NTDYITEATIMRPAEVGYSAPYYSEASTRGPFKTPIAAGRGAQTDENQAADGDPYAFGRQHGQKTTTTGETPERFITY	1198
FPV-1 JX048608.1.seq	NTDYITEATIMRPAEVGYSAPYYSEASTQGPFKTPIAAGRGAQTDENQAADGDPYAFGRQHGQKTTTTGETPERFITY	1198
FJ222824-CPV2-388-05-3.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSAPYYSEASTQGPFKTPIAAGRGAQTDENQAADGNPRYAFGRQHGKTTTTGETPERFITY	1198
EU914139_vaccine_Pfizer.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSAPYYSEASTQGPFKTPIAAGRGAQTDENQAADGDPYAFGRQHGKTTTTGETPERFITY	1198
JN625220_vac2.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSAPYYSEASTQGPFKTPIAAGRGAQTDENQAADGNPRYAFGRQHGQKTTTTGETPERFITY	1198
JN625221_vac3.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSAPYYSEASTQGPFKTPIAAGRGAQTDENQAADGNPRYAFGRQHGQKTTTTGETPERFITY	1198
JN625222_vac4.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSAPYYSEASTQGPFKTPIAAGRGAQTDENQAADGNPRYAFGRQHGKTTTTGETPERFITY	1198
JN625223_vac5.seq	KTNYITEATIMRPAEVGYSAPYYSEASTQGPFKTPIAAGRGAQTDENQAADGDPYAFGRQHGQKTTTTGETPERFITY	1198
JN625224_vac6.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSAPYYSEASTQGPFKTPIAAGRGAQTDENQAADGNPRYAFGRQHGQKTTTTGETPERFITY	1198
FJ011097_merial_vaccine.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSAPYYSEASTQGPFKTPIAAGRGAQTDENQAADGNPRYAFGRQHGQKTTTTGETPERFITY	1198
vaccine-vbc.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSAPYYSEASTQGPFKTPIAAGRGAQTDENQAADGNPRYAFGRQHGQKTTTTGETPERFITY	1198
vaccine-nbvc.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSAPYYSEASTQGPFKTPIAAGRGAQTDENQAADGNPRYAFGRQHGKTTTTGETPERFITY	1198
AB128923-CPV2a-shonna.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSAPYYSEASTQGPFKTPIAAGRGAQTDENQAADGDPYAFGRQHGQKTTTTGETPERFITY	1198
FJ005259-CPV2a-100-08.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSAPYYSEASTQGPFKTPIAAGRGAQTDENQAADGDPYAFGRQHGQKTTTTGETPERFITY	1198
FJ005252-CPV2a-96-08.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSAPYYSEASTQGPFKTPIAAGRGAQTDENQAADGDPYAFGRQHGQKTTTTGETPERFITY	1198
CPV2a_recuy364.seq	NTNIITEATIMRPAEVGYSAPYYSEASTQGPFKTPIAAGRGAQTDENQAADGDPYAFGRQHGQKTTTTGETPERFITY	1198
CPV2a_uy245.seq	NTNIITEATIMRPAEVGYSAPYYSEASTQGPFKTPIAAGRGAQTDENQAADGDPYAFGRQHGQKTTTTGETPERFITY	1198
FJ005261-CPV2b-G162-97.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSAPYYSEASTQGPFKTPIAAGRGAQTDENQAADGDPYAFGRQHGQKTTTTGETPERFITY	1198
FJ005260-CPV2b-G82-97.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSAPYYSEASTQGPFKTPIAAGRGAQTDENQAADGDPYAFGRQHGQKTTTTGETPERFITY	1198
FJ222822-CPV2b-SAH.seq	KTNYITEATIMRPAEVGYSAPYYSEASTQGPFKTPIAAGRGAQTDENQAADGDPYAFGRQHGQKTTTTGETPERFITY	1198
FJ222823-CPV2b-29-97.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSAPYYSEASTQGPFKTPIAAGRGAQTDENQAADGDPYAFGRQHGQKTTTTGETPERFITY	1198
FJ005236-CPV2c-1100727.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSAPYYSEASTQGPFKTPIAAGRGAQTDENQAADGDPYAFGRQHGQKTTTTGETPERFITY	1198
MX-DCR1.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSAPYYSEASTQGPFKTPIAAGRGAQTDENQAADGDPYAFGRQHGQKTTTTGETPERFITY	1198
MX-DCR2.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSAPYYSEASTQGPFKTPIAAGRGAQTDENQAADGDPYAFGRQHGQKTTTTGETPERFITY	1200
FJ005196_CPV2c-G797.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSAPYYSEASTQGPFKTPIAAGRGAQTDENQAADGDPYAFGRQHGQKTTTTGETPERFITY	1198
FJ005249-CPV2c-219-085.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSAPYYSEASTQGPFKTPIAAGRGAQTDENQAADGDPYAFGRQHGQKTTTTGETPERFITY	1198
FJ005247-CP2c-195-08.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSAPYYSEASTQGPFKTPIAAGRGAQTDENQAADGDPYAFGRQHGQKTTTTGETPERFITY	1198
FJ005246-CPV2c-128-08.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSAPYYSEASTQGPFKTPIAAGRGAQTDENQAADGDPYAFGRQHGQKTTTTGETPERFITY	1198
FJ222821-CPV2c-56.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSAPYYSEASTQGPFKTPIAAGRGAQTDENQAADGDPYAFGRQHGQKTTTTGETPERFITY	1198

MX-DCR7.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSSAPYYSEFASTQGGPFKTPIAAGRGGQTDENQAADGDPRYAFGRQHGQKTTTTGETPERFTY	1198
MX-TAM7 KY818894.1.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSSAPYYSEFASTQGGPFKTPIAAGRGGQTDENQAADGDPRYAFGRQHGQKTTTTGETPERFTY	1138
MX-YUC1 KY818895.1 .seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSSAPYYSEFASTQGGPFKTPIAAGRGGQTDENQAADGDPRYAFGRQHGQKTTTTGETPERFTY	1138
MX-TAM1 KY818890.1.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSSAPYYSEFASTQGGPFKTPIAAGRGGQTDENQAADGDPRYAFGRQHGQKTTTTGETPERFTY	1138
MX SON 1 KY818889.1.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSSAPYYSEFASTQGGPFKTPIAAGRGGQTDENQAADGDPRYAFGRQHGQKTTTTGETPERFTY	1138
MX-QR6 OKY818887.1.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSSAPYYSEFASTQGGPFKTPIAAGRGGQTDENQAADGDPRYAFGRQHGQKTTTTGETPERFTY	1138
MX-PUE1KY818884.1.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSSAPYYSEFASTQGGPFKTPIAAGRGGQTDENQAADGDPRYAFGRQHGQKTTTTGETPERFTY	1138
MX-NAY8 KY818883.1.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSSAPYYSEFASTQGGPFKTPIAAGRGGQTDENQAADGDPRYAFGRQHGQKTTTTGETPERFTY	1138
MX-NAY4 KY818880.1.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSSAPYYSEFASTQGGPFKTPIAAGRGGQTDENQAADGDPRYAFGRQHGQKTTTTGETPERFTY	1138
MX-MOR6 KY818878.1.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSSAPYYSEFASTQGGPFKTPIAAGRGGQTDENQAADGDPRYAFGRQHGQKTTTTGETPERFTY	1138
MX-MOR2 KY818874.1.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSSAPYYSEFASTQGGPFKTPIAAGRGGQTDENQAADGDPRYAFGRQHGQKTTTTGETPERFTY	1138
MX-MICH3 KY818871.1.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSSAPYYSEFASTQGGPFKTPIAAGRGGQTDENQAADGDPRYAFGRQHGQKTTTTGETPERFTY	1138
MX-HG06 KY818865.1.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSSAPYYSEFASTQGGPFKTPIAAGRGGQTDENQAADGDPRYAFGRQHGQKTTTTGETPERFTY	1138
MX-GTO3 KY818861.1.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSSAPYYSEFASTQGGPFKTPIAAGRGGQTDENQAADGDPRYAFGRQHGQKTTTTGETPERFTY	1138
MX-MEX82 KY818857.1.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSSAPYYSEFASTQGGPFKTPIAAGRGGQTDENQAADGDPRYAFGRQHGQKTTTTGETPERFTY	1138
MX-BCN9 KY818853.1.seq	NSNYITEATIMRPAEVGYSSAPYYSEFASTQGGPFKTPIAAGRGGQTDENQAADGDPRYAFGRQHGQKTTTTGETPERFTY	1138
MX-BCN2 KY818850.1 .seq	NSNYITEATIMRPAEVGYSSAPYYSEFASTQGGPFKTPIAAGRGGQTDENQAADGDPRYAFGRQHGQKTTTTGETPERFTY	1138
MX-AGC4 KY818849.1.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSSAPYYSEFASTQGGPFKTPIAAGRGGQTDENQAADGDPRYAFGRQHGQKTTTTGETPERFTY	1138
59.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSSAPYYSEFASTQGGPFKTPIAAGRGGQTDENQAADGDPRYAFGRQHGQKTTTTGETPERFTY	1198
118.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSSAPYYSEFASTQGGPFKTPIAAGRGGQTDENQAADGDPRYAFGRQHGQKTTTTGETPERFTY	1198
MX-DCR6.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSSAPYYSEFASTQGGPFKTPIAAGRGGQTDENQAADGDPRYAFGRQHGQKTTTTGETPERFTY	1198
MX-DCR3.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSSAPYYSEFASTQGGPFKTPIAAGRGGQTDENQAADGDPRYAFGRQHGQKTTTTGETPERFTY	1198
MX-DCR4.seq	NPNYITEATIMRPAEVGYSSAPYYSEFASTQGGPFKTPIAAGRGGQTDENQAADGDPRYAFGRQHGQKTTTTGETPERFTY	1198
MX DCR56 MH480648.1 .seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSSAPYYSEFASTQGGPFKTPIAAGRGGQTDENQAADGDPRYAFGRQHGQKTTTTGETPERFTY	1198
MX-DCR41 MH480647.1.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSSAPYYSEFASTQGGPFKTPIAAGRGGQTDENQAADGDPRYAFGRQHGQKTTTTGETPERFTY	1198
MX-DCR22 MH480646.1.seq	NTNYITEATIMRPAEVGYSSAPYYSEFASTQGGPFKTPIAAGRGGQTDENQAADGDPRYAFGRQHGQKTTTTGETPERFTY	1198

Majority

IAHQDTGRYPEGDWIQNINFNLPVTEDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 410 420 430 440 450 460 470 480
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

FPV KC473946.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQNINFNLPVTNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
FPV-1 JX048608.1.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQNINFNLPVTNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
FJ222824-CPV2-388-05-3.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQNINFNLPVTNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
EU914139_vaccine_Pfizer.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQNINFNLPVTNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
JN625220_vac2.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQNINFNLPVTNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
JN625221_vac3.seq	IAHQDTGRYPEGDWIKINFNLPVTNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
JN625222_vac4.seq	IAHQDTGRYPEGDWIKINFNLPVTNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
JN625223_vac5.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQNINFNLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
JN625224_vac6.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQNINFNLPVTNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438

FJ011097_merial_vaccine.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
vaccine-vbc.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
vaccine-nbvc.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
AB128923-CPV2a-shonna.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
FJ005259-CPV2a-100-08.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
FJ005252-CPV2a-96-08.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
CPV2a_recuy364.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTNDNVLLPTDPIGGKAGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
CPV2a_uy245.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTNDNVLLPTDPIGGKAGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
FJ005261-CPV2b-G162-97.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
FJ005260-CPV2b-G82-97.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
FJ222822-CPV2b-SAH.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
FJ222823-CPV2b-29-97.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
FJ005236-CPV2c-1100727.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTEDNVLLPTDPIGGKAGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
MX-DCR1.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTEDNVLLPTDPIGGKAGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
MX-DCR2.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTEDNVLLPTDPIGGKAGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1440
FJ005196-CPV2c-G797.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTEDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
FJ005249-CPV2c-219-085.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTEDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
FJ005247-CP2c-195-08.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTEDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
FJ005246-CPV2c-128-08.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTEDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
FJ222821-CPV2c-56.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTEDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
MX-DCR7.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTEDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
MX-TAM7 KY818894.1.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTEDNVLLPTDPIGGKAGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1378
MX-YUC1 KY818895.1 .seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTEDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1378
MX-TAM1 KY818890.1.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTEDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1378
MX SON 1 KY818889.1.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTEDNVLLPTDPIGGKAGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1378
MX-QR6 OKY818887.1.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTEDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1378
MX-PUE1KY818884.1.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTEDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1378
MX-NAY8 KY818883.1.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTEDNVLLPTDPIGGKAGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1378
MX-NAY4 KY818880.1.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTEDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1378
MX-MOR6 KY818878.1.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTEDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1378
MX-MOR2 KY818874.1.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTEDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1378
MX-MICH3 KY818871.1.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTEDNVLLPTDPIGGKAGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1378
MX-HGO6 KY818865.1.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTEDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1378
MX-GTO3 KY818861.1.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTEDNVLLPTDPIGGKAGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1378
MX-MEX82 KY818857.1.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTEDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1378
MX-BCN9 KY818853.1.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1378
MX-BCN2 KY818850.1 .seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTEDNVLLPTDPIGGKAGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1378
MX-AGC4 KY818849.1.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTEDNVLLPTDPIGGKAGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1378
59.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQINISFNLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
118.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTEDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438

MX-DCR6.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTEENVLLPTDPIGGKAGINYTNIFNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
MX-DCR3.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTEENVLLPTDPIGGKAGINYTNIFNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
MX-DCR4.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTEENVLLPTDPIGGKAGINYTNIFNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
MX-DCR56 MH480648.1 .seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTEENVLLPTDPIGGKAGINYTNIFNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
MX-DCR41 MH480647.1.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTEENVLLPTDPIGGKAGINYTNIFNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438
MX-DCR22 MH480646.1.seq	IAHQDTGRYPEGDWIQININFNLPVTEENVLLPTDPIGGKAGINYTNIFNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP	1438

Majority

RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 490 500 510 520 530 540 550 560
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

FPV KC473946.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
FPV-1 JX048608.1.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
FJ222824-CPV2-388-05-3.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
EU914139_vaccine_Pfizer.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
JN625220_vac2.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
JN625221_vac3.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
JN625222_vac4.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
JN625223_vac5.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
JN625224_vac6.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
FJ011097_merial_vaccine.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
vaccine-vbc.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
vaccine-nbvc.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
AB128923-CPV2a-shonna.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
FJ005259-CPV2a-100-08.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
FJ005252-CPV2a-96-08.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
CPV2a_recuy364.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
CPV2a_uy245.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
FJ005261-CPV2b-G162-97.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
FJ005260-CPV2b-G82-97.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
FJ222822-CPV2b-SAH.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
FJ222823-CPV2b-29-97.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
FJ005236-CPV2c-1100727.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
MX-DCR1.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
MX-DCR2.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1680
FJ005196-CPV2c-G797.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
FJ005249-CPV2c-219-085.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
FJ005247-CP2c-195-08.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
FJ005246-CPV2c-128-08.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
FJ222821-CPV2c-56.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678

MX-DCR7.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWWKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
MX-TAM7 KY818894.1.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWWKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1618
MX-YUC1 KY818895.1 .seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWWKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1618
MX-TAM1 KY818890.1.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWWKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1618
MX SON 1 KY818889.1.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWWKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1618
MX-QR6 OKY818887.1.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWWKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1618
MX-PUE1KY818884.1.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWWKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1618
MX-NAY8 KY818883.1.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWWKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1618
MX-NAY4 KY818880.1.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWWKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1618
MX-MOR6 KY818878.1.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWWKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1618
MX-MOR2 KY818874.1.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWWKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1618
MX-MICH3 KY818871.1.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWWKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1618
MX-HG06 KY818865.1.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWWKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1618
MX-GTO3 KY818861.1.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWWKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1618
MX-MEX82 KY818857.1.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWWKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1618
MX-BCN9 KY818853.1.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWWKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1618
MX-BCN2 KY818850.1 .seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWWKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1618
MX-AGC4 KY818849.1.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWWKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1618
59.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWWKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
118.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWWKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
MX-DCR6.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWWKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
MX-DCR3.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWWKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
MX-DCR4.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWWKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
MX DCR56 MH480648.1 .seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWWKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
MX-DCR41 MH480647.1.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWWKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678
MX-DCR22 MH480646.1.seq	RLHVNAPFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWWKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFN	1678

Majority

YVPSNIGG-----
 -----+-----+-----
 570 580
 -----+-----+-----

FPV KC473946.seq	YVPNNIGAMKIVYEKSQLAPRKLY .	1753
FPV-1 JX048608.1.seq	YVPNNIGAMKIVYEKSQLAPRKLY .	1753
FJ222824-CPV2-388-05-3.seq	YVPSNIGG	1702
EU914139_vaccine_Pfizer.seq	YVPSNIGG	1702
JN625220_vac2.seq	YVPSNIGGMKIVFEKSQLAPRKLY .	1753
JN625221_vac3.seq	YVPSNIGGMKIVYEKSQLAPRKLY .	1753
JN625222_vac4.seq	YVPSNIGGMKIVYEKSQLAPRKLY .	1753
JN625223_vac5.seq	YVPSNIGGMEIVYERSQLAPRKLY .	1753
JN625224_vac6.seq	YVPSNIGGMKIVYEKSQLAPRKLY .	1753

FJ011097_merial_vaccine.seq	YVPSNIGG	1702
vaccine-vbc.seq	YVPSNIGG	1702
vaccine-nbvc	YVPSNIGG	1702
AB128923-CPV2a-shonna.seq	YVPSNIGG	1702
FJ005259-CPV2a-100-08.seq	YVPSNIGG	1702
FJ005252-CPV2a-96-08.seq	YVPSNIGG	1702
CPV2a_recuy364.seq	YVPSNIGG	1702
CPV2a_uy245.seq	YVPSNIGG	1702
FJ005261-CPV2b-G162-97.seq	YVPSNIGG	1702
FJ005260-CPV2b-G82-97.seq	YVPSNIGG	1702
FJ222822-CPV2b-SAH.seq	YVPSNIGG	1702
FJ222823-CPV2b-29-97.seq	YVPSNIGG	1702
FJ005236-CPV2c-1100727.seq	YVPSNIGG	1702
MX-DCR1.seq	YVPSNIGG	1702
MX-DCR2.seq	YVPSNIG	1701
FJ005196_CPV2c-G797.seq	YVPSNIGG	1702
FJ005249-CPV2c-219-085.seq	YVPSNIGG	1702
FJ005247-CP2c-195-08.seq	YVPSNIGG	1702
FJ005246-CPV2c-128-08.seq	YVPSNIGG	1702
FJ222821-CPV2c-56.seq	YVPSNIGG	1702
MX-DCR7.seq	YVPSNIGG	1702
MX-TAM7 KY818894.1.seq	YVPSNI	1636
MX-YUC1 KY818895.1 .seq	YVPSNI	1636
MX-TAM1 KY818890.1.seq	YVPSNI	1636
MX SON 1 KY818889.1.seq	YVPSNI	1636
MX-QR6 OKY818887.1.seq	YVPSNI	1636
MX-PUE1KY818884.1.seq	YVPSNI	1636
MX-NAY8 KY818883.1.seq	YVPSNI	1636
MX-NAY4 KY818880.1.seq	YVPSNI	1636
MX-MOR6 KY818878.1.seq	YVPSNI	1636
MX-MOR2 KY818874.1.seq	YVPSNI	1636
MX-MICH3 KY818871.1.seq	YVPSNI	1636
MX-HGO6 KY818865.1.seq	YVPSNI	1636
MX-GTO3 KY818861.1.seq	YVPSNI	1636
MX-MEX82 KY818857.1.seq	YVPSNI	1636
MX-BCN9 KY818853.1.seq	YVPSNI	1636
MX-BCN2 KY818850.1 .seq	YVPSNI	1636
MX-AGC4 KY818849.1.seq	YVPSNI	1636
59.seq	YVPSNIGGMKN	1711
118.seq	YVPSNIGGEKN	1711

MX-DCR6.seq	YVPSNIGG	1702
MX-DCR3.seq	YVPSNIGG	1702
MX-DCR4.seq	YVPSNIGG	1702
MX DCR56 MH480648.1 .seq	YVPSNIGG	1702
MX-DCR41 MH480647.1.seq	YVPSNIGG	1702
MX-DCR22 MH480646.1.seq	YVPSNIGG	1702