

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



UANL

**“CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y ANTIGÉNICA DE VIRUS ADN
PRESENTES EN CANINOS CON SÍNDROME DE DIARREA HEMORRÁGICA
AGUDA (SDHA)”**

Por

ARMANDO BUSQUETA MEDINA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIA ANIMAL**

Abril, 2026



UANL

**“CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y ANTIGÉNICA DE VIRUS ADN
PRESENTES EN CANINOS CON SÍNDROME DE DIARREA HEMORRÁGICA
AGUDA (SDHA)”**

APROBACIÓN DE LA TESIS

**DRA SIBILINA CEDILLO ROSALES
DIRECTOR DE TESIS**

**DR. RAMIRO ÁVALOS RAMÍREZ
CODIRECTOR DE TESIS**

**DRA. DIANA ELISA ZAMORA ÁVILA
CODIRECTOR DE TESIS**

**DR. VICTOR EUSTORGIO AGUIRRE ARZOLA
CODIRECTOR DE TESIS**

**DR. JUAN FRANCISCO CONTRERAS CORDERO
CODIRECTOR DE TESIS**

**DR. UZIEL CASTILLO VELÁZQUEZ
SUBDIRECTOR DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**



UANL

**“CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y ANTIGÉNICA DE VIRUS ADN
PRESENTES EN CANINOS CON SÍNDROME DE DIARREA HEMORRÁGICA
AGUDA (SDHA)”**

Este trabajo se realizó en los Departamentos de Virología y Genética, en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la Dirección de la Dra. Sibilina Cedillo Rosales y la Codirección del Dr. Ramiro Ávalos Ramírez, Dra. Diana Eliza Zamora Ávila, Dr. Víctor Eustorgio Aguirre Arzola y el Dr. Juan Francisco Contreras Cordero.

A handwritten signature in blue ink, enclosed in a thin black rectangular border. The signature is stylized and appears to read "S. Cedillo".

**Dra. Sibilina Cedillo Rosales
DIRECTOR DE TESIS**

A handwritten signature in blue ink, enclosed in a thin black rectangular border. The signature is stylized and appears to read "J.F. Contreras".

**Dr. Juan Francisco Contreras Cordero
CODIRECTOR EXTERNO DE TESIS**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por la oportunidad de realizar este posgrado, así como por el financiamiento otorgado mediante el Programa de PAFI-FMVZ (Programa de Apoyo y Fortalecimiento de la Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia) y el Programa PAICYT (Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica).

Se reconoce con especial consideración el apoyo otorgado por la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) mediante la beca concedida durante la formación de posgrado, la cual facilitó la dedicación exclusiva al desarrollo de la presente investigación.

Agradezco a los Departamentos de Virología y Genética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por brindarme el espacio, las herramientas, los recursos y el entrenamiento necesario para el desarrollo del proyecto de investigación de esta tesis.

Mi más profundo agradecimiento a mi directora de tesis, la Dra. Sibilina Cedillo Rosales, por su orientación, paciencia, apoyo y valiosas aportaciones a lo largo del desarrollo de este trabajo. De igual manera, agradezco a los integrantes del comité de tesis, Dr. Ramiro Ávalos Ramírez, Dra. Diana Elisa Zamora Ávila, Dr. Víctor E. Aguirre Arzola y Dr. Juan Francisco Contreras Cordero por sus comentarios, sugerencias y disposición, los cuales contribuyeron de manera significativa a mejorar la calidad de esta investigación.

Agradezco a las técnicas de laboratorio Leslee Nayelly De la Rosa Camacho y Cynthia Marisol Padrón Carrillo por su apoyo y disposición a lo largo de la realización de los experimentos de este trabajo.

Gracias a todos por su apoyo para la culminación de este trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres, Gloria y Armando, por su amor, apoyo incondicional y por impulsarme siempre a seguir adelante.

A Eduardo y Raúl, por estar conmigo en cada etapa de este camino.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	IV
DEDICATORIA	V
ÍNDICE	VI
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURA	IX
LISTA DE TABLAS	XI
LISTA DE FIGURAS	XII
RESUMEN	XIV
ABSTRACT	XV
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO	3
2.1 PARVOVIRUS CANINO	3
2.1.1 <i>Clasificación taxonómica</i>	3
2.1.2 <i>Morfología del virión</i>	3
2.1.3 <i>Características del genoma</i>	4
2.1.4 <i>Evolución genética de CPV-2</i>	6
2.1.5 <i>Mecanismos de entrada e infección de CPV-2</i>	8
2.1.6 <i>Antigenicidad e inmunización</i>	9
2.1.7 <i>Aislamiento</i>	11
2.2 CIRCOVIRUS CANINO.....	12
2.2.1 <i>Clasificación taxonómica</i>	12
2.2.2 <i>Morfología del virión</i>	12
2.2.3 <i>Características del genoma y proteína que codifica</i>	13
2.2.4 <i>Evolución genética de CCV</i>	15
2.2.5 <i>Mecanismos de entrada e infección de CCV</i>	16
2.2.6 <i>Antigenicidad e inmunización</i>	17
2.2.7 <i>Aislamiento</i>	17
2.3 BOCAVIRUS CANINO.....	18

2.3.1	<i>Clasificación taxonómica</i>	18
2.3.2	<i>Morfología del virión</i>	18
2.3.3	<i>Características del genoma</i>	19
2.3.4	<i>Evolución genética de CBoV</i>	21
2.3.5	<i>Mecanismos de entrada e infección de CBoV</i>	22
2.3.6	<i>Antigenicidad e inmunización</i>	22
2.3.7	<i>Aislamiento</i>	23
3	PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	24
4	HIPÓTESIS	25
5	OBJETIVOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	25
5.1	OBJETIVO GENERAL.....	25
5.1.1	<i>Objetivos específicos</i>	25
6	MATERIALES Y MÉTODOS.	26
6.1	MATERIALES DE LABORATORIO.....	26
6.1.1	<i>Equipos y consumibles</i>	26
6.1.2	<i>Sistemas comerciales, reactivos y soluciones utilizadas</i>	27
6.1.3	<i>Biológicos</i>	29
6.2	METODOLOGÍA	30
6.2.1	<i>Lugar de trabajo</i>	30
6.2.2	<i>Área y tiempo de muestreo</i>	30
6.2.3	<i>Tipo de muestra y preparación inicial de la muestra</i>	30
6.2.4	<i>Metodología para realizar el Objetivo 1</i>	31
6.2.5	<i>Metodología para realizar el Objetivo 2</i>	37
6.2.6	<i>Metodología para realizar el Objetivo 3</i>	40
6.2.7	<i>Metodología para realizar el Objetivo 4</i>	41
6.3	CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD	49
7	RESULTADOS	50
7.1	RESULTADOS DEL OBJETIVO 1	50
7.1.1	<i>Área de muestreo</i>	50
7.1.2	<i>Características de las muestras analizadas</i>	51
7.1.3	<i>Patrones de polimorfismo de CPV detectado por PCR-RFLP</i>	54
7.1.4	<i>Aislamiento viral</i>	56
7.2	RESULTADOS DEL OBJETIVO 2	57

7.2.1	<i>Diseño de oligonucleótidos</i>	57
7.2.2	<i>Amplificación y secuenciación del genoma completo de CPV-2</i>	63
7.2.3	<i>Amplificación y secuenciación del genoma completo de CBoV-1</i>	65
7.2.4	<i>Análisis filogenético de CPV-2</i>	66
7.2.5	<i>Análisis filogenéticos de CBoV-1</i>	68
7.3	RESULTADOS DEL OBJETIVO 3	70
7.3.1	<i>Análisis de las secuencias de aminoácidos de CPV-2</i>	70
7.3.2	<i>Análisis de las secuencias de aminoácidos de CBoV-1</i>	81
7.4	RESULTADOS DEL OBJETIVO 4	85
7.4.1	<i>Titulación de los virus stock</i>	85
7.4.2	<i>Producción de sueros policlonales contra CPV-2</i>	87
7.4.3	<i>Pruebas de seroneutralización</i>	87
8	DISCUSIÓN	90
9	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	112
10	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
11	ANEXOS	126
	ANEXO 1. DICTAMEN APROBADO POR EL COMITÉ DE BIOÉTICA Y BIENESTAR ANIMAL.....	126
	ANEXO 2. DICTAMEN APROBADO POR EL COMITÉ DE BIOSEGURIDAD E HIGIENE.....	127
	ANEXO 3. CUESTIONARIO EPIDEMIOLÓGICO.....	128
	ANEXO 4. DATOS DE LAS MUESTRAS CLÍNICAS.....	130
	ANEXO 5. DATOS DE SECUENCIAS COMPLETAS DE CPV-2 OBTENIDAS DEL GENBANK.....	138
	ANEXO 6. DATOS DE SECUENCIAS PARCIALES DEL GEN VP2 DE CPV-2 OBTENIDAS DEL GENBANK.....	140
	ANEXO 7. DATOS DE SECUENCIAS COMPLETAS DE CBOV OBTENIDAS DEL GENBANK.....	143

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURA

DESCRIPCIÓN	SÍMBOLO O ABREVIATURA
Por ciento (Porcentaje)	%
Grados centígrados	° C
Aminoácido	aa
<i>Deoxyadenosine triphosphate</i> (Trifosfato de desoxiadenosina)	dATP
<i>Deoxycytidine triphosphate</i> (Trifosfato de desoxicitidina)	dCTP
<i>Deoxyguanosine triphosphate</i> (Trifosfato de desoxiguanosina)	dGTP
<i>Deoxynucleotide triphosphate</i> (Desoxirribonucleótido trifosfato)	dNTP
<i>Deoxythymidine triphosphate</i> (Trifosfato de desoxitimidina)	dTTP
Gramos	g
Gravedades o Fuerza	g
Hora	h
Microgramos	µg
Miligramos	mg
Minutos	min
Mililitros	ml
Microlitros	µl
Milimolar	mM
Micromolar	µM
Nanómetros	nm
Pares de bases	pb
Revoluciones por minuto	rpm
Segundos	seg
Alanina	A
<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)	ADN
<i>Bovine Parvovirus</i> (Parvovirus bovino)	BPV
Capsid protein (Proteína de la Cápside)	CAP
<i>Canine Bocavirus</i> (Bocavirus canino)	CBoV
<i>Canine Circovirus</i> (Circovirus canino)	CCV
<i>Canine Minute Virus</i> (Minute virus canino)	CMV
Dióxido de carbono	CO ₂
<i>Cytopathic effect</i> (Efecto citopático)	CPE
<i>Canine Parvovirus</i> (Parvovirus canino)	CPV
Sulfato de condroitina tipo B, Dermatógeno sulfato	CS-B
Domino carboxi-terminal	C-terminal
<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> (Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima)	ELISA
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia	FMVZ
Glucosaminoglicanos	GAG

Gastroenteritis no hemorrágica	GE
<i>Human Bocavirus</i> (Bocavirus humano)	HBoV
Ácido clorhídrico	HCl
Heparán sulfato	HS
Kilobases	Kb
Cloruro de potasio	KCl
<i>Madin-Darby Canine Kidney</i> (Línea celular de riñón de canino)	MDCK
Madin-Darby)	
Cloruro de magnesio	MgCl ₂
Hidróxido de sodio	NaOH
<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional para la Información Biotecnológica)	NCBI
Nuevo León	N.L.
Número de catálogo	No. Cat.
Nucleoproteína	NP
<i>Non-structural protein</i> (Proteína no estructural)	NS
Dominio amino-terminal	N-terminal
<i>Open reading frame</i> (Marco de lectura abierto)	ORF
Origen de replicación	Ori
<i>Polymerase chain reaction</i> (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	PCR
<i>Porcine Circovirus</i> (Circovirus porcino)	PCV
Potencial de hidrógeno	pH
<i>Rolling circle replication</i> (Replicación en círculo rodante)	RCR
Proteína Replicasa	REP
<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción)	RFLP
Síndrome de Diarrea Hemorrágica Aguda	SDHA
Sin signología	S/S
<i>Single-stranded deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla- ssADN)	ssDNA
<i>Tissue Culture Infectious Dose 50%</i> (Dosis infecciosa en cultivo de tejidos al 50%)	TCID ₅₀
<i>Melting temperature</i> (Temperatura de fusión)	T _m
Unidades	U
Universidad Autónoma de Nuevo León	UANL
<i>Viral Protein</i> (Proteína estructural de la cápside)	VP

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Equipos utilizados en el proyecto.....	26
Tabla 2. Materiales consumibles.....	27
Tabla 3. Calendario de inmunizaciones utilizado para la producción de antisueros policlonales	42
Tabla 4. Monoinfecciones y coinfecciones presentadas en las muestras clínicas	54
Tabla 5. Patrones de polimorfismo de un segmento de ADN de la proteína VP2 de cepas de CPV-2 obtenidas por PCR-RFLP	55
Tabla 6. Oligonucleótidos para la amplificación del genoma de CPV-2.....	59
Tabla 7. Oligonucleótidos para la amplificación del genoma de CBoV-1	60
Tabla 8. Oligonucleótidos para la amplificación del genoma de CBoV-2.....	61
Tabla 9. Oligonucleótidos para la amplificación del genoma de CCV.....	62
Tabla 10. Especificaciones de las secuencias de CPV-2 obtenidas en este estudio	64
Tabla 11. Cambios de aminoácidos en la proteína NS1 de CPV-2.....	73
Tabla 12. Cambios de aminoácidos en la proteína NS2 de CPV-2.....	74
Tabla 13. Cambios de aminoácidos en la proteína VP2 de CPV-2.....	77
Tabla 14. Cambios de aminoácidos en la proteína NS1 de CBoV-1.....	82
Tabla 15. Cambios de aminoácidos en la proteína VP2 de CBoV-1	84
Tabla 16. Títulos en TCID ₅₀ de los aislados virales de este estudio	86
Tabla 17. Dosis neutralizantes de los antisueros anti-CPV-2	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrativo del virión de CPV.....	4
Figura 2. Esquema ilustrativo del genoma de CPV.....	5
Figura 3. Esquema evolutivo de CPV-2 basada en las sustituciones de aminoácidos en la proteína VP2.	7
Figura 4. Esquema ilustrativo y micrografía electrónica de PCV.	13
Figura 5. Esquema ilustrativo del genoma de CCV.	14
Figura 6. Esquema evolutivo de genoma de CCV.	15
Figura 7. Esquema ilustrativo de la estructura de CBoV-1.	19
Figura 8. Esquema ilustrativo del genoma de CBoV.....	20
Figura 9. Patrones de polimorfismo en el gen de la proteína VP2.....	35
Figura 10. Representación esquemática de una placa de cultivo celular de 24 pozos utilizada en el presente trabajo.....	36
Figura 11. Cuadrículas de la cámara Fuchs-Rosenthal.....	44
Figura 12. Representación esquemática de una placa de cultivo celular de 96 pozos utilizada en la titulación viral.....	45
Figura 13. Representación esquemática de una placa de cultivo celular de 96 pocillos utilizada para las pruebas de seroneutralización..	48
Figura 14. Localización geográfica por municipio de las clínicas que participaron en la recolección de muestras para el proyecto.....	50
Figura 15. Electroforesis de PCR de diagnóstico para CPV-2.....	52
Figura 16. Electroforesis de PCR de diagnóstico para CBoV-1.....	52
Figura 17. Electroforesis de PCR de diagnóstico para CBoV-2.....	53
Figura 18. Electroforesis de PCR de diagnóstico para CCV.....	53

Figura 19. Electroforesis de PCR-RFLP de un fragmento del gen VP2 de 1779 pb.....	55
Figura 20. Células MDCK control e infectadas por CPV-2.....	56
Figura 21. Células MDCK control e infectadas por CBoV-1.....	57
Figura 22. Amplificación del genoma completo de CPV-2.....	63
Figura 23. Amplificación del genoma completo de CBoV-1.....	65
Figura 24. Dendrograma generado con el genoma completo de CPV-2.	68
Figura 25. Dendrograma generado con el genoma completo de CBoV.....	70
Figura 26. Mutaciones identificadas en el gen NS1 de CPV-2 de los aislados del presente estudio.	71
Figura 27. Mutaciones identificadas en el gen NS2 de CPV-2 de los aislados del presente estudio.	72
Figura 28. Mutaciones identificadas en el gen VP2 de CPV-2 de los aislados del presente estudio..	76
Figura 29. Dendrograma basado en el gen VP2 de CPV-2.	80
Figura 30. Mutaciones identificadas en el gen NS1 de CBoV-1 del aislado MX-ABM30.	81
Figura 31. Mutaciones identificadas en el gen VP2 de CBoV-1 del aislado MX-ABM30.	83
Figura 32. Placa de titulación del aislado MX-ABM55.	86
Figura 33. Seroneutralización cruzada de los antisueros SVC y SVH frente al virus heterólogo MX-ABM24.....	88

RESUMEN

Dentro de las enfermedades clínicamente importantes en caninos a nivel mundial, está el síndrome de diarrea hemorrágica aguda (SDHA). El SDHA puede tener etiologías multifactoriales, siendo *Protoparvovirus carnívoro tipo 1* (parvovirus canino tipo 2 (CPV-2)) el patógeno encontrado con mayor frecuencia. Sin embargo, se han encontrado coinfecciones de CPV-2 con virus emergentes como bocavirus canino (CBoV) y circovirus canino (CCV) con cuadros clínicos más severos. En México, aunque estos virus han sido detectados, su caracterización genética y antigénica es limitada. Por lo que el objetivo de este estudio fue identificar las variantes genéticas de CPV-2, CBoV y CCV en caninos del área metropolitana de Monterrey, N.L., evaluar sus propiedades antigénicas y su asociación con la presentación del SDHA. Para ello, fueron procesadas 51 muestras positivas a CPV-2, CBoV-1 y 2 y CCV, correspondientes a 48 caninos domésticos y tres coyotes silvestres (*Canis latrans*) con SDHA y gastroenteritis no hemorrágica (GE), para su aislamiento en células MDCK. Se logró el aislamiento de CPV-2 en 35 muestras y de CBoV-1 en una muestra, mientras que CBoV-2 y CCV no pudieron ser aislados. Se amplificó y secuenció el genoma completo de 10 aislados de CPV-2 (ocho caninos domésticos y dos coyotes), en los que se identificaron 83 mutaciones puntuales y 19 sustituciones de aminoácidos. El análisis filogenético clasificó los aislados dentro del subtipo CPV-2c y reveló una relación genética entre los aislados de coyotes y de caninos domésticos de México y Estados Unidos, lo que sugiere una transmisión interespecie. Asimismo, a partir del aislado MX-ABM30 se obtuvo una secuencia genética completa de CBoV-1, en la que se identificaron 66 mutaciones puntuales y seis sustituciones de aminoácidos, con una similitud del 98 % con aislados de Estados Unidos y Portugal. Fueron desarrollados dos antisueros policlonales en cabras a partir de las cepas vacunales NL-35-D y Cornell de CPV-2, los cuales se emplearon en las pruebas de seroneutralización. Ambos antisueros presentaron títulos neutralizantes de 1:140 ($2.15 -\log_{10} \text{ND}_{50}$) frente a su virus homólogo y de 1:47 ($1.67 -\log_{10} \text{ND}_{50}$) frente a los aislados de CPV-2c obtenidos. En conjunto, estos resultados evidencian la circulación de variantes genéticas de CPV-2c y CBoV-1 en caninos domésticos con SDHA y GE, así como la infección clínica de CPV-2c en coyotes silvestres de México. No obstante, son necesarios estudios adicionales que permitan determinar si las mutaciones identificadas influyen en la patogenicidad de CPV-2c y CBoV-1. Por otro lado, la reducción en los títulos neutralizantes entre las cepas vacunales y los aislados de CPV-2c sugiere una posible reducción en la eficacia de las vacunas actuales frente a las variantes circulantes de CPV-2, sin embargo, es necesario realizar más estudios para confirmarlo.

Palabras clave: CPV, CBoV, CCV, SDHA, *Canis lupus familiaris*, *Canis latrans*, noreste de México.

ABSTRACT

Acute hemorrhagic diarrhea syndrome (AHDS) is considered a clinically important disease in dogs worldwide. AHDS has a multifactorial etiology, in which *Protoparvovirus carnivoran 1* (canine parvovirus type 2 (CPV-2)) is the most frequently identified pathogen. However, coinfections involving CPV-2 and emerging viruses such as canine bocavirus (CBoV) and canine circovirus (CCV) have been associated with more severe clinical manifestations. In Mexico, although these viruses have been detected, their genetic and antigenic characterization remains limited. Therefore, the objective of this study was to identify the genetic variants of CPV-2, CBoV, and CCV circulating in dogs from the metropolitan area of Monterrey, Nuevo León, evaluate their antigenic properties, and determine their association with the occurrence of AHDS. To this end, 51 samples positive for CPV-2, CBoV-1, CBoV-2 and CCV were processed for viral isolation in MDCK cells. These samples were obtained from 48 domestic dogs and three wild coyotes (*Canis latrans*) diagnosed with AHDS or non-hemorrhagic gastroenteritis (GE). CPV-2 was successfully isolated from 35 samples, and CBoV-1 from one sample, whereas CBoV-2 and CCV could not be isolated. The complete genome of 10 CPV-2 isolates (eight domestic dogs and two coyotes) was amplified and sequenced, revealing 83 nucleotide mutations and 19 amino acid substitutions. Phylogenetic analysis classified all isolates within the CPV-2c subtype, revealing a genetic relationship between isolates derived from coyotes and domestic dogs from Mexico and the United States, suggesting the occurrence of cross-species transmission. Likewise, a complete genetic sequence of CBoV-1 was obtained from MX-ABM30 isolate, in which 66 nucleotide mutations and six amino acid substitutions were identified, with 98 % of identity with isolates from the United States and Portugal. Two goat polyclonal antisera were developed using the NL-35-D and Cornell CPV-2 vaccine strains and were subsequently used in virus neutralization assays. Both antisera exhibited neutralizing titers of 1:140 ($2.15 -\log_{10} \text{ND}_{50}$) against the homologous virus and 1:47 ($1.67 -\log_{10} \text{ND}_{50}$) against the obtained CPV-2 isolates. Overall, these results reveal the circulation of genetic variants of CPV-2c and CBoV-1 in domestic dogs with AHDS and GE, as well as the clinical CPV-2c infection among wild coyotes from Mexico. Nevertheless, additional studies are necessary to determine whether the identified mutations influence the pathogenicity of CPV-2c and CBoV-1. Furthermore, the decrease in neutralizing antibody titers between the vaccine strains and CPV-2c isolates suggests a potential reduction in the effectiveness of current vaccines against circulating CPV-2 variants, however, further studies are required to validate this finding.

Keywords: CPV, CBoV, CCV, AHDS, *Canis lupus familiaris*, *Canis latrans*, northeastern Mexico.

1 INTRODUCCIÓN

Este proyecto de investigación se desarrolla en el contexto de enfermedades infecciosas de origen viral que afectan la salud de la población canina. En los últimos años, el síndrome de diarrea hemorrágica aguda (SDHA) ha tomado relevancia debido a la identificación de coinfecciones virales que agravan el cuadro clínico y aumentan la mortalidad en animales afectados. A nivel regional, existe la necesidad de generar información que permita comprender mejor la presencia y el comportamiento de agentes virales como parvovirus canino tipo 2 (CPV-2), así como de virus emergentes como bocavirus canino (CBoV) y el circovirus canino (CCV). A nivel nacional, la información disponible sobre la caracterización genética de estos virus, en especial de CBoV y CCV, es limitada, lo que dificulta el desarrollo de estrategias diagnósticas y preventivas adecuadas. A nivel internacional, el estudio de estos agentes contribuye a los esfuerzos de vigilancia epidemiológica y manejo de enfermedades infecciosas emergentes en animales

Este estudio contribuye al conocimiento científico al caracterizar genética y antigénicamente a CPV-2, CBoV y CCV en caninos con y sin SDHA que circulan en el área metropolitana de Monterrey, N.L., México. La metodología empleada, basada en técnicas de aislamiento viral, análisis genético y pruebas de seroneutralización, permiten establecer un diagnóstico definitivo caracterizando los múltiples agentes etiológicos que participan en síndromes desarrollados en la especie canina, estos modelos diagnósticos pueden ser utilizada en estudios similares y aplicada en otros contextos epidemiológicos. Los resultados de este estudio pueden ampliar la información disponible sobre CPV-2, CBoV y CCV, su participación en coinfecciones, así como también sus propiedades antigénicas, lo que favorece la comprensión de su epidemiología en el área de estudio. El desarrollo de esta investigación aclarará algunos aspectos sobre la epidemiología y diversidad genética de CPV-2, CBoV y CCV en el área de estudio y en México. Además, contribuye a la difusión y empleo en la zona de métodos

diagnósticos más eficientes para el fortalecimiento de mecanismos de prevención y manejo de enfermedades infecciosas de origen viral en la población canina, que beneficiaría la práctica profesional veterinaria de la zona de estudio.

2 ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

2.1 PARVOVIRUS CANINO

2.1.1 Clasificación taxonómica

El *Protoparvovirus carnívoro tipo 1*, también llamado parvovirus canino tipo 2 (CPV-2) se encuentra agrupado dentro del género *Protoparvovirus*, en la subfamilia *Parvovirinae* y familia *Parvoviridae*, acorde a lo descrito por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV). Debido a su diversidad genética y variabilidad antigénica, este virus se ha subdividido en los genotipos CPV-2, 2a, 2b y 2c (Decaro et al., 2020).

2.1.2 Morfología del virión

El virión de CPV-2 es desnudo ya que no posee una envoltura lipídica, mide 25 nm de diámetro, su cápside toma forma de icosaedro y su genoma se conforma de ADN monocatenario en forma lineal de 5.2 kb. La cápside se conforma de 60 subunidades de las proteínas estructurales VP1 y VP2, de las que el 90 % de la cápside la conforma la proteína VP2 (alrededor de 55 copias). Estas subunidades se organizan mediante interacciones de los ejes de simetría de dos, tres y cinco pliegues (Mietzsch et al., 2019).

Los rasgos superficiales de la cápside incluyen una protrusión (espícula) de 22 Å de longitud en los ejes de simetría de tres pliegues, una depresión de 15 Å de profundidad dispuestas alrededor de formaciones cilíndricas asociadas a los ejes de simetría de cinco pliegues, y un surco de 15 Å de profundidad ubicada en los ejes de simetría de dos pliegues (Figura 1). Además, los ejes de simetría de tres pliegues constituyen la región de mayor antigenicidad de la cápside y son reconocidas por anticuerpos neutralizantes (Hartmann et al., 2023; Mietzsch et al., 2019).

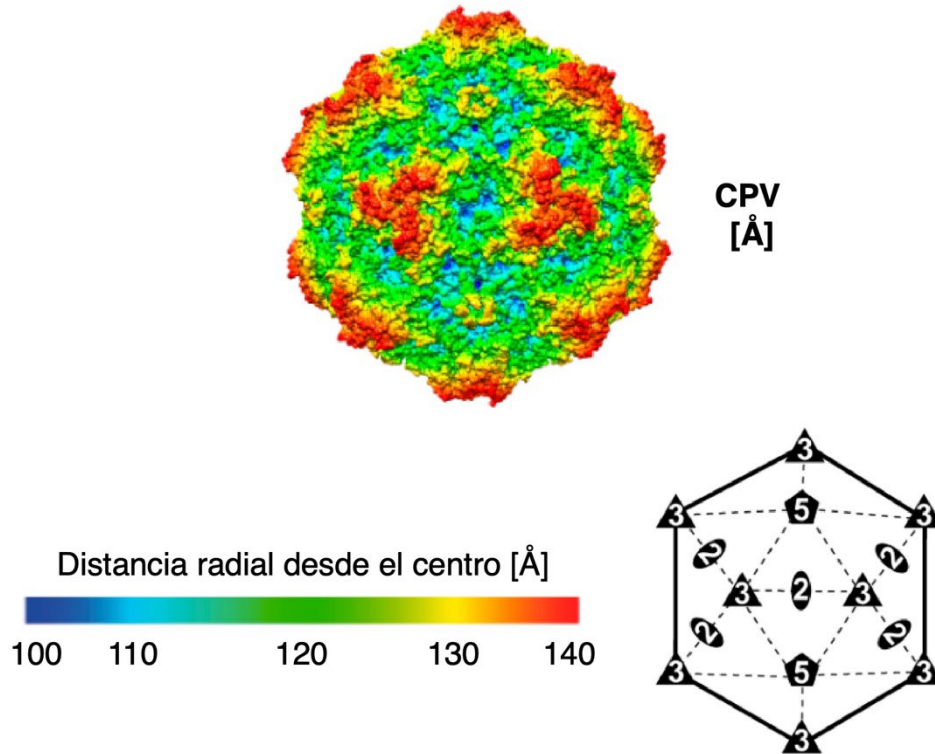


Figura 1. Esquema ilustrativo del virión de CPV. Se observa la superficie de la cápside de CPV. La escala de colores representa la distancia radial desde el centro de la partícula, variando de azul a rojo. En la parte inferior derecha se muestra un diagrama de simetría que ilustra la ubicación de los ejes de simetría icosaédricos en las superficies de la cápside. Modificado de Mietzsch et al. (2019).

2.1.3 Características del genoma

El genoma de CPV-2 se conforma de ADN monocatenario lineal de 5.2 kb y se caracteriza por tener dos ORFs o marcos de lectura abiertos (Figura 2). El ORF1 es responsable de codificar las proteínas NS1 y NS2, por otro lado, el ORF2 se encarga de codificar las proteínas de la cápside (VP1, VP2 y VP3) (Singh et al., 2021).

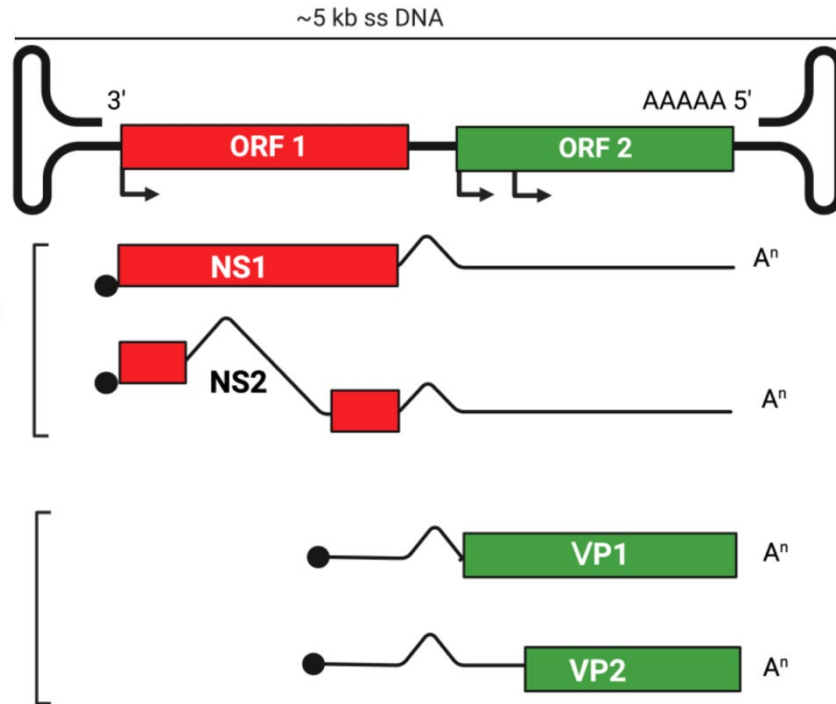


Figura 2. Esquema ilustrativo del genoma de CPV. El CPV tiene un genoma que presenta secuencias palindrómicas terminales que forman estructuras complejas en forma de horquilla en los extremos 5' y 3'. Estas estructuras funcionan como origen de la replicación (Ori) y facilitan la encapsidación (empaquetamiento) del ADN viral. Los extremos 5' de los transcritos de ARN están capados (círculos negros), y los extremos 3' están poliadenilados (Aⁿ). VP1 y VP2 se codifican a partir del mismo ARNm (Capozza et al., 2023).

La proteína NS1 comprende 2007 nucleótidos (nt) y 669 aminoácidos (aa), está relacionada con la patogénesis del virus, tiene la habilidad de inducir apoptosis de la célula huésped a través de la ruta de apoptosis intrínseca, alterando la estructura y función de la mitocondria e interfiriendo con el ciclo celular (Mira et al., 2019). El gen NS1 cuenta con tres dominios funcionales: el primero es el dominio de unión al ORI (Origen de Replicación) del residuo 16 al 275; el dominio de la helicasa, que se localiza desde el residuo 299 al 486; y por último el dominio de transactivación, que comprende desde el residuo 600 al 667. Mientras que la proteína NS2 comprende 498 nt y 166 aa, se encarga principalmente de la

replicación viral y actúa como promotor de la expresión proteica del virus (Mira et al., 2019).

La cápside del virión está formada principalmente por VP1 y VP2, proteínas estructurales que protegen el genoma del virus. La proteína VP1, que comprende 2184 nt y 728 aa, es importante para el tránsito intracelular por su dominio de fosfolipasa. La proteína VP2 comprende 1755 nt y 585 aa, es la proteína estructural más abundante (90% de las proteínas estructurales) y su función principal es la interacción virus/célula, permitiendo ingresar al virus a la célula huésped, además de presentar en su gen las mutaciones que permite clasificar los subtipos de CPV-2 (G. Li et al., 2017). Existen varias regiones y aminoácidos específicos que son importantes para la función de VP2. El aminoácido 426 es clave para la clasificación de las variantes CPV2b y CPV-2c (Mietzsch et al., 2019). Los bucles superficiales (Bucle 1, 2, 3 y 4) se encargan del reconocimiento de receptores celulares, determinan el rango de hospedero y contienen los principales sitios antigénicos del virus. El bucle 3 comprende los aminoácidos 295-306 y contiene los sitios de neutralización antigénicos principales, además de interactuar con el receptor de transferrina (TfR) (Alexis et al., 2021).

Por último, la proteína estructural VP3 se origina mediante el procesamiento proteolítico de VP2, eliminando de 20-25 aminoácidos del extremo N-terminal después del empaquetamiento de ADN (Mietzsch et al., 2019).

2.1.4 Evolución genética de CPV-2

El parvovirus canino tipo 2 fue descrito por primera vez en 1978, y fue considerado como una variante genética que evolucionó a través de mutaciones puntuales del virus de la panleucopenia felina (FPV), estas seis mutaciones específicas en la proteína VP2 (K80R, K93N, V103A, D323N, N564S, A568G) generaron cambios en los aminoácidos de la proteína permitiendo al virus cruzar la barrera interespecie, afectando así a la especie canina, esparciéndose por Europa, Asia, América y Oceanía. Para 1982 surge una nueva variante CPV-2a, que difiere genética y antigénicamente de CPV-2 (M87L, I101T, A300G, D305Y,

V555I). Las sustituciones en el aminoácido N426D Y I555V de la proteína VP2, la zona más antigénica del virus ocasionó la generación de las variantes CPV-2b en 1984. Por último, en el 2001 se describe una nueva sustitución del aminoácido D426E, generando el subtipo CPV-2c (Figura 3). A pesar de que estas variantes del virus afectan a caninos, se ha reportado que el virus está recobrando la habilidad de infectar a felinos y a otros carnívoros (Giraldo-Ramirez, Rendon-Marin y Ruiz-Saenz, 2020).

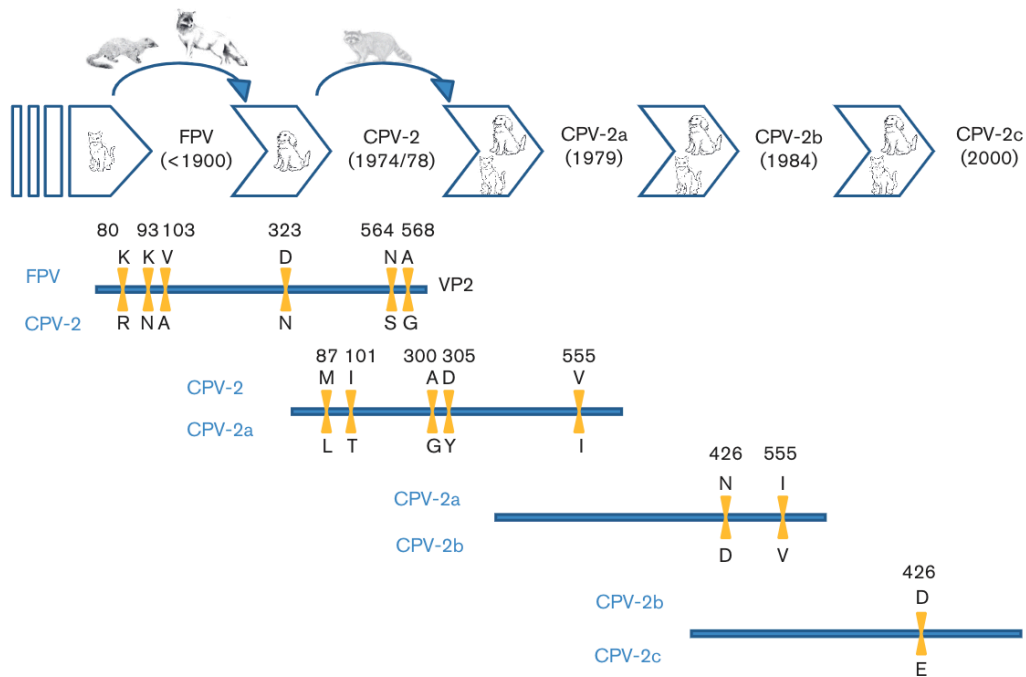


Figura 3. Esquema evolutivo de CPV-2 basada en las sustituciones de aminoácidos en la proteína VP2. Se describen las sustituciones de aminoácidos que ha presentado el gen VP2 de CPV-2 desde su surgimiento a partir del FPV, dando origen a los subtipos 2, 2a, 2b y 2c, así como también el rango de hospedero que ha presentado el virus con estas sustituciones. Modificado de Miranda y Thompson (2016).

La distribución de los subtipos de CPV-2 difieren de cada región, la cepa CPV-2a se presenta con más frecuencia en países de Europa como Francia, Italia, India Bangladesh, sin embargo, hay reportes que este subtipo está presente también en países de América (Giraldo-Ramirez, Rendon-Marin y Ruiz-Saenz, 2020; Singh et al., 2021). Las variantes 2b y 2c están presentes en el continente

americano, estudios realizados en México describen a CPV-2c como el subtipo predominante en la población canina del país (Faz et al., 2019; Pedroza-Roldán et al., 2015).

VP2 desempeña un papel crítico en la unión a receptores, la determinación del espectro de hospederos y la capacidad de inducir anticuerpos neutralizantes, por lo que las mutaciones en VP2 son impulsores clave de la evolución y la variación antigénica de CPV-2 (G. Li et al., 2017; Oliveira et al., 2019). Estudios en VP2 han descrito varias sustituciones de aminoácidos como marcadores moleculares de la evolución de CPV-2. Por ejemplo, las nuevas variantes “new CPV-2a” y “new CPV-2b” se caracterizan por las sustituciones S297A y Y324I (Oliveira et al., 2019).

2.1.5 Mecanismos de entrada e infección de CPV-2

El CPV-2 se transmite de forma oro-nasal por contacto directo de animales susceptibles. La signología puede presentarse a partir de los 7-14 días de la infección (periodo de incubación del virus), sin embargo, hay casos donde este periodo puede ser más corto (Khatri et al., 2017). Los viriones pueden ser excretados durante un periodo de hasta dos semanas y son extremadamente infecciosos. Se caracterizan por su resistencia a los detergentes, desinfectantes y solventes, así como también a los cambios de pH y de temperatura, lo que les permite mantener su capacidad infecciosa durante varios meses (Mazzaferro, 2020).

Al entrar al organismo, CPV-2 tiene afinidad por el tejido linfóide como los ganglios retrofaríngeos y mesentéricos, siendo éstos los sitios primarios de replicación del virus. Esta afinidad de infección hacia un tipo de tejido o célula se le llama tropismo celular y está dado principalmente por los receptores celulares que puedan estar presentes (Khatri et al., 2017; Mazzaferro, 2020). Después de replicarse en tejido linfático, se produce una infección generalizada llegando a órganos como el bazo, hígado, corazón e intestinos, produciendo así una viremia. Días posteriores, la replicación se da en órganos que poseen células con alta

tasa de replicación como médula ósea donde destruye células del sistema inmune, provocando una linfopenia aguda, dejando al animal inmunocomprometido (Mazzaferro, 2020). El órgano más afectado en la infección por CPV-2 es el intestino delgado, éste infecta el epitelio germinal, destruyendo el epitelio y las vellosidades, dando como resultado la característica diarrea hemorrágica (Mazzaferro, 2020).

2.1.6 Antigenicidad e inmunización

Las variaciones genéticas entre los subtipos de CPV-2 están relacionadas con sustituciones de aminoácidos en el residuo 426, donde CPV-2c tiene Ácido Glutámico (Glu), CPV-2b tiene Ácido Aspártico (Asp) y CPV-2a tiene Asparagina (Asn). Esta mutación afecta la región con mayor antigenicidad de la proteína VP2. Se han reportado diferentes mutaciones en la proteína VP2, sin embargo, la zona en la que modifican a la proteína no representa cambios en la antigenicidad del virus o podrían ampliar el rango de hospederos del virus (Miranda y Thompson, 2016).

A la fecha solo existen vacunas con los subtipos CPV-2 y CPV-2b en diversos países, entre ellos México. A pesar de la extensa vacunación contra CPV en todo el mundo, la parvovirus continúa asociándose con una elevada mortalidad en los caninos, especialmente los jóvenes. La falla en la inmunización de animales de compañía puede atribuirse a múltiples factores, entre los que destacan la presencia de inmunidad pasiva materna que interviene con el montaje de la respuesta inmune al momento de la vacunación, la variabilidad en la competencia inmunológica del hospedador y la emergencia de nuevos genotipos con variación antigénica de CPV-2 (Decaro et al., 2020).

La proteína VP2 está formada por 585 residuos de aminoácidos, es la más abundante e inmunogénica de las proteínas estructurales y es de suma importancia para el tropismo viral y el rango de especies afectadas (G. Li et al., 2017). Es importante resaltar que simples mutaciones en el gen de la proteína que originan cambios en los aminoácidos pueden alterar las características

biológicas del virus; CPV-2 surge a partir del FPV, donde mutaciones específicas en el gen de la proteína VP2 permitieron al virus cruzar la barrera interespecie, afectando así a la especie canina, esparciéndose por Europa, Asia, América y Oceanía. (Giraldo-Ramirez, Rendon-Marin y Ruiz-Saenz, 2020).

Estudios recientes han reportado nuevas mutaciones en el gen de la proteína VP2 con cambios de aminoácidos, específicamente en regiones asociadas con el receptor de transferrina, dando lugar a nuevas variantes del virus con propiedades antigénicas distintas, pudiendo evadir la respuesta inmunitaria (Alexis et al., 2021; P. Zhou et al., 2017).

Una de las mejores medidas preventivas para controlar la infección por CPV-2 es la vacunación, sin embargo, a pesar de los programas de vacunación aplicados mundialmente, la parvovirus sigue siendo de las principales enfermedades en caninos (Decaro et al., 2020). Existe debate entre investigadores de la efectividad que tienen las vacunas contra CPV generadas con aislados del genotipo de CPV-2 para proteger a los caninos contra las nuevas variantes del virus (CPV2a-c). Diferentes mutaciones en la proteína VP2 han dado lugar a nuevas variantes de CPV, favoreciendo la replicación del virus y la evasión de los viriones a la respuesta inmune, contribuyendo a reducir la eficacia de las vacunas contra CPV comúnmente usadas en diferentes países (Alexis et al., 2021).

Estudios *in-vitro* describen que no existe neutralización cruzada entre las variantes de CPV y la vieja variante CPV-2. Animales vacunados con la variante CPV-2 demostraron una baja tasa de anticuerpos neutralizantes contra los subtipos CPV-2a, 2b y 2c. Además, los animales vacunados con el subtipo CPV-2c mostraron altas tasas de anticuerpos neutralizantes contra los subtipos CPV-2, 2a y 2b (Cavalli et al., 2008). Las diferencias antigénicas observadas plantean preocupaciones sobre la eficacia de las vacunas comúnmente usadas, dando lugar a la selección de nuevas variantes de CPV para la producción de vacunas más eficientes (Cavalli et al., 2008).

2.1.7 Aislamiento

El aislamiento viral consiste en recuperar el virus infeccioso a partir de muestras clínicas (heces, tejido intestinal, miocardio, etc.) y propagar el virus en una línea celular. Se utiliza ampliamente para la caracterización de cepas de campo, estudios de antigenicidad y desarrollo de vacunas. En investigación, el aislamiento sigue siendo la prueba de oro para estudiar virus vivos, sin embargo, el tiempo requerido, el equipo y la capacitación técnica necesaria para realizarla son algunas de las desventajas que se han observado (Hematian et al., 2016).

El aislamiento y propagación de CPV-2 ha sido realizado en diversas líneas celulares. Las células *Crandell Feline Kidney* (CRFK) también han sido ampliamente utilizadas para el aislamiento y propagación de CPV-2 (Mira et al., 2019). La línea celular A-72 también se utiliza para el aislamiento, propagación y titulación de CPV-2, además de ser utilizada para estudios de caracterización antigénica y desarrollo de vacunas (Cavalli et al., 2008).

Las células F81 se han utilizado ampliamente para la titulación viral de CPV-2 ya que induce la formación de placas, lo que facilita la cuantificación. Además, las células *Madin-Darby Canine Kidney* (MDCK) han sido utilizadas para estudiar los efectos citotóxicos de la infección por CPV-2, empleando ensayos para determinar la viabilidad celular tras el proceso de infección (Wang et al., 2025). Cuando el virus es inoculado en esta línea celular puede causar efecto citopático (ECP) en el cultivo, esto dado a la alta tasa de replicación viral. El ECP puede aparecer después de 24 horas inoculado el virus en las células o inclusive en menos tiempo si la cepa de CPV es muy virulenta (Khatri et al., 2017; Mazzaferro, 2020).

También se han utilizado las líneas celulares MDCK y HEK293T para estudios de infección y transfección. Estas células se transfectan con plásmidos que expresan proteínas reporteras y posteriormente se infectan con CPV-2 para monitorear los niveles de expresión proteica o evaluar el impacto de la infección por CPV-2 sobre la síntesis de proteínas del hospedero. Estos métodos

proporcionan información sobre los efectos del virus en la maquinaria de traducción celular (Wang et al., 2025).

2.2 CIRCOVIRUS CANINO

2.2.1 Clasificación taxonómica

El circovirus canino (CCV) es miembro de la familia *Circoviridae*, género *Circovirus*. Estudios genéticos describen que el CCV puede subdividirse hasta en cinco genotipos (CCV-1 – CCV-5), de los cuales CCV-2, CCV-3 y CCV-4 solo han sido identificados en China, CCV-1 es la cepa que se presenta con más frecuencia en América y Europa y por último CCV-5 ha sido identificada sólo en zorros de Noruega (Giraldo-Ramirez, Rendon-Marin, Vargas-Bermudez, et al., 2020).

2.2.2 Morfología del virión

Los viriones de CCV tienen un tamaño de 20 nm de diámetro, no tienen envoltura lipídica y su cápside presenta una simetría icosaédrica T=1, cuenta con 60 subunidades de la proteína Cap (Figura 4). En el CCV no se ha determinado la estructura de la cápside, sin embargo, se cree que es muy similar a la presente en otros circovirus que infectan animales como en el virus de la enfermedad del pico y las plumas (BFDV) y del circovirus porcino tipo 2 (PCV-2), estas se componen de 12 unidades estructurales pentaméricas de conformación plana (Crowther et al., 2003).

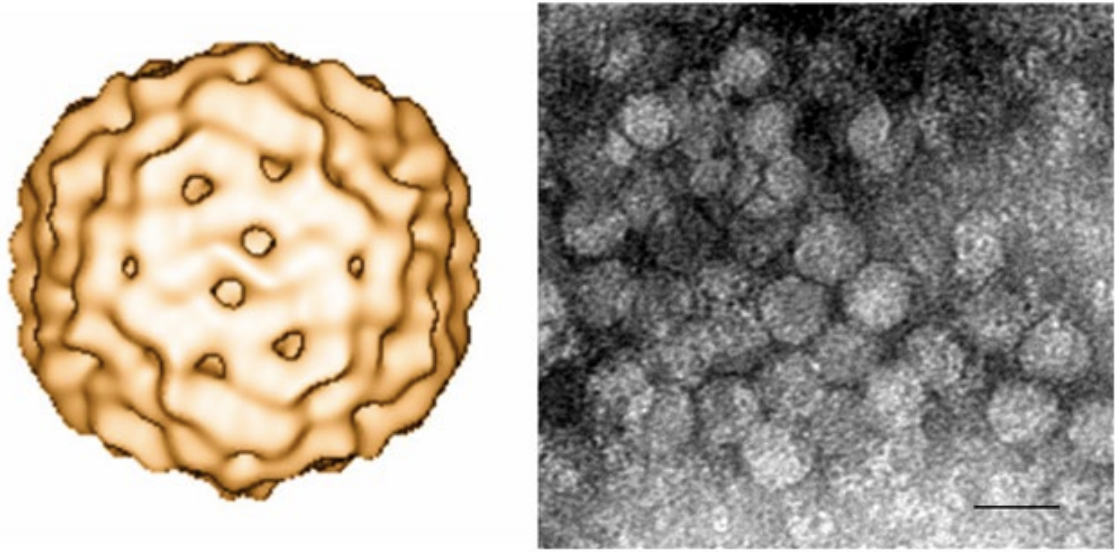


Figura 4. Esquema ilustrativo y micrografía electrónica de PCV. (Izquierda) Representación tridimensional del PCV-2 obtenida mediante microscopía crioelectrónica. El modelo estructural propuesto consta de 60 subunidades organizadas con simetría icosaédrica T=1, distribuidas en 12 capsómeros pentaméricos (Crowther et al., 2003). (Derecha) Partículas de PCV-2. Imagen de microscopía electrónica de transmisión. Escala 20 nm (Imagen de Carolina Rodríguez-Cariño; Joaquim Segalés, CReSA, España).

2.2.3 Características del genoma y proteína que codifica

El genoma de CCV es ADN monocatenario de forma circular de 2 kb que comprende dos ORFs en hebras complementarias orientadas en direcciones opuestas que codifican a las proteínas Rep y Cap (Kapoor, Dubovi, et al., 2012). La proteína Rep, de tipo no estructural, tiene 303 aminoácidos y posee varias funciones, entre ellas está la identificación del origen de replicación (Ori), el inicio y la terminación en la síntesis de ADN, así como la inhibición de la transcripción, por último, la inducción de la replicación en la célula (Hao, Li, Chen, et al., 2022). La proteína Cap (única estructural) que consta de 270 aminoácidos, forma la cápside del virión y proporciona las propiedades antigénicas al virus (Crowther et al., 2003).

El genoma de CCV también posee 2 regiones intergénicas que no codifican (135 y 203 nt). Dentro del origen de replicación (TAG TAT TACA), se encuentra una secuencia palindrómica de 12 pares de nucleótidos y un bucle abierto de 10 nucleótidos (CATAGTATTA). Adicionalmente, contiene un tercer marco de lectura abierto (ORF3) en la hebra anti sentido de ORF1 en una cepa de Tailandia, aunque su función aún es desconocida (Figura 5) (da Silva et al., 2025; Piewbang, Jo, Puff, Van Der Vries, et al., 2018).

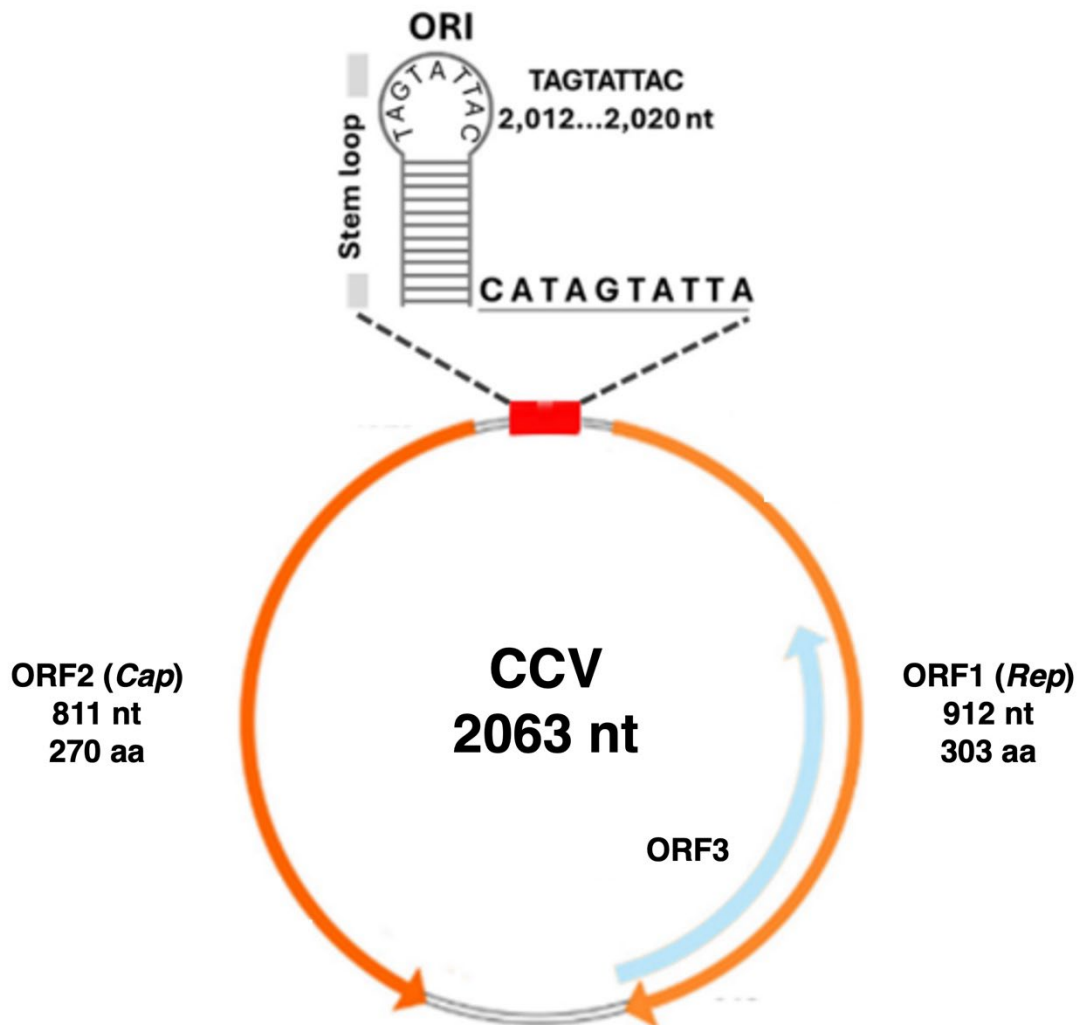


Figura 5. Esquema ilustrativo del genoma de CCV. Se muestran los diferentes marcos de lectura y el origen de replicación (ORI). Circovirus canino (CCV); gen de la proteína replicasa (Rep) en el ORF1; gen de la proteína de la cápside (Cap) en el ORF2; tercer marco de lectura ORF3 (Modificado de da Silva et al. 2025).

2.2.4 Evolución genética de CCV

El CCV fue descrito por primera vez en 2012 en Estados Unidos y está genéticamente relacionado con PCV-2 (Kapoor, Dubovi, et al., 2012). En años posteriores CCV fue identificado en diferentes países, relacionándose con vasculitis hemorrágica y problemas gastroentéricos, llamando la atención como virus emergente en enfermedades caninas (Tuong et al., 2021).

Estudios recientes describen la aparición de nuevas variantes de CCV por recombinación genética (Piewbang, Jo, Puff, Van Der Vries, et al., 2018). A la fecha CCV se ha dividido en cinco subtipos CCV-1 – CCV-5 (Figura 6), donde el subtipo CCV-1 se considera la cepa cosmopolita, identificada en América, Europa y Asia, mientras que los subtipos CCV-2, CCV-3 y CCV-4 sólo se han reportado en Asia (Giraldo-Ramirez, Rendon-Marin, Vargas-Bermudez, et al., 2020; Tuong et al., 2021).

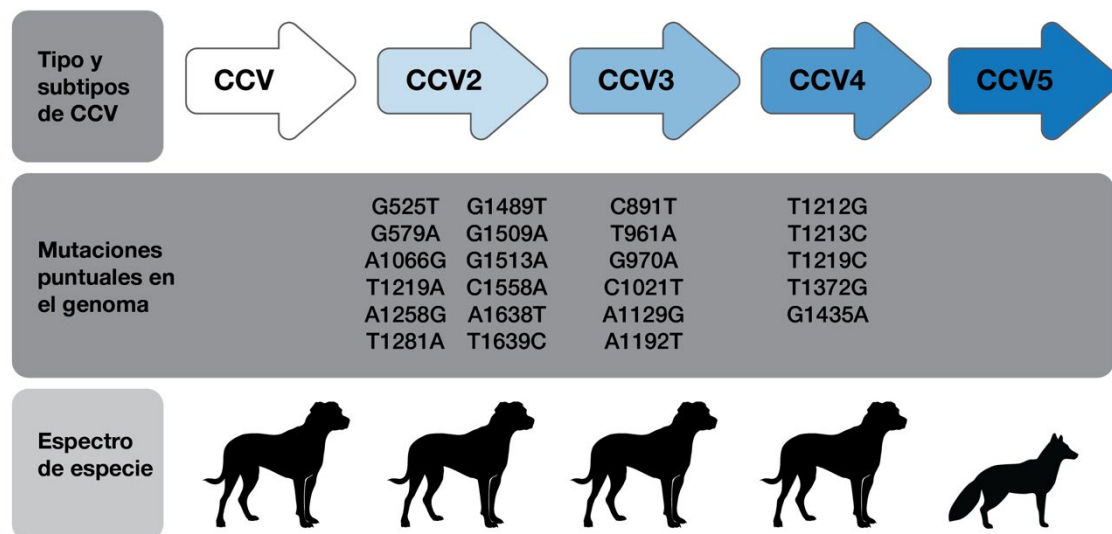


Figura 6. Esquema evolutivo de genoma de CCV. Se muestran las mutaciones puntuales en el genoma que han dado origen a los subtipos de CCV, así como también el rango de hospedero que se ha descrito por cada subtipo (Modificado de Tuong et al., 2021).

Diferentes estudios han estimado que la tasa evolutiva de CCV es de aproximadamente 1.6×10^{-3} sustituciones de bases por sitio por año. Por lo que se estima que el virus evoluciona tanto mediante mutaciones genéticas como por recombinación genética. Estos eventos de recombinación contribuyen a la aparición de nuevos linajes virales y aumentan la diversidad genética (Piewbang, Jo, Puff, Van Der Vries, et al., 2018; Tuong et al., 2021).

Investigaciones recientes han vinculado a CCV con la aparición de gastroenteritis hemorrágica en caninos y, aunque no es el agente responsable de esta enfermedad en la mayoría de los casos, actúa como un cofactor agravante en las infecciones causadas por CPV-2 (Anderson et al., 2017).

2.2.5 Mecanismos de entrada e infección de CCV

Los circovirus comúnmente se transmiten de forma fecal-oral. El tropismo celular de circovirus canino no está muy bien definido, sin embargo, han descrito la presencia de CCV en ganglios linfáticos e intestino bazo, por lo que podría tratarse de una enfermedad sistémica (L. Li, McGraw, et al., 2013). Hasta el momento, aún se desconocen los receptores celulares empleados por CCV, pero se sospecha que, al igual que el PCV-2, podría utilizar sulfato de condroitina (CS-B) o heparán sulfato (HS) unidos a un glicosaminoglicano (GAG) para poder ingresar a la célula (Crowther et al., 2003).

El CCV utiliza el proceso de endocitosis mediada por clatrin para ingresar en la célula. Se cree que la vía de entrada al núcleo de CCV se da atravesando el Complejo del Poro Nuclear (CPN) debido al tamaño de los circovirus, éstos pueden atravesar el CPN sin problema. Dentro del núcleo, el genoma de CCV se replica utilizando un mecanismo llamado *Rolling Circle Replication*, (RCR) o replicación en círculo rodante. Este proceso es mediado por la actividad enzimática durante la fase de síntesis (S) en el ciclo celular de la célula huésped (Crowther et al., 2003).

Circovirus canino con frecuencia se presenta coinfectando con otros patógenos, agravando los síntomas de la enfermedad en los caninos infectados, sin embargo, un estudio reciente describe cómo CCV interviene en la respuesta inmunitaria del huésped dando pie a otras infecciones como la de parvovirus canino (Hao, Li, Chen, et al., 2022). Debido a la dificultad del aislamiento de CCV, aún no se tiene con claridad sus propiedades fisicoquímicas, procesos de replicación y características patogénicas.

2.2.6 Antigenicidad e inmunización

Son pocos los estudios que hacen referencia a las propiedades antigénicas de CCV, sin embargo, como las proteínas Rep y Cap son altamente conservadas en el genoma y están relacionadas con la patogénesis del virus, ambas pueden ayudar a generar respuesta inmune en el huésped. No obstante, la proteína Cap estimula una respuesta inmunológica más fuerte en comparación con la proteína Rep. La proteína Cap contiene epítomos antigénicos que pueden interactuar con moléculas asociadas a células T, lo que indica su papel en el montaje de la respuesta inmune celular, además de mostrar una alta variabilidad genética, lo que representa un factor determinante en la diversidad antigénica y la evolución de los circovirus (Crowther et al., 2003). Sin embargo, aunque se han propuesto epítomos de células T, el estudio de estos epítomos antigénicos sigue siendo limitado, y los epítomos de células B de CCV aún no han sido demostrados.

2.2.7 Aislamiento

A la fecha, el aislamiento de CCV ha demostrado ser una tarea difícil, ya que se ha intentado aislar sin éxito en diferentes líneas celulares como *Felis Catus Whole Foetus* (FCWF), A-72, *Walter Reed Canine Cells* (WRCC), MDCK, *African Green Monkey Kidney* (VERO) y CRFK. Sin embargo, a pesar de que no se ha logrado el aislamiento de CCV, se ha podido caracterizar al virus mediante la clonación del genoma viral en un plásmido y transfectarlo a células F81 (Hao, Li, Chen, et al., 2022).

2.3 BOCAVIRUS CANINO

2.3.1 Clasificación taxonómica

El bocavirus canino (CBoV) se clasifica dentro del género *Bocaparvovirus*, subfamilia *Parvovirinae* y la familia *Parvoviridae*. Hasta ahora se conocen tres subespecies de CBoV, el minute virus canino, recientemente renombrado por el ICTV como bocavirus canino tipo 1 (CBoV-1), ha sido identificado en problemas respiratorios en cachorros e infertilidad en caninos adultos (González-Hein et al., 2020), por otro lado, bocavirus canino tipo 2 (CBoV-2) y bocavirus canino tipo 3 (CBoV-3) fueron identificados recientemente en caninos con gastroenteritis (Bodewes et al., 2014; L. Li, Pesavento, et al., 2013).

2.3.2 Morfología del virión

El CBoV es un virus de 25 nm de diámetro, sin envoltura lipídica y una cápside icosaédrica (Manteufel y Truyen, 2009). La cápside de CBoV está compuesta por 60 subunidades de proteínas estructurales (VPs). El género *Bocaparvovirus* genera las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3, donde la más predominante en la cápside es la proteína VP2 (Gurda et al., 2010).

La estructura de la cápside de diferentes bocavirus se observó por medio de microscopía crioelectrónica y reveló que CBoV-1 posee un canal conservado en el eje de simetría de cinco pliegues, también se observaron protusiones prominentes en el eje de simetría de tres pliegues y una reducción de la clásica depresión en el eje de simetría de dos pliegues en comparación con otros bocavirus. En la figura 7 se pueden observar las anteriores características del virión (Velez et al., 2023).

CBoV-1

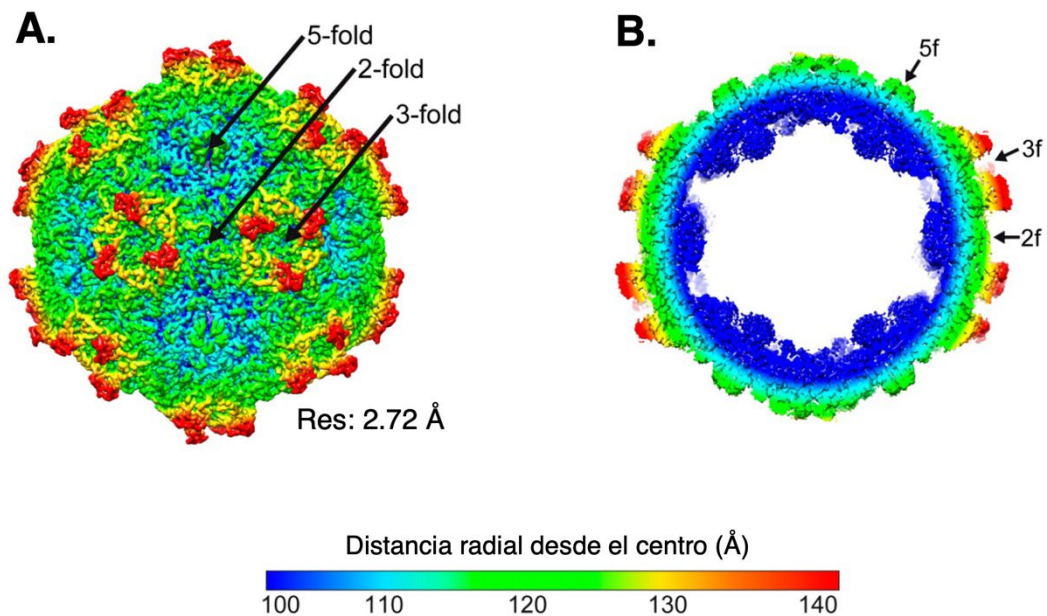


Figura 7. Esquema ilustrativo de la estructura de CBoV-1. **A.** Mapa de densidad de la superficie de la cápside de CBoV-1. Los mapas están coloreados radialmente (de azul a rojo) de acuerdo con la distancia al centro de la cápside, como se indica en la barra de escala inferior. Se señalan los ejes icosaédricos aproximados de simetría de dos, tres y cinco pliegues. **B.** Vista en sección transversal del mapa de densidad de CBoV-1 (Modificado de Velez et al., 2023).

2.3.3 Características del genoma

El CBoV tiene un genoma de ADN monocatenario lineal de 5.5 kb. A diferencia de otros parvovirus, el género *Bocaparvovirus* se caracteriza por presentar tres marcos de lectura (ORFs). Las proteínas no estructurales NS1 y NS2 se codifican por el ORF1, las proteínas estructurales se codifican por el ORF2 (VP1 y VP2), mientras que el ORF3, característico de los bocavirus, codifica para la fosfoproteína nuclear NP1 (Capozza et al., 2023). El ORF4 fue descrito en un estudio recientes y no se conoce con exactitud la función de la proteína codificada (Figura 8) (Piewbang, Jo, Puff, Ludlow, et al., 2018).

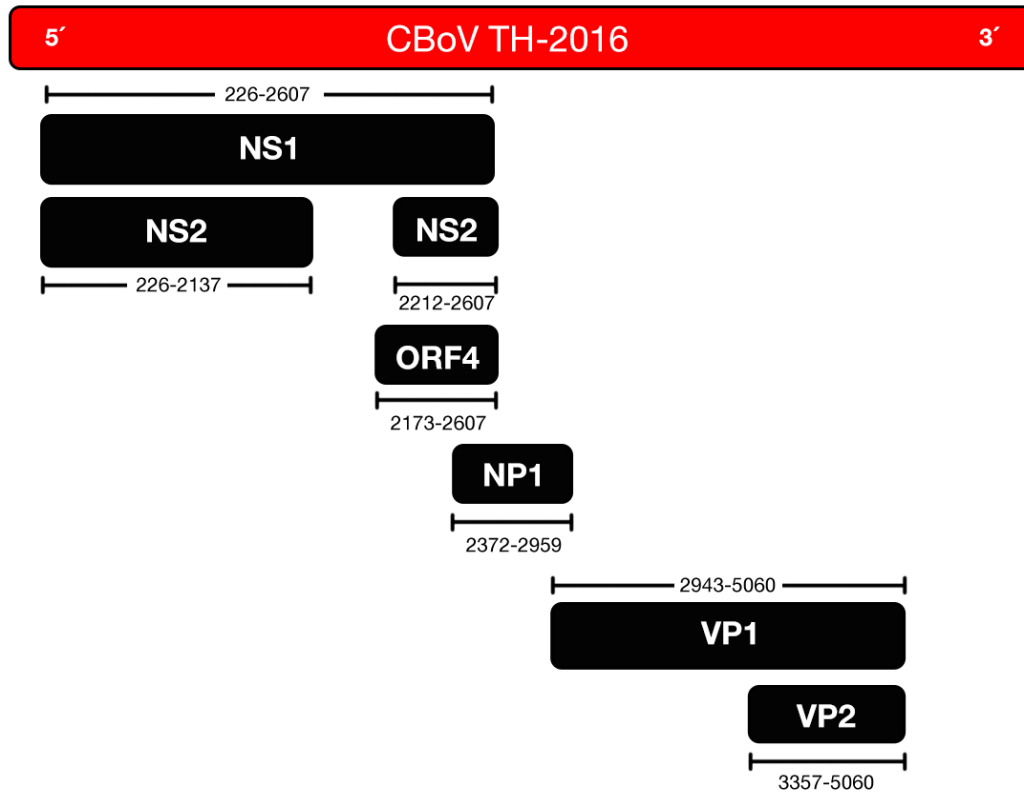


Figura 8. Esquema ilustrativo del genoma de CBoV. Se indica la posición de los genes NS1, NS2, VP1, VP2 y NP1, así como también la ubicación del ORF4 en la cepa TH-2016 de CBoV-2 (Modificado de: Piewbang, Jo, Puff, Ludlow, et al., 2018).

NS1 se encarga de distintas funciones relacionadas con la replicación viral, la región N-terminal tiene zonas de unión al ADN y también funciona como endonucleasa, por otro lado, la región C-terminal participa en la activación de la transcripción, mientras que la sección entre estos dos dominios tiene funciones de ATPasa y helicasa (Kapoor, Mehta, et al., 2012).

Sólo los virus del género *Bocaparvovirus* codifican la proteína NP1, esta proteína regula la síntesis de las proteínas estructurales, inhibiendo la señal interna de poliadenilación durante el procesamiento de ARNm (Dong et al., 2019).

Las proteínas estructurales tienen en común una región C-terminal, la proteína VP1 contiene una región N-terminal distinta, que posee un dominio conservado de fosfolipasa A2, con la función de hidrolizar fosfolípidos, que le ayuda al virión escapar del endosoma e iniciar su travesía al núcleo para su replicación. La proteína VP2 conforma la mayor parte de la cápside, lo que le proporciona estabilidad al genoma y le confiere al virus su estructura tridimensional, además de participar en las interacciones virus-huésped (Gurda et al., 2010).

2.3.4 Evolución genética de CBoV

La evolución de CBoV se caracteriza por su elevada diversidad genética y los frecuentes eventos de recombinación que presentan los parvovirus (Capozza et al., 2023; Kapoor, Mehta, et al., 2012).

El CBoV-1, originalmente denominado minute virus canino (CMV) fue descrito en 1967 en muestras de heces de caninos sanos, no fue hasta 1992 cuando el virus empezó a considerarse patógeno para los caninos. Anteriormente se clasificaba en el género *Protoparvovirus*, sin embargo, cuando surgieron las nuevas especies de bocavirus, se reclasificó al género *Bocaparvovirus* por el ICTV. En 2012 se identificó a CBoV-2 en caninos que presentaban problemas respiratorios, teniendo una divergencia genética del 40% en comparación con CBoV-1 (Kapoor, Mehta, et al., 2012). CBoV-3 se identificó en el 2013 en un canino con linfadenitis granulomatosa, vasculitis necrotizante y gastroenteritis. CBoV-3 presentó una similitud de <60 % en las secuencias de aminoácidos con CBoV-1 y CBoV-2 (L. Li, Pesavento, et al., 2013).

En la última década las diferentes variantes de CBoV han sido identificadas en diferentes países, en especial CBoV-2, que se ha relacionado con presencia de gastroenteritis hemorrágica, principalmente en el continente asiático (Choi et al., 2015; Guo et al., 2016; Piewbang, Jo, Puff, Ludlow, et al., 2018). También se han descrito casos donde CBoV2 se presenta en coinfección con parvovirus canino, aumentando la letalidad de la enfermedad (Guo et al., 2016).

2.3.5 Mecanismos de entrada e infección de CBoV

El CBoV se transmite por contacto directo de forma oro-nasal con animales infectados. La viremia producida por CBoV se da desde el primer día al tercer día después de la infección. Una segunda replicación del virus ocurre en células con alta actividad mitótica. Los órganos diana son pulmones, intestino delgado y tejido linfoide (Manteufel y Truyen, 2009).

Las infecciones causadas por cepas virales de la familia *Parvoviridae* inducen muerte celular mediante mecanismos de apoptosis o necrosis en las células infectadas, lo que contribuye al desarrollo de alteraciones patológicas en los tejidos donde se establece la replicación viral. La patogenia de CBoV varía dependiendo la especie de bocavirus que este infectando, en el caso de CBoV-1 los hallazgos post mortem incluyen neumonía intersticial con hipertrofia e hiperplasia de células alveolares. En intestino delgado se presentaron lesiones de enteritis aguda con hiperplasia de células epiteliales y necrosis de las placas de Peyer (Manteufel y Truyen, 2009). En el caso de CBoV-2 se han presentado casos de cachorros con lesiones de enteritis severa con una atrofia masiva de las vellosidades, además de formar cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos. (Piewbang, Jo, Puff, Ludlow, et al., 2018).

2.3.6 Antigenicidad e inmunización

Las proteínas VP1 y VP2 son determinantes clave en la antigenicidad en los bocavirus. Se ha sugerido que cambios en algunos aminoácidos de estas proteínas de CBoV-2 pueden influir en el tropismo tisular y posiblemente en las propiedades antigénicas, aunque aún no existe evidencia directa (Caddy, 2018).

Las propiedades antigénicas de CBoV no han sido descritas, probablemente por las restricciones de aislamiento del virus en cultivo celular. Sin embargo, estudios con bocavirus humano (HBoV) se enfocan principalmente en la inmunogenicidad de las proteínas estructurales VP, como en el caso de CPV-2 y parvovirus bovino (B19) (Gurda et al., 2010).

2.3.7 Aislamiento

A la fecha, solo se conoce a la especie canina como huésped definitivo de CBoV, y se creía que su aislamiento en cultivo celular era muy restringido. Estudios previos describían a la línea celular WRCC como la única en la que se podía aislar a CBoV-1 (Binn et al., 1970). Sin embargo, se ha descrito que las células MDCK y A72 también son susceptibles a la infección por CBoV-1. Las líneas celulares bovinas y humanas soportan la replicación de manera menos eficiente, y células mononucleares en sangre periférica de caninos (PBMCs) han demostrado ser permisivas para la replicación de CBoV-1 *in vitro*.

En el caso de CBoV-2, se ha intentado sin éxito el aislamiento, por esta razón, se ha optado por técnicas como PCR, hibridación *in situ* y la secuenciación para su detección y caracterización (Bodewes et al., 2014).

3 PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

En México existen pocos datos sobre las cepas regionales de parvovirus canino tipo 2 (CPV-2) y la implicación que tienen las diferencias genéticas y antigénica tanto en la infectividad, la virulencia, la patogenia y el grado de protección que una cepa vacunal puede conferir contra cepas regionales de este virus en caninos. Por otro lado, el papel que juegan virus emergentes como bocavirus canino (CBoV) y circovirus canino (CCV) a nivel mundial en la población canina en la presentación de problemas digestivos como el síndrome de diarrea hemorrágica aguda (SDHA), que en la última década se ha estado asociando no solamente a monoinfecciones de CPV-2, sino también a coinfecciones con otros virus ADN (CBoV y CCV), con virus RNA y también agentes bacterianos. Si bien, en el norte de México se ha caracterizado genéticamente cepas de CPV-2 en base a la proteína VP2 y se ha detectado la presencia de CCV, CBoV-1 y 2 a través de PCR, no hay reportes publicados sobre la caracterización del genoma completo de estos virus en caninos con SDHA. Por otro lado, no existe información sobre si las diferencias genéticas de las cepas de CPV-2 se reflejen en una diferencia antigénica importante que permita que dichas cepas escapen a la respuesta inmune generada por las cepas vacunales de uso frecuente en la región y que confiera una diferencia significativa entre la virulencia, patogenicidad y epidemiología entre cepas regionales.

Derivado de lo anterior, el objetivo general de esta tesis es caracterizar genética y antigénicamente virus ADN presentes en el SDHA y en la gastroenteritis no hemorrágica (GE), mediante la detección, aislamiento y análisis genético y antigénico de cepas que circulan en caninos, para contribuir a una mejor comprensión de la epidemiología y patogenicidad de estos virus en caninos con SDHA y GE, y establecer fundamentos para el desarrollo de herramientas diagnósticas más precisas, así como para el fortalecimiento de estrategias de tratamiento, control y prevención de estas infecciones.

4 HIPÓTESIS

Existen diferencias genéticas y antigénicas en las cepas de virus ADN (CPV, CBoV y CCV) presentes en caninos con síndrome de diarrea hemorrágica aguda (SDHA) y gastroenteritis no hemorrágica (GE).

5 OBJETIVOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

5.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar genética y antigénicamente virus ADN presentes en el síndrome de diarrea hemorrágica aguda (SDHA) y en la gastroenteritis no hemorrágica (GE) a través de la detección, aislamiento, análisis genéticos y antigénicos de cepas que circulan en caninos.

5.1.1 Objetivos específicos

1. Aislar parvovirus canino, bocavirus canino y circovirus canino en cultivo celular a partir de muestras clínicas de caninos con SDHA y gastroenteritis no hemorrágica.
2. Caracterizar genéticamente cepas de CPV, CBoV y CCV a través de secuenciación y análisis del genoma completo o parcial de cepas que circulan en caninos con SDHA y gastroenteritis no hemorrágica.
3. Establecer las diferencias en las secuencias de aminoácidos presentes en proteínas virales de CPV, CBoV y CCV deducidas a partir de las secuencias del genoma.
4. Establecer si existen diferencias en los patrones de seroneutralización entre distintas cepas virales de CPV-2 con antisueros producidos a partir de cepas vacunales.

6 MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 MATERIALES DE LABORATORIO

6.1.1 Equipos y consumibles

Los equipos que fueron utilizados se enlistan en la siguiente tabla:

Tabla 1. Equipos utilizados en el proyecto

Nombre	Marca	Modelo
Campana de bioseguridad Clase II	Thermo Scientific	1300 SERIES A2
Campana para PCR	UVP	UV2
Centrífuga (Rotor para tubos de 2ml, 15ml y 50ml)	Labnet	Z300K
Fotodocumentador UV	AXYGEN	Axygen Gel Documentation System
Báscula digital	Denver Instrument	APX-200
Termociclador	Labnet	MULTIGENE OPTIMAX
Refrigerador 2 - 4°C	Torrey	BCD256
Agitador (Vórtex)	DAIGGER	Vórtex Genie 2
Congelador -20 °C	General Electric	FCM5FSWH
Congelador -80 °C	SANYO	MDF-C8V1
Congelador -150 °C	SANYO	MDFC2156VANC
Bloque térmico	Labnet	D1100
Cámara de electroforesis	Labnet	E0304
Fluorómetro Quantus TM	Promega	E6150
Micropipetas (1000/100 µl); (200/20 µl); (100/10 µl); (10/0.5 µl).	Labnet	Labnet BioPette A
Incubadora de CO ₂	SANYO	MCO-19AIC (UV)
Microscopio invertido	Carl Zeiss	Axiovert 40 CFL

Estufa/Baño maría	BOEKEL	148007
Pipetor manual	JOANLAB	NA
Cámara Fuchs-Rosenthal	BPAND-BLAU BRAND	NA

Dentro de los materiales consumibles que se utilizaron en el proyecto se encuentran los siguientes:

Tabla 2. Materiales consumibles

Nombre	Marca
Tubos Eppendorf (1.5 ml)	NEST
Tubos para PCR (0.2 ml y 0.5 ml)	NEST
Tubos para centrífuga (15 ml y 50 ml)	AXYGEN
Jeringas estériles (1 ml, 3 ml y 5 ml)	BD Plastipak
Puntillas para micropipeta (10 µl, 200 µl y 1000 µl)	NEST
Puntillas con filtro para micropipeta (10 µl, 200 µl y 1000 µl)	NEST
Pipetas serológicas (5 ml, 10 ml y 25 ml)	NEST
Filtros de membrana de polietersulfona (PES) (0.22 µm)	NEST
Cajas de cultivo celular (25 cm ²)	NEST
Cajas de cultivo celular (24 pozos)	NEST
Cajas de cultivo celular (96 pozos)	NEST

6.1.2 Sistemas comerciales, reactivos y soluciones utilizadas

El ADN total de las muestras clínicas se obtuvo con el sistema E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit marca OMEGA bio-tek (Número de catálogo D3396-01). Este estuche contiene material para realizar 50 reacciones, para las cuales se utiliza lo siguiente: 100 piezas de Tubos de 2 ml para recolección, 50 Mini Columnas de ADN HiBind®, 20 ml de solución Buffer BL, 25 ml de solución Buffer HBC (se

agregó 10 ml de 100% de isopropanol), 20 ml de solución Buffer TL, 15 ml de solución Buffer de lavado (se agregó 60 ml de 100 % de isopropanol), 1.5 ml de Proteinasa K en solución, así como 30 ml de solución Buffer de elución.

Para realizar la PCR (prueba de reacción en cadena de la polimerasa), fue utilizado el sistema PCR SuperMix de la marca Invitrogen (Número de catálogo 10572014). Este estuche contiene cuatro viales de 1.1X PCR SuperMix con 1.125 ml cada uno para un total de 100 reacciones, cada vial contiene 22 U/ml de Taq ADN Polimerasa, 55 mM de KCl, 22 mM de Tris-HCL (pH 8.4), 1.65 mM de MgCl₂, 220 µM de cada dNTP (dGTP, dATP, dTTP y dCTP), así como estabilizadores no especificados.

Para llevar a cabo la purificación de amplicones de PCR a partir de geles de agarosa, fue utilizado el sistema E.Z.N.A. ® Gel Extraction Kit de la marca OMEGA bio-tek (Número de catálogo D2500-01). Este estuche contiene material para un total de 50 reacciones, para las cuales se tienen 100 piezas de Tubos de 2 ml para recolección, 50 Mini Columnas de ADN HiBind®, 25 ml de solución Buffer de lavado SPW (se agregó 100 ml de 100 % de etanol), 40 ml de solución Binding Buffer XP2, así como 30 ml de Buffer de elución.

Para cuantificar el ADN de los amplicones purificados, se utilizó el sistema QuantiFluor® dsDNA System marca Promega (Número de catálogo: E2671). Este estuche contiene 1 ml de QuantiFluor® dsDNA Dye, 25 ml de 20X solución amortiguadora TE (pH 7.5) y un control positivo (Lambda DNA Standard a 100 µg/ml).

Los reactivos y soluciones que se utilizaron en el proyecto se enlistan a continuación:

- **Medio 1X DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) - Gibco™.** Alto contenido de glucosa, con piruvato y L-Glutamina.
- **100X Antibiótico-Antimicótico - Gibco™.** Contiene Penicilina (10,000 U/mL), Estreptomina (10,000 µg/mL) y Anfotericina B (25 µg/mL).

- **Suero Fetal Bovino - Gibco™.** Certificado en Estados Unidos, triple filtrado (0.1 μm).
- **Tripsina-EDTA (0.25 %) - Gibco™.**
- **Dimetilsulfóxido (DMSO) - Sigma Aldrich.**
- **Azul Tripano (0.4 %) - Gibco™.**
- **Bromophenol blue - Sigma-Aldrich.** No. Cat. 115-39-9
- **Colorante en gel para ácidos nucleicos GelRed® 10,000X - Biotium.** Se preparó una dilución 1:3 para su uso.
- **Solución amortiguadora SB (0.04 % NaOH, 0.225 % ácido bórico).** Fue elaborada una solución al 20X. Se diluyeron 2.24 g de ácido bórico y 0.4 g de NaOH en un litro de agua destilada. Se preparó una dilución al 1X para su uso.
- **Solución amortiguadora TAE.** Fue elaborada una solución al 50X. Se diluyó ácido acético glacial al 17.5 M (57.1 ml), Tris Base (242 g), EDTA al 0.5 M pH 8.0 (100 ml) y 1X 40 μM Tris-acetato/1 μM EDTA en un litro de agua destilada. Se preparó una dilución al 1X para su uso.
- **Solución salina amortiguadora con fosfato (PBS)**
- **Solución salina fisiológica**

6.1.3 Biológicos

Los biológicos utilizados en este proyecto fueron los siguientes:

- **Línea celular “Madin–Darby Canine Kidney” (MDCK) (ATCC® CCL-34™).**
- **Vacuna Vanguard Plus CPV (Zoetis).** CPV-2 vivo modificado, cepa NL-35-D, $>10^{7.2}$ TCID₅₀.
- **Vacuna Parvomune (Holland).** CPV-2 vivo modificado, cepa Cornell, mínimo $10^{2.5}$ DIC₅₀/50%.

6.2 METODOLOGÍA

6.2.1 Lugar de trabajo

El procesamiento junto con el análisis de las muestras fue realizado en los departamentos de Virología y Genética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

6.2.2 Área y tiempo de muestreo

Todas las muestras fueron tomadas a partir de caninos de distinta edad, raza y sexo que manifestaron signos clínicos de gastroenteritis hemorrágica, no hemorrágica y también sin signología aparente que hayan sido atendidos en diferentes clínicas veterinarias de pequeñas especies ubicadas en Monterrey y su zona metropolitana en el estado de Nuevo León en el transcurso de enero 2018 a diciembre 2023.

6.2.3 Tipo de muestra y preparación inicial de la muestra

Para realizar el aislamiento viral y caracterización genética de los virus fueron recolectadas muestras fecales e hisopados rectales de caninos con signología de gastroenteritis hemorrágica, no hemorrágica y sin signología aparente. Las muestras clínicas se recolectaron junto con los datos del paciente, historial clínico y registro de vacunación en una encuesta que se le entregó al veterinario (Anexo 1).

Las muestras de heces e hisopados rectales fueron recolectadas en tubos para centrífuga de 15 ml y transportadas en cadena fría al laboratorio de 12 a 24 horas posteriores a la recolección, en caso de no poder transportarlas en el lapso establecido las muestras se refrigeraron a 4 °C hasta su transporte.

En el laboratorio, las muestras de heces e hisopados rectales se resuspendieron en solución salina fisiológica y se agitaron por 5 minutos en un vórtex para que el material biológico quedara homogenizado en la solución. Esta solución fue

empleada para la extracción de ácidos nucleicos y fue conservada a -20 °C en caso de no usarse de inmediato.

Para el aislamiento viral, se utilizó una dilución 1:10 de la solución anterior en PBS que se centrifugó a 3,000 g por 10 minutos, y se hizo pasar a través de un filtro de membrana PES de 0.22 µm y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

Para las pruebas de seroneutralización, se recolectaron muestras de sangre de cabras inmunizadas con cepas vacunales de CPV-2 (Cornell y NL-D-35). Las muestras sanguíneas se recolectaron en tubos sin anticoagulante (10 ml), fueron transportadas en cadena fría al laboratorio de 12 a 24 horas posterior a su recolección. En caso de no poder transportarlas en el lapso establecido se refrigeraron a 4 °C hasta ser transportadas.

En el laboratorio, las muestras sanguíneas pasaron a centrifugarse a 1500 g por 5 minutos para separar el suero. Una vez obtenidos los sueros, se inactivaron en baño maría a 56 °C por media hora y se conservaron a 4 °C. De no poder trabajarse los antisueros en las próximas 48 horas éstos fueron conservados a -20 °C hasta su uso.

6.2.4 Metodología para realizar el Objetivo 1

El objetivo 1 consistió en el aislamiento de parvovirus canino, bocavirus canino y circovirus canino. Para ello, se extrajo el ADN de las muestras clínicas para la detección de los virus de estudio mediante un PCR de diagnóstico. Posteriormente, las muestras positivas se inocularon en cultivos de células MDCK y fueron incubadas hasta observarse el efecto citopático (ECP) en el cultivo. A continuación, se describe a detalle la metodología utilizada para completar este objetivo.

6.2.4.1 Extracción de ácidos nucleicos

A partir de las muestras clínicas, se extrajo el ADN con el sistema E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit. Este sistema se basa en la tecnología de mini columnas de

centrifugación con membrana de sílice, la cual permite la extracción de ADN mediante cuatro etapas: lisis celular, fijación del ADN a la membrana, lavado para eliminar impurezas y elución del ADN purificado. El procedimiento fue realizado conforme a las especificaciones del fabricante, descritas a continuación:

Para la lisis celular, se colocaron 250 μ l de cada muestra en microtubos (1.5 ml), junto con Proteinasa K (25 μ l) y Buffer TL (200 μ l). La mezcla fue homogenizada usando un vórtex y se incubó a 55 °C con agitación durante aproximadamente tres horas en baño maría, permitiendo la disrupción celular y la liberación del ADN. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas por cinco minutos a $\geq 10,000$ g, transfiriendo el sobrenadante en un microtubo nuevo, evitando romper el pellet al fondo del tubo.

Para la unión del ADN a la membrana de sílice, 220 μ l de Buffer BL fueron añadidos al sobrenadante recuperado, mezclándose vigorosamente mediante vórtex. La mezcla fue incubada por 10 minutos a 70 °C para favorecer esta unión. Después, 220 μ l de etanol al 100 % fueron agregados y se mezcló nuevamente. Toda la preparación se transfirió a la mini columna de sílice (Mini Columna de ADN HiBind®), esta última se colocó dentro de un microtubo colector de 2 ml, incluyendo cualquier precipitado formado. Tras una centrifugación durante un minuto a velocidad máxima, el ADN se unió a la membrana de sílice de la columna, mientras que el filtrado fue descartado.

Para el lavado de la columna, 500 μ l de Buffer HBC fueron añadidos y se centrifugó durante 30 segundos a velocidad máxima. Posteriormente, la mini columna se transfirió a un nuevo microtubo colector y se realizaron dos lavados consecutivos con 700 μ l de Buffer de lavado, con una centrifugación de 30 segundos a velocidad máxima después de cada lavado. La mini columna vacía fue centrifugada a velocidad máxima durante dos minutos para eliminar completamente los residuos de etanol que pudieran interferir con los pasos posteriores.

Finalmente, para recuperar el ADN purificado, se transfirió la mini columna a un microtubo de 1.5 ml libre de nucleasas, se añadió Buffer de elución precalentado a 70 °C (100-200 µl), incubándose por dos minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó durante un minuto a velocidad máxima. Este procedimiento se repitió una segunda vez para maximizar el rendimiento de la recuperación del ADN. Finalmente, el ADN fue almacenado a -20 °C hasta su empleo.

6.2.4.2 PCR de diagnóstico

Tras la obtención de ADN, se llevaron a cabo las prueba de PCR para diagnosticar a CCV, CBoV-2, CBoV-1 y CPV-2 en las muestras clínicas.

Para el diagnóstico de CPV-2 se utilizaron los oligonucleótidos (primers) CPV2748F y CPV4527R (Cedillo, 2019) que amplifican un fragmento del gen VP2 de 1779 pb.

El PCR de diagnóstico para CCV fue realizado con los oligonucleótidos previamente diseñados por Busqueta (2020), que amplifican un fragmento del gen CAP de 393 pb (CCV/CAP/1517 (forward) y CCV/CAP/1908 (reverse)).

De igual forma, para diagnosticar a CBoV-1, fueron utilizados los oligonucleótidos previamente diseñados (CBoV/NP1/2305 (forward) y CBoV1/NP1/2678 (reverse)), que producen un fragmento amplificado del gen NP1 de 253 pb (Busqueta, 2020).

El diagnóstico de CBoV-2 se realizó con los oligonucleótidos diseñados en estudios previos (CBoV/NP1/2305 (forward) y CBoV2/NP1/2520 (reverse)), que amplifican un fragmento del gen NP1 de 215 pb (Busqueta, 2020).

Para realizar la prueba de PCR fue utilizado el sistema PCR SuperMix marca Invitrogen. Cada reacción de PCR fue de 25 µl de volumen total, 2 µl de la muestra de ADN, 0.5 µl al 50 µM de cada uno de los oligonucleótidos (forward y reverse) y 22 µl de 1.1X PCR SuperMix.

Las condiciones empleadas para la amplificación por PCR se establecieron de la siguiente manera: una etapa de desnaturalización por cinco minutos a 94 °C; posteriormente se programaron 30 ciclos compuestos de tres fases, una desnaturalización por 30 segundos a 94 °C, un alineamiento de oligonucleótidos durante 30 segundos a 60 °C y una extensión a 72 °C por un minuto; finalmente, se incluyó una etapa de extensión final a 72 °C por 10 minutos.

Para determinar la positividad de las muestras clínicas, los productos amplificados de PCR fueron cargados dentro de un gel al 1.5 % de agarosa en solución amortiguadora SB al 1X y fueron separados en una cámara de electroforesis a 120 V por 60 minutos. Después, se observaron en un transiluminador UV con fotodocumentador y para determinar su tamaño, fueron comparados con un marcador de peso molecular. Las muestras positivas a PCR se procesaron para el aislamiento viral.

6.2.4.3 PCR-RFLP

Las muestras positivas a CPV-2 fueron sometidas a un PCR-RFLP donde se establecieron los patrones de digestión que realiza la endonucleasa Mbo II en un fragmento del gen VP2 de 1779 pb (Figura 9), empleando el método de Buonavoglia como referencia (Cedillo, 2019).

Para realizar la reacción de PCR-RFLP, fueron utilizados 5 µl del fragmento de 1779 pb obtenido, 1 µl de tampón CutSmart 10X, 3 µl de agua libre de endonucleasas y 1 U de la endonucleasa Mbo II, para tener un volumen final de 10 µl dentro de un microtubo para PCR. La mezcla de reacción fue incubada durante 60 minutos a 37 °C y fue sometida a una inactivación enzimática durante 15 minutos a 65 °C. Posteriormente, los productos digeridos enzimáticamente fueron analizados mediante electroforesis en un gel al 1.5 % de agarosa. Finalmente, el patrón de digestión del fragmento de 1779 pb se registró mediante un fotodocumentador.

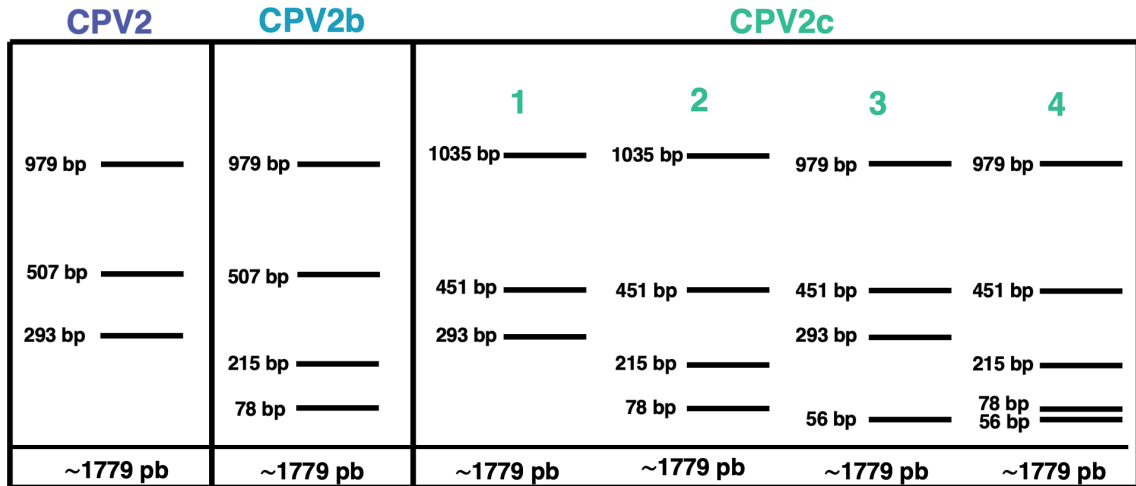


Figura 9. Patrones de polimorfismo en el gen de la proteína VP2. Se muestran los diferentes patrones de corte en un fragmento del gen VP2 de 1779 pb con un protocolo de PCR-RFLP basado en el método de Buonavoglia, usando la endonucleasa Mbo II, diferenciando los subtipos CPV-2, CPV-2b y CPV-2c.

6.2.4.4 Aislamiento viral

El procedimiento de aislamiento viral se realizó con la línea celular *Madin-Darby Canine Kidney* (MDCK), propagadas en cajas de 25 cm² para cultivo celular, en medio para cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) enriquecido con 5 % de suero fetal bovino (SFB) y 1 % de antibiótico/antimicótico para prevenir contaminación fúngica y/o bacteriana.

El aislamiento viral fue realizado en placas de 24 pozos para cultivo. En cada placa se inocularon 7 muestras por triplicado a volúmenes de 100 µl, 25 µl y 5 µl, y se dejaron 3 pocillos sin inocular como control celular (Figura 10).

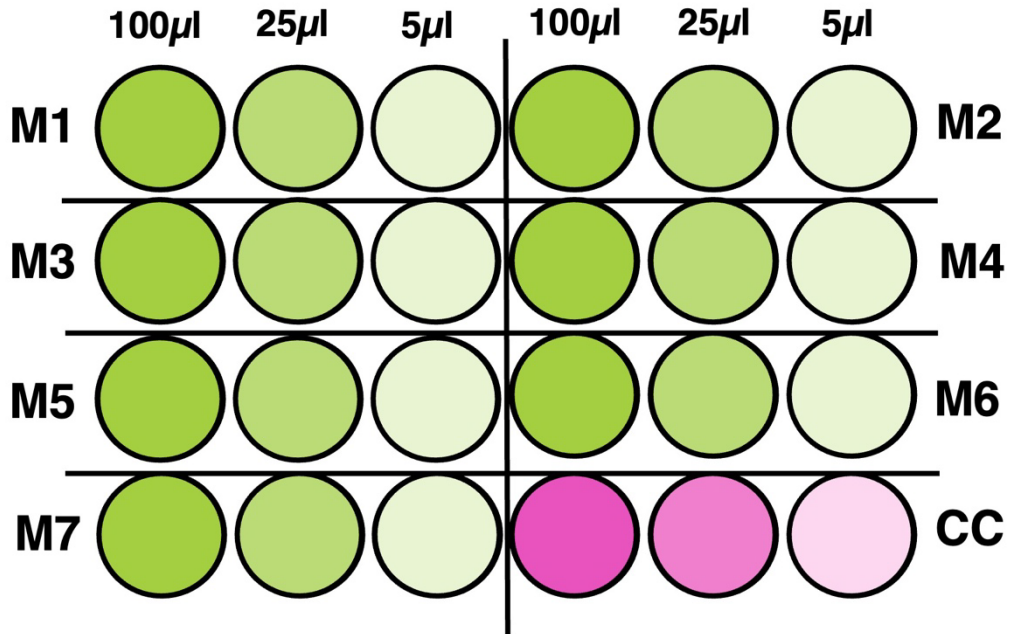


Figura 10. Representación esquemática de una placa de cultivo celular de 24 pozos utilizada en el presente trabajo. De color verde se muestran los pocillos utilizados para inocular 7 muestras distintas (M) a volúmenes de 100 µl, 25 µl y 5 µl. Los pocillos utilizados para el control celular (CC) se muestran en rosa.

El protocolo de aislamiento fue el siguiente:

En todos los pozos se cultivaron células MDCK hasta alcanzar una confluencia de 60 %. Se retiró el sobrenadante de cada pozo para realizar un lavado del cultivo con 200 µl medio DMEM y después del lavado se desechó el sobrenadante. Se agregaron 200 µl medio DMEM suplementado con antibiótico/antimicótico al 1 % en todos los pocillos y se inocularon las células con 100 µl, 25 µl y 5 µl de las muestras procesadas y filtradas. La placa fue incubada por 60 minutos a 37 °C en una incubadora de CO₂ a 95 % de humedad y pasado este tiempo de incubación, el sobrenadante fue descartado de los pocillos y 400 µl de medio DMEM enriquecido con 1 % de antibiótico/antimicótico y 5 % de SFB fueron agregados. Después, la placa fue incubada a 37 °C en la incubadora de CO₂ de 3-7 días hasta observar el efecto citopático (ECP) en el cultivo celular.

Cuando se presentaron coinfecciones de dos o más virus, se realizaron tres pasajes en ciego.

Después de realizar los pasajes en ciego se tomaron los sobrenadantes de los cultivos que presentaron ECP para extraer el ADN y realizar PCR de diagnóstico para CCV, CBoV-2, CBoV-1 y CPV-2 para confirmar el aislamiento de un solo virus.

6.2.5 Metodología para realizar el Objetivo 2

El objetivo 2 consistió en caracterizar genéticamente a circovirus canino, bocavirus canino y parvovirus canino mediante secuenciación y análisis del genoma completo o parcial de cepas que circulan en caninos con SDHA y GE. Para ello, se diseñaron oligonucleótidos que amplificaran el genoma de los virus de estudio en su totalidad. Después, los fragmentos amplificados fueron recuperados y purificados del gel de agarosa para su posterior secuenciación. Posteriormente, con el programa DNASTAR Lasergene v.15 fueron analizadas las secuencias obtenidas. La metodología detallada se menciona a continuación.

6.2.5.1 Diseño de oligonucleótidos

Para diseñar los oligonucleótidos se llevó a cabo una búsqueda en la base de datos del GenBank de secuencias completas de CCV, CBoV-2, CBoV-1 y CPV-2, de las cuales se seleccionaron las que abarcaran tanto las regiones codificantes como los UTR's 5' y 3'. Se alinearon las secuencias seleccionadas con el programa MegAlign Pro/DNASTAR Lasergene v.15 donde se buscaron las zonas más conservadas del genoma de cada uno de los virus para diseñar los oligonucleótidos. Con el programa NCBI/Primer-BLAST se realizó el diseño de los oligonucleótidos y la confirmación de su especificidad (Ye et al., 2012). Se seleccionaron los oligonucleótidos que amplificaran un fragmento de entre 1000 y 2000 pb aproximadamente y que tuvieran una temperatura promedio de hibridación de 60 °C. La síntesis de los oligonucleótidos fue realizada por la empresa Integrated DNA Technologies (IDT) en Estados Unidos.

6.2.5.2 Condiciones del PCR para amplificar el genoma completo de los virus

Las condiciones de amplificación empleadas para la reacción de PCR consistieron en: un ciclo inicial de desnaturalización durante cinco minutos a 95 °C; continuado por 40 ciclos de tres temperaturas, una desnaturalización por 30 segundos a 95 °C, un alineamiento de oligonucleótidos durante 30 segundos a 60 °C y una extensión del segmento por 30 segundos a 72 °C; y un ciclo final de extensión por 10 minutos a 72 °C.

6.2.5.3 Purificación de los productos de PCR y secuenciación

Para purificar los productos amplificados de interés se utilizó el sistema E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit. Este sistema, al igual que el E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit, utiliza columnas con membrana de sílice para la recuperación y purificación eficiente de productos de PCR a partir de geles de agarosa. El procedimiento comprende la disolución del fragmento de gel mediante un buffer de unión especializado, la adsorción del ADN a la membrana de sílice, la eliminación de impurezas mediante etapas de lavado y la recuperación del ADN purificado mediante elución. El procedimiento fue realizado conforme a las especificaciones del fabricante, descritas a continuación:

Para la unión del ADN a la columna, fueron separados por electroforesis los productos de PCR en un gel al 0.8 % de agarosa en solución amortiguadora TAE por 60 minutos a 120 V, se cortó la sección del gel que contenga la banda correspondiente a purificar y fue transferido a un microtubo de 1.5 ml. Por cada 0.100 g de agarosa fueron añadidos 100 µl de Binding Buffer XP2 y la mezcla fue incubada a 60 °C durante aproximadamente 7 minutos, con agitación periódica, hasta lograr la completa disolución del gel. La solución resultante fue transferida a una Mini Columna de ADN HiBind® colocada en un microtubo colector de 2 ml. La transferencia se realizó en alícuotas de hasta 700 µl, seguidas de centrifugación a 10,000 g durante 1 minuto, repitiendo este procedimiento hasta procesar la totalidad de la muestra. Durante esta etapa, el ADN fue fijado en la

membrana de sílice de la columna. Posteriormente, fueron añadidos 300 μ l adicionales de Binding Buffer XP2 y la columna fue centrifugada durante un minuto a velocidad máxima para favorecer la unión completa del ADN a la matriz.

Para el lavado de la columna fue necesario eliminar restos de agarosa, sales y otras impurezas. Para ello, la columna fue sometida a dos lavados consecutivos con 700 μ l de Buffer de lavado SPW (previamente diluido con etanol al 100 %). Después de cada lavado, la columna fue centrifugada durante un minuto a velocidad máxima y el filtrado fue descartado. Una vez finalizados los lavados, la columna vacía fue centrifugada durante 2 minutos a velocidad máxima para garantizar la remoción de residuos de etanol que pudieran interferir con los pasos posteriores. Después, la Mini Columna de ADN HiBind® fue colocada en un nuevo microtubo de 1.5 ml.

La elución del ADN purificado se realizó mediante la adición de 30-50 μ l de Buffer de elución sobre el centro de la membrana de la columna. Después de un periodo de incubación a temperatura ambiente durante dos minutos, la columna fue centrifugada por un minuto a velocidad máxima, permitiendo la elución del ADN retenido. El ADN purificado obtenido fue almacenado a -20 °C hasta su empleo.

La concentración de ADN de los fragmentos purificados se verificó con el sistema QuantiFluor® dsDNA System y se analizó con el equipo Quantus™ Fluorometer de la marca Promega. Los productos amplificados con ≥ 30 ng/ μ l de concentración de ADN fueron enviados a la empresa Psomagen en Estados Unidos para su secuenciación.

6.2.5.4 Edición y análisis de secuencias

Tras la obtención de los ferogramas, el programa EditSeq/DNASTAR Lasergene v.15 fue utilizado para editar las secuencias de nucleótidos y después fueron comparadas con las secuencias que han sido reportadas en la plataforma GenBank/NCBI con el programa NCBI/BLASTN para establecer la identidad de

las secuencias. Posteriormente, se efectuó el ensamblaje del genoma de cada virus con las secuencias editadas.

Con el programa MegAlign Pro/DNASTAR Lasergene v.15 fueron realizados los análisis filogenéticos. Para cada virus de estudio se realizó un alineamiento múltiple de secuencias reportadas en el GenBank y las obtenidas en este estudio. A partir de estos alineamientos de secuencias se compararon las pares de bases y usando el método de Kimura doble parámetro fue posible establecer la divergencia genética entre las secuencias(Kimura, 1980).

Partiendo de la matriz de divergencia genética, utilizando el método Neighbour-Joining fue construido un dendrograma (Saitou y Nei, 1987), y para otorgarle un soporte estadístico a las clados de secuencias en el dendrograma, fue realizado un “Bootstrap” (Felsenstein, 1985) de mil repeticiones.

6.2.6 Metodología para realizar el Objetivo 3

El objetivo 3 consistió en establecer las diferencias en las secuencias aminoacídicas de cada una de las proteínas de los virus de estudio deducidas a partir de las secuencias de nucleótidos. Posteriormente, se efectuó un alineamiento de dichas secuencias con el propósito de detectar las sustituciones de aminoácidos presentes en los diferentes genes de los virus de estudio. A continuación se describe detalladamente la metodología para cumplir con este objetivo.

6.2.6.1 Análisis de las secuencias de aminoácidos

Para cada una de las secuencias obtenidas, fueron determinadas las secuencias de nucleótidos correspondientes para cada uno de los genes de los virus de estudio. En el caso de CPV-2, se analizaron los genes NS1, NS2, VP1 y VP2; para CBoV los genes NS1, NP1 y VP2.

Una vez determinadas las secuencias nucleotídicas de cada gen, se efectuó un alineamiento de secuencias con el programa MegAlign Pro/DNASTAR Lasergene

v.15, donde se emplearon las secuencias obtenidas en este trabajo y las secuencias de referencia descargadas de la base de datos GenBank, con el objetivo de identificar las mutaciones puntuales presentes en los diferentes genes de los virus de estudio. Posteriormente, mediante el mismo programa, fueron inferidas las secuencias de aminoácidos con base en las secuencias de nucleótidos para determinar si las mutaciones puntuales identificadas correspondieron a mutaciones con cambio de sentido.

Empleando el método de Kimura de doble parámetro, fue determinada la variación aminoacídica de las proteínas virales (Kimura, 1980) y, a partir de la matriz de distancias aminoacídicas, fue construido un dendrograma empleando el método Neighbour-Joining (Saitou y Nei, 1987). Para brindar soporte estadístico a los clados de secuencias en el dendrograma, se efectuó un análisis de "Bootstrap" con mil repeticiones (Felsenstein, 1985).

6.2.7 Metodología para realizar el Objetivo 4

El objetivo 4 consistió en establecer las diferencias en los patrones de seroneutralización entre distintas cepas virales de CPV-2 con antisueros producidos a partir de cepas vacunales. Para ello, se elaboraron antisueros policlonales con cepas vacunales de CPV-2 en cabras. Para determinar los patrones de seroneutralización, los antisueros fueron enfrentados contra diferentes variantes de CPV-2 aisladas de pacientes con SDHA y GE, especialmente aquellas que presentaron mutaciones en la proteína de la cápside. A continuación se menciona detalladamente la metodología para cumplir con este objetivo.

6.2.7.1 Producción de antisueros policlonales contra CPV-2

Para la producción de antisueros policlonales contra CPV-2, se utilizaron dos cabras hembras de raza indistinta, mayores a seis meses de edad y clínicamente sanos. Las cabras se mantuvieron en el Centro de Exposiciones Agropecuarias

del Campus de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Nuevo León en el periodo de marzo a mayo del 2024.

Previo a la inmunización, se les realizó un examen físico a las cabras para corroborar que se encontraran en buen estado de salud, posteriormente se tomaron muestras sanguíneas con el fin de confirmar la ausencia de anticuerpos anti-CPV-2 y utilizar el suero obtenido como control negativo.

Cada animal fue inmunizado con una cepa vacunal distinta de CPV-2. Una cabra se inmunizó con la cepa vacunal NL-35-D y la otra cabra con la cepa vacunal Cornell. Las inmunizaciones se llevaron a cabo de la siguiente manera: Se inocularon las cabras al día 0 y al día 15 con 2 ml de la cepa vacunal vía subcutánea. Se tomaron muestras sanguíneas a los 30 días post inoculación para la obtención de los antisueros policlonales. En la siguiente tabla se describe el calendario de inmunizaciones.

Tabla 3. Calendario de inmunizaciones utilizado para la producción de antisueros policlonales

	Cepa vacunal de CPV-2	TCID ₅₀ /ml	Día 0	Día 15	Día 30
Cabra 1	NL-35-D	>10 ^{7.2} TCID ₅₀	1. Toma de muestra sanguínea. 2. Inoculación de la vacuna vía SC.	1. Inoculación de la vacuna vía SC.	1. Toma de muestra sanguínea.
Cabra 2	Cornell	>10 ^{2.5} TCID ₅₀	1. Toma de muestra sanguínea. 2. Inoculación de la vacuna vía SC.	1. Inoculación de la vacuna vía SC.	1. Toma de muestra sanguínea.

6.2.7.2 Conteo celular

Tanto para la titulación viral como para las pruebas de seroneutralización fue necesario contar con una cantidad definida de células, por lo que el conteo celular fue realizado con la siguiente metodología:

A una caja de cultivo de 25 cm² con células MDCK a una confluencia del 90–95 % se le retiró y desechó el sobrenadante. Después, las células fueron lavadas cuidadosamente en forma de cascada con 3 ml de medio DMEM con una pipeta serológica de 5 ml y el sobrenadante fue descartado. A continuación, se añadieron 2 ml al 0.25 % de Tripsina-EDTA (volumen suficiente para cubrir la monocapa celular) y la caja fue incubada por 5 min. en una incubadora de CO₂. Finalizada la incubación, la caja de cultivo se agitó suavemente para favorecer el desprendimiento celular. Posteriormente, 3 ml de medio DMEM fueron añadidos y las células se homogeneizaron mediante pipeteo con una pipeta serológica de 5 ml. La suspensión de células se transfirió a un tubo de 15 ml y fue centrifugada a temperatura ambiente por 5 minutos a 4000 g. Tras la centrifugación, el sobrenadante se desechó, preservando el pellet celular, el cual fue reconstituido en 5 ml de medio DMEM mediante agitación suave en un vórtex. Para el conteo celular, se preparó una mezcla de 90 µl al 0.4 % de Azul Tripano con 10 µl de la suspensión celular, obteniendo una dilución 1:10. Posteriormente, se colocó un portaobjetos sobre la cuadrícula de una cámara de Fuchs-Rosenthal, dejando el espacio correspondiente entre el borde del portaobjetos y la cámara. Se añadió una gota de la mezcla celular en el borde del portaobjetos, permitiendo que la solución cubriera la cuadrícula por capilaridad. Utilizando un microscopio invertido, se realizó el conteo de células en los cuatro cuadrantes mayores dispuestos diagonalmente de la cámara Fuchs-Rosenthal (Figura 11A). Se contabilizaron todas las células viables y morfológicamente íntegras presentes dentro del cuadrante, así como aquellas localizadas sobre las líneas del borde izquierdo e inferior (Figura 11B).

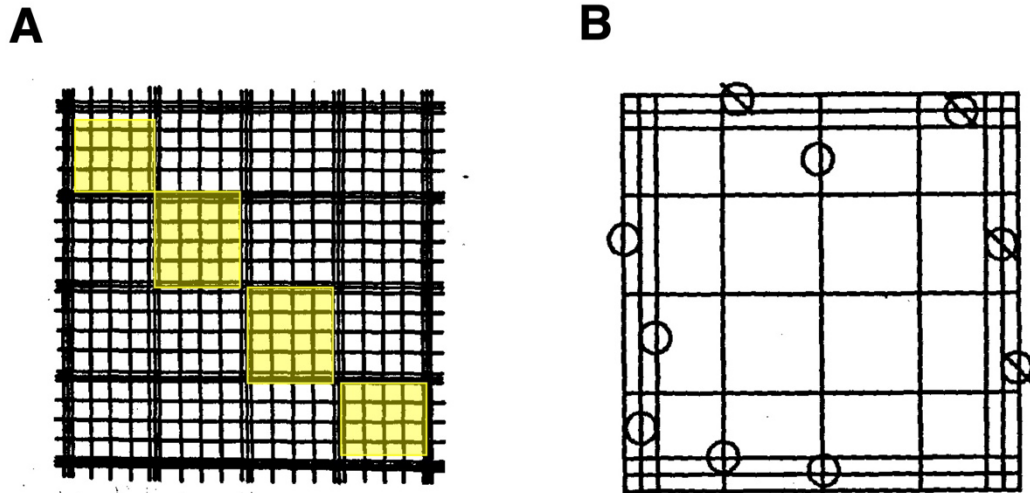


Figura 11. Cuadrículas de la cámara Fuchs-Rosenthal. A. Campo de conteo de la cámara de Fuchs-Rosenthal, se utilizaron los 4 cuadrantes sombreados en amarillo. **B.** Cuadrante de cámara de conteo; Ø No se contaron estas células, O Células que se tomaron en cuenta en el conteo.

Finalmente, para estimar la concentración celular, fue utilizada la siguiente fórmula:

$$n \times 4 \times V \times \frac{1000}{3.2} = \text{Células / ml}$$

$$n \times V \times 1250 = \text{Células / ml}$$

Donde:

n = Suma de las células en los 4 cuadrantes

V = Factor de dilución

6.2.7.3 Titulación de los virus stock

Previo a las pruebas de seroneutralización, se calculó la dosis media infectiva en cultivo celular (TCID₅₀) de las cepas aisladas de CPV-2 que se utilizaron. El procedimiento fue de la siguiente manera:

En una placa para cultivo de 96 pozos, fueron agregados 100 μl de medio DMEM 1X a todos los pocillos que se utilizaron (4 filas por muestra y 2 filas para control celular). Después se añadieron 25 μl de la muestra a titular en los pocillos A1, B1, C1 y D1 y 25 μl de medio DMEM 1X en los pocillos F1 y G1. Con una micropipeta multicanal se tomaron 25 μl de los pocillos A1, B1, C1 y D1 y se pasaron a los pocillos A2, B2, C2 y D2, se homogenizó y fueron tomados 25 μl para pasar a los pocillos A3, B3, C3 y D3 y así sucesivamente hasta los pocillos A12, B12, C12 y D12, esto para tener diluciones quíntuples seriadas (Figura 12). Se realizó lo mismo para los pocillos control. Por último, se agregaron 100 μl de una suspensión celular al 1.25×10^5 en medio DMEM 1X enriquecido con antibiótico/antimicótico al 1 % y SFB al 10 % en todos los pocillos. Posteriormente, la placa fue incubada de 3-7 días a 37 °C con 5 % de CO₂ hasta observarse el ECP.

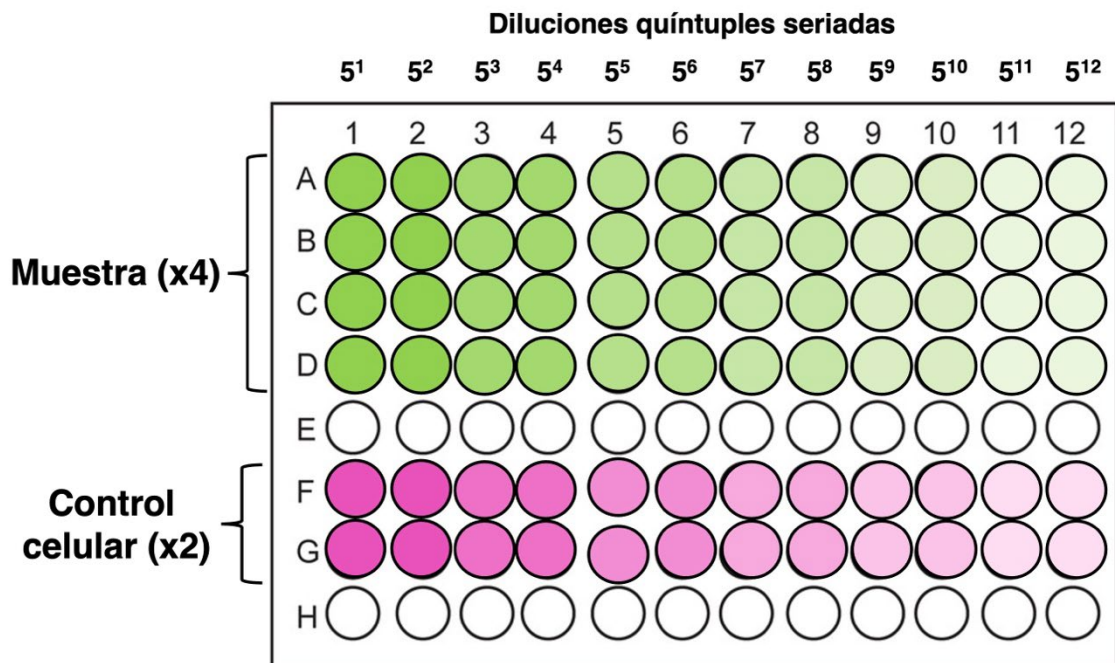


Figura 12. Representación esquemática de una placa de cultivo celular de 96 pozos utilizada en la titulación viral. De color verde se muestran los pocillos utilizados para las diluciones quíntuples seriadas del virus a titular. Los pocillos utilizados para el control celular se muestran en rosa.

La titulación de los aislados, así como la dosis infectiva se determinó con la fórmula de Spearman-Kärber de la siguiente manera:

$$\text{Título} = D^{-R}$$

$$\text{Dosis} = -\log_{10} (D^{-R}) \text{ } [\log_{10} \text{ND}_{50}] \text{ esto es } [\log_{10} \text{TCID}_{50}]$$

Donde:

R = Suma del valor r + 0.5

r = valores de reacción (Pozos con ECP / Número de replicados por dilución)

D = Factor de dilución

Los resultados se dieron como el logaritmo decimal de la dosis infectiva al 50 por ciento ($\log_{10}\text{TCID}_{50}$) ($-\log_{10}$ la dilución más alta del virus, con la cual se observa ECP en el 50 % de los replicados).

6.2.7.4 Pruebas de seroneutralización

Los sueros de prueba y controles fueron descongelados a temperatura ambiente y fueron mezclados empleando un vórtex. Los virus utilizados en el procedimiento se descongelaron y fueron diluidos para tener una concentración final de 100 $\text{TCID}_{50}/50 \mu\text{l}$ en medio DMEM y se conservaron en hielo hasta su uso.

Se probó el potencial de neutralización de los sueros generados con cepas homologas y heterólogas. En una placa de 96 pocillos fueron añadidos 150 μl de medio DMEM en los pocillos del A1-A4 hasta los pozos H1-H4; en los pocillos restantes se colocaron 100 μl de medio DMEM. Se colocaron 50 μl del suero positivo en los pocillos A5, A6, B5 y B6 y 50 μl de suero negativo en los pocillos A7, A8, B7 y B8. El contenido de los pocillos del B5-B8 se mezcló y se tomaron 50 μl para depositar en los siguientes pocillos, se mezclaron nuevamente y así se procedió hasta los pocillos del H5-H8. Se desecharon los últimos 50 μl de la última línea de pocillos. Después, se colocaron 50 μl del suero de prueba #1 en

los pocillos A9, A10, B9, B10 y 50 μ l del suero de prueba #2 en los pocillos A11, A12, B11 y B12. El contenido de los pocillos del B9-B12 se mezcló y se tomaron 50 μ l para depositar en los siguientes pocillos, se mezclaron nuevamente y así se procedió hasta los pocillos del H9-H12. Se desecharon los últimos 50 μ l de la última línea de pocillos. Posteriormente se colocaron 50 μ l del virus a una concentración de 100 TCID₅₀/50 μ l en los pocillos del B5-B12 hasta los pocillos H5-H12, cuidando de no tocar los bordes de los pocillos con la puntilla. En los pocillos del A1-A4 se colocaron 50 μ l del virus a una concentración de 100 TCID₅₀/50 μ l, se homogenizó perfectamente y 50 μ l fueron tomados para depositar en los siguientes pocillos, se mezclaron nuevamente y así se procedió hasta los pocillos del G1-G4. Se desecharon los últimos 50 μ l de la última línea de pocillos. Los pocillos del H1-H4 se utilizaron como control celular. En la figura 13 se muestra la organización de la placa de 96 pocillos para la prueba de seroneutralización. Antes de agregar las células indicadoras, la placa fue incubada por 60 minutos a 37 °C en una incubadora de CO₂. Por último, se agregaron a todos los pocillos 50 μ l de células MDCK a una concentración de 1.25×10^5 cel/ μ l en medio DMEM enriquecido con antibiótico/antimicótico al 1 % y SFB al 10 % cuidando de no tocar los pocillos con la puntilla de la pipeta para evitar contaminaciones. La placa fue incubada a 37 °C en una incubadora de CO₂ por 3-7 días.

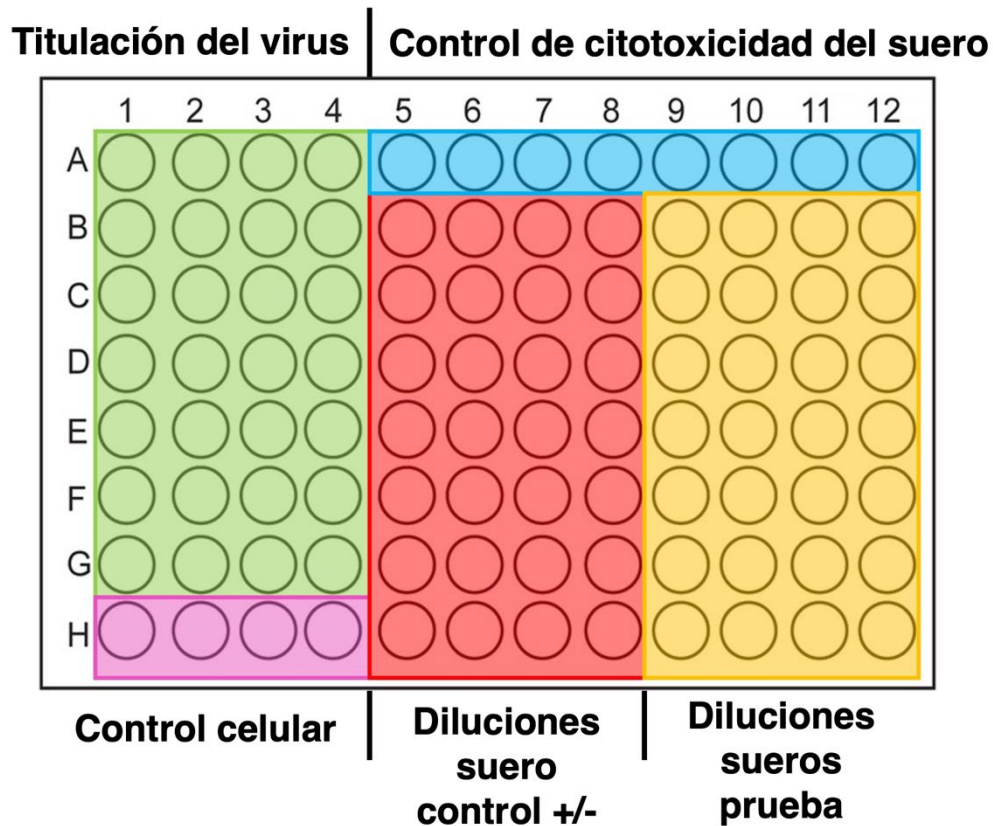


Figura 13. Representación esquemática de una placa de cultivo celular de 96 pocillos utilizada para las pruebas de seroneutralización. De color verde se muestran los pocillos utilizados para la titulación del virus stock. Los pocillos utilizados para el control celular se muestran en rosa. De color azul se muestran los pocillos utilizados para el control de citotoxicidad del suero. Los pocillos para las diluciones de los sueros control se muestran en color rojo. Los pocillos para las diluciones de los sueros de prueba se muestran de color amarillo.

Las placas se revisaron en un microscopio invertido, en busca de la presencia de ECP. La presencia de ECP se documentó como pocillo “positivo” y “negativo” en la ausencia de ECP. El título, así como la dosis de anticuerpos neutralizantes en los sueros de prueba se realizaron con la fórmula utilizada por Spearman-Kärber:

$$\text{Título} = D^{-R}$$

$$\text{Dosis} = -\log_{10} (D^{-R}) \quad [\log_{10} ND_{50}] \text{ esto es } [\log_{10} TCID_{50}]$$

Donde:

$R = \text{Suma del valor } r + 0.5$

$r = \text{valores de reacción (Pozos protegidos / Número de replicados por dilución)}$

$D = \text{Factor de dilución}$

Los resultados de las pruebas de seroneutralización se dieron como el logaritmo negativo de la dosis neutralizante al 50 por ciento ($-\log_{10}ND_{50}$) ($-\log_{10}$ la dilución más alta del suero, con la cual no se observa ECP en el 50 por ciento de los replicados). Un título $> 0.24 \log_{10}ND_{50}$ se tomó como neutralizante.

6.3 CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD

Este proyecto fue revisado por el Comité de Bioética y Bienestar Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UANL, y fue aprobado con el Dictamen 33/2022” con fecha de emisión el 29 de abril de 2022 (Anexo 1).

Este proyecto fue revisado por el Comité de Bioseguridad e Higiene de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UANL, y fue aprobado con el dictamen ID CSBH: 075 con fecha de emisión el 18 de mayo de 2022 (Anexo 2).

7 RESULTADOS

7.1 RESULTADOS DEL OBJETIVO 1

7.1.1 Área de muestreo

Las clínicas veterinarias que desearon participar en la recolección de muestras para este proyecto se localizan en los municipios de Apodaca, General Escobedo, Monterrey, San Nicolás de los Garza, Salinas Victoria, San Pedro y Santiago del estado de Nuevo León (Figura 14). Tras su recolección, fueron trasladadas de inmediato a la FMVZ para su procesamiento.



Figura 14. Localización geográfica por municipio de las clínicas que participaron en la recolección de muestras para el proyecto. Se observa un mapa de los municipios que

constituyen la zona metropolitana de Monterrey, Nuevo León, México. De color anaranjado se muestran los municipios que participaron en el proyecto.

Además, se entregó a los clínicos una encuesta en la que debían registrar la información de cada mascota, incluyendo su expediente clínico y registro de vacunación (Anexo 3).

7.1.2 Características de las muestras analizadas

Se recolectaron 151 muestras clínicas que fueron clasificadas dependiendo la signología presentada en tres grupos: pacientes con síndrome de diarrea hemorrágica aguda (SDHA), pacientes con gastroenteritis no hemorrágica (GE) y pacientes sin signología aparente (S/S). De las cuales 56 provenían de pacientes con SDHA, 71 de pacientes con GE y 24 de pacientes S/S.

La extracción de ADN de las muestras fue llevada a cabo para posteriormente realizar un PCR de diagnóstico para los virus CCV, CBoV-2, CBoV-1 y CPV-2.

De las 151 muestras clínicas analizadas, en 123 se detectó al menos uno de los virus de estudio, mientras que en 28 muestras no se identificó ninguno de ellos. En el Anexo 4 se describen los datos de cada una de las muestras recolectadas para este objetivo.

Se detectó a CPV-2 en 113 muestras, de las cuales 83 fueron monoinfecciones y 30 fueron coinfecciones con los otros virus de estudio. En la figura 15 puede observarse la electroforesis de un PCR de diagnóstico para CPV-2, donde se observan tres muestras positivas.

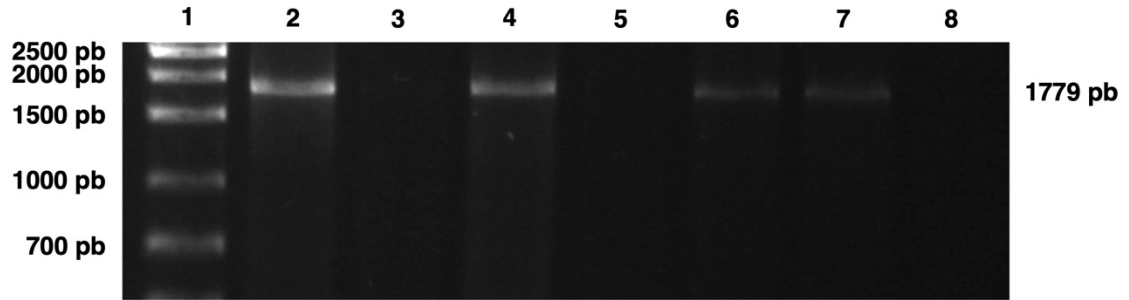


Figura 15. Electroforesis de PCR de diagnóstico para CPV-2. Carril 1, Marcador de peso molecular. Carril 2, control positivo. Carril 3, muestra 104 (-). Carril 4, muestra 105 (+). Carril 5, muestra 106 (-). Carril 6, muestra 108 (+). Carril 7, muestra 109 (+). Carril 8, control negativo (agua DEPC).

Se detectó a CBoV-1 en 22 muestras, de las cuales 5 fueron monoinfecciones y 17 coinfecciones. En la figura 16 puede observarse la electroforesis de un PCR de diagnóstico para CBoV-1, donde se observan cuatro muestras positivas.

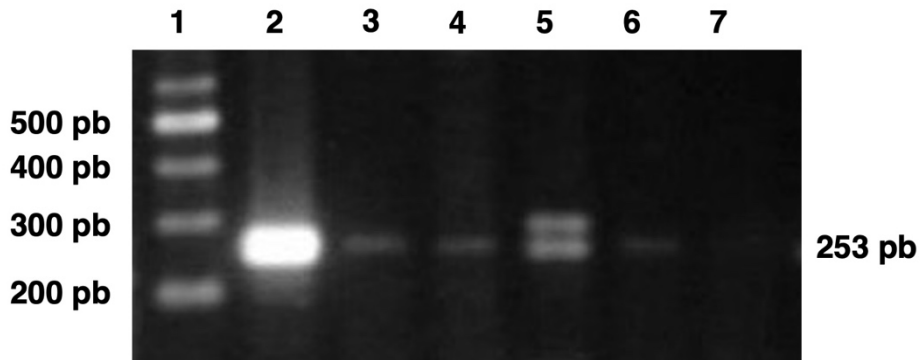


Figura 16. Electroforesis de PCR de diagnóstico para CBoV-1. Carril 1, Marcador de peso molecular. Carril 2, control positivo. Carril 3, muestra 22 (+). Carril 4, muestra 25 (+). Carril 5, muestra 28 (+). Carril 6, muestra 30 (+). Carril 7, control negativo (agua DEPC).

También se detectó a CBoV-2 en 15 muestras, de las cuales 3 fueron monoinfecciones y 12 coinfecciones. En la figura 17 se puede observar la

electroforesis de un PCR de diagnóstico para CBoV-2, donde se observan dos muestras positivas.

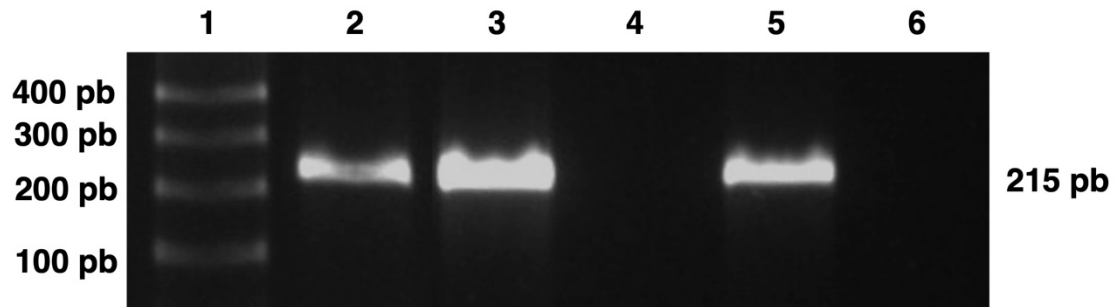


Figura 17. Electroforesis de PCR de diagnóstico para CBoV-2. Carril 1, Marcador de peso molecular. Carril 2, control positivo. Carril 3, muestra 127 (+). Carril 4, muestra 128 (-). Carril 5, muestra 129 (+). Carril 6, control negativo (agua DEPC).

Por otro lado, se detectó a CCV en 10 muestras donde todas fueron coinfecciones. En la figura 18 puede observarse la electroforesis de un PCR de diagnóstico para CVV, donde se observan tres muestras positivas.

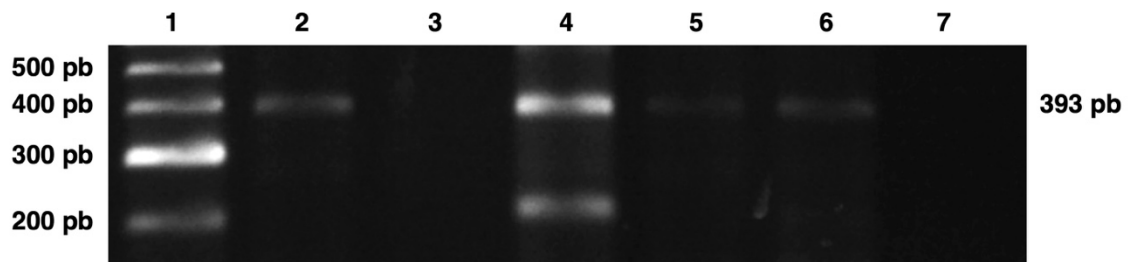


Figura 18. Electroforesis de PCR de diagnóstico para CCV. Carril 1, Marcador de peso molecular. Carril 2, control positivo. Carril 3, muestra 17 (-). Carril 4, muestra 18 (+). Carril 5, muestra 19 (+). Carril 6, muestra 20 (+). Carril 7, control negativo (agua DEPC).

Se detectaron un total de 91 monoinfecciones, de las cuales 83 fueron causadas por CPV-2, cinco por CBoV-1 y tres por CBoV-2. Por otro lado, se presentaron un total de 32 coinfecciones de dos o más virus. En la siguiente tabla se resume

la cantidad de muestras con monoinfecciones y coinfecciones, así como su clasificación de acuerdo con la signología observada.

Tabla 4. Monoinfecciones y coinfecciones presentadas en las muestras clínicas

Monoinfecciones / Coinfecciones	SDHA	GE	S/S
Monoinfecciones:			
CPV-2	33	49	1
CBoV-1	0	2	3
CBoV-2	0	1	2
Coinfecciones (2 virus):			
CPV-2, CBoV-1	6	6	0
CPV-2, CBoV-2	3	4	0
CPV-2, CCV	6	1	0
CBoV-1, CBoV-2	1	0	0
Coinfecciones (3 virus):			
CPV-2, CBoV-1, CCV	1	0	0
CPV-2, CBoV-2, CCV	1	0	0
CPV-2, CBoV1, CBoV-2	1	1	0
Coinfecciones (4 virus):			
CPV-2, CBoV1, CBoV-2, CCV	1	0	0
Negativos	3	7	18
TOTAL	56	71	24

7.1.3 Patrones de polimorfismo de CPV detectado por PCR-RFLP

Se estableció en 56 de las 113 muestras positivas a CPV-2 los patrones de polimorfismo en la proteína VP2 usando la endonucleasa Mbo II. De estas, 55 muestras presentaron un patrón compatible con el subtipo CPV-2c (Figura 19),

mientras que una muestra mostró un patrón compatible con el subtipo CPV-2b. En la tabla 5 se describe la cantidad de muestras que se obtuvieron con los diferentes patrones de corte de polimorfismo.

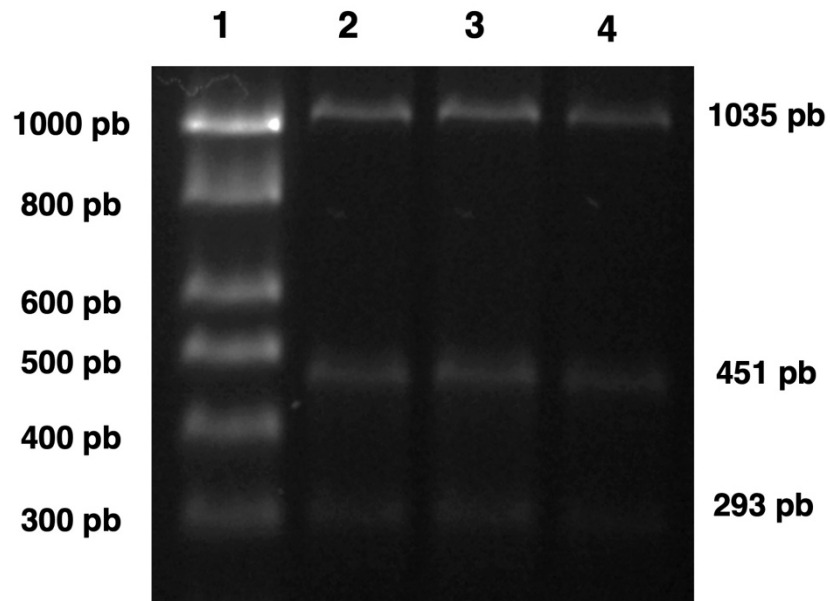


Figura 19. Electroforesis de PCR-RFLP de un fragmento del gen VP2 de 1779 pb. Se muestra el patrón de corte de 1035/451/293 en los carriles 2, 3, y 4. Carril 1, Marcador de peso molecular. Carril 2, muestra 42. Carril 3, muestra 94. Carril 4, muestra 151.

Tabla 5. Patrones de polimorfismo de un segmento de ADN de la proteína VP2 de cepas de CPV-2 obtenidas por PCR-RFLP

Subtipo/Patrón de corte, tamaño de fragmento obtenido con Mbo-II	Cantidad
CPV-2 (293/507/979)	0
CPV-2b (78/215/507/979)	1
CPV-2c (293/451/1035)	28
CPV-2c (78/215/451/1035)	10
CPV-2c (56/293/451/979)	11
CPV-2c (56/78/215/451/979)	6
TOTAL	56

7.1.4 Aislamiento viral

Para llevar a cabo el aislamiento viral, fueron utilizadas 51 muestras positivas a los virus de estudio de las cuales 31 provenían de pacientes con SDHA, 14 de pacientes con GE y seis de pacientes S/S.

Se realizó con éxito el aislamiento de CPV-2 de 32 muestras, 23 muestras de pacientes con SDHA, en ocho de pacientes con GE y en una muestra de un paciente sin signología.

El efecto citopático (ECP) causado por CPV-2 se caracterizó por la lisis celular, cambios morfológicos como el redondeamiento de las células y la formación de sincitios, así como también el desprendimiento de la monocapa (Figura 20), los cuales se observaron entre los días 4 y 5 posteriores a la inoculación.

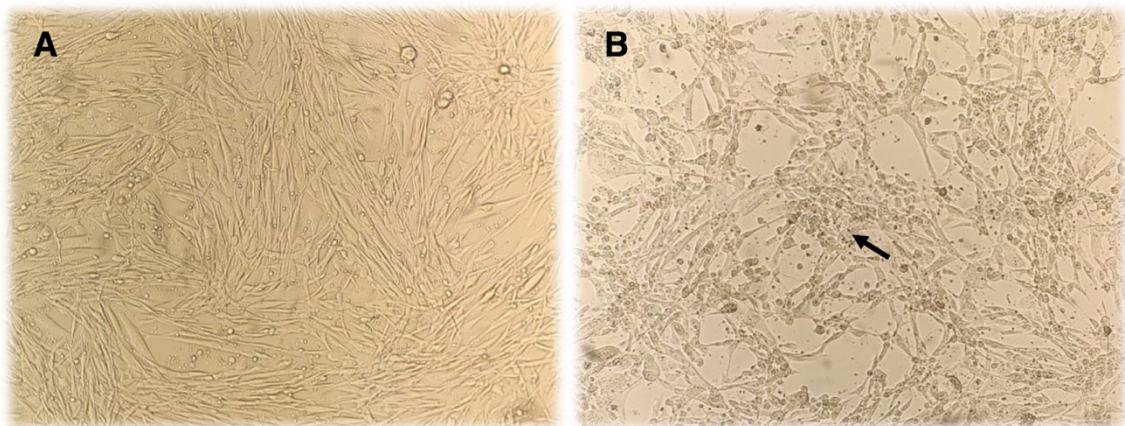


Figura 20. Células MDCK control e infectadas por CPV-2. A. Células MDCK sin infectar a una confluencia de 90 %. **B.** Efecto citopático (ECP) en células MDCK infectadas con CPV-2, se señala con una flecha el ECP observado en la monocapa al día 4 después de la inoculación.

De igual manera, se realizó con éxito el aislamiento de CBoV-1 de una muestra que provenía de un paciente con SDHA.

El ECP causado por CBoV-1, al igual que con CPV-2, se caracterizó por la lisis celular, células redondeadas, la formación de sincitios y el desprendimiento de la monocapa (Figura 21), visibles a partir del día 5 de la inoculación.

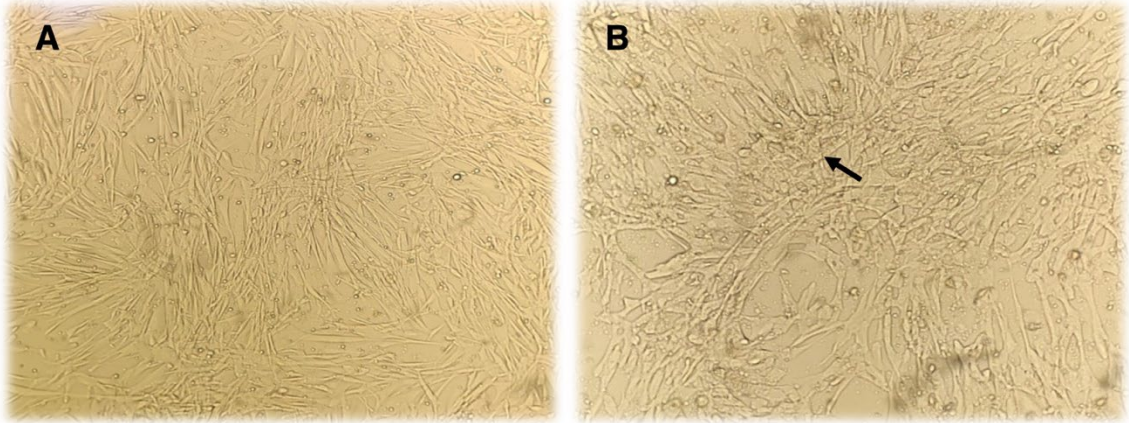


Figura 21. Células MDCK control e infectadas por CBoV-1. A. Células MDCK sin infectar a una confluencia de 95 %. **B.** Efecto citopático (ECP) en células MDCK infectadas con CBoV-1, se señala con una flecha el ECP observado en la monocapa al día 5 de la inoculación.

A pesar de que la presencia de CBoV-2 y CCV fue confirmada mediante PCR en las muestras, no se logró el aislamiento de ninguno de estos virus, ya que en ninguno de ambos casos se logró confirmar su replicación por PCR en los sobrenadantes después del cultivo.

A cada uno de los aislados obtenidos se le asignó la denominación MX-ABM, seguida del número correspondiente a la muestra de origen.

7.2 RESULTADOS DEL OBJETIVO 2

7.2.1 Diseño de oligonucleótidos

Mediante el programa MegAlign Pro/DNASTAR Lasergene v.15 fueron alineadas 34 secuencias completas de CPV-2 obtenidas del GenBank, que se utilizaron para diseñar cuatro pares de oligonucleótidos que en conjunto amplifican el genoma completo de CPV-2. En base al alineamiento, se seleccionaron las zonas

más conservadas del genoma y utilizando la cepa MX-ZAP-149-2015 con número de acceso MT448702 se diseñaron los oligonucleótidos con el programa NCBI/Primer-BLAST. Las secuencias de los oligonucleótidos, así como también sus especificaciones pueden consultarse en la tabla 6.

Para obtener la secuencia completa de CBoV-1 fueron diseñados cuatro pares de oligonucleótidos a partir de un alineamiento de nueve secuencias completas de CBoV-1 reportadas en el GenBank, la posición de los oligonucleótidos diseñados fue basada en la secuencia de CBoV-1 con número de acceso NC_004442. Las especificaciones de los oligonucleótidos para CBoV-1 pueden observarse en la tabla 7.

Para obtener la secuencia completa de CBoV-2 fueron diseñados cuatro pares de oligonucleótidos a partir de un alineamiento de nueve secuencias completas de CBoV-2 reportadas en el GenBank, los oligonucleótidos para amplificar el genoma de CBoV-2 se basaron en la cepa Con-161 con número de acceso JN648103. En la tabla 8 pueden consultarse las especificaciones de los oligonucleótidos para CBoV-2.

Fueron diseñados tres pares de oligonucleótidos para amplificar el genoma de CCV, seleccionados a partir de un alineamiento de 23 secuencias completas de CCV reportadas en el GenBank, la posición de los oligonucleótidos fue basada en la secuencia con número de acceso JQ821392. En la tabla 9 se encuentran descritas las secuencias de los oligonucleótidos, así como también sus especificaciones.

Tabla 6. Oligonucleótidos para la amplificación del genoma de CPV-2

Nombre	Secuencia (5'- 3')	Tamaño (nt)	Tm (°C)	Producto (pb)
CPV/1-72/FWD	ACGGCAGTCACACGTCATAC	20	60.39	1162
CPV/1-1233/REV	CACCTCCTGGTTGTGCCATC	20	60.96	
CPV/2-1060/FWD	AAACCACAGTGACGACAGCA	20	60.11	1410
CPV/2-2469/REV	CGGCGTCAGAAGGGTTAGTT	20	60.04	
CPV/3-2172/FWD	CACAAAGACGTGCAAGCGAG	20	60.38	1301
CPV/3-3472/REV	GGTGTGCCACTAGTTCCAGTATG	23	60.93	
CPV/4-3248/FWD	ATCTGCTACTCAGCCACCAAC	21	60.07	1706
CPV/4-4953/REV	TTGATTAAGCAGAGCAACCAACC	23	59.74	

Tabla 7. Oligonucleótidos para la amplificación del genoma de CBoV-1

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño (nt)	Tm (°C)	Producto (pb)
CBoV1/1-25/FWD	TGGAGGACGGAAGTGTGATTC	21	59.72	1242
CBoV1/1-1266/REV	CGGCGCACCCATTTACAAG	19	59.86	
CBoV1/2-1117/FWD	TGCCTAAGGTACCTGAATCTTCTTG	25	60.34	1408
CBoV1/2-2524/REV	TGGAGGACGATTGGTTCCTG	20	59.39	
CBoV1/3-2157/FWD	ACAGGTGAGATCCTTAATCACAATG	25	58.88	1506
CBoV1/3-3662/REV	TGAGACGTTGCCAGTCTTGT	20	59.54	
CBoV1/4-3507/FWD	CACGACAGTGGTATGCACCT	20	60.04	1589
CBoV1/4-5095/REV	AAACACACCCAGTGGTGACG	20	60.75	

Tabla 8. Oligonucleótidos para la amplificación del genoma de CBoV-2

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño (nt)	Tm (°C)	Producto (pb)
CBoV2/1-101/FWD	ATTGCGCTGTCTTGTGGTTG	20	59.69	1297
CBoV2/1-1397/REV	GTGAACCATCTGAAGCAAGGTC	22	59.51	
CBoV2/2-1273/FWD	GCTGCGAAAAGAATCACTTGC	21	59.02	1386
CBoV2/2-2658/REV	AGACCTCCATCGGAGTCGTC	20	60.75	
CBoV2/3-2535/FWD	CTTCAGAGTGGGGAGAGATGC	21	59.86	1524
CBoV2/3-4058/REV	TTCGTCAGGTCAGCCTGTAG	20	59.11	
CBoV2/4-3933/FWD	TGACGGGAGCCATCAGTTTC	20	60.04	1406
CBoV2/4-5338/REV	GGTAGCTTAGTTATGTGACGAGCA	24	60.44	

Tabla 9. Oligonucleótidos para la amplificación del genoma de CCV

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño (nt)	Tm (°C)	Producto (pb)
CCV/1-32/FWD	GAGATAGCCGGCGAGGTAAC	20	60.04	1072
CCV/1-1103/REV	CAAACGCCATTCAGTGTCACG	21	60.66	
CCV/2-1016/FWD	AGGGCGTTTACCTGTTCACC	20	60.25	1032
CCV/2-2047/REV	TGTGCTGTGTCTGTGACGAG	20	60.25	
CCV-FWD	CCGTCAAGATCAAGTGCTGTTC	22	59.84	2063
CCV-REV	AACCTCCACTTCCGTCTTCC	20	59.31	

7.2.2 Amplificación y secuenciación del genoma completo de CPV-2

Fue estandarizada la reacción de PCR para la amplificación del genoma de CPV-2 con las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización inicial (95 °C por 5 min); 40 ciclos de tres temperaturas, una desnaturalización (95 °C por 30 seg), un alineamiento (60 °C por 30 seg) y una extensión (72 °C por 30 seg); y un ciclo de extensión final (72 °C por 10 min).

Con el protocolo anterior fue posible obtener los fragmentos de 1162 pb, 1410 pb, 1301 pb y 1706 pb para CPV-2. En la figura 22 puede observarse la posición de los amplicones en el genoma y la electroforesis de los fragmentos amplificados por PCR.

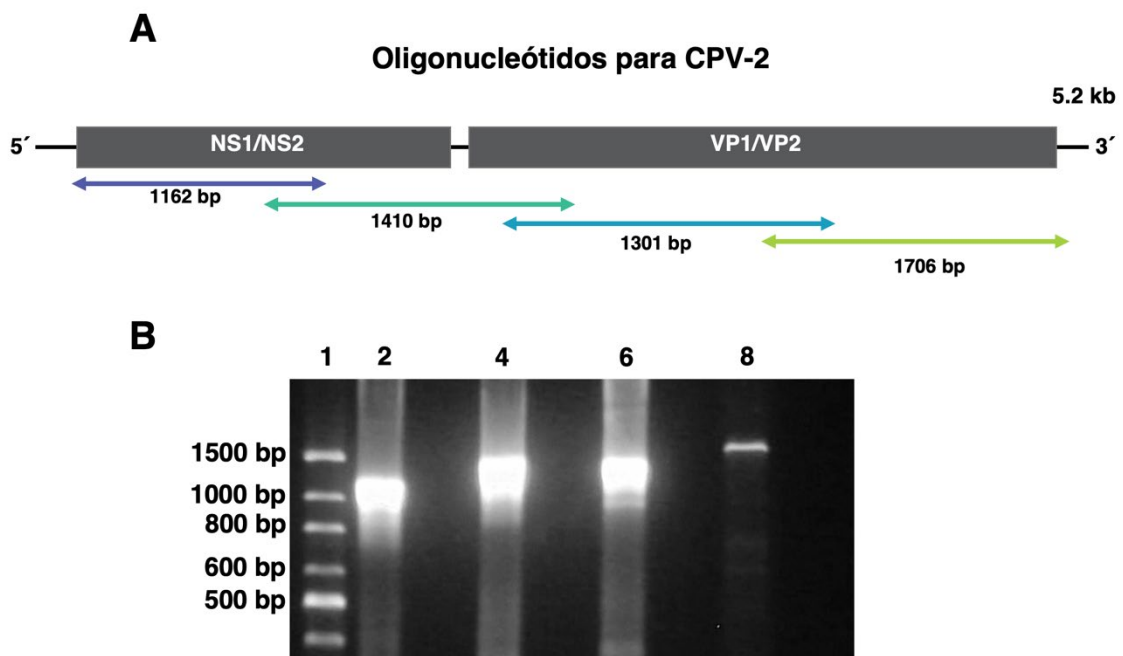


Figura 22. Amplificación del genoma completo de CPV-2. **A.** Esquema del genoma completo de CPV. Se muestra con líneas de doble flecha la posición de los amplicones esperados en el genoma. **B.** Electroforesis de PCR para el genoma completo de CPV-2 del aislado MX-ABM8. Carril 1, Marcador de peso molecular. Carril 2, fragmento de 1162 pb. Carril 4, fragmento de 1410 pb. Carril 6, fragmento de 1301 pb. Carril 8, fragmento de 1706 pb.

Se seleccionaron diez aislados de CPV-2 para secuenciar su genoma completo (MX-ABM4, MX-ABM8, MX-ABM15, MX-ABM19, MX-ABM24, MX-ABM37, MX-ABM55, MX-ABM56, MX-ABM69 y MX-ABM151), de los cuales seis correspondieron a casos de GE y cuatro de SDHA. La selección fue realizada considerando tanto la manifestación clínica observada como los distintos patrones de polimorfismo detectados en el gen VP2 mediante PCR-RFLP (Tabla 10).

Los fragmentos amplificados de 1162 pb, 1410 pb, 1301 pb y 1706 pb correspondientes a cada uno de los diez aislados de CPV-2 fueron enviados a secuenciación a la empresa Psomagen. Tras el ensamblaje de las secuencias obtenidas, se generaron diez secuencias completas del genoma de CPV-2. A partir de las secuencias se identificaron los genes que codifican para las proteínas NS1 (2007 pb), NS2 (498 pb), VP1 (2184 pb) y VP2 (1755 pb). Las secuencias completas de CPV-2 fueron depositadas en la base de datos GenBank. En la tabla 10 se puede consultar los números de acceso al GenBank de cada uno de los aislados.

Tabla 10. Especificaciones de las secuencias de CPV-2 obtenidas en este estudio

Aislado	Huésped	Signología presentada	Patrón de polimorfismo (RFLP) *	Longitud (pb)	Número de acceso GenBank
MX-ABM4	Canino	GE	4	4431	PQ683615
MX-ABM15	Canino	GE	1	4439	PQ683617
MX-ABM24	Canino	GE	2	4439	PX096633
MX-ABM37	Canino	GE	3	4609	PQ683619
MX-ABM55	Coyote	GE	3	4465	PQ065988
MX-ABM56	Coyote	GE	3	4469	PQ065989
MX-ABM8	Canino	SDHA	1	4368	PQ683616
MX-ABM19	Canino	SDHA	3	4370	PQ683618
MX-ABM69	Canino	SDHA	2	4368	PQ683620

* Los números representan el patrón de polimorfismo obtenido de acuerdo con la figura 9 del presente trabajo.

7.2.3 Amplificación y secuenciación del genoma completo de CBoV-1

Para amplificar el genoma completo de CBoV-1 fue utilizado el mismo protocolo de PCR que para CPV-2 mencionado anteriormente.

Se obtuvieron los fragmentos de 1242 pb, 1408 pb, 1506 pb y 1589 pb para CBoV-1. La electroforesis de los fragmentos obtenidos y su posición en el genoma de CBoV-1 puede observarse en la figura 23.

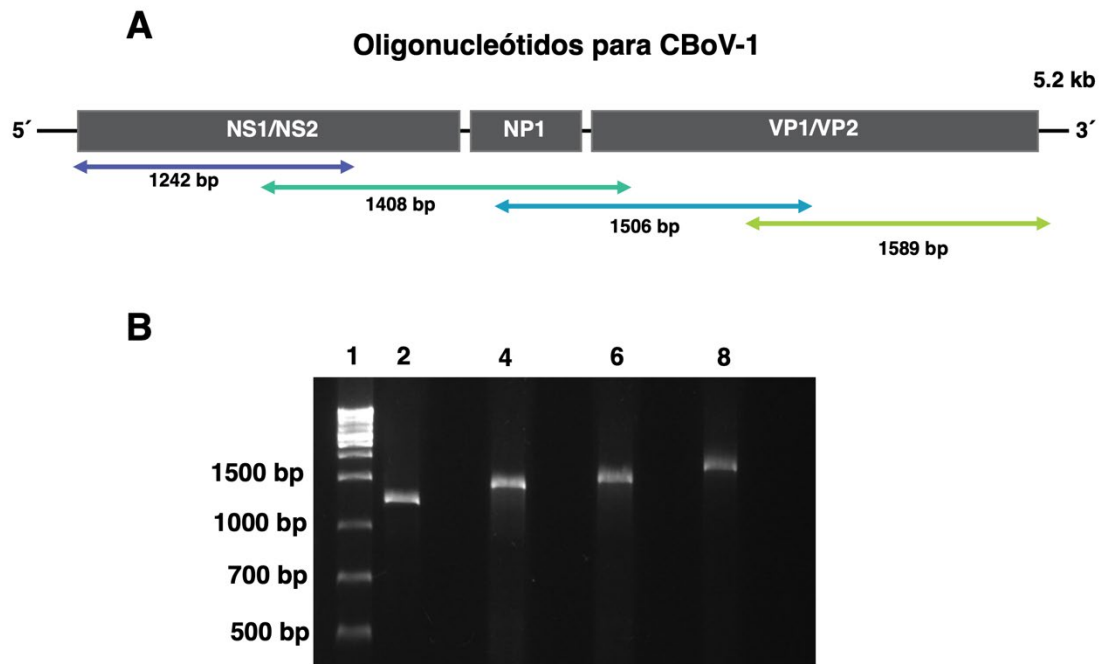


Figura 23. Amplificación del genoma completo de CBoV-1. A. Esquema del genoma completo de CBoV1. Se muestra con líneas de doble flecha la posición de los amplicones esperados en el genoma. **B.** Electroforesis de PCR para el genoma completo de CBoV-1 del aislado MX-ABM30. Carril 1, Marcador de peso molecular. Carril 2, fragmento de 1242 pb. Carril 4, fragmento de 1408 pb. Carril 6, fragmento de 1506 pb. Carril 8, fragmento de 1589 pb.

Se secuenció el aislado MX-ABM30, positivo a CBoV-1, de un paciente con SDHA. Se mandaron los fragmentos amplificados de 1242 pb, 1408 pb, 1424 pb y 1589 pb para su secuenciación a la empresa Psomagen. Después de ensamblar las secuencias obtenidas, se estableció una secuencia completa de CBoV-1 de 4973 pb en donde se identificaron los genes de las proteínas NS1 (2322 pb), NP1 (558 pb), VP1 (2109 pb) y VP2 (1713 pb). Esta secuencia se encuentra disponible en la base de datos del GenBank con el número de acceso PQ683622.

En el caso de los virus CBoV-2 y CCV, no fue posible estandarizar el PCR para la amplificación del genoma completo, ya que los oligonucleótidos diseñados no lograron amplificar los fragmentos correspondientes del genoma en los diferentes ensayos de PCR realizados.

7.2.4 Análisis filogenético de CPV-2

Utilizando el programa MegAlign Pro/DNASTAR Lasergene v.15 se alinearon 60 secuencias del genoma completo de CPV-2, de diferentes países y aisladas de diferentes especies, incluidas las secuencias de los aislados MX-ABM4, MX-ABM8, MX-ABM15, MX-ABM19, MX-ABM24, MX-ABM37, MX-ABM55, MX-ABM56, MX-ABM69 y MX-ABM151, además, se incluyó la cepa vacunal NL-35-D y como grupo externo se utilizaron las secuencias del virus de enteritis del mink (MEV) y el virus de panleucopenia felina (FPV). En el Anexo 5 se describen las especificaciones de las secuencias genéticas obtenidas del GenBank.

Se determinó que los aislados del presente trabajo presentaron una similitud del 98.6 al 99.7 % frente a las demás secuencias reportadas en el GenBank y una divergencia genética del 0.3 al 1.4 %, que equivale a una variación de hasta 60 pb entre las secuencias.

Con los datos obtenidos a partir del alineamiento se construyó un dendrograma (Figura 24), donde se identifican tres clados principales, a pesar de la alta similitud entre las secuencias analizadas. En uno de los clados predominan

secuencias provenientes de Sudamérica, otro clado está conformado exclusivamente por secuencias de México y Estados Unidos, mientras que el tercer clado incluye principalmente secuencias del continente asiático.

Las secuencias obtenidas en el presente estudio se distribuyeron en dos clados distintos. Los aislados MX-ABM4, MX-ABM37 y MX-ABM19 se agruparon en un clado con una amplia diversidad geográfica. Estos aislados mostraron una relación genética cercana con secuencias de Estados Unidos, sin embargo, en el clado también se incluyen secuencias reportadas en Ecuador, Argentina, Brasil, Perú y Uruguay.

Por otro lado, los aislados MX-ABM55, MX-ABM56, MX-ABM15, MX-ABM151, MX-ABM8, MX-ABM69 y MX-ABM24 se agruparon en el clado conformado únicamente por secuencias de México y Estados Unidos, indicando una mayor cercanía genética con cepas circulantes de la región.

Finalmente, los aislados MX-ABM55 y MX-ABM56, provenientes de coyotes, presentaron una relación genética cercana con los aislados MX-ABM15, MX-ABM151, MX-ABM8, MX-ABM69 y MX-ABM24.

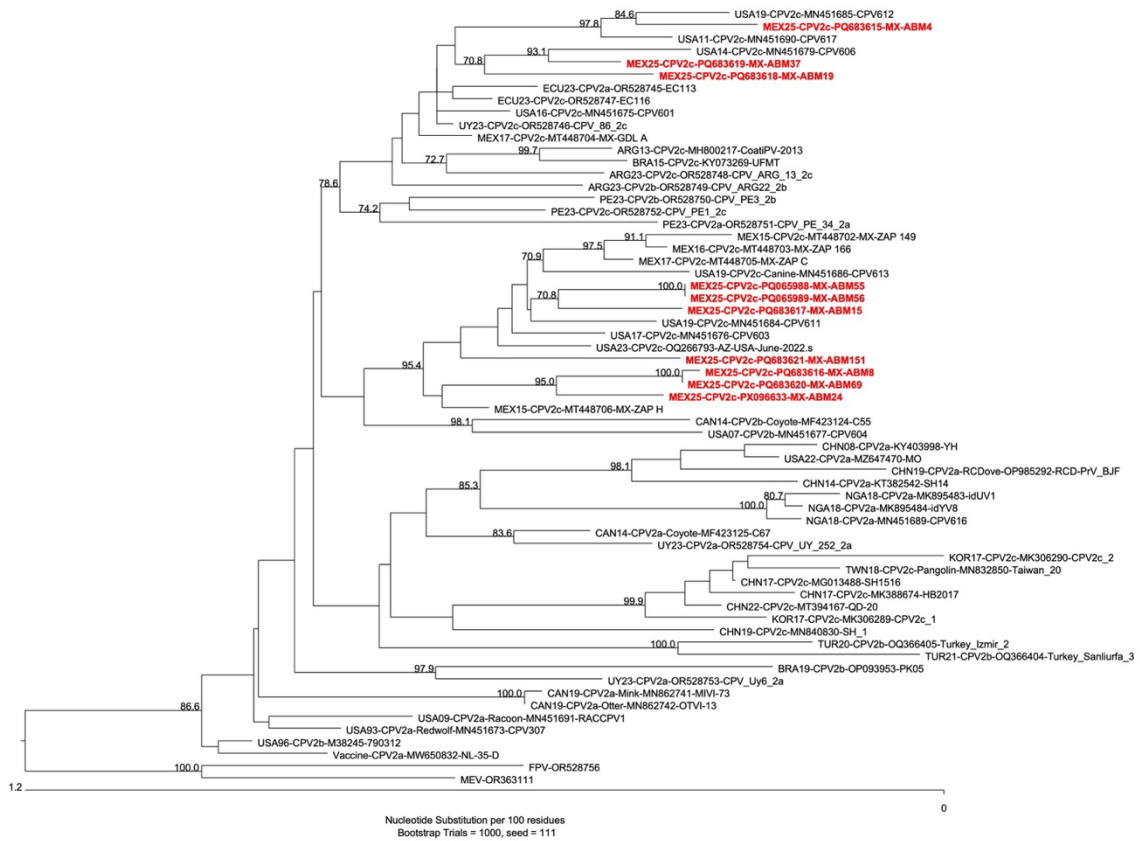


Figura 24. Dendrograma generado con el genoma completo de CPV-2. Con el programa MegaAlign/DNASTAR v.15 y utilizando el algoritmo Clustal W, se llevó a cabo un alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas completas de CPV-2. La divergencia genética fue determinada empleando el método Kimura 2-Parámetros (Kimura, 1980), el dendrograma fue elaborado con el método Neighbour-Joining (Saitou y Nei, 1987). La robustez estadística de los resultados se determinó utilizando un análisis “Bootstrap” de mil repeticiones (Felsenstein, 1985). Las secuencias del presente trabajo están marcadas con color rojo. Solo se muestran los valores de Bootstrap >70.

7.2.5 Análisis filogenéticos de CBoV-1

De igual manera, con el programa MegAlign Pro/DNASTAR Lasergene v.15 se alinearon 18 secuencias del genoma completo de CBoV-1, incluida la secuencia del aislado MX-ABM30, 6 secuencias del genoma completo de CBoV-2 y una secuencia del genoma completo de CBoV-3. En el Anexo 7 se describen las

especificaciones de las secuencias de CBoV-1, CBoV-2 y CBoV-3 obtenidas del GenBank.

Se determinó que el aislado MX-ABM30 presentó una similitud del 87.3 al 98.1% frente a las demás secuencias de CBoV-1 y una divergencia genética del 1.9 al 14%, que equivale a una variación de hasta 646 pb entre las secuencias. Por otro lado, el aislado MX-ABM30 presentó una similitud del 62 % frente a las secuencias de CBoV-2, con una divergencia genética de 55 % y una similitud de 59 % frente a la secuencia de CBoV-3, con una divergencia genética de 58 %.

Con los datos obtenidos a partir del alineamiento se construyó un dendrograma (Figura 25) en el cual se observa una agrupación de las secuencias por subtipo, identificándose tres clados correspondientes a CBoV-1, CBoV-2 y CBoV-3.

El aislado MX-ABM30 se agrupó dentro del clado de CBoV-1, revelando una estrecha relación genética con aislados de Estados Unidos y Portugal con un 98 % de similitud, así como también con aislados de Japón e Italia con 97 % de similitud.

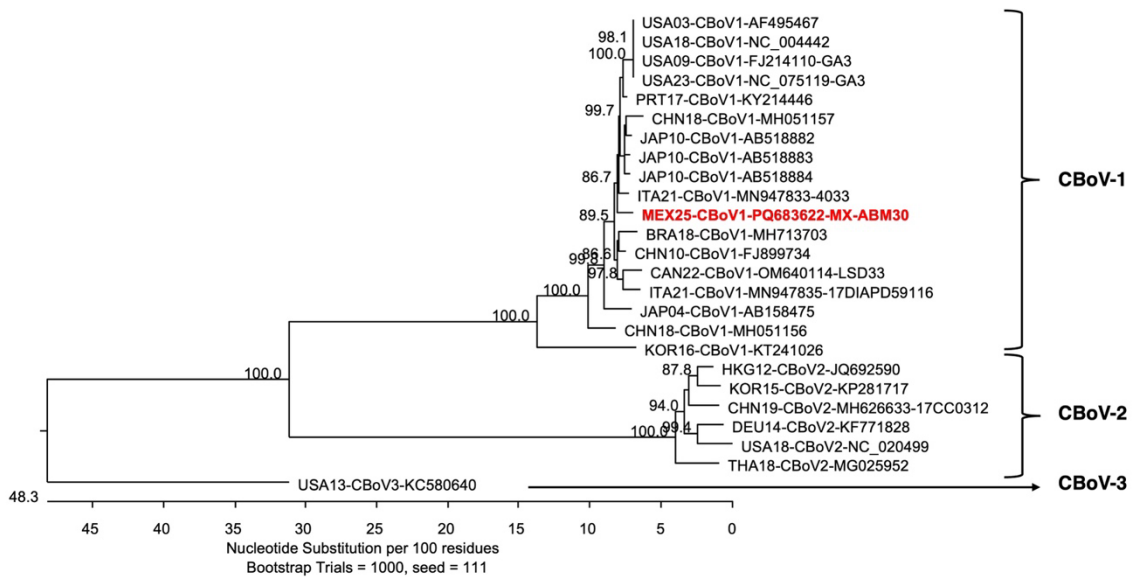


Figura 25. Dendrograma generado con el genoma completo de CBoV. Con el programa MegaAlign/DNASTAR v.15 y utilizando el algoritmo Clustal W, se llevó a cabo un alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas completas de CBoV-1, CBoV-2 y CBoV-3. La divergencia genética fue determinada empleando el método Kimura 2-Parámetros (Kimura, 1980), el dendrograma fue elaborado con el método Neighbour-Joining (Saitou y Nei, 1987). La robustez estadística de los resultados se determinó utilizando un análisis “Bootstrap” de mil repeticiones (Felsenstein, 1985). La secuencia del aislado MX-ABM30 está marcada con color rojo. Solo se muestran los valores de Bootstrap >80.

7.3 RESULTADOS DEL OBJETIVO 3

7.3.1 Análisis de las secuencias de aminoácidos de CPV-2

Mediante el programa MegAlign Pro/DNASTAR Lasergene v.15, fue realizado un alineamiento de secuencias nucleotídicas correspondientes a los genes completos de NS1 y NS2 de CPV-2, obtenidas de las secuencias completas de CPV-2 previamente reportadas en GenBank, junto con las secuencias de los aislados MX-ABM4, MX-ABM8, MX-ABM15, MX-ABM19, MX-ABM24, MX-ABM37, MX-ABM55, MX-ABM56, MX-ABM69 y MX-ABM151. A partir de este análisis, se identificaron un total de 31 mutaciones puntuales en el gen NS1 y siete mutaciones puntuales en el gen NS2.

Posteriormente, con base en las secuencias nucleotídicas de los aislados del presente trabajo, se determinaron las secuencias aminoacídicas de las proteínas NS1 (669 aa) y NS2 (166 aa).

De las 31 mutaciones puntuales identificadas en el gen NS1, nueve correspondieron a mutaciones con cambio de sentido: N351K, L354V, R369K, E530K, G573S, V596A, L597P, D603G y E621K. La sustitución R369K se detectó únicamente en un aislado proveniente de un paciente con SDHA. Por su parte, las sustituciones L354V, G573S y E621K se identificaron exclusivamente en aislados de pacientes con GE, mientras que las sustituciones N351K, E530K, V596A, L597P y D603G estuvieron presentes en aislados de pacientes con SDHA y GE (Figura 26).

Adicionalmente, las sustituciones N351K, E530K, G573S, L597P, D603G y E621K se clasificaron como no conservativas, dado que implican un cambio de aminoácidos con propiedades fisicoquímicas distintas. En la tabla 11 se describe de forma resumida el alineamiento de las secuencias de aminoácidos del gen NS1, donde los aislados del presente trabajo están sombreados y las sustituciones que presentaron se muestran en rojo.

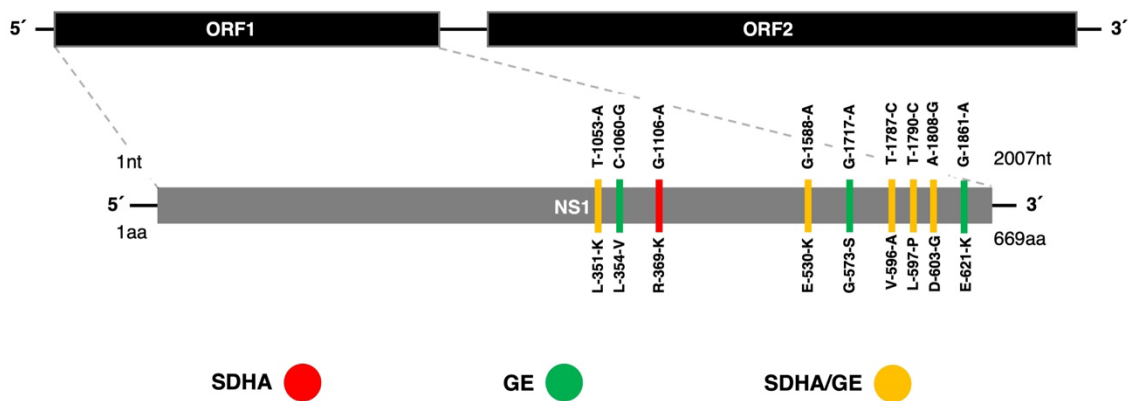


Figura 26. Mutaciones identificadas en el gen NS1 de CPV-2 de los aislados del presente estudio. En la parte superior se señala la posición del nucleótido correspondiente a la mutación, mientras que en la parte inferior se indica la sustitución del aminoácido asociada. De color rojo se muestran las sustituciones identificadas en los aislados con SDHA, de color verde las

sustituciones identificadas en los aislados con GE y en color amarillo las sustituciones identificadas tanto en aislados con SDHA y GE.

Por otro lado, de las siete mutaciones puntuales identificadas en el gen NS2, cuatro correspondieron a mutaciones con cambio de sentido: T94A, S109F, R130K y T135A. La sustitución T135A se detectó únicamente en un aislado de un paciente con SDHA, las sustituciones S109F y R130K se identificaron en aislados de pacientes con GE, mientras que la sustitución T94A estuvo presente en aislados de pacientes con SDHA y GE (Figura 27).

Asimismo, las sustituciones T94A, S109F y T135A correspondieron a cambios no conservativos. La comparación de las secuencias de aminoácidos del gen NS2 puede consultarse en la tabla 12, donde los aislados del presente trabajo están sombreados y las sustituciones que presentaron se muestran en rojo.

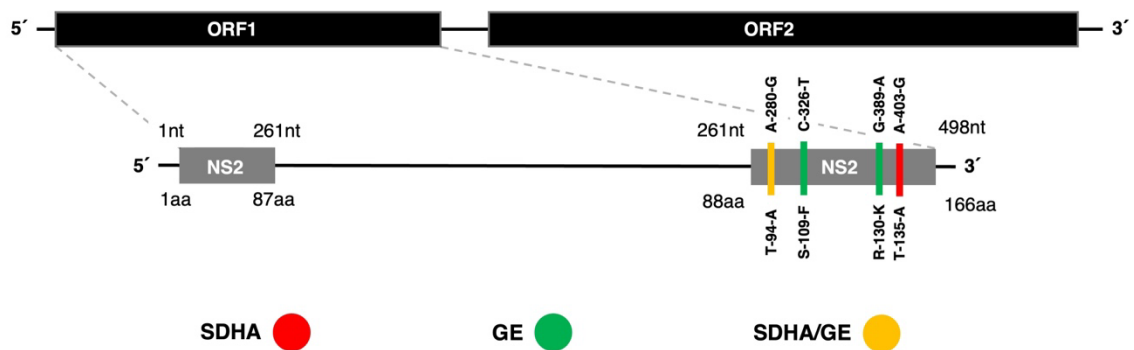


Figura 27. Mutaciones identificadas en el gen NS2 de CPV-2 de los aislados del presente estudio. En la parte superior se señala la posición del nucleótido correspondiente a la mutación, mientras que en la parte inferior se indica la sustitución del aminoácido asociada. De color rojo se muestran las sustituciones identificadas en los aislados con SDHA, de color verde las sustituciones identificadas en los aislados con GE y en color amarillo las sustituciones identificadas tanto en aislados con SDHA y GE.

Tabla 11. Cambios de aminoácidos en la proteína NS1 de CPV-2

Número de acceso GenBank	País	Huésped	Subtipo	Sustituciones de aminoácidos								
				N-351-K	L-354-V	R-369-K	E-530-K	G-573-S	V-596-A	L-597-P	D-603-G	E-621-K
OR528749	Argentina	Canino	CPV-2b	N	L	R	E	G	V	L	D	E
KY073269	Brasil	Canino	CPV-2c	K	L	R	E	G	V	L	D	E
MF423125	Canadá	Coyote	CPV-2a	N	L	R	E	G	V	L	D	E
MF423124	Canadá	Coyote	CPV-2b	N	L	R	E	G	V	P	G	E
OR528745	Ecuador	Canino	CPV-2a	N	L	R	E	G	V	L	D	E
MT448702	México	Canino	CPV-2c	N	L	R	K	G	V	P	G	E
MT448706	México	Canino	CPV-2c	N	L	R	K	G	V	P	G	E
MT448703	México	Canino	CPV-2c	N	L	R	K	G	V	P	G	E
MT448704	México	Canino	CPV-2c	N	L	R	E	G	V	L	D	E
MT448705	México	Canino	CPV-2c	N	L	R	K	G	V	P	G	E
PQ683615	México	Canino	CPV-2c	N	L	R	E	S	A	L	D	K
PQ683616	México	Canino	CPV-2c	N	L	R	K	G	V	P	G	E
PQ683617	México	Canino	CPV-2c	N	L	R	K	G	V	P	G	E
PQ683618	México	Canino	CPV-2c	K	L	K	E	G	A	L	D	E
PX096633	México	Canino	CPV-2c	N	L	R	K	G	V	P	G	E
PQ683619	México	Canino	CPV-2c	K	L	R	E	G	A	L	D	E
PQ065988	México	Coyote	CPV-2c	N	V	R	K	G	V	P	G	E
PQ065989	México	Coyote	CPV-2c	N	V	R	K	G	V	P	G	E
PQ683620	México	Canino	CPV-2c	N	L	R	K	G	V	P	G	E
PQ683621	México	Canino	CPV-2c	N	L	R	K	G	V	P	G	E
OR528750	Perú	Canino	CPV-2b	N	L	R	E	G	V	P	D	E
MN451677	EUA	Canino	CPV-2b	N	L	R	E	G	V	P	G	E
MZ647470	EUA	Canino	CPV-2a	N	L	R	E	G	V	L	D	E
OQ266793	EUA	Canino	CPV-2c	N	L	R	K	G	V	P	G	E
OR528753	Uruguay	Canino	CPV-2a	K	L	R	E	G	V	P	D	E
MW650832	China	NA	Vacunal	N	L	R	E	G	V	L	D	E

Tabla 12. Cambios de aminoácidos en la proteína NS2 de CPV-2

Número de acceso GenBank	País	Huésped	Subtipo	Sustituciones de aminoácidos			
				T-94-A	S-109-F	R-130-K	T-135-A
OR528749	Argentina	Canino	CPV-2b	A	S	R	T
KY073269	Brasil	Canino	CPV-2c	A	S	R	T
MF423125	Canadá	Coyote	CPV-2a	A	S	R	T
MF423124	Canadá	Coyote	CPV-2b	T	S	R	T
OR528745	Ecuador	Canino	CPV-2a	A	S	R	T
MT448702	México	Canino	CPV-2c	T	S	R	T
MT448706	México	Canino	CPV-2c	T	S	R	T
MT448703	México	Canino	CPV-2c	T	S	R	T
MT448704	México	Canino	CPV-2c	A	S	R	T
MT448705	México	Canino	CPV-2c	T	S	R	T
PQ683615	México	Canino	CPV-2c	A	S	K	T
PQ683616	México	Canino	CPV-2c	T	S	R	T
PQ683617	México	Canino	CPV-2c	T	S	R	T
PQ683618	México	Canino	CPV-2c	A	S	R	A
PX096633	México	Canino	CPV-2c	T	S	R	T
PQ683619	México	Canino	CPV-2c	A	S	R	T
PQ065988	México	Coyote	CPV-2c	T	F	R	T
PQ065989	México	Coyote	CPV-2c	T	F	R	T
PQ683620	México	Canino	CPV-2c	T	S	R	T
PQ683621	México	Canino	CPV-2c	T	S	R	T
OR528750	Perú	Canino	CPV-2b	A	S	R	T
MN451677	EUA	Canino	CPV-2b	T	S	R	T
MZ647470	EUA	Canino	CPV-2a	T	S	R	T
OQ266793	EUA	Canino	CPV-2c	T	S	R	T
OR528753	Uruguay	Canino	CPV-2a	T	S	R	T
MW650832	China	NA	Vacunal	T	S	R	T

Adicionalmente, se llevó a cabo un alineamiento de secuencias nucleotídicas correspondientes a los genes completos de VP1 y VP2 de CPV-2, obtenidas de las secuencias completas de CPV-2 previamente reportadas en GenBank, junto con las secuencias de los aislados MX-ABM4, MX-ABM8, MX-ABM15, MX-ABM19, MX-ABM24, MX-ABM37, MX-ABM55, MX-ABM56, MX-ABM69 y MX-ABM151, además, se incluyeron secuencias parciales de VP2 reportadas previamente en el GenBank. En el Anexo 6 se describen las especificaciones de las secuencias parciales de VP2 obtenidas del GenBank.

A partir de este análisis, se identificaron un total de 45 mutaciones puntuales en los genes VP1 y VP2 en los aislados del presente trabajo. Posteriormente, con base en las secuencias nucleotídicas de los aislados, se determinaron las secuencias aminoacídicas de la proteína VP1 (728 aa) y VP2 (585 aa).

De las 45 mutaciones puntuales identificadas en el gen VP2, seis correspondieron a mutaciones con cambio de sentido, que dieron lugar a las sustituciones N56D, V139I, T170I, T245P, D426E y T440A. La sustitución T245P se detectó únicamente en un aislado proveniente de un paciente con SDHA, la sustitución T170I se identificó exclusivamente en un aislado de un paciente con GE, mientras que las sustituciones N56D, V139I, D426E y T440A estuvieron presentes en aislados de pacientes con SDHA y GE (Figura 28). El gen VP1 presentó las mismas sustituciones que el gen VP2.

Adicionalmente, las sustituciones N56D, T170I, T245P y T440A se clasificaron como no conservativas. En la tabla 13 se presenta de manera resumida el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de VP2, en el que los aislados del presente estudio se muestran sombreados y las sustituciones de aminoácidos se indican en rojo.

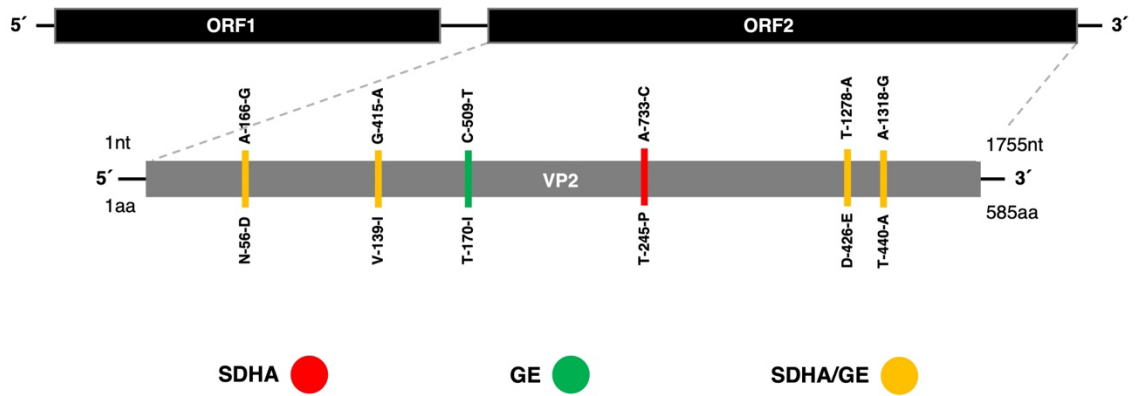


Figura 28. Mutaciones identificadas en el gen VP2 de CPV-2 de los aislados del presente estudio. En la parte superior se señala la posición del nucleótido correspondiente a la mutación, mientras que en la parte inferior se indica la sustitución del aminoácido asociada. De color rojo se muestran las sustituciones identificadas en los aislados con SDHA, de color verde las sustituciones identificadas en los aislados con GE y en color amarillo las sustituciones identificadas tanto en aislados con SDHA y GE.

Tabla 13. Cambios de aminoácidos en la proteína VP2 de CPV-2

Número de acceso GenBank	País/Estado	Huésped	Subtipo	Sustituciones de aminoácidos					
				N-56-D	V-139-I	T-170-I	T-245-P	D-426-E	T-440-A
OR528749	Argentina	Canino	CPV-2b	N	V	T	T	D	T
KY073269	Brasil	Canino	CPV-2c	N	V	T	T	E	T
MF423125	Canadá	Coyote	CPV-2a	N	V	T	T	N	T
MF423124	Canadá	Coyote	CPV-2b	N	V	T	T	D	T
OR528745	Ecuador	Canino	CPV-2a	N	V	T	T	E	T
MT448702	México/Gdl	Canino	CPV-2c	N	V	T	T	E	A
MT448706	México/Gdl	Canino	CPV-2c	N	V	T	T	E	T
MT448703	México/Gdl	Canino	CPV-2c	N	V	T	T	E	A
MT448704	México/Gdl	Canino	CPV-2c	N	V	T	T	E	T
MT448705	México/Gdl	Canino	CPV-2c	N	V	T	T	E	A
KY818846	México/Ags	Canino	CPV-2c	N	V	T	T	E	A
KY818850	México/BCN	Canino	CPV-2c	D	V	T	T	E	A
KY818853	México/BCN	Canino	CPV-2b	N	V	T	T	D	T
KY818859	México/Gto	Canino	CPV-2c	D	V	T	T	E	T
KY818860	México/Gto	Canino	CPV-2c	N	V	T	T	E	A
KY818864	México/Hgo	Canino	CPV-2c	D	V	T	T	E	T
KY818868	México/Hgo	Canino	CPV-2c	N	V	T	T	E	A
KY818854	México/EdoMex	Canino	CPV-2c	N	V	T	T	E	T
KY818855	México/EdoMex	Canino	CPV-2c	N	V	T	T	E	A
KY818857	México/EdoMex	Canino	CPV-2c	D	V	T	T	E	T
KY818869	México/Mich	Canino	CPV-2c	N	V	T	T	E	A
KY818874	México/Mor	Canino	CPV-2c	N	V	T	T	E	T
KY818877	México/Mor	Canino	CPV-2c	D	V	T	T	E	T
KY818879	México/Nay	Canino	CPV-2c	D	V	T	T	E	T
KY818881	México/Nay	Canino	CPV-2c	N	V	T	T	E	T
KY818883	México/Nay	Canino	CPV-2c	N	V	T	T	E	A
KY818884	México/Pue	Canino	CPV-2c	N	V	T	T	E	T
KY818885	México/Pue	Canino	CPV-2c	N	V	T	T	E	A
KY818886	México/Qro	Canino	CPV-2c	N	V	T	T	E	A

KY818887	México/Qro	Canino	CPV-2c	D	V	T	T	E	T
KY818889	México/Son	Canino	CPV-2c	N	V	T	T	E	A
KY818890	México/Tam	Canino	CPV-2c	N	V	T	T	E	T
KY818891	México/Tam	Canino	CPV-2c	D	V	T	T	E	T
KY818894	México/Tam	Canino	CPV-2c	N	V	T	T	E	A
KY818895	México/Yuc	Canino	CPV-2c	N	V	T	T	E	T
KY921600	México/NL	Canino	CPV-2c	N	V	T	T	E	A
KY921601	México/NL	Canino	CPV-2c	N	V	T	T	E	A
KY921602	México/NL	Canino	CPV-2c	D	V	T	T	E	T
KY921603	México/NL	Canino	CPV-2c	D	V	T	T	E	T
KY921604	México/NL	Canino	CPV-2c	N	I	T	T	E	A
KY921605	México/NL	Canino	CPV-2c	N	V	T	T	E	T
KY921606	México/NL	Vacuna	CPV-2	N	V	T	T	N	T
KY921607	México/NL	Vacuna	CPV-2	N	V	T	T	N	T
MH480646	México/NL	Canino	CPV-2c	D	V	T	T	E	T
MH480647	México/NL	Canino	CPV-2c	N	V	T	T	E	T
PQ683615	México/NL	Canino	CPV-2c	D	V	T	T	E	T
PQ683616	México/NL	Canino	CPV-2c	D	V	T	P	E	T
PQ683617	México/NL	Canino	CPV-2c	N	V	T	T	E	A
PQ683618	México/NL	Canino	CPV-2c	N	V	T	T	E	T
PX096633	México/NL	Canino	CPV-2c	D	V	I	T	E	T
PQ683619	México/NL	Canino	CPV-2c	N	V	T	T	E	T
PQ065988	México/NL	Coyote	CPV-2c	N	I	T	T	E	A
PQ065989	México/NL	Coyote	CPV-2c	N	I	T	T	E	A
PQ683620	México/NL	Canino	CPV-2c	D	V	T	T	E	T
PQ683621	México/NL	Canino	CPV-2c	N	I	T	T	E	A
OR528750	Perú	Canino	CPV-2b	N	V	T	T	D	S
MN451677	EUA	Canino	CPV-2b	N	V	T	T	D	T
MZ647470	EUA	Canino	CPV-2a	N	V	T	T	N	A
OQ266793	EUA	Canino	CPV-2c	N	V	T	T	E	A
OR528753	Uruguay	Canino	CPV-2a	N	V	T	T	N	T
MW650832	China	Vacuna	CPV-2	N	V	T	T	N	T

Con los datos obtenidos a partir del alineamiento de aminoácidos del gen VP2 se construyó un dendrograma (Figura 29), en el cual las secuencias se organizaron en cinco clados distintos, correspondiendo a los distintos subtipos de CPV-2.

En este dendrograma, las cepas vacunales se agruparon en un clado independiente correspondiente al subtipo CPV-2. En el clado correspondiente al subtipo CPV-2a se agruparon secuencias provenientes de China, Nigeria, Estados Unidos, Canadá y Uruguay. Por otro lado, el clado del subtipo CPV-2b lo conformaron secuencias de Argentina, Estados Unidos, Canadá, Perú y una de México.

Dentro del clado del subtipo CPV-2c se agruparon las secuencias de origen mexicano, incluidos los aislados del presente trabajo, junto con secuencias de Argentina, Estados Unidos, Brasil, Ecuador y Uruguay. Mientras que los aislados MX-ABM4, MX-ABM8, MX-ABM15, MX-ABM24, MX-ABM55, MX-ABM56, MX-ABM69 y MX-ABM151 se agruparon con cepas regionales y de Estados Unidos, los aislados MX-ABM19 y MX-ABM37 se agruparon en un subclado con cepas de Brasil, Ecuador y Uruguay.

Por otro lado, los aislados provenientes de los coyotes (MX-ABM55 y MX-ABM56) mostraron una estrecha relación aminoacídica con los aislados MX-ABM15 y MX-ABM151.

Adicionalmente se formó un segundo clado más pequeño del subtipo CPV-2c, sin embargo, este clado contiene exclusivamente secuencias de origen asiático.

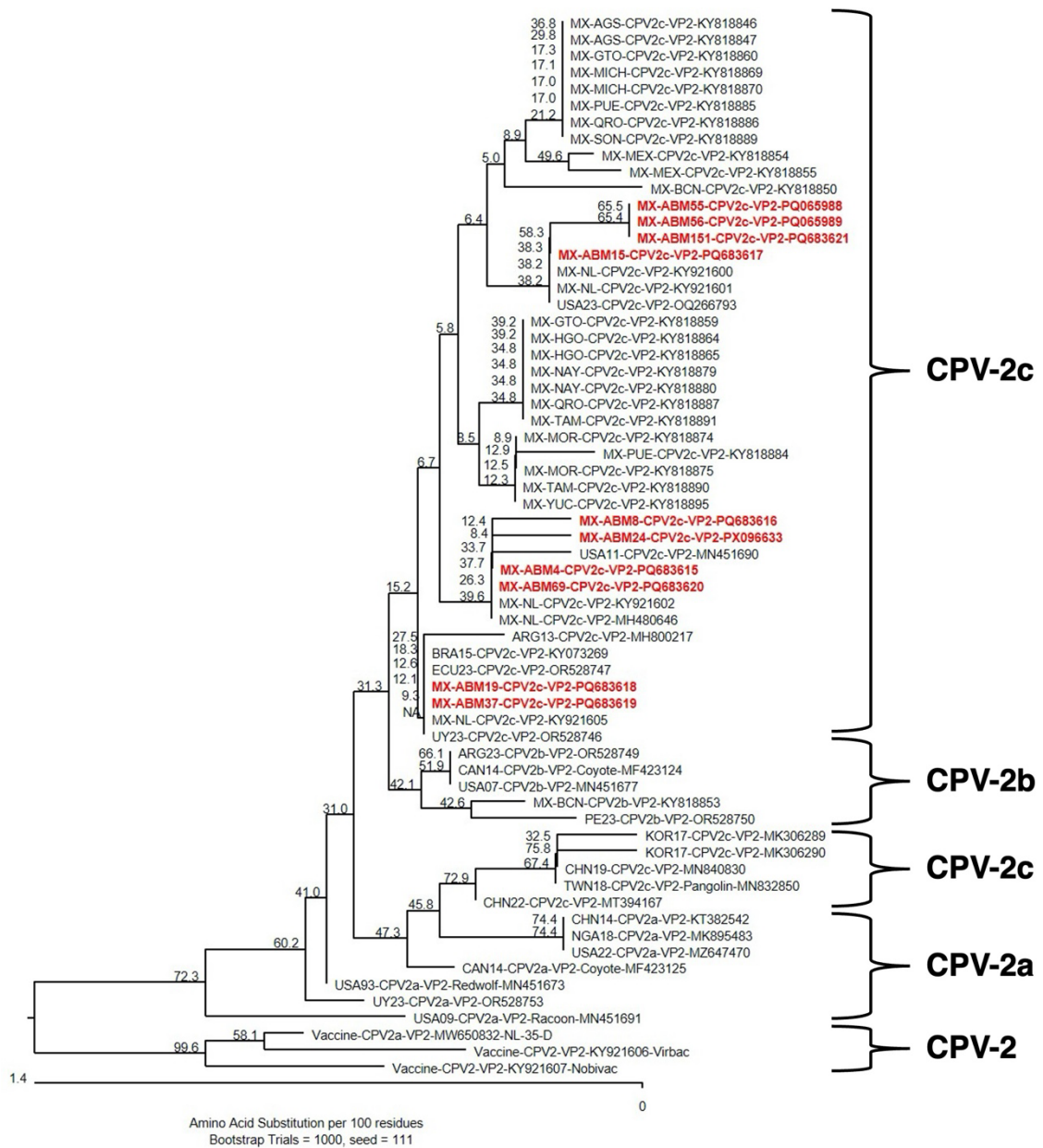


Figura 29. Dendrograma basado en el gen VP2 de CPV-2. Con el programa MegaAlign/DNASTAR v.15 y utilizando el algoritmo ClustalW, se llevó a cabo un alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas del gen VP2 de CPV-2. La variación aminoacídica fue determinada empleando el método Kimura 2-Parámetros (Kimura, 1980), el dendrograma fue elaborado con el método Neighbour-Joining (Saitou y Nei, 1987). La robustez estadística de los resultados se determinó utilizando un análisis “Bootstrap” de mil repeticiones (Felsenstein, 1985). Se marcaron con color rojo las secuencias del presente trabajo.

7.3.2 Análisis de las secuencias de aminoácidos de CBoV-1

Mediante el programa MegAlign Pro/DNASTAR Lasergene v.15, se llevó a cabo un alineamiento de secuencias nucleotídicas correspondientes al gen NS1 de CBoV-1, obtenidas de las secuencias completas de CBoV-1 previamente reportadas en GenBank, junto con la secuencia del aislado MX-ABM30. A partir de este análisis, el aislado MX-ABM30 presentó un total de 22 mutaciones puntuales en el gen NS1.

Posteriormente, con base en la secuencia de nucleótidos del aislado MX-ABM30, se determinó la secuencia de aminoácidos de la proteína NS1 (774 aa).

De las 22 mutaciones puntuales detectadas en NS1, cuatro correspondieron a mutaciones con cambio de sentido: K176R, K182N, P669S y I680L (Figura 30). Las sustituciones K182N y la P669S se clasificaron como no conservativas.

En la tabla 14 se puede consultar el alineamiento de las secuencias de aminoácidos del gen NS1, donde el aislado MX-ABM30 está sombreado y las sustituciones que se presentaron se muestran en rojo.

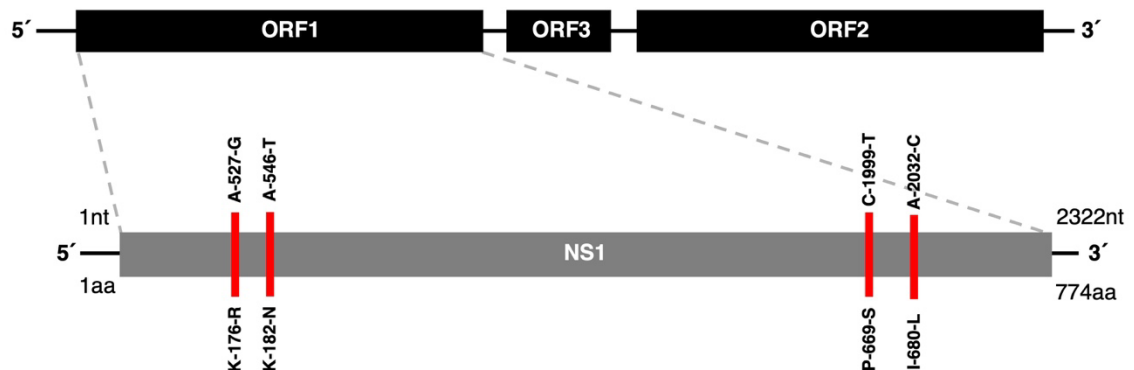


Figura 30. Mutaciones identificadas en el gen NS1 de CBoV-1 del aislado MX-ABM30. La localización de cada mutación en el gen se indica mediante líneas rojas. En la parte superior se señala la posición del nucleótido correspondiente a la mutación, mientras que en la parte inferior se indica la sustitución del aminoácido asociada.

Tabla 14. Cambios de aminoácidos en la proteína NS1 de CBoV-1

Número de acceso GenBank	País	Huésped	Sustituciones de aminoácidos			
			K-176-R	K-182-N	P-669-S	I-680-L
MH711303	Brasil	Canino	K	K	P	S
OM640114	Canadá	Canino	K	K	P	S
FJ899734	China	Canino	K	K	S	I
MH051156	China	Canino	K	K	P	N
MH051157	China	Canino	K	K	S	I
MN947833	Italia	Canino	K	K	P	I
MN947835	Italia	Canino	K	K	P	S
AB158475	Japón	Canino	K	K	S	L
AB518882	Japón	Canino	K	K	S	I
AB518883	Japón	Canino	K	K	S	I
AB518884	Japón	Canino	K	K	S	I
PQ683622	México	Canino	R	N	S	L
KY214446	Portugal	Canino	K	K	S	I
AF495467	EUA	Canino	K	K	P	S
FJ214110	EUA	Canino	K	K	P	S
NC_004442	EUA	Canino	K	K	P	S
NC_075119	EUA	Canino	K	K	P	S

De igual manera, fue realizado un alineamiento de secuencias nucleotídicas correspondientes a los genes VP1 y VP2 de CBoV-1, obtenidas de las secuencias completas de CBoV-1 previamente reportadas en GenBank, junto con la secuencia del aislado MX-ABM30.

A partir de este análisis, se identificaron un total de 38 mutaciones puntuales en los genes VP1 y VP2 del aislado MX-ABM30. Posteriormente, con base en la secuencia de nucleótidos del aislado MX-ABM30, se determinaron las secuencias de aminoácidos de las proteínas VP1 (703 aa) y VP2 (571 aa).

De las 38 mutaciones puntuales detectadas en VP2, solo dos correspondieron a mutaciones con cambio de sentido: S200G y S536A (Figura 31). Ambas sustituciones se clasificaron como no conservativas. El gen VP1 presentó las mismas sustituciones que el gen VP2.

En la tabla 15 se presenta de manera resumida el alineamiento de las secuencias de aminoácidos del gen VP2, donde el aislado MX-ABM30 está sombreado y las sustituciones que se presentaron se muestran en rojo.

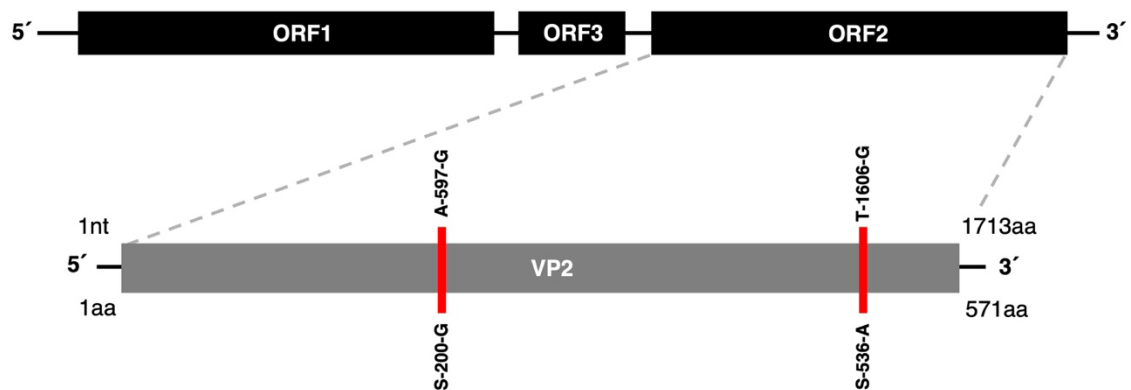


Figura 31. Mutaciones identificadas en el gen VP2 de CBoV-1 del aislado MX-ABM30. La localización de cada mutación en el gen se indica mediante líneas rojas. En la parte superior se señala la posición del nucleótido correspondiente a la mutación, mientras que en la parte inferior se indica la sustitución del aminoácido asociada.

Tabla 15. Cambios de aminoácidos en la proteína VP2 de CBoV-1

Número de acceso GenBank	País	Huésped	Sustituciones de aminoácidos	
			S-200-G	S-536-A
MH711303	Brasil	Canino	G	A
OM640114	Canadá	Canino	G	A
FJ899734	China	Canino	S	A
MH051156	China	Canino	G	A
MH051157	China	Canino	S	S
MN947833	Italia	Canino	S	S
MN947835	Italia	Canino	G	A
AB158475	Japón	Canino	G	S
AB518882	Japón	Canino	S	S
AB518883	Japón	Canino	S	S
AB518884	Japón	Canino	S	S
PQ683622	México	Canino	G	A
KY214446	Portugal	Canino	S	S
AF495467	EUA	Canino	S	S
FJ214110	EUA	Canino	S	S
NC_004442	EUA	Canino	S	S
NC_075119	EUA	Canino	S	S

También se llevó a cabo un alineamiento de secuencias nucleotídicas correspondientes al gen NP1 de CBoV-1, obtenidas de las secuencias completas de CBoV-1 previamente reportadas en GenBank, junto con la secuencia del aislado MX-ABM30. A partir de este análisis, se identificaron un total de 6 mutaciones puntuales en el gen NP1 del aislado MX-ABM30. Posteriormente, con base en la secuencia de nucleótidos del aislado MX-ABM30, se determinó la secuencia de aminoácidos de la proteína NP1 (186 aa).

En este caso, todas las mutaciones puntuales en el gen NP1 fueron silenciosas, sin generar ningún cambio de aminoácido en la proteína.

7.4 RESULTADOS DEL OBJETIVO 4

7.4.1 Titulación de los virus stock

Para las pruebas de seroneutralización, se titularon doce aislados de CPV-2 (MX-ABM4, MX-ABM8, MX-ABM15, MX-ABM16, MX-ABM19, MX-ABM24, MX-ABM25, MX-ABM37, MX-ABM55, MX-ABM56, MX-ABM69 y MX-ABM151). La titulación viral fue llevada a cabo en placas para cultivo de 96 pocillos, donde se realizaron diluciones quíntuples seriadas por cuatuplicado con una suspensión de células MDCK al 1.25×10^5 , a un volumen de 200 μ l por pocillo. Tras un periodo de incubación de 3-7 días, los pocillos que presentaron ECP fueron registrados como positivos con un “+” (Figura 32), y se calculó el TCID₅₀ mediante la fórmula de Spearman-Kärber. Los títulos obtenidos para cada aislado se muestran en la tabla 16.

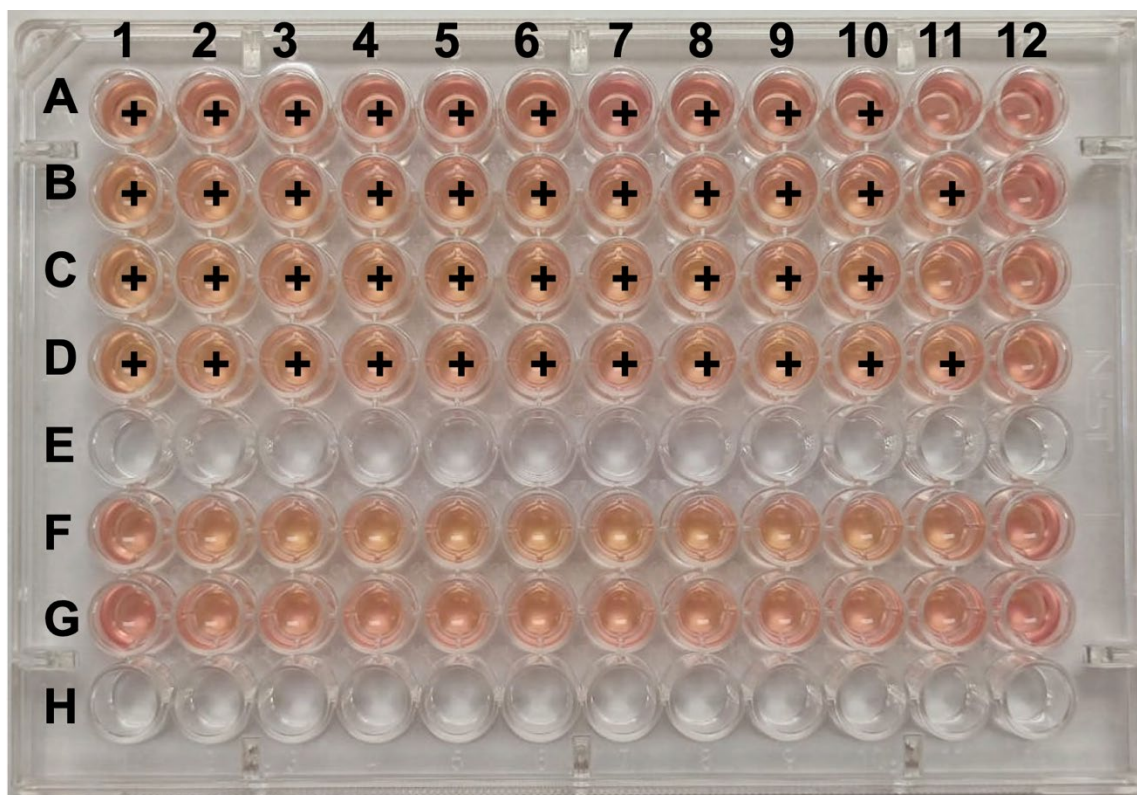


Figura 32. Placa de titulación del aislado MX-ABM55. La titulación viral del aislado MX-ABM55 fue realizada en una placa de 96 pocillos. Las filas A, B, C y D son los replicados de la prueba, las filas F y G son los controles negativos. Se partió de una dilución 1:5, realizando diluciones quíntuples seriadas de la columna 1 hasta la columna 12. Se marcaron los pozos con “+” cuando se observó ECP. El aislado MX-ABM55 obtuvo un título de 7.69 $-\log_{10}$ TCID₅₀ usando la fórmula de Spearman-Kärber.

Tabla 16. Títulos en TCID₅₀ de los aislados virales de este estudio

Aislado	Signología presentada	Virus aislado	TCID ₅₀ / ml
MX-ABM4	GE	CPV-2	1.95 x 10 ⁹
MX-ABM15	GE	CPV-2	1.95 x 10 ⁹
MX-ABM24	GE	CPV-2	9.77 x 10 ⁹
MX-ABM37	GE	CPV-2	1.15 x 10 ⁹
MX-ABM55	GE	CPV-2	1.95 x 10 ⁹

MX-ABM56	GE	CPV-2	1.95 x 10 ⁹
MX-ABM8	SDHA	CPV-2	1.95 x 10 ⁹
MX-ABM16	SDHA	CPV-2	1.15 x 10 ⁹
MX-ABM25	SDHA	CPV-2	1.95 x 10 ⁹
MX-ABM19	SDHA	CPV-2	1.95 x 10 ⁹
MX-ABM69	SDHA	CPV-2	4.37 x 10 ⁹
MX-ABM151	SDHA	CPV-2	4.37 x 10 ⁹

7.4.2 Producción de sueros policlonales contra CPV-2

Se obtuvieron dos sueros policlonales empleando las cepas vacunales Cornell y NL-35-D de CPV-2. Se recolectaron muestras sanguíneas al día 0, previo al esquema de inmunización. Ninguna de las cabras presentó actividad neutralizante detectable frente a CPV-2, lo que confirmó la ausencia de anticuerpos preexistentes.

Posteriormente, tras completar el protocolo de inmunización, fueron obtenidas nuevas muestras de sangre a los 15 días de la última inoculación (día 30 del esquema). En estas muestras se observó actividad neutralizante frente a las cepas homólogas. Los dos antisueros alcanzaron títulos de neutralización de 1:140. Estos antisueros fueron inactivados para utilizarlos para las pruebas de seroneutralización.

7.4.3 Pruebas de seroneutralización

Se realizaron las pruebas de seroneutralización de cada antisuero vacunal frente a doce virus heterólogos; seis virus del grupo GE (MX-ABM4, MX-ABM15, MX-ABM24, MX-ABM37, MX-ABM55 y MX-ABM56) y seis virus del grupo SDHA (MX-ABM8, MX-ABM16, MX-ABM19, MX-ABM25, MX-ABM69 y MX-ABM151).

El antisuero generado contra la cepa vacunal Cornell presentó neutralización a una dilución de 1:27 contra los aislados MX-ABM4, MX-ABM8, MX-ABM15, MX-

ABM16, MX-ABM19, MX-ABM25, MX-ABM37, MX-ABM55, MX-ABM56, MX-ABM69 y MX-ABM151, mientras que el aislado MX-ABM24 presentó neutralización a una dilución de 1:81 (Figura 33).

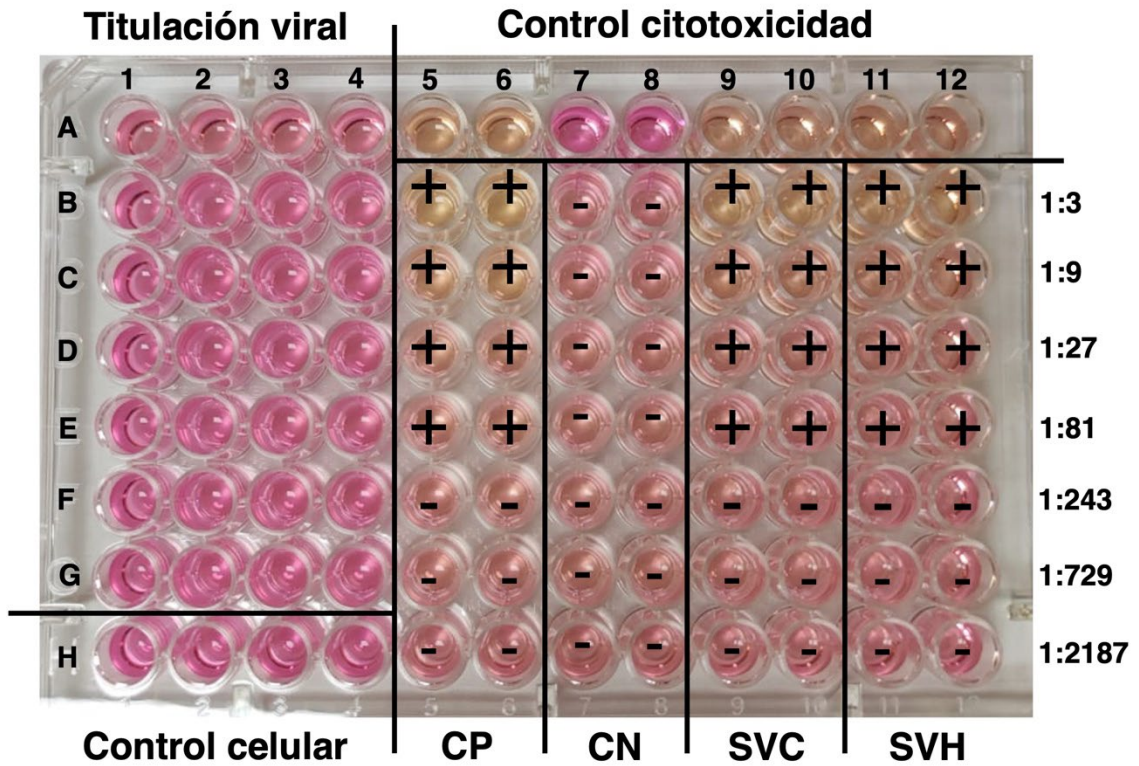


Figura 33. Seroneutralización cruzada de los antiseros SVC y SVH frente al virus heterólogo MX-ABM24. La prueba de seroneutralización del aislado MX-ABM24 contra los antiseros policlonales anti CVP-2 fue llevada a cabo en una placa de 96 pocillos. El virus se evaluó a una dosis constante de 100 TCID₅₀ /50 µl frente a diluciones triples seriadas de cada antisuero. El símbolo “+” indica neutralización y “-” presencia de ECP. Control positivo (CP). Control negativo (CN). Antisuero vacunal cepa Cornell (SVC). Antisuero vacunal cepa NL-35-D (SVH).

El antisuero generado contra la cepa vacunal NL-35-D presentó un patrón de seroneutralización semejante al observado con el antisuero de la cepa vacunal Cornell. La neutralización contra las cepas heterólogas se observó a una dilución de 1:27 en los aislados MX-ABM4, MX-ABM8, MX-ABM15, MX-ABM16, MX-

ABM19, MX-ABM25, MX-ABM37, MX-ABM55, MX-ABM56, MX-ABM69 y MX-ABM151, de la misma forma, el aislado MX-ABM24 presentó neutralización a una dilución de 1:81.

Por último, se calcularon las dosis neutralizantes de cada antisuero contra las diferentes cepas de CPV-2 utilizando la fórmula de Spearman-Kärber. Los resultados se dieron como el logaritmo negativo de la dosis neutralizante al 50 % ($-\log_{10} ND_{50}$) (Tabla 17).

Tabla 17. Dosis neutralizantes de los antisueros anti-CPV-2

Antisuero	Cepas GE						Cepas SDHA					
	4	15	24	37	55	56	8	16	19	25	69	151
Cepa Cornell	1.67	1.67	2.15	1.67	1.67	1.67	1.67	1.67	1.67	1.67	1.67	1.67
Cepa NL-35-D	1.67	1.67	2.15	1.67	1.67	1.67	1.67	1.67	1.67	1.67	1.67	1.67

Los resultados se dieron como el logaritmo negativo de la dosis neutralizante al 50 % ($-\log_{10} ND_{50}$)

8 DISCUSIÓN

El síndrome de diarrea hemorrágica aguda (SDHA) es considerado uno de los trastornos gastrointestinales en caninos más comúnmente tratados en la práctica veterinaria. Se caracteriza por la aparición de diarrea con sangre y vómitos, pueden acompañarse de otros signos como anorexia, letargo y malestar abdominal, lo que puede llevar a una deshidratación severa debido a la pérdida masiva de fluidos (Unterer y Busch, 2021).

A pesar de su importancia clínica, la etiología del SDHA aún no está completamente definida, diferentes estudios asocian la enfermedad principalmente con la presencia de las toxinas NetE y NetF de *Clostridium perfringens*, que podrían contribuir con el daño de la mucosa intestinal (Unterer y Busch, 2021). No obstante, además de los agentes bacterianos, también han sido relacionados otros patógenos como parásitos y virus, siendo éstos últimos responsables de aproximadamente 40-60 % de los casos de diarrea hemorrágica en caninos, con parvovirus canino tipo 2 (CPV-2) como el agente etiológico más frecuentemente relacionado (Decaro et al., 2020; Khatri et al., 2017; Miranda y Thompson, 2016; H. Zhou et al., 2025). Sin embargo, recientemente se ha reconocido la participación de virus emergentes como bocavirus canino (CBoV) y circovirus canino (CCV) en cuadros gastroentéricos y respiratorios en caninos (Caddy, 2018; Capozza et al., 2023).

La alta frecuencia de detección de CPV-2 en cuadros gastrointestinales ha sido reportada a nivel global. En el continente asiático han reportado prevalencias del 70 % en muestras de caninos con sintomatología gastrointestinal (Singh et al., 2021). Por otro lado, en Egipto se reportó una prevalencia del 85 % en caninos con signología de gastroenteritis (Magouz et al., 2023).

A diferencia de CPV-2, la tasa de detección para CBoV y CCV es considerablemente menor en la población canina. En Turquía se reportaron prevalencias del 3.9 % en caninos adultos y del 34 % en caninos jóvenes para

CBoV-1, así como del 2.3 % en adultos y 26 % en jóvenes para CBoV-2 (Isidan y Turan, 2021), mientras que en Chile se reportó una prevalencia del 7.5 % para CBoV-1 en muestras de sangre de caninos (González-Hein et al., 2020). Respecto a CCV, en Vietnam se reportó una prevalencia del 19 % en caninos con diarrea (Tuong et al., 2021). Sin embargo, en Estados Unidos se reportó un 11 % de positividad en caninos con gastroenteritis (L. Li, McGraw, et al., 2013).

En México, diversos estudios han caracterizado genéticamente a CPV-2 en base a la proteína estructural VP2 (Cedillo, 2019; Faz et al., 2019; Pedroza-Roldán et al., 2015), lo que ha permitido identificar los subtipos circulantes en el país. No obstante, los estudios sobre las variantes genéticas de CPV-2 y su implicación en la infectividad, virulencia y antigenicidad siguen siendo limitados. Asimismo, aunque en el norte del país se ha documentado la presencia de CCV, CBoV-2 y CBoV-1 en coinfecciones con CPV-2 (Busqueta, 2020), hasta el momento no existen reportes publicados sobre la caracterización molecular de los mismos.

En este trabajo fueron analizadas 151 muestras fecales distribuidas en tres grupos clínicos: 56 muestras fueron de pacientes con SDHA, 71 muestras de pacientes con gastroenteritis no hemorrágica (GE) y 24 muestras de pacientes sin signología aparente (S/S). Todas las muestras fueron evaluadas mediante PCR para la detección de CCV, CBoV-2, CBoV-1 y CPV-2.

En el 74.8 % (113/151) de las muestras fue detectado CPV-2, lo que lo posiciona como el agente viral más prevalente en caninos con gastroenteritis entre la población estudiada en el presente estudio. Similar a estos resultados, en Ecuador se reportó una prevalencia del 78 % de CPV-2 en caninos con gastroenteritis (Loor-Giler et al., 2025) y en Chile se documentó una prevalencia de 72 % en muestras sanguíneas de caninos enfermos (González-Hein et al., 2020). En contraste, Faz et al. (2019) describen una prevalencia del 33 % (50/150) de CPV-2 en caninos con signos de gastroenteritis en México.

Por otra parte, se detectó a CBoV-1 en el 14.5 % (22/151) y a CBoV-2 en el 9.9 % (15/151) en las muestras analizadas. Estas frecuencias son superiores a las

reportadas en Chile, donde se reportó una prevalencia del 7.5 % para CBoV-1 (González-Hein et al., 2020).

También se detectó a CCV en el 6.6 % (10/151) de las muestras analizadas. En contraste con los resultados de CBoV, esta frecuencia está por debajo de lo observado en otros estudios. En Colombia fue reportada una prevalencia del 16 % en caninos con diarrea hemorrágica y no hemorrágica, y en Brasil se informó una tasa del 15 % (22/147) en caninos enfermos y sanos (Giraldo-Ramirez, Rendon-Marin, Vargas-Bermudez, et al., 2020).

En conjunto, las variaciones en las frecuencias de detección de los virus estudiados respecto a las reportadas por otros autores podrían atribuirse a variaciones en las características de la población estudiada, el estado de salud e inmunológico de los pacientes, su calendario de vacunación, el tamaño de muestra y las técnicas diagnósticas empleadas.

Recientemente, ha sido resaltada la importancia que tienen las coinfecciones de CPV-2 en la forma de presentación del SDHA, particularmente con virus emergentes como CBoV y CCV, situación que se ha asociado con cuadros clínicos más severos e incluso fatales (Caddy, 2018; Capozza et al., 2023). En una investigación realizada en Alemania, los pacientes con SDHA que presentaron una coinfección de CPV-2 con CCV también presentaron una elevada mortalidad (Anderson et al., 2017). En contraste, se han reportado coinfecciones de CPV-2 con CBoV en caninos con gastroenteritis, sin embargo, no las han relacionado con un cuadro severo de la enfermedad (González-Hein et al., 2020; Isidan y Turan, 2021).

En el presente trabajo se obtuvo una tasa de mono infecciones del 60.2 % (91/151), de las cuales el 91.2 % (83/91) fueron causadas por CPV-2, el 5.4 % (5/91) por CBoV-1 y el 3.2 % (3/91) por CBoV-2. No se identificaron casos de mono infección por CCV en ninguna muestra. Esto refuerza el papel de CPV-2 como uno de los virus más relevantes implicados en procesos gastroentéricos en caninos (H. Zhou et al., 2025).

Mientras que CPV-2 se detectó principalmente como monoinfección en los grupos de SDHA y GE, las monoinfecciones por CBoV-1 y CBoV-2 fueron menos frecuentes y se identificaron principalmente en los grupos de GE y S/S. Este hallazgo coincide con reportes previos que describen a CBoV tanto en animales enfermos como en clínicamente sanos, lo que sugiere que estos virus podrían circular de manera subclínica (Capozza et al., 2023).

Por otro lado, se obtuvo una tasa de coinfección del 21.1 % (32/151) de los virus de estudio. Las coinfecciones se presentaron en combinaciones de dos, tres y hasta cuatro virus, principalmente en el grupo SDHA. Las asociaciones más frecuentes incluyeron a CBoV-1 con CPV-2 (12/151), CBoV-2 con CPV-2 (7/151) y a CCV con CPV-2 (7/151). Otras combinaciones se presentaron con menor frecuencia, se identificó un caso de coinfección de CBoV-1 con CBoV-2, un caso de CPV-2 con CBoV-1 y CCV; y un caso de CPV-2 con CBoV-2 y CCV. Asimismo, se registraron dos casos de coinfección de CBoV-2, CPV-2 y CBoV-1, y un único caso de coinfección cuádruple que incluyó a CCV, CPV-2, CBoV-2 y CBoV-1. El virus con mayor incidencia en las coinfecciones fue CPV-2, lo cual coincide con estudios previos que lo señalan como el agente viral más prevalente en coinfecciones con CBoV y CCV (Guo et al., 2016; Isidan y Turan, 2021).

La mayor frecuencia de coinfecciones observadas en el grupo con SDHA sugiere que la interacción entre los virus podría influir en la severidad del cuadro clínico. Esto ya ha sido mencionado en diferentes estudios, donde estadísticamente la presencia de coinfecciones está relacionada con un cuadro más severo de gastroenteritis. Anderson et al. (2017) correlacionaron las coinfecciones de CPV-2 y CCV con una frecuencia de mortalidad elevada ($p < 0.039$). Recientemente en México se correlacionó la presencia de coinfecciones virales entre CPV-2, CBoV y CCV con los cuadros de diarrea hemorrágica en caninos ($p < 0.0007$) y una elevada letalidad ($p < 0.0002$) (Busqueta, 2020).

Adicionalmente, el grupo S/S presentó la mayor cantidad de muestras negativas, lo que respalda la relación entre la detección viral y la manifestación de signos clínicos. Sin embargo, la identificación de CPV-2, CBoV-1 y CBoV-2 en pacientes

aparentemente sanos enfatiza la importancia de considerar la condición inmunológica del hospedero, el estadio de la infección viral, el tiempo de infección, así como también la carga viral y otros parámetros predisponentes que podrían repercutir en la presentación de las enfermedades gastrointestinales en caninos (Capozza et al., 2023).

La evolución de CPV-2 ha dado lugar a las variantes CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c, cuya caracterización se centra en el análisis molecular del gen VP2. Estos subtipos se distinguen por una sustitución de aminoácido en el residuo 426 de dicha proteína; el aminoácido asparagina (N) está presente en CPV-2a, en CPV-2b se encuentra el aminoácido ácido aspártico (D) y en el subtipo CPV-2c se presenta el aminoácido ácido glutámico (E) (Miranda y Thompson, 2016; H. Zhou et al., 2025).

Uno de los métodos empleados para la identificación de las variantes de CPV-2 es la técnica molecular de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (*Restriction fragment length polymorphism*, RFLP). Esta técnica permite detectar variaciones en las secuencias de ADN mediante la identificación de cambios en el tamaño de los fragmentos producidos mediante digestión con endonucleasas específicas. Estas variaciones ocurren cuando mutaciones o polimorfismos crean o eliminan sitios de restricción, produciendo fragmentos de distintos tamaños que posteriormente se separan y analizan mediante electroforesis. Entre sus principales ventajas destaca que es una técnica rápida y accesible, sin embargo, presenta limitaciones importantes, ya que, al identificar polimorfismos en un gen específico, se puede subestimar la diversidad genética viral. En contraste, la secuenciación genética permite identificar todas las mutaciones presentes, analizar relaciones filogenéticas, detectar eventos de recombinación y estudiar la dinámica evolutiva del virus, por lo que se considera el método de referencia para la caracterización molecular de CPV-2 (Magouz et al., 2023; Polat et al., 2019; Umar et al., 2024).

En México, múltiples investigaciones se han enfocado en determinar el subtipo de CPV-2 presente en distintas regiones. Pedroza-Roldán et al. (2015)

identificaron a CPV-2c como el subtipo predominante en el oeste del país mediante la técnica de PCR-RFLP y el uso de la endonucleasa Mbo II. De manera similar, se identificó en la mayoría de los caninos con gastroenteritis en el noreste de México al subtipo CPV-2c (Cedillo, 2019).

En esta investigación se determinó el subtipo de CPV-2 en 56 muestras mediante un PCR-RFLP utilizando el método modificado de Buonavoglia (Cedillo, 2019). El subtipo CPV-2c se identificó en 55 muestras, mientras que una muestra correspondió al subtipo CPV-2b. Estos hallazgos coinciden con reportes previos que identifican al subtipo CPV-2c como la variante predominante de CPV-2 en México mediante la técnica de PCR-RFLP (Cedillo, 2019; Pedroza-Roldán et al., 2015). Adicionalmente, Faz et al. (2019) y López-Pérez et al. (2019) han reportado la circulación de los subtipos CPV-2a y CPV-2b en México, sin embargo, también identificaron al subtipo CPV-2c como el más frecuente en el país, utilizando la secuenciación como método para diferenciar los subtipos de CPV-2.

Aunado a las herramientas moleculares como el PCR, el aislamiento viral es reconocido como la prueba de referencia para el diagnóstico y la caracterización viral, ya que permite recuperar el agente infeccioso y disponer de cepas virales viables, dando lugar a estudios adicionales, como la caracterización genética y antigénica, el análisis del comportamiento del virus en diferentes medios *in vitro*, así como la elaboración de vacunas y el desarrollo de herramientas para mejorar las técnicas de diagnóstico (Hematian et al., 2016).

En este trabajo se logró aislar a CPV-2c de 32 muestras clínicas en la línea celular MDCK, de las cuales 23 aislados provenían de pacientes con SDHA, ocho aislados provenían de pacientes con GE y un único aislado de un paciente S/S. El ECP observado en células MDCK causado por CPV-2c se caracterizó por lisis celular, redondeamiento de las células junto con la formación de sincitios y la pérdida de integridad de la monocapa. Estos cambios se hicieron evidentes entre los días 4 y 5 posteriores a la inoculación. De igual forma se ha descrito el

aislamiento de CPV-2 en diferentes líneas celulares con ECP similares a los observados en nuestros resultados (Mira et al., 2019).

También se logró el aislamiento de CBoV-1 en la línea celular MDCK a partir de una muestra de un paciente con SDHA. De manera similar, un estudio en Japón se reportó el aislamiento de CBoV-1 en células MDCK de un paciente geriátrico con gastroenteritis severa (Ohshima et al., 2010). Estos resultados sugieren la asociación de CBoV-1 con cuadros gastroentéricos graves en caninos. En general, la infección por CBoV-1 se ha relacionado con infecciones subclínicas o con cuadros gastroentéricos y respiratorios leves en cachorros (Capozza et al., 2023). El ECP observado fue similar al descrito para CPV-2, incluyendo lisis celular, redondeamiento celular acompañado de la formación de sincitios y desprendimiento de la monocapa, visibles a partir del día 5 posterior a la inoculación.

En contraste, a pesar de confirmar la presencia de CBoV-2 y CCV en muestras clínicas, no fue posible establecer su aislamiento en cultivo celular. Lo anterior coincide con lo reportado en diferentes trabajos. En el caso de CBoV-2, se ha intentado el aislamiento con resultados negativos, por lo que su detección depende principalmente técnicas como PCR o la hibridización *in situ* en muestras de tejido (Bodewes et al., 2014). Por otro lado, a pesar de que se ha intentado aislar a CCV sin éxito, no se descarta la posibilidad de caracterizar a los virus por otros métodos. Por ejemplo, en un estudio se logró rescatar una cepa de CCV mediante la clonación del genoma viral en un plásmido y su posterior transfección en células F81 (Hao, Li, Chen, et al., 2022). Esta dificultad para aislar a CBoV-2 y CCV puede atribuirse a diversos factores, entre ellos una baja carga viral en las muestras clínicas o una baja susceptibilidad de la línea celular. Asimismo, algunos virus requieren de condiciones particulares para su replicación *in vitro*, dando lugar a infecciones latentes o abortivas, lo que puede dificultar su aislamiento (Hematian et al., 2016).

La caracterización genética de los virus que afectan al tracto gastrointestinal en la población canina es considerada una herramienta fundamental para la

vigilancia epidemiológica y el análisis de la dinámica de las infecciones virales. Permite identificar las variantes genéticas presentes en la población canina, comprender su dinámica de transmisión, desarrollar estrategias de prevención de enfermedades, así como también estudiar los mecanismos de infección y evolución de los virus en poblaciones caninas (Condon et al., 2024).

La caracterización genética de CPV-2 a nivel global se ha enfocado principalmente en el análisis del gen de la proteína VP2 debido a que posee los principales determinantes antigénicos y las mutaciones que permiten diferenciar entre los distintos subtipos de CPV-2 se localizan en esta proteína (Hao, Li, Xiao, et al., 2022; P. Zhou et al., 2017). Los estudios basados en la caracterización del gen VP2, además de indicar los patrones de agrupamiento de los subtipos de CPV-2, también proporcionan información sobre la distribución geográfica y la evolución de las variantes de CPV-2 (Silva et al., 2022), además de identificar mutaciones en el gen que podrían estar asociadas con la aparición de nuevas variantes antigénicas (Magouz et al., 2023; Polat et al., 2019). En contraste, las investigaciones que analizan el genoma completo de CPV-2 son relativamente escasas en comparación con aquellas que solamente caracterizan el gen VP2. La caracterización del genoma completo de CPV-2 permite evaluar no únicamente a las proteínas estructurales, sino que también las proteínas involucradas en los procesos de replicación viral, las cuales desempeñan una función relevante en la patogénesis del virus (Reddy et al., 2024).

Como se discutió anteriormente, la caracterización genética de CPV-2 en México se ha realizado principalmente del gen VP2. Los estudios realizados coinciden en que el subtipo CPV-2c es actualmente la variante predominante en el país y adicionalmente han reportado las mutaciones de aminoácidos en el gen VP2 (Cedillo, 2019; Faz et al., 2019; Pedroza-Roldán et al., 2015; Quiroga et al., 2024). No obstante, hasta la fecha, la información sobre la caracterización del genoma completo de CPV-2 en México es limitada, por lo que se desconoce la variabilidad de otras regiones genéticas del virus, particularmente de las proteínas no estructurales.

En el presente trabajo fueron obtenidas 10 secuencias genéticas completas de CPV-2, de las cuales seis provenían de pacientes con GE (MX-ABM4, MX-ABM15, MX-ABM24, MX-ABM37, MX-ABM55 y MX-ABM56) y cuatro de pacientes con SDHA (MX-ABM8, MX-ABM19, MX-ABM69 y MX-ABM151). Estos aislados presentaron una alta similitud (>98 %) con secuencias previamente reportadas en el GenBank. Estudios han reportado una elevada similitud entre secuencias del gen VP2 de países distintos (Faz et al., 2019; Loor-Giler et al., 2025), lo que refleja una elevada conservación del virus a nivel global.

A pesar de la alta similitud genética entre las secuencias, el análisis filogenético de CPV-2 permitió identificar tres diferentes clados en el dendrograma (Figura 24), los cuales mostraron una agrupación por zonas geográficas. Uno de los clados está conformado por secuencias de Sudamérica, mientras que el segundo clado está integrado exclusivamente por secuencias de México y Estados Unidos, y el tercer clado incluyó principalmente secuencias provenientes de Asia. La divergencia genética que presentaron las secuencias de este estudio refleja la contribución de las mutaciones puntuales a procesos evolutivos y de adaptación del virus (Hao, Li, Xiao, et al., 2022; Mietzsch et al., 2019; H. Zhou et al., 2025).

La agrupación de los aislados MX-ABM55, MX-ABM56, MX-ABM15, MX-ABM151, MX-ABM8, MX-ABM69 y MX-ABM24 con otras secuencias de México y Estados Unidos coinciden con lo descrito por Faz et al. (2019) y Quiroga et al. (2024), en donde describen una estrecha relación genética con las secuencias reportadas en Estados Unidos, favorecida principalmente por su proximidad geográfica.

La relación genética entre los aislados provenientes de coyotes (MX-ABM55 y MX-ABM56) con los aislados MX-ABM15, MX-ABM151, MX-ABM8, MX-ABM69 y MX-ABM24 sugiere una posible transmisión cruzada entre hospedadores silvestres y domésticos. Cabe destacar que las muestras de los coyotes fueron obtenidas de individuos localizados en las instalaciones del Aeropuerto Internacional General Mariano Escobedo. Un estudio realizado en el noroeste de

México ha reportado la detección de CPV-2 tanto en carnívoros silvestres como en caninos domésticos, sugiriendo una transmisión bidireccional, además, se describe una mayor exposición del virus en animales capturados cerca de zonas urbanas, indicando que los caninos domésticos podrían actuar como reservorios que facilitan la circulación del virus en la fauna silvestre (López-Pérez et al., 2019). Adicionalmente, estudios internacionales sobre CPV-2 señalan que la transmisión inter-especie es relativamente frecuente en la periferia de las zonas urbanas, donde la propagación del virus es favorecida por la estrecha relación entre los animales domésticos y silvestres (Allison et al., 2013).

Por otro lado, los aislados provenientes de pacientes con SDHA y GE se agruparon dentro de los mismos clados. Este resultado sugiere que las diferencias en la presentación clínica en las infecciones por CPV-2 no necesariamente están determinadas por la variabilidad genética mostrada en el análisis filogenético. No obstante, es importante considerar que los estudios filogenéticos por sí solos no permiten establecer conclusiones definitivas sobre los determinantes de la gravedad clínica.

Para determinar si la variabilidad genética del virus puede influir en la patogénesis, se analizaron las mutaciones puntuales y sustituciones de aminoácidos que se observaron en los genes NS1, NS2, VP1 y VP2 de los 10 aislados de CPV-2 con SDHA y GE.

El gen NS1 se identificaron nueve sustituciones de aminoácidos (N351K, L354V, R369K, E530K, G573S, V596A, L597P, D603G y E621K). Dentro del dominio de la helicasa se identificó la sustitución N351K, que se presentó en aislados provenientes de pacientes con SDHA y con GE (MX-ABM19 y MX-ABM37, respectivamente). También se identificó en el dominio de la helicasa a la sustitución L354V. Interesantemente, esta mutación se detectó exclusivamente en los aislados provenientes de coyotes (MX-ABM55 y MX-ABM56), siendo única entre todas las secuencias analizadas de CPV-2. Aunque los estudios evolutivos de CPV-2 señalan que los cambios adaptativos suelen concentrarse en la proteína VP2, también se ha propuesto que mutaciones en las proteínas no

estructurales pueden influir en la interacción con factores celulares del hospedero (Mira et al., 2019). Bajo este contexto, la mutación observada en los aislados de coyotes podría representar una variación asociada a la adaptación del virus a este hospedero silvestre.

Dentro del mismo dominio, la sustitución R369K fue única entre las secuencias de CPV-2 analizadas y se presentó en un aislado proveniente de un paciente con SDHA (MX-ABM19). Diversos estudios han demostrado que las regiones N-terminal y β -loop en el dominio de la helicasa ejercen un papel fundamental en la unión de NS1 al ADN (Niskanen et al., 2010, 2013), sugiriendo que las mutaciones dentro de este dominio pueden afectar la eficiencia de la replicación viral y, potencialmente, influir en la gravedad de la enfermedad.

Las sustituciones E530K, G573S, V596A y L597P no se localizaron dentro de dominios funcionales de NS1. Las sustituciones E530K, G573S, V596A y L597P, presentes tanto en aislados de SDHA y GE, también se identificaron en secuencias de Canadá, Estados Unidos, Perú, Uruguay y Brasil.

En el dominio de transactivación de NS1 se identificaron las sustituciones D603G y E621K. La sustitución D603G fue detectada en aislados con SDHA y GE. Por otro lado, la sustitución E621K, presente en un aislado de un paciente con GE (MX-ABM4), también fue identificada en dos secuencias de Estados Unidos (No. Acceso GenBank MN451690 y MN451685). Estudios han descrito la importancia de residuos específicos en esta región para la patogénesis viral. Se ha demostrado que los residuos T598 y T601 desempeñan un rol importante en la replicación viral, ya que mutaciones en estos sitios la reducen significativamente (Miao et al., 2022). En contraste, en el virus FPV, se demostró que el residuo N588 en NS1 incrementa la eficiencia de replicación viral (L. Li et al., 2024).

En el gen NS2 se identificaron cuatro sustituciones de aminoácidos (T94A, S109F, R130K y T135A). La sustitución T94A fue la mutación más frecuente (26/63) y se presentó en secuencias de diferentes países, así como en los aislados provenientes de pacientes con SDHA y GE.

Por otro lado, la sustitución S109F se observó exclusivamente en los aislados provenientes de coyotes, pudiendo representar una variación asociada a la adaptación del virus a los coyotes, al igual que la sustitución L354V en el gen NS1. Tanto T94A como S109F también fueron reportadas en un estudio realizado en Italia, donde se caracterizaron los genes NS1 y NS2 de CPV-2 y FPV (Mira et al., 2019).

La sustitución R130K, presente en un aislado de GE (MX-ABM4), también se identificó en dos secuencias de Estados Unidos (No. acceso GenBank MN451690 y MN451685). Finalmente, la sustitución T135A, detectada en un aislado de un paciente con SDHA (MX-ABM19), se observó igualmente en dos secuencias reportadas en Argentina y Uruguay (No. acceso GenBank OR528748 y OR528746).

Si bien las mutaciones identificadas en NS1 y NS2 podrían influir en la replicación viral de CPV-2, se requieren de estudios funcionales dirigidos a las mutaciones para poder asociarlas con la presentación clínica del virus.

Las sustituciones de aminoácidos identificadas en el gen VP1 fueron las mismas observadas en el gen VP2, esto debido a que VP1 comparte la secuencia sobrepuesta con VP2, pero contiene una región N-terminal extendida (Mietzsch et al., 2019). En el gen VP2 se identificaron las sustituciones N56D, V139I, T170I, T245P, D426E y T440A.

La sustitución N56D, presente en aislados de pacientes con SDHA y GE, fue reportada con anterioridad por Faz et al. (2019), quienes señalaron que esta mutación era exclusiva de cepas mexicanas. Sin embargo, también se identificó esta mutación en dos secuencias de Estados Unidos recolectadas en el 2011 y 2019 (No. acceso GenBank MN451690 y MN451685).

Las sustituciones V139I, T170I y T245P se identificaron exclusivamente en los aislados del presente trabajo. La sustitución V139I la presentaron los dos aislados de coyotes (MX-ABM55 y MX-ABM56) y el aislado MX-ABM151, este

hallazgo refuerza la idea de la transmisión cruzada entre caninos domésticos y coyotes en las áreas periurbanas de la zona metropolitana de Monterrey. La sustitución T170I, identificada exclusivamente en el aislado MX-ABM24, y la sustitución T245P, presente únicamente en el aislado MX-ABM8, podrían representar variaciones genéticas que no están involucradas con cambios en el tropismo, antigenicidad o virulencia de CPV-2, ya que no se encuentran en regiones expuestas de la cápside, sin embargo, no puede descartarse que puedan influir de indirectamente en la estabilidad estructural de la cápside. Por otra parte, el hecho de que ambas sustituciones se hayan detectado exclusivamente en aislados individuales sugiere que podrían corresponder a mutaciones esporádicas, más que a cambios fijados evolutivamente. En estudios evolutivos de VP2 se ha demostrado que solo un número reducido de sustituciones logra mantenerse en la población viral, generalmente aquellas asociadas con ventajas adaptativas (G. Li et al., 2017).

Como se ha mencionado anteriormente, CPV-2 se divide en subtipos antigénicos dependiendo del aminoácido presente en el residuo 426, CPV-2a presenta asparagina (N), CPV-2b presenta ácido aspártico (D) y CPV-2c presenta ácido glutámico (E) (Miranda y Thompson, 2016). Sin embargo, se han documentado las nuevas variantes “new CPV-2a” y “new CPV-2b”, caracterizadas por la sustitución S297A en el gen VP2, además, la variante “new CPV-2b” presenta la sustitución adicional Y324I en el mismo gen (Oliveira et al., 2019).

En los 10 aislados del presente trabajo se identificó la sustitución D426E, clasificándolas como CPV-2c. Estos resultados coinciden con lo reportado en estudios realizados en México donde describen que la cepa CPV-2c es la más frecuente en el país (Cedillo, 2019; Faz et al., 2019; Pedroza-Roldán et al., 2015; Quiroga et al., 2024). Sin embargo, también se ha reportado en México un caso de infección con subtipo CPV-2a en un zorro del noroeste del país (López-Pérez et al., 2019), y dos casos con el subtipo CPV-2b en caninos con gastroenteritis (Cedillo, 2019; Faz et al., 2019).

La sustitución T440A se presentó en el 36.6 % (47/132) de las secuencias de VP2 analizadas, incluidas cuatro del presente estudio (MX-ABM15, MX-ABM55, MX-ABM56 y MX-ABM151). Esta mutación se sitúa dentro de la protrusión superior del bucle 4 de VP2, similar al residuo 426, por lo que mutaciones en este residuo pueden influir en la antigenicidad del virus (Hao, Li, Xiao, et al., 2022; P. Zhou et al., 2017). Diferentes autores han asociado la sustitución T440A junto con otras mutaciones en VP2 como F267Y y Y324I con procesos de deriva antigénica, posiblemente impulsados por la presión inmunológica derivada de la vacunación, lo que podría contribuir al fallo vacunal (Capozza et al., 2023; Hao, Li, Xiao, et al., 2022; Polat et al., 2019; P. Zhou et al., 2017).

Adicionalmente, fue elaborado un dendrograma derivado del alineamiento de secuencias de aminoácidos del gen VP2 de CPV-2 que permitió inferir la relación aminoacídica entre las secuencias analizadas. A diferencia del análisis filogenético basado en el genoma completo de CPV-2, en donde las secuencias tendieron a agruparse por zonas geográficas, el dendrograma basado en el gen VP2 mostró una agrupación de las secuencias por subtipo de CPV-2.

Los aislados del presente trabajo se agruparon en distintos subclados dentro del subtipo CPV-2c, en función de las mutaciones identificadas. Los aislados MX-ABM4, MX-ABM8, MX-ABM24 y MX-ABM69, caracterizados por la sustitución N56D, se agruparon en un mismo subclado. De manera similar, los aislados MX-ABM15, MX-ABM55, MX-ABM56 y MX-ABM151 formaron otro subclado, caracterizado por la sustitución T440A. Por otro lado, los aislados MX-ABM19 y MX-ABM37, que únicamente presentaron la sustitución D426E se agruparon en un subclado distinto a los aislados anteriores.

Interesantemente, el subtipo CPV-2c se organizó en dos clados distintos, en uno se agruparon la mayoría de las secuencias mexicanas, incluidos los aislados del presente trabajo, junto con secuencias de otros países del continente americano, y el segundo clado dentro del subtipo CPV-2c se conformó exclusivamente por secuencias de origen asiático. Diversas mutaciones en el gen VP2 han sido

reportadas en cepas de CPV-2 de origen asiático. Las mutaciones A5G, F267Y, Y324I, G365H y Q370R funcionan como marcadores genéticos que distinguen a las cepas de CPV-2 de origen asiático de las secuencias occidentales (Umar et al., 2024).

Estos resultados resaltan la importancia de considerar tanto el análisis de las secuencias nucleotídicas como las de aminoácidos para una mejor comprensión de la evolución y dispersión de CPV-2, ya que cada enfoque aporta información complementaria sobre la dinámica evolutiva del virus.

Las sustituciones N351K, E530K, G573S, L597P, D603G y E621K en NS1, T94A, S109F y T135A en NS2, así como N56D, T170I, T245P y T440A en VP2, correspondieron a cambios no conservativos, representando el 68.4 % (13/19) del total de sustituciones de aminoácidos identificadas. Este predominio de cambios no conservativos sugiere posibles alteraciones en las propiedades fisicoquímicas de las proteínas virales, lo que podría repercutir en la eficiencia de replicación, el tropismo celular o la antigenicidad del virus, dependiendo de la proteína afectada. No obstante, es importante considerar que la predicción del impacto funcional basada únicamente en la naturaleza de las sustituciones no es determinante, por lo que es indispensable realizar estudios experimentales dirigidos que permitan determinar su impacto real en la biología del virus.

La caracterización genética de los aislados de CPV-2 permitió identificar diversas sustituciones de aminoácidos potencialmente relevantes en la forma de presentación del SDHA. No obstante, la gravedad de la enfermedad no depende exclusivamente de las características genéticas virales, sino que también está influenciada por otros factores del virus como la carga viral, factores del hospedero como la respuesta inmune o la presencia de coinfecciones, así como también por factores ambientales.

Aunado a esto, la circulación simultánea de otros virus entéricos en caninos resalta la importancia de ampliar el análisis molecular hacia virus emergentes. En este contexto, CBoV es considerado como un patógeno emergente de interés

debido a su detección en infecciones entéricas y respiratorias, por lo que su caracterización genética ayudará a comprender mejor su variabilidad, evolución y su posible papel en la patogénesis del SDHA.

Se ha demostrado que CBoV presenta una alta variabilidad genética, lo que ha permitido clasificarlo en tres genotipos (CBoV-1, CBoV-2 y CBoV-3) (Capozza et al., 2023). El primer bocavirus identificado en caninos fue CBoV-1 (Antes conocido como minute virus canino (MVC)) en 1970 (Binn et al., 1970). La mayor parte de los casos de infecciones por CBoV-1 son leves en cachorros y subclínicas en adultos, sin embargo, se ha asociado con diversas afecciones sistémicas y con la habilidad de traspasar la barrera placentaria, causando problemas reproductivos y mortalidad neonatal (Capozza et al., 2023; Choi et al., 2016; Ohshima et al., 2010).

Después, en el 2012 se identificó a CBoV-2, que compartía menos del 64 % de similitud con CBoV-1 (Kapoor, Mehta, et al., 2012). De los tres genotipos, CBoV-2 ha sido el más estudiado por su asociación con gastroenteritis severa y neumonía intersticial en caninos (Bodewes et al., 2014; Choi et al., 2015).

Por último, en el 2013 se identificó a CBoV-3, que compartía una similitud del 47 % y 57 % con CBoV-1 y CBoV-2 respectivamente. CBoV-3 fue identificado en el tejido hepático de un canino con gastroenteritis hemorrágica (Li, Pesavento, et al., 2013). No obstante, es el único caso reportado de CBoV-3 de forma global.

En México, la información disponible sobre CBoV se centra en su detección molecular por PCR. En 2020 se identificó a CBoV-1 y CBoV-2 en coinfección con CPV-2 en caninos con SDHA en el noreste del país (Busqueta, 2020). Sin embargo, al momento no se han generado artículos científicos basados en la caracterización genética de este virus.

En este trabajo se estableció una secuencia genética completa de CBoV-1 a partir del aislado MX-ABM30, proveniente de un paciente con SDHA. Esta secuencia presentó una similitud mayor al 87 % con respecto a las demás

secuencias completas de CBoV-1 analizadas, indicando una baja variabilidad entre las cepas de CBoV-1. Estos hallazgos son similares a lo reportado por Ohshima et al. (2010), en donde compararon cepas de CBoV-1 de Estados Unidos, Japón y Corea. Sin embargo, en comparación con los resultados de las secuencias de CPV-2, la similitud con secuencias reportadas en otros países fue considerablemente menor en el caso de CBoV-1. Esto podría deberse a la limitada disponibilidad de secuencias completas de CBoV-1, subestimando la verdadera diversidad genética de CBoV-1.

Por otro lado, la similitud del aislado MX-ABM30 frente a las secuencias de CBoV-2 (62 %) fue muy similar a lo establecido por Kapoor, Mehta et al. (2012). En contraste, la similitud observada frente al genotipo CBoV-3 (59 %) resultó ligeramente superior a lo descrito por L. Li, Pesavento et al. (2013), quienes reportaron una similitud del 47 % entre secuencias de CBoV-1 y la secuencia de CBoV-3.

Estudios filogenéticos han demostrado que las cepas de CBoV-1 que circulan en Europa están estrechamente relacionadas con cepas de origen asiático, indicando una dispersión global de este virus (González-Hein et al., 2020; Ohshima et al., 2010). En el presente trabajo, el aislado MX-ABM30 mostró una estrecha relación genética con secuencias reportadas en Estados Unidos, Portugal, Japón e Italia. Sin embargo, el aislado MX-ABM30 se organizó en un subclado independiente de las otras secuencias, lo que sugiere la posible existencia de un linaje propio en México.

Al igual que con las secuencias obtenidas de CPV-2, se analizaron las mutaciones puntuales y sustituciones de aminoácidos que se identificaron en los genes NS1, NP1, VP1 y VP2 del aislado MX-ABM30.

Dentro del gen NS1 se identificaron las sustituciones K176R, K182N, P669S e I680L. Las sustituciones K176R, K182N fueron exclusivas del aislado MX-ABM30, pudiendo ser cambios particulares de esta variante.

Por otro lado, las sustituciones P669S e I680L también fueron identificadas en secuencias provenientes de China, Japón y Portugal, indicando que estas mutaciones pudieran ser conservadas a nivel global. Adicionalmente, secuencias de Brasil, Canadá, Italia y Estados Unidos presentaron el aminoácido Serina (S) en el residuo 680, mientras que una secuencia de China (No. acceso GenBank MH051156) presentó el aminoácido Asparagina (N), evidenciando una elevada variabilidad en este residuo.

Aunque el gen NS1 desempeña un papel clave en la replicación viral, actualmente no existe evidencia que asocie mutaciones específicas con cambios en la presentación clínica de la infección por CBoV-1 (Choi et al., 2016; González-Hein et al., 2020).

Dentro del gen NP1 se presentaron seis mutaciones puntuales, sin embargo, todas las mutaciones fueron silenciosas. La elevada conservación de esta proteína puede atribuirse a que NP1 ejerce una función crucial en la modulación de la expresión genética de las proteínas de la cápside. Específicamente, NP1 facilita la lectura de un sitio interno de poliadenilación (pA)_p en un precursor del RNA mensajero, permitiendo la generación de RNAs mensajeros que codifican las proteínas de la cápside (Dong et al., 2019). Mutaciones en NP1 podrían afectar la producción de las proteínas estructurales, que son fundamentales para el ensamblaje de viriones infecciosos.

Al igual que con las secuencias de CPV-2, las sustituciones de aminoácidos presentes en el gen VP1 fueron las mismas identificadas en el gen VP2, debido a que ambas proteínas comparten parte de su secuencia codificante. En el gen VP2, el aislado MX-ABM30 presentó las sustituciones S200G y S536A, que también fueron identificadas en secuencias reportadas en Brasil, Canadá, China e Italia.

Investigaciones sobre la estructura de los bocavirus han descrito la presencia de nueve regiones variables en la proteína VP2 (VR-I a VR-IX), las cuales se distribuyen en los bucles superficiales de la cápside (Gurda et al., 2010; Velez

et al., 2023). Interesantemente, la sustitución S200G se localiza en la región VR-III, dentro del eje de simetría de dos pliegues. A pesar de que este eje se describe como una depresión en la región superficial de la cápside de la mayoría de los bocavirus, en el caso de CBoV-1 este eje se presenta como una protusión debido a la presencia de aminoácidos adicionales en VR-III en comparación con otros bocavirus (Velez et al., 2023), sugiriendo un posible papel en la interacción virus-huésped de CBoV-1.

De igual forma, la sustitución S536A se localiza dentro del eje de simetría de dos pliegues, en la región variable VR-IX. En el caso de CBoV-1, esta región presenta un incremento en la superficie radial de la cápside en comparación con HBoV y BPV (Velez et al., 2023).

Estas mutaciones en VP2, al localizarse en regiones superficiales de la cápside, podrían estar asociadas a la interacción virus-huésped, lo que sugiere que podrían contribuir a la adaptación del virus a otras especies o a cambios en la antigenicidad de CBoV-1. Así como con CPV-2, es importante recalcar que se necesitan estudios dirigidos a las mutaciones en NS1 y VP2 que se presentaron en el aislado MX-ABM30 para poder determinar su impacto real en la patogénesis y antigenicidad de CBoV-1.

Tras el análisis de las secuencias de aminoácidos de las proteínas de la cápside de los virus CPV-2 y CBoV-1, la caracterización antigénica basada en la determinación de la capacidad neutralizante de anticuerpos generados a partir de cepas vacunales frente a cepas de campo permite evaluar su eficacia contra las variantes virales circulantes. Debido a que actualmente no existen vacunas disponibles para CBoV, la caracterización antigénica se llevó a cabo exclusivamente para los aislados de CPV-2 del presente trabajo.

En la última década se han incrementado los casos a nivel global de caninos que no desarrollan una inmunidad activa contra CPV-2 a pesar de haberse administrado una vacuna contra el virus, dejando expuesto al paciente a una infección por CPV-2 (Decaro et al., 2020; H. Zhou et al., 2025). Decaro et al.

(2020) describen que entre las principales causas de inmunización fallida están la presencia de anticuerpos maternos, una respuesta humoral deficiente por parte del paciente, la reversión de las cepas vacunales a virus virulentos, errores en la manufactura y/o almacenamiento de las vacunas y las variantes emergentes de CPV-2.

En un estudio en Brasil señalaron que existían diferencias genéticas y estructurales entre las cepas vacunales y las cepas de campo de CPV-2 (Silva et al., 2022). A pesar de que los subtipos de CPV-2 son antigénicamente distintos, las vacunas actuales proporcionan protección cruzada frente a todas las variantes (Cavalli et al., 2008). No obstante, se han documentado casos de enfermedad en caninos vacunados, aumentando la preocupación de la efectividad de las vacunas contra variantes emergentes de CPV-2, especialmente contra las nuevas variantes de CPV-2c (Alexis et al., 2021; Decaro et al., 2020).

En el presente estudio fue evaluado el potencial neutralizante de los anticuerpos generados por la inmunización con las cepas vacunales Cornell y NL-35-D (dos de las vacunas comerciales más empleadas en el área metropolitana de Monterrey) frente a 12 aislados de CPV-2c de la misma región, seis provenientes de pacientes con GE y seis de pacientes con SDHA.

Los resultados de las pruebas de seroneutralización indicaron que los antisueros generados por las cepas vacunales Cornell y NL-35-D mostraron títulos neutralizantes de 1:140, equivalente a una dosis neutralizante de $2.15 -\log_{10} ND_{50}$, frente a su cepa homóloga. Por otro lado, ambos antisueros mostraron títulos neutralizantes de 1:47 ($1.67 -\log_{10} ND_{50}$), frente a los aislados MX-ABM4, MX-ABM8, MX-ABM15, MX-ABM16, MX-ABM19, MX-ABM25, MX-ABM37, MX-ABM55, MX-ABM56, MX-ABM69 y MX-ABM151, y un título neutralizante de 1:140 ($2.15 -\log_{10} ND_{50}$) frente al aislado MX-ABM24.

Estos hallazgos coinciden con lo descrito por Cavalli et al. (2008), quienes observaron que animales inmunizados con cepas CPV-2 desarrollaron títulos de

anticuerpos neutralizantes más bajos frente a las variantes CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c en comparación con el virus homólogo.

Aunque en el presente estudio la reducción en los títulos de seroneutralización frente a los aislados de CPV-2c fue menor a la reportada previamente, estas diferencias podrían atribuirse a variaciones biológicas entre las especies utilizadas para generar los antisueros, así como también a diferencias metodológicas en las pruebas de seroneutralización.

El aislado MX-ABM24 que presentó una dosis neutralizante mayor a los demás aislados, mostró la mutación T170I en la proteína VP2. No obstante, como se mencionó previamente, este residuo no se localiza en una región expuesta de la cápside, por lo que su contribución directa a la antigenicidad del aislado es limitada. Por otra parte, los aislados MX-ABM15, MX-ABM55, MX-ABM56 y MX-ABM151, que presentaron la mutación T440A, presentaron dosis neutralizantes similares a los aislados carentes de esta mutación. Lo anterior puede deberse a que la proteína VP2 contiene múltiples regiones de epítopos reconocidas por las células B, localizadas en regiones superficiales de la proteína, que participan en la unión al receptor, el tropismo del hospedador y la respuesta de anticuerpos neutralizantes (Silva et al., 2022). Además, se ha demostrado que los anticuerpos policlonales se unen a múltiples regiones de la cápside, más allá de la espícula de tres pliegues de la proteína VP2 (Hartmann et al., 2023).

Sin embargo, recientemente han asociado diversas mutaciones en la proteína VP2 con la deriva antigénica de CPV-2, lo que podría desencadenar una evasión de la respuesta inmune, así como inmunizaciones poco eficientes (Hao, Li, Xiao, et al., 2022; Magouz et al., 2023; Oliveira et al., 2019; Silva et al., 2022). Las mutaciones F267Y, Y324I y T440A en VP2 están localizadas en bucles superficiales altamente antigénicos y se han asociado a la evasión de la respuesta inmune y fallas en la vacunación (Capozza et al., 2023; Polat et al., 2019). Aunque en este trabajo las mutaciones N56D, V139I, T170I, T245P y T440A no mostraron un efecto directo sobre la capacidad neutralizante, la

acumulación de modificaciones en las regiones antigénicas de la proteína VP2 podrían contribuir a una disminución progresiva en la eficacia vacunal.

Es importante señalar que los aislados provenientes de coyotes (MX-ABM55 y MX-ABM56) mostraron un patrón de seroneutralización similar al observado en aislados de caninos domésticos, lo que sugiere una estrecha relación antigénica entre las cepas que circulan en ambos hospedadores y respalda la reciente transmisión interespecie.

En conjunto, las pruebas de seroneutralización sugieren que las cepas vacunales Cornell y NL-35-D conservan la capacidad de inducir una respuesta neutralizante frente a las variantes de CPV-2c que circulan en caninos del área metropolitana de Monterrey. Sin embargo, la reducción en los títulos neutralizantes frente a los aislados respalda la existencia de diferencias antigénicas entre el CPV-2 original y las variantes de CPV-2c circulantes, tal como lo reportan Cavalli et al. (2008).

La continua evolución genética de CPV-2 resalta la importancia de sostener una vigilancia molecular constante y de reevaluar periódicamente la capacidad neutralizante de los anticuerpos generados con las cepas vacunales con el fin de garantizar una protección adecuada frente a las nuevas variantes de CPV-2.

9 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El presente estudio permitió caracterizar a las variantes genéticas de virus ADN asociados al síndrome de diarrea hemorrágica aguda (SDHA) en caninos del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León.

Fue confirmada la presencia de CPV-2 en monoinfecciones, así como también en coinfecciones con los virus emergentes CBoV-1, CBoV-2 y CCV, evidenciando la diversidad viral implicada en cuadros de gastroenteritis en caninos de la región.

El aislamiento exitoso de CPV-2 y CBoV-1 en células MDCK, confirmó la susceptibilidad de esta línea celular para estos virus, estableciendo el aislamiento viral como un método diagnóstico viable. Sin embargo, no se logró establecer el aislamiento de CBoV-2 y CCV en esta línea celular a pesar de confirmar su presencia en las muestras clínicas de los caninos.

A partir de los aislados virales, se amplificó y secuenció el genoma completo de diez aislados de CPV-2, de los cuales seis provenían de pacientes con gastroenteritis no hemorrágica (GE) y cuatro de pacientes con SDHA. El análisis filogenético reveló que los aislados de CPV-2 obtenidos en el presente estudio fueron del subtipo CPV-2c y mostraron una estrecha relación genética con cepas reportadas en el continente americano, especialmente con cepas de Estados Unidos.

Además, se demostró la relación genética entre los aislados provenientes de coyotes (MX-ABM55 y MX-ABM56) con los aislados de caninos del presente trabajo, sugiriendo una posible transmisión cruzada de CPV-2 entre fauna silvestre y caninos domésticos, favorecida por la estrecha relación de estas especies en las zonas periurbanas de Monterrey. Hasta donde se tiene conocimiento, este es el primer reporte en México de una infección clínica por CPV-2c en coyotes silvestres. Evidenciando la diseminación de CPV-2 más allá del entorno doméstico, con la capacidad de causar enfermedad clínica en hospederos silvestres.

La caracterización genética de los aislados de CPV-2 permitió identificar diversas sustituciones de aminoácidos en las proteínas NS y VP del virus. Algunas de estas sustituciones se localizan en sitios previamente relacionados con procesos como la replicación viral, la antigenicidad y la determinación del rango de hospedero, lo que sugiere su posible participación en la evolución del virus y su patogenicidad. Sin embargo, no se identificaron mutaciones que se asocien directamente a la presencia del SDHA.

De igual forma, se amplificó y secuenció el genoma completo de CBoV-1 a partir del aislado MX-ABM30, proveniente de un paciente con SDHA. Los resultados del análisis filogenético mostraron una relación genética cercana entre el aislado MX-ABM30 y cepas de CBoV-1 reportadas en Estados Unidos, Portugal, Japón e Italia.

La caracterización genética del aislado MX-ABM30, al igual que con los aislados de CPV-2, permitió identificar sustituciones de aminoácidos en las proteínas NS y VP que pudieran tener un papel en la replicación viral, la producción de las proteínas estructurales y en la antigenicidad del virus, que en conjunto podrían ser de importancia en la presentación del SDHA. Cabe mencionar que esta muestra presentó una coinfección de los virus incluidos en este estudio (CPV-2, CCV, CBoV-1 y CBoV-2), por lo que no es posible asociar la enfermedad solamente a CBoV-1.

Hasta donde se tiene conocimiento, este estudio representa el primer reporte del aislamiento y la caracterización de CBoV-1 en México, lo que aporta información novedosa sobre la epidemiología de CBoV y sienta las bases para futuros estudios enfocados en su distribución y su rol en enfermedades entéricas de la población canina del país.

Es importante considerar que, debido a la naturaleza descriptiva de este estudio, no es posible establecer una relación causal directa entre las sustituciones identificadas en las proteínas de virales y cambios funcionales específicos. Se requieren de estudios funcionales dirigidos que permitan evaluar el impacto de

las sustituciones identificadas en los aislados de CPV-2 y CBoV-1 con el fin de comprender su verdadero papel en la patogénesis y adaptación de estos virus.

Las pruebas de seroneutralización revelaron que los antisueros generados a partir de las cepas vacunales Cornell y NL-35-D, basadas en la cepa de CPV-2 original, tienen capacidad de neutralizar a las cepas circulantes de CPV-2c del área metropolitana de Monterrey, independientemente de la presencia de SDHA o GE y de las mutaciones específicas identificadas en el gen VP2.

En conjunto, estos resultados confirman la circulación de variantes genéticas de CPV-2c y CBoV-1 en caninos domésticos con SDHA y GE, así como la infección clínica de CPV-2c en coyotes silvestres de México. Sin embargo, con base en los datos obtenidos, no es posible establecer una asociación directa entre estas diferencias genéticas y la presentación de SDHA y GE.

Adicionalmente, los resultados de las pruebas de seroneutralización indican que, a pesar de la reducción observada en los títulos neutralizantes frente a los aislados de CPV-2c, no se evidenciaron diferencias antigénicas que sugieran una capacidad de evadir por completo la respuesta inmune generada por las cepas vacunales basadas en la cepa de CPV-2 original.

A partir de los hallazgos de este proyecto, es posible implementar diversas áreas de investigación a futuro. Incrementar el número de secuencias genéticas analizadas contribuiría a generar un panorama más representativo de la diversidad genética de CPV-2 y CBoV, tanto en el norte de México como en el resto del país. Asimismo, sería relevante realizar estudios funcionales más profundos que permitan determinar el impacto biológico de las mutaciones identificadas en CPV-2 y CBoV-1, particularmente de aquellas localizadas en dominios importantes de las proteínas NS1 y VP2, con el objetivo de esclarecer su participación en la replicación viral y en la antigenicidad del virus, respectivamente. De igual manera, resulta necesario evaluar la eficacia de las vacunas comerciales frente a variantes emergentes mediante estudios *in vivo*, a fin de correlacionar los resultados obtenidos en las pruebas de seroneutralización

del presente trabajo con una respuesta inmune en condiciones reales. Adicionalmente, sería importante profundizar en el estudio de la dinámica de transmisión de CPV-2c entre cánidos domésticos y silvestres, así como en el posible papel de las poblaciones silvestres en la circulación y mantenimiento de variantes emergentes.

Finalmente, los hallazgos de esta investigación subrayan la importancia de mantener programas de vigilancia epidemiológica y molecular continuas, que permitan la detección oportuna de nuevas variantes virales tanto en poblaciones domésticas como silvestres, y contribuyan al desarrollo de estrategias de control más efectivas, incluyendo la posible actualización de cepas vacunales.

10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexis, V. A., Sonia, V., Daniela, S., Miguel, G., Timothy, H., Valentina, F., Lisette, L., & Leonardo, S. (2021). Molecular analysis of full-length VP2 of canine parvovirus reveals antigenic drift in CPV-2b and CPV-2c variants in central Chile. *Animals*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/ani11082387>
- Allison, A. B., Kohler, D. J., Fox, K. A., Brown, J. D., Gerhold, R. W., Shearn-Bochsler, V. I., Dubovi, E. J., Parrish, C. R. & Holmes, E. C. (2013). Frequent Cross-Species Transmission of Parvoviruses among Diverse Carnivore Hosts. *Journal of Virology*, 87(4), 2342–2347. <https://doi.org/10.1128/jvi.02428-12>
- Anderson, A., Hartmann, K., Leutenegger, C. M., Proksch, A. L., Mueller, R. S., & Unterer, S. (2017). Role of canine circovirus in dogs with acute haemorrhagic diarrhoea. *Veterinary Record*, 180(22). <https://doi.org/10.1136/vr.103926>
- Binn, L. N., Lazar, E. C., Eddy, G. A., & Kajima, M. (1970). Recovery and Characterization of a Minute Virus of Canines¹. *Infection and Immunity*, 1(5), 503–508. <https://doi.org/10.1128/iai.1.5.503-508.1970>
- Bodewes, R., Lapp, S., Hahn, K., Habierski, A., Förster, C., König, M., Wohlsein, P., Osterhaus, A. D. M. E., & Baumgärtner, W. (2014). Novel canine bocavirus strain associated with severe enteritis in a dog litter. *Veterinary Microbiology*, 174(1–2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.08.025>
- Busqueta, A. (2020). *Detección Molecular de Virus Emergentes en Caninos con Gastroenteritis Aguda del Área Metropolitana de Monterrey* [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León]. <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/19983>
- Caddy, S. L. (2018). New viruses associated with canine gastroenteritis. *Veterinary Journal*, 232, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.12.009>

- Capozza, P., Buonavoglia, A., Pratelli, A., Martella, V., & Decaro, N. (2023). Old and Novel Enteric Parvoviruses of Dogs. *Pathogens*, 12(5), 722. <https://doi.org/10.3390/pathogens12050722>
- Cavalli, A., Martella, V., Desario, C., Camero, M., Bellacicco, A. L., De Palo, P., Decaro, N., Elia, G., & Buonavoglia, C. (2008). Evaluation of the antigenic relationships among canine parvovirus type 2 variants. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(3), 534–539. <https://doi.org/10.1128/CVI.00444-07>
- Cedillo, D. (2019). *Caracterización Genética de Cepas de Parvovirus Canino Presentes en el Área Metropolitana de Monterrey, Nuevo León* [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León]. <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/19699>
- Choi, J. W., Jung, J. Y., Lee, J. Il, Lee, K. K., & Oem, J. K. (2016). Molecular characteristics of a novel strain of canine minute virus associated with hepatitis in a dog. *Archives of Virology*, 161(8), 2299–2304. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2895-7>
- Choi, J. W., Lee, K. H., Lee, J. Il, Lee, M. H., Lee, K. K., & Oem, J. K. (2015). Genetic characteristics of canine bocaviruses in Korean dogs. *Veterinary Microbiology*, 179(3–4), 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.023>
- Crowther, R. A., Berriman, J. A., Curran, W. L., Allan, G. M., & Todd, D. (2003). Comparison of the Structures of Three Circoviruses: Chicken Anemia Virus, Porcine Circovirus Type 2, and Beak and Feather Disease Virus. *Journal of Virology*, 77(24), 13036–13041. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.24.13036-13041.2003>
- da Silva, D. F., Ciola, M., Lopes, V. de O., Matias, D. R. M., Oliveira, T. S., & Castro, A. M. M. G. de. (2025). Canine circovirus: emergence, adaptation, and challenges for animal and public health. *Frontiers in Veterinary Science*, 12, 1535650. <https://doi.org/10.3389/fvets.2025.1535650>

- Decaro, N., Buonavoglia, C., & Barrs, V. R. (2020). Canine parvovirus vaccination and immunisation failures: Are we far from disease eradication? *Veterinary Microbiology*, 247, 108760. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108760>
- Dong, Y., Fasina, O. O., & Pintel, D. J. (2019). Minute Virus of Canines NP1 Protein Interacts with the Cellular Factor CPSF6 To Regulate Viral Alternative RNA Processing. *Journal of Virology*, 93(2). <https://doi.org/10.1128/jvi.01530-18>
- Faz, M., Martínez, J. S., Gómez, L. B., Quijano-Hernández, I., Fajardo, R., & Del Ángel-Caraza, J. (2019). Origin and genetic diversity of canine parvovirus 2c circulating in Mexico. *Archives of Virology*, 164(2), 371–379. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-4072-7>
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the Bootstrap. *Evolution*, 4(39), 783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>.
- Giraldo-Ramirez, S., Rendon-Marin, S., & Ruiz-Saenz, J. (2020). Phylogenetic, evolutionary and structural analysis of canine parvovirus (CPV-2) antigenic variants circulating in Colombia. *Viruses*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/v12050500>
- Giraldo-Ramirez, S., Rendon-Marin, S., Vargas-Bermudez, D. S., Jaime, J., & Ruiz-Saenz, J. (2020). First detection and full genomic analysis of Canine Circovirus in CPV-2 infected dogs in Colombia, South America. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74630-8>
- González-Hein, G., Huaracán, B., & Aguirre, I. (2020). First report of molecular detection of Carnivore bocaparvovirus 1 (former CnMV: Canine Minute Virus) in Chilean domestic dogs. En *Austral J Vet Sci* (Vol. 52). <https://doi.org/10.4067/S0719-81322020000200063>
- Guo, D., Wang, Z., Yao, S., Li, C., Geng, Y., Wang, E., Zhao, X., Su, M., Wei, S., Wang, X., Feng, L., Chang, Y. fu, & Sun, D. (2016). Epidemiological investigation reveals genetic diversity and high co-infection rate of canine bocavirus strains circulating in

Heilongjiang province, Northeast China. *Research in Veterinary Science*, 106, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.03.003>

Gurda, B. L., Parent, K. N., Bladek, H., Sinkovits, R. S., DiMattia, M. A., Rence, C., Castro, A., McKenna, R., Olson, N., Brown, K., Baker, T. S., & Agbandje-McKenna, M. (2010). Human Bocavirus Capsid Structure: Insights into the Structural Repertoire of the Parvoviridae. *Journal of Virology*, 84(12), 5880–5889. <https://doi.org/10.1128/jvi.02719-09>

Hao, X., Li, Y., Chen, H., Chen, B., Liu, R., Wu, Y., Xiao, X., Zhou, P., & Li, S. (2022). Canine Circovirus Suppresses the Type I Interferon Response and Protein Expression but Promotes CPV-2 Replication. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), 6382. <https://doi.org/10.3390/ijms23126382>

Hao, X., Li, Y., Xiao, X., Chen, B., Zhou, P., & Li, S. (2022). The Changes in Canine Parvovirus Variants over the Years. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19). <https://doi.org/10.3390/ijms231911540>

Hartmann, S. R., Charnesky, A. J., Früh, S. P., López-Astacio, R. A., Weichert, W. S., DiNunno, N., Cho, S. H., Bator, C. M., Parrish, C. R., & Hafenstein, S. L. (2023). Cryo EM structures map a post vaccination polyclonal antibody response to canine parvovirus. *Communications Biology*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05319-7>

Hematian, A., Sadeghifard, N., Mohebi, R., Taherikalani, M., Nasrolahi, A., Amraei, M., & Ghafourian, S. (2016). Traditional and Modern Cell Culture in Virus Diagnosis. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 7(2), 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2015.11.011>

Isidan, H., & Turan, T. (2021). A comprehensive study of canine parvoviruses (Carnivore protoparvovirus 1, Carnivore bocaparvovirus 1 and 2) from shelter dogs in Turkey. *Veterinarni Medicina*, 66(10), 423–430. <https://doi.org/10.17221/130/2020-VETMED>

- Kapoor, A., Dubovi, E. J., Henriquez-Rivera, J. A., & Lipkin, W. I. (2012). Complete Genome Sequence of the First Canine Circovirus. *Journal of Virology*, *86*(12), 7018–7018. <https://doi.org/10.1128/jvi.00791-12>
- Kapoor, A., Mehta, N., Dubovi, E. J., Simmonds, P., Govindasamy, L., Medina, J. L., Street, C., Shields, S., & Ian Lipkin, W. (2012). Characterization of novel canine bocaviruses and their association with respiratory disease. *Journal of General Virology*, *93*(2). <https://doi.org/10.1099/vir.0.036624-0>
- Khatri, R., Poonam, Mohan, H., Minakshi, & CS, P. (2017). Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis and Treatment of Canine Parvovirus Disease in Dogs: A Mini Review. *Journal of Veterinary Science & Medical Diagnosis*, *06*(03). <https://doi.org/10.4172/2325-9590.1000233>
- Kimura, M. (1980). A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. *Journal of Molecular Evolution*, *16*, 111–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Li, G., Ji, S., Zhai, X., Zhang, Y., Liu, J., Zhu, M., Zhou, J., & Su, S. (2017). Evolutionary and genetic analysis of the VP2 gene of canine parvovirus. *BMC Genomics*, *18*(1), 534. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3935-8>
- Li, L., Liu, Z., Liang, R., Yang, M., Yan, Y., Jiao, Y., Jiao, Z., Hu, X., Li, M., Shen, Z., & Peng, G. (2024). Novel mutation N588 residue in the NS1 protein of feline parvovirus greatly augments viral replication. *Journal of Virology*, *98*(5). <https://doi.org/10.1128/jvi.00093-24>
- Li, L., McGraw, S., Zhu, K., Leutenegger, C. M., Marks, S. L., Kubiski, S., Gaffney, P., Dela Cruz, F. N., Wang, C., Delwart, E., & Pesavento, P. A. (2013). Circovirus in tissues of dogs with vasculitis and hemorrhage. *Emerging Infectious Diseases*, *19*(4), 534–541. <https://doi.org/10.3201/eid1904.121390>
- Li, L., Pesavento, P. A., Leutenegger, C. M., Estrada, M., Coffey, L. L., Naccache, S. N., Samayoa, E., Chiu, C., Qiu, J., Wang, C., Deng, X., & Delwart, E. (2013). A novel

bocavirus in canine liver. *Virology Journal*, 10, 54. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-54>

Loor-Giler, A., Santander-Parra, S., Castillo-Reyes, S., Campos, M., Mena-Pérez, R., Prado-Chiriboga, S., & Nuñez, L. (2025). Characterization, Quantification, and Molecular Identification of Co-Infection of Canine Parvovirus (CPV-2) Variants in Dogs Affected by Gastroenteritis in Ecuador During 2022–2023. *Veterinary Sciences*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/vetsci12010046>

López-Pérez, A. M., Moreno, K., Chaves, A., Ibarra-Cerdeña, C. N., Rubio, A., Foley, J., List, R., Suzán, G., & Sarmiento, R. E. (2019). Carnivore Protoparvovirus 1 at the Wild–Domestic Carnivore Interface in Northwestern Mexico. *EcoHealth*, 16(3), 502–511. <https://doi.org/10.1007/s10393-019-01436-0>

Magouz, A., El-Kon, I., Raya-Álvarez, E., Khaled, E., Alkhalefa, N., Alhegaili, A. S., El-khadragy, M. F., Agil, A., & Elmahallawy, E. K. (2023). Molecular typing of canine parvovirus type 2 by VP2 gene sequencing and restriction fragment length polymorphism in affected dogs from Egypt. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1254060>

Manteufel, J., & Truyen, U. (2009). Animal bocaviruses: A brief review. *Intervirology*, 51(5), 328–334. <https://doi.org/10.1159/000173734>

Mazzaferro, E. M. (2020). Update on Canine Parvoviral Enteritis. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 50(6), 1307–1325. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2020.07.008>

Miao, B., Chen, S., Zhang, X., Ma, P., Ma, M., Chen, C., Zhang, X., Chang, L., Du, Q., Huang, Y., & Tong, D. (2022). T598 and T601 phosphorylation sites of canine parvovirus NS1 are crucial for viral replication and pathogenicity. *Veterinary Microbiology*, 264. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109301>

Mietzsch, M., Pénczes, J. J., & Agbandje-Mckenna, M. (2019). Twenty-five years of structural parvovirology. *Viruses*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/v11040362>

- Mira, F., Canuti, M., Purpari, G., Cannella, V., Di Bella, S., Occhiogrosso, L., Schirò, G., Chiaramonte, G., Barreca, S., Pisano, P., Lastra, A., Decaro, N., & Guercio, A. (2019). Molecular characterization and evolutionary analyses of carnivore protoparvovirus 1 NS1 Gene. *Viruses*, *11*(4). <https://doi.org/10.3390/v11040308>
- Miranda, C., & Thompson, G. (2016). Canine parvovirus: The worldwide occurrence of antigenic variants. *Journal of General Virology*, *97*(9), 2043–2057. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000540>
- Niskanen, E. A., Ihalainen, T. O., Kalliolinna, O., Häkkinen, M. M., & Vihinen-Ranta, M. (2010). Effect of ATP Binding and Hydrolysis on Dynamics of Canine Parvovirus NS1. *Journal of Virology*, *84*(10), 5391–5403. <https://doi.org/10.1128/jvi.02221-09>
- Niskanen, E. A., Kalliolinna, O., Ihalainen, T. O., Häkkinen, M., & Vihinen-Ranta, M. (2013). Mutations in DNA Binding and Transactivation Domains Affect the Dynamics of Parvovirus NS1 Protein. *Journal of Virology*, *87*(21), 11762–11774. <https://doi.org/10.1128/jvi.01678-13>
- Ohshima, T., Kawakami, K., Abe, T., & Mochizuki, M. (2010). A minute virus of canines (MVC: canine bocavirus) isolated from an elderly dog with severe gastroenteritis, and phylogenetic analysis of MVC strains. *Veterinary Microbiology*, *145*(3–4), 334–338. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.03.033>
- Oliveira, P. S. B., Cargnelutti, J. F., Masuda, E. K., Weiblen, R., & Flores, E. F. (2019). New variants of canine parvovirus in dogs in southern Brazil. *Archives of Virology*, *164*(5), 1361–1369. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04198-w>
- 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. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *27*(1), 107–111. <https://doi.org/10.1177/1040638714559969>
- Piewbang, C., Jo, W. K., Puff, C., Ludlow, M., van der Vries, E., Banlunara, W., Rungsipipat, A., Kruppa, J., Jung, K., Techangamsuwan, S., Baumgärtner, W., &

- Osterhaus, A. D. M. E. (2018). Canine Bocavirus Type 2 Infection Associated With Intestinal Lesions. *Veterinary Pathology*, 55(3), 434–441. <https://doi.org/10.1177/0300985818755253>
- Piewbang, C., Jo, W. K., Puff, C., Van Der Vries, E., Kedsangsakonwut, S., Rungsipipat, A., Kruppa, J., Jung, K., Baumgärtner, W., Techangamsuwan, S., Ludlow, M., & Osterhaus, A. D. M. E. (2018). Novel canine circovirus strains from Thailand: Evidence for genetic recombination. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25936-1>
- Polat, P. F., Şahan, A., Aksoy, G., Timurkan, M. O., & Dinçer, E. (2019). Molecular and restriction fragment length polymorphism analysis of canine parvovirus 2 (CPV-2) in dogs in southeast Anatolia, Turkey. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 86(1). <https://doi.org/10.4102/ojvr.v86i1.1734>
- Quiroga, E. D., Acuña, D. L. S., Ortega, G. A., Martinez, G. C., & Roldán, P. C. (2024). Genome Sequences of Canine Parvovirus Type 2c Prevalent in Western Mexico. *Archives of Razi Institute*, 79(2), 387–394. <https://doi.org/10.32592/ARI.2024.79.2.387>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Silva, L. M. N., Santos, M. R., Carvalho, J. A., Carvalho, O. V., Favarato, E. S., Fietto, J. L. R., Bressan, G. C., & Silva-Júnior, A. (2022). Molecular analysis of the full-length VP2 gene of Brazilian strains of canine parvovirus 2 shows genetic and structural variability between wild and vaccine strains. *Virus Research*, 313. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198746>
- Singh, P., Kaur, G., Chandra, M., & Dwivedi, P. N. (2021). Prevalence and molecular characterization of canine parvovirus. *Veterinary World*, 14(3), 603–606. <https://doi.org/10.14202/VETWORLD.2021.603-606>



- Tuong, N. M., Piewbang, C., Rungsipipat, A., & Techangamsuwan, S. (2021). Detection and molecular characterization of two canine circovirus genotypes co-circulating in Vietnam. *Veterinary Quarterly*, *41*(1), 232–241. <https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1967511>
- Umar, S., Gao, D., Kim, S., Cheng, Y., Fang, Z., Zhongqi, Q., Yu, W., & Anderson, B. D. (2024). Molecular characterization of canine parvovirus type 2 (CPV2) reveals a high prevalence of the CPV2c genotype among dogs suffering from diarrhea. *Animal Diseases*, *4*(1). <https://doi.org/10.1186/s44149-023-00107-6>
- Unterer, S., & Busch, K. (2021). Acute Hemorrhagic Diarrhea Syndrome in Dogs. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, *51*(1), 79–92. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2020.09.007>
- Velez, M., Mietzsch, M., Hsi, J., Bell, L., Chipman, P., Fu, X., & McKenna, R. (2023). Structural Characterization of Canine Minute Virus, Rat and Porcine Bocavirus. *Viruses*, *15*(9). <https://doi.org/10.3390/v15091799>
- Wang, X., Hao, X., Zhao, Y., Xiao, X., Li, S., & Zhou, P. (2025). Canine parvovirus NS1 induces host translation shutoff by reducing mTOR phosphorylation. *Journal of Virology*, *99*(1). <https://doi.org/10.1128/jvi.01463-24>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, *13*, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Zhou, H., Cui, K., Su, X., Zhang, H., Xiao, B., Li, S., & Yang, B. (2025). Overview of Recent Advances in Canine Parvovirus Research: Current Status and Future Perspectives. *Microorganisms*, *13*(1), 47. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13010047>
- Zhou, P., Zeng, W., Zhang, X., & Li, S. (2017). The genetic evolution of canine parvovirus - A new perspective. *PLoS ONE*, *12*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175035>

11 ANEXOS

ANEXO 1. DICTAMEN APROBADO POR EL COMITÉ DE BIOÉTICA Y BIENESTAR ANIMAL

	<p>UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA</p> <p>COMITÉ DE BIOÉTICA Y BIENESTAR ANIMAL</p> <p>DICTAMEN DEL COMITÉ DE BIOÉTICA Y BIENESTAR ANIMAL</p>	 <p>RC-INV-004 Rev. 01-09/21</p>
DICTAMEN		
DEL COMITÉ DE BIOÉTICA Y BIENESTAR ANIMAL		
<p>1. MARCO REGULATORIO: Lineamiento para el Bienestar animal en la Educación y la Investigación Capítulo VI. De la Evaluación de Protocolos de Investigación y Prácticas Artículos 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80.</p>		
<p>2. IDENTIFICACIÓN DEL DICTAMEN: NÚMERO DEL DICTAMEN: Folio 31/2022, Dictamen 33/2022. FECHA DE EMISIÓN: 29 de abril del 2022.</p>		
<p>3. IDENTIFICACIÓN DEL PROTOCOLO: DOI: 038 TÍTULO: "Caracterización genética y antigénica de virus DNA presentes en caninos con síndrome de diarrea hemorrágica aguda (SDHA)". GRADO A OBTENER: Doctor en Ciencia Animal. PUBLICACIÓN: No aplica. INVESTIGADOR / DOCENTE RESPONSABLE: Dra. Sibilina Cedillo Rosales. M.V.Z RESPONSABLE: MVZ. MC. Armando Busqueta Medina. CANDIDATO: MVZ. MC. Armando Busqueta Medina.</p>		
<p>RESOLUCIÓN;</p> <p>POSITIVA (POR UNANIMIDAD DE ACUERDO AL ARTÍCULO 75. NUMERAL 75.3 DEL LINEAMIENTO PARA EL BIENESTAR ANIMAL EN LA EDUCACIÓN Y LA INVESTIGACIÓN DE LA FMVZ - UANL).</p>		
<p>Pág. 1</p>		

ANEXO 2. DICTAMEN APROBADO POR EL COMITÉ DE BIOSEGURIDAD E HIGIENE


	<p>UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA COMITÉ DE BIOSEGURIDAD E HIGIENE Dictamen de Revisión del Protocolo de Investigación/Práctica</p>	 <p>MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA RC-INV-003 Rev. 00-06/21</p>
---	--	---

Título (proyecto investigación/ práctica):	Caracterización genética y antigénica de virus DNA presentes en caninos con Síndrome de Diarrea Hemorrágica Aguda (SDHA)	ID CSBH: 075
Investigador Principal: Nombre		
Dictamen:	Aprobado con observaciones	Fecha dictamen: 18/Mayo/2022
Observaciones/Modificaciones:	Anexar referencia de desinfección	

Lista de observaciones/modificaciones:

- Añadir una referencia que respalde la eficacia del método de desinfección en la sección 4.1 y 4.2.

Nombre y firma recibido: _____

Sello CBSH: 

Miembros del Comité de Bioseguridad e Higiene

Julio C. Cruz Valdéz	_____
Oscar D. García Pérez	_____
Alicia G. Marroquín Cardona	_____
Rodrigo Hernández Santiago	_____
Karina W. Vázquez Cisneros	_____

Dictamen Comité de Bioseguridad e Higiene FMVZ UANL Página: 1

ANEXO 3. CUESTIONARIO EPIDEMIOLÓGICO

Nombre del propietario:		Fecha:
Nombre mascota:	Sexo:	Raza:
Edad:	Clínica de procedencia:	Municipio de origen:
Teléfono clínica:		

Marcar con "X" en donde corresponda y contestar lo que se le pide.

SIGNOS CLÍNICOS				
	SI	NO	TIPO	DÍAS CON SÍNTOMA
Diarrea				
Vómito				
Deshidratación				
Pérdida de consciencia				
Muerte				
Otros:				
Comentarios				
VACUNACIÓN				
	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				

ANEXO 4. DATOS DE LAS MUESTRAS CLÍNICAS

No. muestra	Especie	Signología	Muerte	PCR CPV-2	PCR RFLP*	PCR CCV	PCR CBoV-1	PCR CBoV-2
1	Canino doméstico	SDHA	No	+	1	-	-	-
2	Canino doméstico	SDHA	Desconocido	+	NE	-	-	-
3	Canino doméstico	GE	No	+	NE	-	-	-
4	Canino doméstico	GE	No	+	4	-	-	-
5	Canino doméstico	SDHA	Desconocido	+	2	-	-	-
6	Canino doméstico	SDHA	No	+	NE	-	-	-
7	Canino doméstico	SDHA	No	+	3	-	-	-
8	Canino doméstico	SDHA	No	+	1	+	-	-
9	Canino doméstico	SDHA	No	+	1	-	-	-
10	Canino doméstico	SDHA	Si	+	1	-	-	-
11	Canino doméstico	GE	No	+	NE	-	-	-
12	Canino doméstico	GE	No	-	NE	-	-	-
13	Canino doméstico	SDHA	No	+	NE	-	-	-
14	Canino doméstico	SDHA	Si	+	NE	+	-	-
15	Canino doméstico	GE	No	+	1	-	-	+
16	Canino doméstico	SDHA	Si	+	1	-	-	+

17	Canino doméstico	GE	No	+	1	-	-	-
18	Canino doméstico	SDHA	No	+	3	+	-	-
19	Canino doméstico	SDHA	No	+	3	+	-	-
20	Canino doméstico	SDHA	No	+	3	+	-	-
21	Canino doméstico	GE	Si	+	NE	-	-	+
22	Canino doméstico	GE	No	+	NE	-	+	-
23	Canino doméstico	GE	No	+	NE	-	-	-
24	Canino doméstico	GE	No	+	2	+	-	-
25	Canino doméstico	SDHA	Si	+	NE	-	+	-
26	Canino doméstico	GE	No	+	1	-	-	-
27	Canino doméstico	SDHA	Si	+	NE	-	-	-
28	Canino doméstico	GE	Si	+	1	-	+	-
29	Canino doméstico	GE	Si	+	NE	-	-	-
30	Canino doméstico	SDHA	Si	+	NE	+	+	+
31	Canino doméstico	GE	Desconocido	+	NE	-	-	-
32	Canino doméstico	GE	Desconocido	+	NE	-	-	-
33	Canino doméstico	GE	No	+	4	-	-	-
34	Canino doméstico	SDHA	No	+	2	+	-	+
35	Canino doméstico	SDHA	Si	+	2	-	+	-
36	Canino doméstico	SDHA	Si	+	3	-	+	-

37	Canino doméstico	GE	No	+	3	-	+	-
38	Canino doméstico	GE	No	+	2	-	-	-
39	Canino doméstico	GE	No	+	2	-	-	-
40	Canino doméstico	SDHA	No	+	1	-	-	-
41	Canino doméstico	GE	No	+	3	-	-	-
42	Canino doméstico	GE	No	+	1	-	-	-
43	Canino doméstico	GE	No	+	NE	-	-	-
44	Canino doméstico	SDHA	No	+	1	-	-	-
45	Canino doméstico	SDHA	Si	+	1	-	-	-
46	Canino doméstico	GE	No	+	NE	-	-	-
47	Canino doméstico	GE	Si	+	NE	-	-	-
48	Canino doméstico	GE	No	+	4	-	-	-
49	Canino doméstico	SDHA	Si	+	1	-	-	-
50	Canino doméstico	GE	Si	+	4	-	-	-
51	Canino doméstico	GE	No	+	3	-	-	-
52	Canino doméstico	GE	Si	+	4	-	-	-
53	Canino doméstico	SDHA	No	+	NE	-	-	-
54	Coyote	SDHA	Si	+	3	-	-	+
55	Coyote	GE	No	+	3	-	-	-
56	Coyote	GE	No	+	3	-	-	-

57	Canino doméstico	SDHA	Desconocido	+	NE	-	-	-
58	Canino doméstico	GE	Desconocido	+	NE	-	-	-
59	Canino doméstico	SDHA	No	+	CPV-2b	-	-	-
60	Canino doméstico	GE	Desconocido	+	NE	-	+	-
61	Canino doméstico	SDHA	Desconocido	+	NE	-	+	-
62	Canino doméstico	SDHA	Desconocido	+	NE	-	+	+
63	Canino doméstico	GE	Desconocido	+	1	-	-	-
64	Canino doméstico	SDHA	No	+	2	-	-	-
65	Canino doméstico	SDHA	No	+	1	-	-	-
66	Canino doméstico	GE	Si	+	2	-	-	-
67	Canino doméstico	GE	No	+	1	-	-	-
68	Canino doméstico	SDHA	No	+	1	-	-	-
69	Canino doméstico	SDHA	Si	+	2	-	+	-
70	Canino doméstico	SDHA	No	+	1	-	-	-
71	Canino doméstico	GE	No	+	4	-	-	-
72	Canino doméstico	GE	No	+	2	-	-	-
73	Canino doméstico	SDHA	Desconocido	+	1	-	-	-
74	Canino doméstico	GE	No	+	NE	-	-	-
75	Canino doméstico	SDHA	Desconocido	+	NE	-	-	-
76	Canino doméstico	GE	Desconocido	+	NE	-	-	-

77	Canino doméstico	SDHA	Desconocido	+	NE	-	-	-
78	Canino doméstico	SDHA	No	+	1	-	-	-
79	Canino doméstico	GE	Desconocido	+	NE	-	-	-
80	Canino doméstico	GE	No	+	NE	-	-	-
81	Canino doméstico	GE	No	+	NE	-	+	+
82	Canino doméstico	GE	Desconocido	+	NE	-	-	-
83	Canino doméstico	SDHA	No	+	NE	-	-	-
84	Canino doméstico	SDHA	No	+	NE	-	-	-
85	Canino doméstico	GE	Desconocido	+	NE	-	-	-
86	Canino doméstico	GE	Desconocido	+	NE	-	-	-
87	Canino doméstico	SDHA	No	+	NE	-	-	-
88	Canino doméstico	GE	No	+	NE	-	-	-
89	Canino doméstico	GE	No	+	NE	-	-	-
90	Canino doméstico	GE	No	+	NE	-	-	+
91	Canino doméstico	GE	No	+	NE	-	-	-
92	Canino doméstico	GE	No	+	NE	-	-	-
93	Canino doméstico	GE	No	+	NE	-	-	-
94	Canino doméstico	S/S	No	+	1	-	-	-
95	Canino doméstico	SDHA	Desconocido	+	NE	-	-	+
96	Canino doméstico	GE	No	+	NE	-	-	-

97	Canino doméstico	SDHA	No	+	1	-	-	-
98	Canino doméstico	GE	No	+	1	-	-	-
99	Canino doméstico	SDHA	No	+	1	-	-	-
100	Canino doméstico	GE	No	+	1	-	-	-
101	Canino doméstico	SDHA	No	-	NE	-	-	-
102	Canino doméstico	SDHA	No	+	NE	-	-	-
103	Canino doméstico	GE	Desconocido	+	1	-	-	-
104	Canino doméstico	S/S	No	-	NE	-	-	-
105	Canino doméstico	GE	Desconocido	+	NE	-	-	-
106	Canino doméstico	GE	No	-	NE	-	+	-
107	Canino doméstico	SDHA	Desconocido	-	NE	-	+	+
108	Canino doméstico	GE	No	+	NE	-	+	-
109	Canino doméstico	GE	No	+	NE	-	+	-
110	Canino doméstico	GE	No	+	NE	-	-	-
111	Canino doméstico	SDHA	Si	+	NE	+	-	-
112	Canino doméstico	GE	Desconocido	-	NE	-	-	-
113	Canino doméstico	S/S	No	-	NE	-	+	-
114	Canino doméstico	GE	Si	+	NE	-	-	+
115	Canino doméstico	SDHA	Si	+	NE	-	+	-
116	Canino doméstico	SDHA	No	+	NE	+	+	-

117	Canino doméstico	GE	Desconocido	-	NE	-	+	-
118	Canino doméstico	SDHA	Desconocido	+	NE	-	-	-
119	Canino doméstico	GE	Si	+	NE	-	-	-
120	Canino doméstico	SDHA	No	-	NE	-	-	-
121	Canino doméstico	SDHA	Si	+	NE	-	-	-
122	Canino doméstico	SDHA	Desconocido	-	NE	-	-	-
123	Canino doméstico	S/S	Desconocido	-	NE	-	-	-
124	Canino doméstico	S/S	Desconocido	-	NE	-	-	-
125	Canino doméstico	GE	Desconocido	-	NE	-	-	-
126	Canino doméstico	GE	Desconocido	-	NE	-	-	-
127	Canino doméstico	GE	Desconocido	-	NE	-	-	+
128	Canino doméstico	GE	Desconocido	+	NE	-	-	-
129	Canino doméstico	S/S	No	-	NE	-	-	+
130	Canino doméstico	S/S	No	-	NE	-	+	-
131	Canino doméstico	S/S	No	-	NE	-	-	-
132	Canino doméstico	S/S	No	-	NE	-	-	-
133	Canino doméstico	S/S	No	-	NE	-	-	-
134	Canino doméstico	S/S	No	-	NE	-	-	-
135	Canino doméstico	S/S	No	-	NE	-	-	-
136	Canino doméstico	S/S	No	-	NE	-	-	-

137	Canino doméstico	S/S	No	-	NE	-	-	-
138	Canino doméstico	S/S	No	-	NE	-	-	-
139	Canino doméstico	S/S	No	-	NE	-	-	-
140	Canino doméstico	S/S	No	-	NE	-	-	-
141	Canino doméstico	S/S	No	-	NE	-	+	-
142	Canino doméstico	S/S	No	-	NE	-	-	+
143	Canino doméstico	S/S	No	-	NE	-	-	-
144	Canino doméstico	S/S	No	-	NE	-	-	-
145	Canino doméstico	S/S	No	-	NE	-	-	-
146	Canino doméstico	S/S	No	-	NE	-	-	-
147	Canino doméstico	S/S	No	-	NE	-	-	-
148	Canino doméstico	GE	Desconocido	-	NE	-	-	-
149	Canino doméstico	GE	Desconocido	-	NE	-	-	-
150	Canino doméstico	GE	Desconocido	-	NE	-	-	-
151	Canino doméstico	SDHA	Si	+	1	-	-	-

* Los números representan el patrón de polimorfismo obtenido de acuerdo con la figura 9 del presente trabajo.
NE (No evaluado) En estas muestras no se estableció el patrón de polimorfismo.

**ANEXO 5. DATOS DE SECUENCIAS COMPLETAS DE CPV-2
OBTENIDAS DEL GENBANK**

Referencia GenBank	Aislado / Cepa	Genotipo	Huésped	País
MH800217	CoatiPV-2013	2c	Coatí	Argentina
OR528749	CPV_ARG22_2b	2b	Canino doméstico	Argentina
OR528748	CPV_ARG_13_2c	2c	Canino doméstico	Argentina
KY073269	UFMT	2c	Canino doméstico	Brasil
OP093953	PK05	2b	Canino doméstico	Brasil
MF423125	C67	2a	Coyote	Canadá
MF423124	C55	2b	Coyote	Canadá
MN862741	MIVI-73	2a	Mink	Canadá
MN862742	OTVI-13	2a	Nutria	Canadá
KY403998	YH	2a	Canino doméstico	China
KT382542	SH14	2a	Canino doméstico	China
MG013488	SH1516	2c	Canino doméstico	China
MK388674	HB2017	2c	Canino doméstico	China
OP985292	RCD-PrV_BJF6	2a	Paloma	China
MN840830	SH_1	2c	Canino doméstico	China
MT394167	QD-20	2c	Canino doméstico	China
OR528745	EC113	2a	Canino doméstico	Ecuador
OR528747	EC116	2c	Canino doméstico	Ecuador
OR528756	FPV_9_AR	FPV	Felino	Argentina
MK306289	CPV2c_1	2c	Canino doméstico	Corea
MK306290	CPV-2c_2	2c	Canino doméstico	Corea
OR363111	MEV_SD-4	MEV	Mink	China
MT448702	MX-ZAP 149	2c	Canino doméstico	México
MT448706	MX-ZAP H	2c	Canino doméstico	México
MT448703	MX-ZAP 166	2c	Canino doméstico	México
MT448704	MX-GDL A	2c	Canino doméstico	México
MT448705	MX-ZAP C	2c	Canino doméstico	México
MK895483	idUV1	2a	Canino doméstico	Nigeria
MK895484	idYV8	2a	Canino doméstico	Nigeria

MN451689	CPV616	2a	Canino doméstico	Nigeria
OR528751	CPV_PE_34_2a	2a	Canino doméstico	Perú
OR528750	CPV_PE3_2b	2b	Canino doméstico	Perú
OR528752	CPV_PE1_2c	2c	Canino doméstico	Perú
OQ366405	Turkey_Izmir_2	2b	Canino doméstico	Turquía
OQ366404	Turkey_Sanliurfa_3	2b	Canino doméstico	Turquía
MN832850	Taiwan_2018	2c	Pangolín	Taiwan
MN451677	CPV604	2b	Canino doméstico	Estados Unidos
MN451691	RACCPV1	2a	Mapache	Estados Unidos
MN451690	CPV617	2c	Canino doméstico	Estados Unidos
MN451679	CPV606	2c	Canino doméstico	Estados Unidos
MN451675	CPV601	2c	Canino doméstico	Estados Unidos
MN451676	CPV603	2c	Canino doméstico	Estados Unidos
MN451686	CPV613	2c	Canino doméstico	Estados Unidos
MN451684	CPV611	2c	Canino doméstico	Estados Unidos
MN451685	CPV612	2c	Canino doméstico	Estados Unidos
MZ647470	MO	2a	Canino doméstico	Estados Unidos
OQ266793	AZ-USA-June-2022	2c	Canino doméstico	Estados Unidos
MN451673	CPV307	2a	Lobo	Estados Unidos
M38245	790312	2b	Canino doméstico	Estados Unidos
OR528753	CPV_Uy6_2a	2a	Canino doméstico	Uruguay
OR528754	CPV_UY_252_2a	2a	Canino doméstico	Uruguay
OR528746	CPV_86_2c	2c	Canino doméstico	Uruguay
MW650832	NL-35-D	Vacunal	NA	China

**ANEXO 6. DATOS DE SECUENCIAS PARCIALES DEL GEN VP2 DE
CPV-2 OBTENIDAS DEL GENBANK**

Referencia GenBank	Aislado / Cepa	Genotipo	Huésped	País/Estado
KY818846	MX-AGC1	2c	Canino doméstico	México/AGS
KY818847	MX-AGC2	2c	Canino doméstico	México/AGS
KY818848	MX-AGC4	2c	Canino doméstico	México/AGS
KY818849	MX-AGC5	2c	Canino doméstico	México/AGS
KY818850	MX-BCN6	2c	Canino doméstico	México/BCN
KY818851	MX-BCN7	2c	Canino doméstico	México/BCN
KY818852	MX-BCN8	2c	Canino doméstico	México/BCN
KY818853	MX-BCN9	2b	Canino doméstico	México/BCN
KM234975	MX- GDL/1/10/13	2c	Canino doméstico	México/GDL
KM234976	MX- GDL/2/10/13	2c	Canino doméstico	México/GDL
KM234977	MX- GDL/6/11/13	2c	Canino doméstico	México/GDL
KM234978	MX- GDL/7/11/13	2c	Canino doméstico	México/GDL
KM234979	MX- GDL/24A/2/14	2c	Canino doméstico	México/GDL
KY818859	MX-GTO1	2c	Canino doméstico	México/GTO
KY818860	MX-GTO2	2c	Canino doméstico	México/GTO
KY818861	MX-GTO3	2c	Canino doméstico	México/GTO
KY818862	MX-GTO4	2c	Canino doméstico	México/GTO
KY818863	MX-GTO9	2c	Canino doméstico	México/GTO
KY818864	MX-HGO2	2c	Canino doméstico	México/HGO
KY818865	MX-HGO6	2c	Canino doméstico	México/HGO
KY818866	MX-HGO1	2c	Canino doméstico	México/HGO
KY818867	MX-HGO4	2c	Canino doméstico	México/HGO
KY818868	MX-HGO8	2c	Canino doméstico	México/HGO

KY818854	MX-MEX71	2c	Canino doméstico	México/EMEX
KY818855	MX-MEX72	2c	Canino doméstico	México/EMEX
KY818856	MX-MEX79	2c	Canino doméstico	México/EMEX
KY818857	MX-MEX82	2c	Canino doméstico	México/EMEX
KY818858	MX-MEX83	2c	Canino doméstico	México/EMEX
KY818869	MX-MICH1	2c	Canino doméstico	México/MICH
KY818870	MX-MICH2	2c	Canino doméstico	México/MICH
KY818871	MX-MICH3	2c	Canino doméstico	México/MICH
KY818872	MX-MICH4	2c	Canino doméstico	México/MICH
KY818873	MX-MICH5	2c	Canino doméstico	México/MICH
KY818874	MX-MOR2	2c	Canino doméstico	México/MOR
KY818875	MX-MOR3	2c	Canino doméstico	México/MOR
KY818876	MX-MOR4	2c	Canino doméstico	México/MOR
KY818877	MX-MOR5	2c	Canino doméstico	México/MOR
KY818878	MX-MOR6	2c	Canino doméstico	México/MOR
KY818879	MX-NAY1	2c	Canino doméstico	México/NAY
KY818880	MX-NAY4	2c	Canino doméstico	México/NAY
KY818881	MX-NAY6	2c	Canino doméstico	México/NAY
KY818882	MX-NAY7	2c	Canino doméstico	México/NAY
KY818883	MX-NAY8	2c	Canino doméstico	México/NAY
KY818884	MX-PUE1	2c	Canino doméstico	México/PUE
KY818885	MX-PUE2	2c	Canino doméstico	México/PUE
KY818886	MX-QRO3	2c	Canino doméstico	México/QRO
KY818887	MX-QRO6	2c	Canino doméstico	México/QRO
KY818888	MX-QRO8	2c	Canino doméstico	México/QRO
KY818889	MX-SON1	2c	Canino doméstico	México/SON
KY818890	MX-TAM1	2c	Canino doméstico	México/TAM
KY818891	MX-TAM2	2c	Canino doméstico	México/TAM
KY818892	MX-TAM3	2c	Canino doméstico	México/TAM
KY818893	MX-TAM6	2c	Canino doméstico	México/TAM
KY818894	MX-TAM7	2c	Canino doméstico	México/TAM
KY818895	MX-YUC1	2c	Canino doméstico	México/YUC
KY921600	MX-DCR1/17	2c	Canino doméstico	México/NL

KY921601	MX-DCR2/17	2c	Canino doméstico	México/NL
KY921602	MX-DCR3/17	2c	Canino doméstico	México/NL
KY921603	MX-DCR4/17	2c	Canino doméstico	México/NL
KY921604	MX-DCR6/17	2c	Canino doméstico	México/NL
KY921605	MX-DCR7/17	2c	Canino doméstico	México/NL
KY921606	MX-VACVBC/17	2c	Canino doméstico	México/NL
KY921607	MX- VACNBVC/17	2c	Canino doméstico	México/NL
MH480646	MX-DCR22/18	2c	Canino doméstico	México/NL
MH480647	MX-DCR41/18	2c	Canino doméstico	México/NL
MH480649	MX-DCR23/18	2c	Canino doméstico	México/NL
MH480650	MX-DCR66/18	2c	Canino doméstico	México/NL
MH480651	MX-DCR73/18	2c	Canino doméstico	México/NL
MH480652	MX-DCR80/18	2c	Canino doméstico	México/NL

**ANEXO 7. DATOS DE SECUENCIAS COMPLETAS DE CBOV
OBTENIDAS DEL GENBANK**

Referencia GenBank	Aislado / Cepa	Genotipo	Huésped	País
MH713703	Paraiba	CBoV-1	Canino doméstico	Brasil
OM640114	LSD33	CBoV-1	Canino doméstico	Canadá
FJ899734	SH1	CBoV-1	Canino doméstico	China
MH051156	CDK47/2017	CBoV-1	Canino doméstico	China
MH051157	CQY9/2016	CBoV-1	Canino doméstico	China
MN947833	4033/Italy/2012	CBoV-1	Canino doméstico	Italia
MN947835	17DIAPD59116/Italy/2017	CBoV-1	Canino doméstico	Italia
AB158475	HM-6	CBoV-1	Canino doméstico	Japón
AB518882	08-017	CBoV-1	Canino doméstico	Japón
AB518883	97-047	CBoV-1	Canino doméstico	Japón
AB518884	97-114	CBoV-1	Canino doméstico	Japón
KY214446	South Douro	CBoV-1	Canino doméstico	Portugal
AF495467	NA	CBoV-1	Canino doméstico	Estados Unidos
FJ214110	GA 3	CBoV-1	Canino doméstico	Estados Unidos
NC_004442	NA	CBoV-1	Canino doméstico	Estados Unidos
NC_075119	GA 3	CBoV-1	Canino doméstico	Estados Unidos
MH626633	17CC0312	CBoV-2	Canino doméstico	China
KF771828	F13000791S	CBoV-2	Canino doméstico	Alemania
JQ692590	HK882U	CBoV-2	Canino doméstico	Hong Kong
KP281717	14D142	CBoV-2	Canino doméstico	Corea
MG025952	TH-2016	CBoV-2	Canino doméstico	Tailandia
NC_020499	Con-161	CBoV-2	Canino doméstico	Estados Unidos

KC580640

UCD

CBoV-3

Canino doméstico

Estados
Unidos