



**Detección, caracterización genómica y frecuencia de Circovirus canino en perros con
y sin síndrome diarreico en Medellín**

Diana Gómez Betancur

Trabajo de grado presentado para optar al título de Magíster en Microbiología

Tutor
Julián Ruíz Sáenz, Doctor (PhD) en Salud Animal

Universidad de Antioquia
Escuela de Microbiología
Maestría en Microbiología
Medellín, Antioquia, Colombia

2023

Cita	(Gómez Betancur, 2023)
Referencia	Gómez Betancur D (2023). <i>Detección, caracterización genómica y frecuencia de Circovirus canino en perros con y sin síndrome diarreico en Medellín</i> [Tesis de maestría]. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
Estilo APA 7 (2020)	



Maestría en Microbiología, Cohorte X.

Escuela de Microbiología



Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Agradecimientos

A mí, por creer, por cada hora de trabajo y estudio, por aprender, dejarme enseñar y corregir, por dar lo mejor que tenía y sacar adelante este proyecto.

A la vida, la UdeA y la escuela de Micro por darme esta oportunidad.

A cada una de los veterinarios y personas que me ayudaron con muestras y por supuesto a los amados perros.

A mi hija Maria Ángel, por ser mi inspiración, mi motivación y mi fuerza, por entender cuando mamá no podía estar con ella.

A mi madre Martha por siempre estar para mí en todos los sentidos que puedan existir, por su apoyo, paciencia, amor, y creer en mi como nadie.

A mi hermana Ana por ser mi polo a tierra, por cada uno de sus consejos, enseñarme, ayudarme en todo, regañarme y siempre estar conmigo.

A mi padre Jairo en la dimensión que este, por haber trabajado y luchado para que yo viva como hoy.

A Santiago Rendón por ayudarme y soportarme, por siempre poder contar con él, no sé qué habría sido mi proceso sin él.

A mis profes Julián y Marlen por creer en mí, apoyarme y enseñarme.

A GRICA por darme la oportunidad de ser, estar, aprender académica, profesional y emocionalmente.

A mi amiga Laura por su amistad, que es de lo mejor que me ha dejado esta experiencia.

A mi mejor amigo por siempre creer en mí y ser feliz conmigo.

CONTENIDO

1. Resumen General.....	8
2. Introducción general.....	11
3. Capítulo 1: Revisión de literatura.....	14
• Abstract.....	14
• Introduction.....	14
• Virus replication.....	15
• Molecular epidemiology.....	15
• Disease in dogs.....	17
• Histopathological findings.....	18
• Infection in wild animals.....	18
• Coinfection and comparative analysis to PCV.....	20
• Final remarks.....	20
• Conclusions.....	21
• References.....	21
4. Capítulo 2: Trabajo de investigación	23
1. Objetivos.....	23
.1.1 Objetivo general.....	23
.1.2 Objetivos Específicos.....	23
1.3 Hipótesis.....	23
2. Metodología.....	24
2.1 Consideraciones bioéticas.....	24
2.2 Tipo de estudio, población de estudio y recolección de la muestra.....	24
2.3 Extracción de ADN.....	25
2.4 Detección de CanineCV y CPV-2.....	25
2.5 Amplificación del genoma.....	26
2.6 Secuenciación y análisis filogenético.....	28
2.7 Análisis estadístico.....	29
3. Resultados.....	29

3.1 Población de estudio.....	29
3.2 Detección de CanineCV y CPV-2.....	30
3.3 Asociación entre la frecuencia de CanineCV con las características epidemiológicas de los animales evaluados.....	33
3.4 Filogenética, filogeografía y tiempos de divergencia de CanineCV.....	36
4. Discusión.....	39
5. Conclusión.....	45
6. Bibliografía.....	46

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO 1

Figura 1. Diagrama estructural del genoma de CanineCV.

Figura 2. Representación del ciclo replicativo del PCV y el mecanismo de círculo rodante.

Figura 3. Árbol filogenético basado en secuencias de genoma completo CanineCV.

Figura 4. Esquema de posibles rutas de enfermedad en la infección por CanineCV en perros domésticos.

LISTA DE TABLAS CAPÍTULO 1

Tabla 1. Estudios realizados para la detección de CanineCV en caninos domésticos.

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO 2

Tabla 1. Primers utilizados en la amplificación del genoma de CanineCV.

Tabla 2. Datos epidemiológicos grupo de caninos con diarrea y clínicamente sanos.

Figura 1. Muestras positivas a CanineCV, CPV-2, coinfección entre ambos virus y negativos.

Figura 2. Gel de electroforesis donde se evidencia 4 muestras positivas para CanineCV, amplicones de 533 pb.

Figura 3. frecuencia de CanineCV en el grupo de animales con diarrea y el grupo clínicamente sano.

Figura 4: frecuencia de CanineCV según el sexo de los caninos evaluados.

Figura 5: frecuencia de CanineCV según la edad de los caninos evaluados.

Figura 7. Árbol de máxima probabilidad basado en secuencias de genoma completo de CanineCV.

Figura 8. Filogeografía y tiempos de divergencia de CanineCV.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

CanineCV: Circovirus canino

CPV-2: Parvovirus canino tipo 2

IFN-1: Interferón I

ISG: genes estimulados por interferón

Nt: nucleótidos

ORF: marco de lectura de abierto

PB: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PCV: Circovirus porcino

PCV1: Circovirus porcino tipo 1

PCV2: Circovirus porcino tipo 2

PCV3: Circovirus porcino tipo 3

PCVAD: enfermedades asociadas a la circovirosis porcina

PMWS: síndrome de emaciación multisistémica

PPV: Parvovirus porcino

PRRRSV: virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino

SIV: virus de la influenza porcina

1. RESUMEN GENERAL

Circovirus canino (CanineCV), es un agente emergente, descrito por primera vez en el año 2011 en Estados Unidos. Pertenece a la familia *Circoviridae*, cuenta con un genoma monocatenario covalentemente cerrado de 2063 nt, siendo ambisentido con dos ORF principales dispuestos en forma inversa. CanineCV infecta cánidos silvestres (zorros, lobos, tejones) y domésticos, la infección es asociada a cuadros clínicos de gastroenteritis aguda, diarrea hemorrágica, signos de vasculitis, linfadenitis, trombocitopenia, neutropenia y linfopenia, lo que se relaciona con actividad inmunosupresora por daño del tejido linfoide, lo cual se ha descrito en infección por Circovirus en aves y cerdos. Sin embargo, el virus también ha sido detectado en muestras de caninos asintomáticos, por lo que su patogenia y epidemiología no se pueden definir aún con claridad.

CanineCV se define como un agente de distribución mundial ya que su circulación se ha reportado en 4 de 5 continentes. Los análisis filogenéticos de las cepas reportadas han permitido clasificar las secuencias en diferentes clados, cuya agrupación depende principalmente de la ubicación geográfica en donde fue encontrada cada secuencia. Sin embargo, cuando se realiza su detección y caracterización genómica en nuevos lugares se presentan diferencias en las agrupaciones ya descritas, en especial cuando se realiza con secuencias de mayor ancestralidad.

La prevalencia de CanineCV en diferentes países, tanto en muestras de pacientes con signos compatibles como de animales asintomáticos es variable, con valores que oscilan entre el 1-30%, reportándose en la mayoría de los casos en coinfección con otros agentes infecciosos donde se destaca Parvovirus canino tipo 2 (CPV-2), alcanzando tasas de coinfección de hasta un 100%. Lo que sugieren las investigaciones actuales es que su rol como patógeno puede ser el exacerbar cuadros clínicos, como se ha descrito en la infección por Circovirus porcino (PCV) en cerdos, debilitando el sistema inmune y favoreciendo la entrada y diseminación de otros virus y bacterias, no obstante, su participación como agente coinfectante aún no es precisa.

En Colombia se confirmó la circulación de CanineCV en el año 2020, a partir de muestras positivas a CPV-2, el estudio realizado concluyó la necesidad de aumentar la vigilancia CanineCV en poblaciones domésticas para comprender mejor su rol en enfermedades

entéricas en caninos, su papel en animales asintomáticos o en coinfección con otros patógenos, y la frecuencia del virus en distintas regiones del país, con el fin de vislumbrar el comportamiento epidemiológico de la infección.

Dado este contexto, el presente trabajo pretende determinar la frecuencia, y caracterización genómica de Circovirus canino y su coinfección con parvovirus en una región de Colombia, específicamente la ciudad de Medellín, con un mayor número de muestras de materia fecal examinadas y partiendo de animales que presentaron diarrea sin un diagnóstico establecido e incluyendo además un grupo de animales clínicamente sanos. Posterior a la recolección de muestras, se realizó la detección de CanineCV y CPV-2 mediante PCR convencional, obteniendo veintiséis muestras positivas para CanineCV, tres para CPV-2 y cero coinfecciones, la mayor frecuencia de CanineCV se encontró en el grupo de caninos con diarrea, respecto al sexo, fue más frecuente en machos, y en relación con la edad en cachorros de menos de un año, además el 60,6% de los positivos presentaba el plan vacunal vigente. El análisis filogenético evidenció la separación en diferentes clados del virus y la filogeografía un origen chino procedente de perros domésticos.

El presente trabajo, evidencia que la frecuencia de CanineCV es elevada en animales con diarrea respecto a lo que se esperaba, sin requerir la coinfección con CPV-2, lo que expone el sub-diagnóstico que existe del virus. Por otra parte, los análisis filogenéticos mostrados aquí, resaltan la necesidad de realizar evaluaciones en especies silvestres y en otras regiones de Colombia, resaltando además la importancia de continuar los estudios e investigaciones en CanineCV ya que aún existen vacíos de conocimiento que impiden determinar la relación verdadera que puede tener este virus en las infecciones gastroentéricas en caninos tanto domésticos como silvestres.

Palabras claves: cánidos, circovirus, gastroenteritis, filogenética, filogeografía.

1. GENERAL SUMMARY

Canine Circovirus (CanineCV), is an emerging agent, first described in 2011 in the United States. It belongs to the *Circoviridae* family and has a covalently closed single-stranded genome of 2063 nt, being ambisense with two main ORFs arranged in reverse. CanineCV

infects wild canids (foxes, wolves, badgers) and domestic, the infection is associated with clinical pictures of acute gastroenteritis, hemorrhagic diarrhea, signs of vasculitis, lymphadenitis, thrombocytopenia, neutropenia, and lymphopenia, which is related to immunosuppressive activity due to damage of lymphoid tissue, which has been described in Circovirus infection in poultry and pigs. However, the virus has also been detected in samples of asymptomatic canines, so its pathogenesis and epidemiology cannot yet be clearly defined.

CanineCV is defined as a worldwide distribution agent since its circulation has been reported in 4 of 5 continents. The phylogenetic analyses of the reported strains have allowed classifying the sequences into different clades, whose grouping depends mainly on the geographical location where each sequence was found. However, when its detection and genomic characterization are carried out in new places, there are differences in the already described groupings, especially when carried out with sequences of greater ancestry.

The prevalence of CanineCV in different countries, both in samples of patients with compatible signs and asymptomatic animals is variable, with values ranging between 1-30%, reporting in most cases in coinfection with other infectious agents where canine parvovirus type 2 (CPV-2) stands out, reaching coinfection rates of up to 100%. What current research suggests is that its role as a pathogen may be to exacerbate clinical pictures, as described in porcine Circovirus (PCV) infection in pigs, weakening the immune system and favoring the entry and dissemination of other viruses and bacteria, however, its participation as a co-infecting agent is not yet precise.

In Colombia, the circulation of CanineCV was confirmed in 2020, from positive samples to CPV-2, the study concluded the need to increase CanineCV surveillance in domestic populations to better understand its role in enteric diseases in canines, its role in asymptomatic animals or in coinfection with other pathogens, and the frequency of the virus in different regions of the country, in order to glimpse the epidemiological behavior of the infection.

Given this context, the present work aims to determine the frequency, and genomic characterization of canine Circovirus and its coinfection with parvovirus in a region of Colombia, specifically the city of Medellín, with a greater number of fecal matter samples examined and starting from animals that presented diarrhea without an established diagnosis

and including a group of clinically healthy animals. After the collection of samples, the detection of CanineCV and CPV-2 was carried out by conventional PCR, obtaining twenty-six positive samples for CanineCV, three for CPV-2, and zero coinfections, the highest frequency of CanineCV was found in the group of canines with diarrhea, regarding sex, was more frequent in males, and in relation to age in puppies less than one-year-old, In addition, 60.6% of the positives had the current vaccination plan. The phylogenetic analysis evidenced the separation into different clades of the virus and phylogeography of Chinese origin from domestic dogs.

The present study shows that the frequency of CanineCV is high in animals with diarrhea compared to what was expected, without requiring coinfection with CPV-2, which exposes the existing underdiagnosis of the virus. On the other hand, the phylogenetic analyses shown here highlight the need to carry out evaluations in wild species and in other regions of Colombia, also highlighting the importance of continuing studies and research in CanineCV since there are still knowledge gaps that prevent determining the truth relationship that this virus can have in gastroenteric infections in both domestic and wild canines.

Keywords: canids, circovirus, gastroenteritis, phylogenetics, phylogeography.

2. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los desórdenes gastrointestinales en caninos representados principalmente por signos de diarrea y vómito son algunas de las enfermedades de mayor frecuencia en estos animales y son de atención rutinaria por parte de los médicos veterinarios dedicados a la clínica de pequeñas especies. La presentación aguda de diarrea se relaciona con múltiples etiologías, en las que se destacan causas infecciosas. Dentro los agentes virales como etiología infecciosa se incluyen el recientemente descrito Circovirus canino (CanineCV) (1–3).

CanineCV es un virus emergente detectado en el año 2011 que infecta cánidos silvestres como lobos, zorros y tejones y cánidos domésticos (4–6), se asocia con signos gastrointestinales, principalmente diarrea de tipo hemorrágica; sin embargo, también es detectado en muestras de animales clínicamente sanos por lo que su patogenia aún es incierta. En este contexto, se plantea que el rol de CanineCV puede ser el de agente coinfectante con

otros patógenos de los cuales se menciona especialmente a Parvovirus canino (CPV-2) (4,5,7,8). La prevalencia que se estima de CanineCV a nivel mundial oscila entre el 1 y el 30%, con tasas de coinfección con CPV-2 de hasta el 100%, existiendo a la fecha solo dos reportes de CanineCV como agente único, sin conocerse además cuales características epidemiológicas de los caninos predisponen a la infección, por lo cual el comportamiento epidemiológico del virus aún no es claro (1,9–12).

Colombia cuenta con un único estudio sobre CanineCV en 2020 (1), en el que se reportó por primera vez la circulación de CanineCV en el país a partir de muestras fecales de pacientes positivos a CPV-2; sin embargo, se desconoce su frecuencia en la población canina del país, tanto en animales con manifestaciones clínicas compatibles principalmente diarrea, en animales sanos o en coinfección con CPV-2, además, las cepas reportadas de CanineCV se agruparon en 4 diferentes genotipos, designando clados de acuerdo con la distribución geográfica, sin embargo, en estudios posteriores evidenciaron que tales segregaciones genéticas no se limitaban a la ubicación geográfica (13) por lo cual es importante realizar nuevamente este tipo de análisis en el país respecto a CanineCV, para evaluar cómo se distribuyen las cepas circulantes, sus respectivos orígenes y la similitud entre ellas.

En el primer capítulo de este trabajo se expone una revisión bibliográfica en donde se contextualiza los aspectos más relevantes del virus, las investigaciones que se han realizado hasta la fecha, y la comparación con el modelo porcino respecto al tema de coinfección. La revisión realizada permite mostrar los vacíos de conocimiento que existen sobre CanineCV y la importancia de continuar con investigaciones sobre este virus que puede suponer un riesgo para la salud y bienestar de la población canina doméstica. Este trabajo fue publicado en la revista *Frontiers in Veterinary Science* (DOI 10.3389/fvets.2023.1150636)

En el segundo capítulo se desarrolla el trabajo de investigación, en el cual se exponen las frecuencias de CanineCV, y CPV-2 de muestras de materia fecal de caninos sanos y con diarrea recolectadas en la ciudad de Medellín, se presenta además el análisis filogenético en el trabajo se expone la frecuencia de CanineCV respecto a la edad, sexo y vigencia del plan vacunal de los animales, al igual que pruebas estadísticas para identificar asociación. A partir de tres muestras positivas se amplificó el genoma de CanineCV para realizar análisis

filogenético de las secuencias encontradas comparándolo con las secuencias reportadas en las bases de datos, filogeografía y tiempos de divergencia.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Mrigendra Rajput,
University of Dayton, United States

REVIEWED BY

Tereza Cristina Cardoso,
Universidade Estadual de São Paulo, Brazil
Olusegun A. Fagbohun,
University of Ibadan, Nigeria

*CORRESPONDENCE

Julian Ruiz-Saenz
✉ julian.ruizs@campusucc.edu.co

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to
Veterinary Infectious Diseases,
a section of the journal
Frontiers in Veterinary Science

RECEIVED 24 January 2023

ACCEPTED 28 March 2023

PUBLISHED 17 April 2023

CITATION

Gomez-Betancur D, Vargas-Bermudez DS,
Giraldo-Ramírez S, Jaime J and
Ruiz-Saenz J (2023) Canine circovirus: An
emerging or an endemic undiagnosed enteritis
virus?
Front. Vet. Sci. 10:1150636.
doi: 10.3389/fvets.2023.1150636

COPYRIGHT

© 2023 Gomez-Betancur, Vargas-Bermudez,
Giraldo-Ramírez, Jaime and Ruiz-Saenz. This is
an open-access article distributed under the
terms of the [Creative Commons Attribution
License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic practice.
No use, distribution or reproduction is
permitted which does not comply with these
terms.

Canine circovirus: An emerging or an endemic undiagnosed enteritis virus?

Diana Gomez-Betancur¹, Diana S. Vargas-Bermudez²,
Sebastian Giraldo-Ramírez³, Jairo Jaime² and Julian Ruiz-Saenz^{1*}

¹Grupo de Investigación en Ciencias Animales—GRICA, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Cooperativa de Colombia, Bucaramanga, Colombia, ²Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Centro de investigación en Infectología e Inmunología Veterinaria (CI3V), Sede Bogotá, Bogotá, Colombia, ³Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Fundación Universitaria Autónoma de las Américas, Medellín, Colombia

Canine Circovirus (CanineCV) belongs to the family *Circoviridae*. It is an emerging virus described for the first time in 2011; since then, it has been detected in different countries and can be defined as worldwide distribution virus. CanineCV infects domestic and wild canids and is mainly related to hemorrhagic enteritis in canines. However, it has been identified in fecal samples from apparently healthy animals, where in most cases it is found in coinfection with other viral agents such as the canine parvovirus type-2 (CPV). The estimated prevalence/frequency of CanineCV has been variable in the populations and countries where it has been evaluated, reaching from 1 to 30%, and there are still many concepts to define the epidemiological characteristics of the virus. The molecular characterization and phylo-evolutionary analyses that allow to postulate the wild origin and intercontinental distribution of the virus. This review focuses on the importance on continuing research and establish surveillance systems for this emerging virus.

KEYWORDS

CanineCV, canines, enteritis, diarrhea, coinfection

1. Introduction

The *Circoviridae* family comprises nonenveloped viruses with a diameter of 15–25 nm and a single-stranded circular DNA genome of less than 2,500 nt in length. According to the international committee on virus taxonomy (ICTV¹), two genera have been recognized within this family: *Circovirus* and *Cyclovirus* (1–3). Within the genus *Circovirus*, almost 50 species have been identified that infect birds and mammals (1), including the clinically relevant beak and feather disease (BFDV), goose circovirus, pigeon circovirus, canary circovirus, porcine circovirus and the most recently recognized canine circovirus (CanineCV) (4–6).

CanineCV has a covalently closed single-stranded DNA genome of 2062–2063 nt (7, 8). It has an ambisense genome with two main ORFs arranged inversely; ORF1 encodes the viral replicase gene (Rep) (nt 1–912) necessary for the initiation of the replication cycle, and ORF2 encodes the capsid protein (Cap) (nt 1,116–1928), which participates in the immune response of the host (1, 7). The Cap and Rep genes of CanineCV share, respectively, between 25 and 50%

1 <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>

identity with the other known animal circoviruses (2). A third ORF (ORF3) has been proposed in samples from Thailand; this ORF is located between nt 470 and 889 in the antisense region in ORF1 (5). Studies in porcine circovirus type 2 (PCV2) relate ORF3 to a protein associated with viral pathogenesis and the induction of apoptosis; however, in the case of CanineCV, its function is not yet being clarified (5, 9).

1. Virus replication

As with other circoviruses, CanineCV has 2 noncoding intergenic regions. The first corresponds to the 5'-intergenic region of 135 nt located between the start codons of the 2 ORFs and comprises the origin of replication (Ori). The latter is a thermodynamically stable conserved stem-loop structure with a characteristic sequence of 9 nt for the initiation of replication (TAGTATTAC), a palindromic sequence of 12 nt pairs and an open loop of 10 nt (CATAGTATTA) (2). The second intergenic region is the 3' region of 203 nt, located between the termination codons of the two main ORFs (Figure 1). These highly conserved sequences in circoviruses are associated with rolling circle replication (2, 10).

The rolling circle mechanism constitutes the process of replication of circular DNA genomes. It has also been described in plasmids, plant viruses and other families of animal viruses, such as *Geminiviridae* and *Nanoviridae*. For circoviruses, the study model has been mainly that of porcine circovirus (PCV). Due to the reduced size of the viral genome that limits its coding capacity, this type of replication depends largely on host cell factors and requires cellular enzymes expressed during the S phase of the cell cycle (11, 12). It is estimated that the virus uses glycosaminoglycans as binding receptors to target cells and penetrates the cell by clathrin-mediated endocytosis (9). The ssDNA genome is transported to the nucleus, where it is converted to a

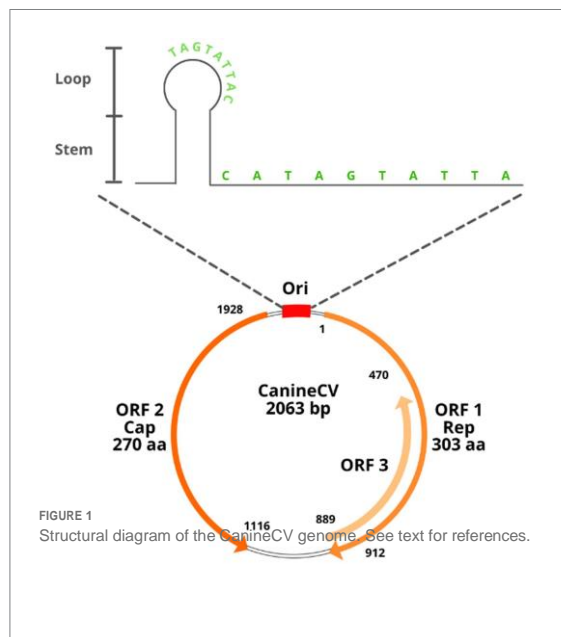
supercoiled intermediate double strand that will serve as a template to generate viral DNA. In *Geminivirus* and *Nanovirus* species, the primer for the negative strand is composed of DNA or RNA with multiple 5' ribonucleotides or RNA synthesized by the host after infection; however, the primer for the negative strand in circoviruses has not yet been determined (12).

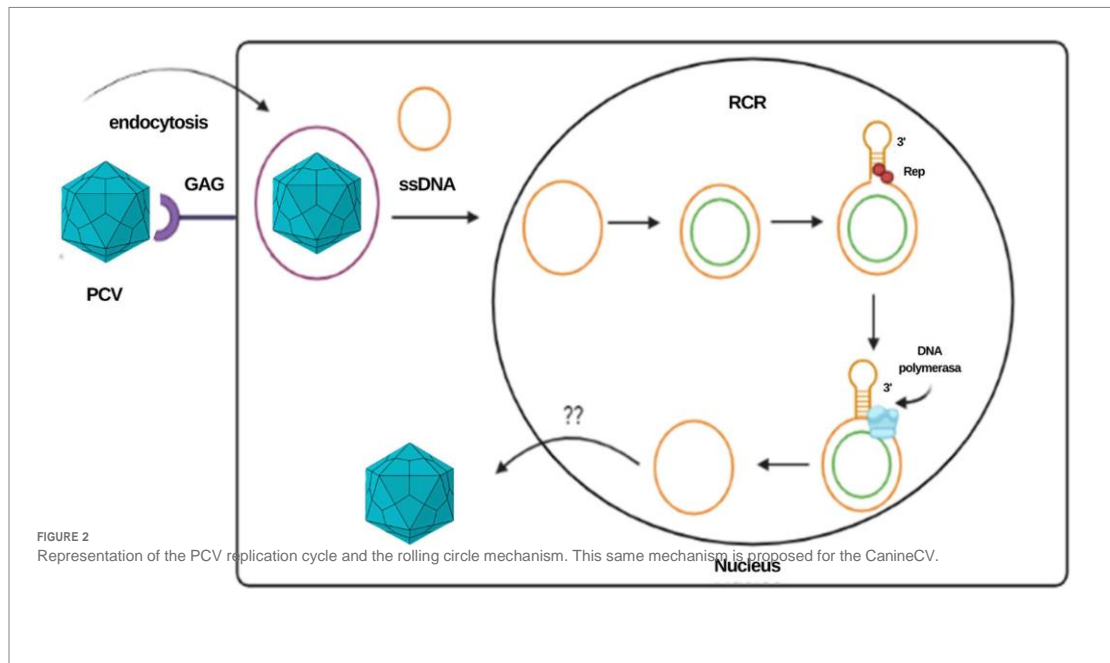
Once the double strand of the genome is formed, an initiation complex composed of Rep and Rep' proteins that have endonuclease activity is attached to the stem-loop structure to cleave the loop, generating a free 3'OH end to which cellular DNA polymerase binds to initiate replication. When a unit of the genome has replicated, the Rep complex closes the loop covalently, leading to the release of a positive circular single-stranded parent molecule and a circular double-stranded DNA molecule, the latter composed of a hybrid of a negative parental strand and a positive strand newly synthesized (11, 12). The single-stranded DNA molecule can be encapsulated or involved in a second replication cycle. In *in vitro* studies in PCV, two different pathways have been suggested for the release of the virus from the cell at the end of the replication cycle: the first is the budding of groups of virions, and the second is cell lysis by apoptosis; however, the *in vivo* mechanism is still poorly understood [Figure 2; (11, 13)]. The "melting-pot" model has been proposed to explain the formation of the double-stranded intermediary. In this model, Rep proteins bind to palindromic sequences, generating a sphere of instability known as a melting pot. In this environment, the four inverted repeat strands present a "fused" state since there is an absence of hydrogen bonds between the positive and negative genomes. In this structure, not any double helix formation can be maintained, but the four strands remain very close to each other, juxtaposed in a tertiary structure that allows a possible exchange between the template strands during the synthesis of the genome, which provides two templates for the synthesis of the palindromic sequences during the initiation and termination of replication (11, 13). The availability of two template chains during the synthesis of the main chain contributes to the flexibility and the increase in the frequency of mutations in the Ori; however, the correction mechanism inherent to the melting pot allows mutations in the palindromic sequences to be eliminated, corrected, or regenerated through the mechanism of template change, allowing the integration of the nt sequence in the Ori (11).

2. Molecular epidemiology

CanineCV was identified for the first time in 2011 by Kapoor et al.

(2) in serum samples from six of 205 clinically healthy dogs, confirming the first non-porcine circovirus to infect mammals (2, 4, 6). From this first report and to date, different studies of detection, genetic sequencing and phylogenetic analysis have been carried out in different countries worldwide, both in domestic dogs and in wild canids. The overall objective of such investigations has been mainly to establish the circulation of CanineCV at the demographic level in the region or area (2, 4). Virus detection studies have been based on molecular techniques including conventional and quantitative PCR (qPCR) (14, 15). Virus isolation has been unsuccessful. In MDCK cells infected with the CanineCV D1056 strain from Brazil only DNA was detected by qPCR in low amounts during the inoculation phase perhaps due to the amount of viral DNA found by qPCR for CanineCV was low (16). The same negative result has been reported by using





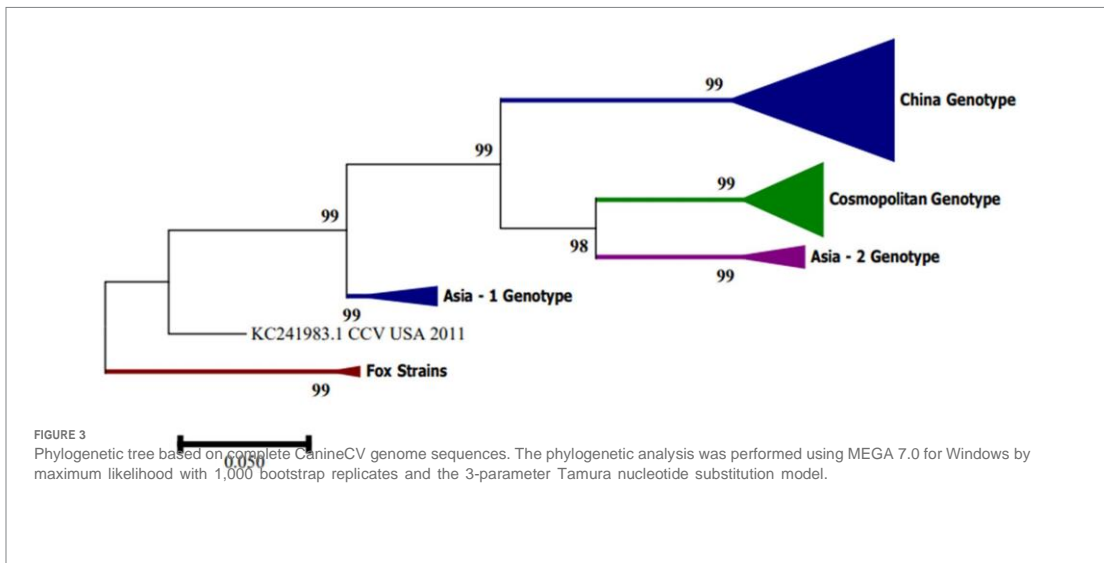
Italian samples in MDCK and D17 cells (8). However, it is well known that most of the circoviruses such as PCV, are generally considered non-cytopathogenic and the low growth efficiency of PCVs in cultured cells has become a major obstacle to the establishment of diagnostic methods (17). Nevertheless, few reports have showed the cytopathic effect of PCV2 in specific cell lines (18, 19).

CanineCV is defined as a worldwide distribution agent since its circulation has been reported in 4 of 5 continents. The phylogenetic analyses of the strains reported to date have been prepared based on the complete genome and with the nucleotide sequences or concatenated amino acids of the Rep and Cap proteins (3, 4, 7). Multiple effort has been made to establish a classification system that helps to understand virus origin and evolution. Sun et al. in China in 2018 based the phylogenetic analysis of the detected CanineCV strains on ORF2 sequences and proposed a classification into two groups: CanineCV-1 and CanineCV-2 (10). Subsequently, it was reported that the existing strains of CanineCV at the global level could be divided into four different groups: CanineCV-1, which includes strains from Italy, four from the United States, two from Germany, one from Argentina, and one from China. CanineCV-2 group strains from China, of which three were detected in 2014, 13 in 2015 and 24 in 2017. CanineCV-3 includes strains from China identified between 2014 and 2015, and CanineCV-4 contains a strain from the United States, three strains from the province of Guangxi and included the five strains detected in their research. The authors indicate that to differentiate the 4 groups, it is possible to use polymorphisms of individual nucleotide sequences (20). On the other hand, in the analysis conducted by Piewbang et al. in 2018 (5), it was concluded that the CanineCV sequences detected in their study were different from the majority of the sequences reported and were mainly related to the UCD3-478 strain from the United States. Additionally, the authors highlight that the phylogenetic trees based on the Rep and

Cap genes of the CanineCV genomes circulating in Thailand are divergent and reveal uneven patterns when comparing both genes, which is associated with recombination events (5).

In South America, CanineCV has been detected in Argentina, Brazil and Colombia. Kotsias F et al. (21) detected the UBA-Baires strain of CanineCV in an outbreak of enteric disease in puppies between 2014 and 2015 in Argentina. Phylogenetic evaluation of whole genome sequences showed that this strain is grouped with viruses from Europe, mainly from Italy, and differed considerably from strains reported in the United States and China (21). In contrast, strain D1056 reported in Brazil by Cruz et al. (16) showed high similarity (<80%) with the NY214 strain reported in the United States. Giraldo-Ramírez et al. Colombia confirmed the separation of CanineCV strains into four different genotypes, designating clades according to geographical distribution and with the new sequences reported as follows: Genotype China includes sequences found in China, Genotype Asia-1 and Asia-2 include sequences from Thailand and China, and Cosmopolitan Genotype contains sequences from Italy, Germany, China, the United States, Argentina and the strain found in Colombia, also defining a clade of CanineCV sequences identified in foxes [Figure 3; (22)].

Phylogenetic analysis of CanineCV sequences identified in arctic and red foxes in Norway (23) showed a distinguishable clustering in five groups in the tree constructed with sequences of complete genomes and in the tree of concatenated amino acids of the Rep and Cap proteins. Group 1 included sequences identified in dogs, wolves and a badger found in Europe, Asia and the United States. Groups 2, 3 and 4 included sequences identified in dogs in Asia, and the sequence 09-10F from 2011 of a red fox in Italy, Group 5, was made up of sequences identified in foxes. The UCD3-478 strain did not fit into any of the previous groups (23). The presence of the sequence 09-10F/2011 in Group 4 indicates that the segregation of the groups



does not occur based on the host where they were identified. The authors also define that the UCD3-478 strain may represent an intermediary between the groups 4 and 5 or the only sequence of a possible sixth group (23).

Recent analysis from Middle east including Turkish and Iranian samples belonging from diarrheic dogs through analysis of the partial Rep and Cap nt sequences, had found that the Iranian CanineCV strains were more closely related to strains detected in Turkey, allowing to hypothesize a possible introduction of the virus from this neighbor country (24–26). However, the most recent complete genome nucleotide sequences analysis of CanineCV strains obtained from Iranian dogs belongs to a separate independent clade (24).

Additionally, in 2020, the first systematic report on the use of codons and adaptation to the hosts of CanineCV was carried out in which all available sequences were used. The results suggest that CanineCV descends from the bat and that the sequences have been dominated mainly by natural selection, making it possible to propose a transmission hypothesis between species in which CanineCV may have evolved from bats (analysis of origin) and, subsequently, have adapted to domestic and wild canids (27).

1. Disease in dogs

In 2013, Li et al. characterized the complete genome of CanineCV from the liver of a dog with severe hemorrhagic gastroenteritis, granulomatous lymphadenitis, and vasculitis. Since then, CanineCV infection has been associated with clinical profiles of acute gastroenteritis, hemorrhagic diarrhea, signs of vasculitis, lymphadenitis, thrombocytopenia, neutropenia, and lymphopenia, which is related to immunosuppressive activity due to lymphoid tissue damage; the latter has also been described in infection by PCVs in pigs and in birds suffering Beak and Feather Disease Virus (BFDV) (3, 6, 28). Other authors have also associated CanineCV with respiratory signs such as dyspnea, nasal discharge, cough, or rales in the lungs (5).

However, the virus has also been detected in samples of asymptomatic canines, so its pathogenesis and epidemiology cannot yet be clearly defined.

Different forms of infection could be suggested, such as subclinical, clinical or coinfection with other infectious agents, and the fecal route as the main route for transmission (3, 6, 28). With the objective of understanding and establishing the behavior of CanineCV infection, in addition to its prevalence and genetic diversity, multiple investigations have been carried out worldwide in dogs with symptoms compatible with those described and in apparently healthy dogs.

The prevalence of CanineCV in different countries, both in samples of patients with compatible signs and asymptomatic animals, is variable. Li et al. in 2013 in the United States (3) established a prevalence in stool samples of 11.3% in dogs with diarrhea, 6.9% in healthy dogs, and 3.3% in serum samples in dogs as signs of thrombocytopenia, neutropenia or history of ticks. The prevalence between positive samples from animals with diarrhea and samples from healthy dogs was not significant (3). In Asia, several studies have been conducted in different countries. In Taiwan, Hsu et al. (4) found a highly significant correlation between the presence of diarrhea and CanineCV, with a prevalence of 28.02% in dogs with diarrhea and 11.9% in healthy dogs; the authors suggested that the difference in the results with respect to the USA may be related to geographic distribution, molecular technique or primer design (4). In Northeast China, a prevalence of CanineCV of 15.6% in dogs with diarrhea and 6.7% in healthy dogs was found; also, authors found a significant difference between both prevalences (20).

Sun W et al. in 2019, in the southern region of Guangxi established a molecular prevalence of CanineCV in serum samples of dogs with diarrhea of 8.75% and in healthy dogs of 9.25% (10). In Germany, it was established a prevalence of CanineCV of 20.1% in dogs with diarrhea and 7.3% in healthy dogs, indicating that the virus can be found significantly more frequently in dogs with diarrhea (29). Nevertheless, no significant difference between the detection of CanineCV in healthy dogs and dogs with hemorrhagic diarrhea, with

prevalence rates of 4.5 and 3.6%, respectively has been found also in Germany (28). In Vietnam, the evaluation for CanineCV was performed on 81 CPV-2c positive fecal samples, establishing that 19.8% of the samples were positive for CanineCV in diarrheic puppies less than 7 months of age (30).

In middle east region, the presence of CanineCv has been studied in Turkey and Iran. In Turkey, from a total of 150 rectal swab samples collected from animals with manifestations of gastrointestinal disease, nine positive samples were obtained (6%) with coinfection with the other two viruses between 2 to 5% (26). To investigate the prevalence and genomic characteristics of CanineCV in Iranian dogs, a total of 203 fecal samples from dogs were collected between February and November 2018 from five different geographical regions and examined by real-time PCR (qPCR). Thirteen dogs (6.4%) tested positive for CanineCV DNA, and all were detected in coinfection with CPV-2. Later in 2022 a second study was carried out in the same way using real-time PCR in 156 rectal swabs from clinically healthy canines. 14 positive samples for CanineCV were obtained (8.9% prevalence). The CanineCV circulation in non-diarrheal dogs in Iran highlighting the need for further epidemiological investigations (24, 25).

The only study reported to date on seroprevalence of CanineCV was conducted with samples taken between 2016 and 2017 in northeast China (31). Authors found a seroprevalence of 39.82%, with differences between the different cities ranging from 23 to 43%. Similarly, the study showed a significant difference in prevalence between dogs with diarrhea and healthy dogs (31). A compilation of the studies carried out to date in different countries and obtained from databases such as PubMed and Science Direct, with the purpose for the detection of CanineCV in domestic dogs is shown in Table 1.

The prevalence of CanineCV varies over a wide range. The differences between the studies may be due to multiple factors as mentioned before. In addition, it is not yet possible to define whether the virus is found more frequently in dogs with diarrhea than in healthy animals, as shown by the variations in the results of the reports published to date. Therefore, it is important to conduct molecular and research that clearly defines the epidemiological characteristics of the virus and its role as an infectious agent in gastrointestinal clinical disease in domestic dogs.

1. Histopathological findings

Necropsy and immunohistochemistry of retrospective cases of dogs with signs compatible with CanineCV has shown critical lesions, such as necrotizing vasculitis in the intestine and spleen, granulomatous lymphadenitis and histiocytic drainage in Peyer's patches and lymph nodes, and microscopic lesions in the kidney

(3). Clinico-Histopathological findings in a case report in Connecticut, United States, showed macroscopically pale mucous membranes, blue-black small intestine, black stools in the colon, splenomegaly, and multiple enlarged and hemorrhagic lymph nodes. At the microscopic level, circumferential transmural vasculitis and necrosis of crypt cells and lymphocyte necrosis in the lymph nodes and spleen were observed in the intestine, and vasculitis was also found in the liver, kidneys, lung, meninges, and brain (33). Similarly, lesions such as friability of the small intestine, focal congestion of Peyer's patches, aqueous and hemorrhagic

content in the small intestine, large intestine with multifocal petechiae and melena inside has been reported (6).

Histologically, loss of microvilli, necrosis in crypt cells, lymphoid necrosis in Peyer's patches in the ileum, mesenteric lymph nodes and spleen, granulomatous inflammation, and increased histiocytes in lymph nodes were found (6). Compiling the above, it is possible to establish that the histopathological findings associated with CanineCV have a close similarity, both in the affected organs and in the lesions found, the most common being blue-black coloration in the intestine, lymphocyte necrosis and granulomatous inflammation. A similar histopathological profile has also been described in PCV2 infection in pigs; however, causality studies that demonstrate by *in situ* hybridization or immunohistochemistry the presence of this viral agent in compatible lesions are still lacking (33).

2. Infection in wild carnivores

Different studies have confirmed the presence of CanineCV in wild carnivores. A retrospective analysis from samples taken between 2013 and 2014, detected and molecularly characterized CanineCV in samples of organs from domestic dogs, wolves, foxes and badgers collected in regions of central and southern Italy; CanineCV was found in nine out of 34 wolves, eight out of 209 dogs, and one out of 10 badgers, confirming that the circulation of the virus is not restricted to domestic dogs (8).

CanineCV has been also confirmed in foxes in the United Kingdom, from samples taken from foxes suffering meningoencephalitis between 2009 and 2013. High frequencies of infection in histological samples and in serum of foxes measured by real-time PCR. Also, phylogenetic analysis revealed a close relationship with CanineCV identified in 2011 in the USA with an identity of 92 and 89% in the amino acid sequence in the Rep protein and in the nt sequence, respectively; however, the sequences of CanineCV from dogs and CanineCV from foxes grouped in separated clades (34). Notably, circovirus infection in wild foxes is associated with neurological signs, in contrast to domestic dog disease which was associated with gastrointestinal, respiratory and vasculitis. The fact that circoviruses that infect foxes and those that infect domestic dogs are very similar viruses but with different symptoms raises several questions for future research regarding the transmission and pathogenesis of both viruses between species of the same family (34). Also, seeking to evaluate the presence of CanineCV in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Italy by using molecular and phylogenetic approaches, CanineCV DNA was detected in one of 32 processed stool samples; confirming that dogs and foxes could share phylogenetic related circoviruses (35).

In another retrospective analysis on samples of 51 arctic foxes (*Vulpes lagopus*) from the Svalbard archipelago, Norway and 59 red foxes (*Vulpes vulpes*) from Northern Norway (mainland) sampled from 1996 to 2018, CanineCV DNA was detected in 10 red foxes and 11 arctic foxes. Positive DNA were found even in samples from Arctic foxes sampled in 1996, fifteen years before the first report in domestic dogs in USA, suggesting that wild carnivores could have harbored an ancestor of CanineCV that could later be transmitted to domestic canids, thus highlighting the role of wild carnivores in the transmission of pathogens to the domestic dogs populations (23).

TABLE 1 Studies conducted for the detection of CanineCV in domestic canines.

Country	Year	Type of sample	Clinical signs	Sampled animals	Reference
United States	2013	Stool, blood	Diarrhea, thrombocytopenia, neutropenia	35 sick 14 healthy	(3)
Italy	2014	Tissues	Hemorrhagic diarrhea	1 sick	(7)
United States	2016	Feces, tissues	Hemorrhagic gastroenteritis	3 sick	(6)
China	2016	Rectal swabs, feces	Diarrhea	58 sick, 19 healthy	(4)
Italy	2017	Rectal swabs, feces	Acute gastroenteritis	71 sick, 19 healthy	(32)
Germany	2017	Feces	Diarrhea	37 sick 6 healthy	(29)
Germany	2017	Feces	Hemorrhagic diarrhea	55 sick, 66 healthy, 54 CPV-2 positives	(28)
Thailand	2018	Oral or nasal swab, tissues	No	9 sick	(5)
China	2019	Serum	Diarrhea	81 sick 79 healthy	(10)
China	2019	Feces	Diarrhea	15 sick 3 healthy	(20)
United States	2019	Tissues	Hemorrhagic gastroenteritis, multisystemic vasculitis	1 sick	(33)
Argentina	2019	Tissues	Hemorrhagic diarrhea	3 sick	(21)
Turkey	2019	Feces	Diarrhea	150 sick	(26)
Colombia	2020	Feces	Hemorrhagic diarrhea	5 sick	(22)
Brazil	2020	Feces	Hemorrhagic gastroenteritis	1 sick	(16)
China	2020	Serum	Diarrhea	417 total	(27)
Vietnam	2021	Feces	Diarrhea	81 total	(30)
Iran	2022	Rectal swabs	No	156 total	(24)

1. Coinfection and comparative analysis to PCV

In the studies on the detection of CanineCV carried out to date, coinfection with other infectious agents has also been analyzed. Among these, the presence of bacteria such as *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp. and enterotoxins of *Clostridium* sp.; parasites such as *Giardia* sp. and *Cryptosporidium* sp.; and viruses such as canine parvovirus type 2 (CPV-2), canine coronavirus and canine distemper has been found (3, 6, 7). In similar way, coinfection between several pathogens and circovirus has already been described in pigs, where it is relatively common

(36). PCVs have been widely studied for several decades, and four different subtypes have been identified: PCV1, PCV2, PCV3 and PCV4 (36–38). PCV1 corresponds to a nonpathogenic type, described in 1974 as a contaminant in PK-15 pig kidney cell lines (39, 40). PCV2 is highly pathogenic, and it has been associated with a series of syndromes and pathologies classified into four forms of presentation that affect pig production worldwide, generating countless economic losses in the industry (41). PCV3 is associated with two clinical presentations called the systemic form and the reproductive form (42). Finally, PCV4 is the most recent discovery and has been reported only in China (43).

PCV2 was initially associated with multisystem wasting syndrome (PMWS); however, after multiple investigations, the

association of PCV2 with other clinical conditions, such as hepatitis, reproductive failure, respiratory disease and nephropathy (PDNS), was established. It has also been associated with porcine respiratory complex disease (PRDC) (36, 38). Currently, it is recognized as the causative agent of some conditions known as porcine circovirus associated diseases (PCVAD), which mainly affect fattening pigs from 7 to 16 weeks of age, where there are clinical manifestations such as weight loss, hypertrophy of lymph nodes, jaundice, growth retardation, dyspnea, and abortions. Histopathological findings include lymphoid depletion, replacement by histiocytes in lymphoid tissue, bronchiolitis and interstitial pneumonia with mononuclear infiltrate in the lungs (41). There are several reports and studies on the role of coinfection with other infectious agents since it is unusual for PCV2 to generate clinical pictures as a single agent (36). It is generally found together with other microorganisms, such as *Salmonella* sp., *Mycoplasma hyopneumoniae*, swine influenza virus (SIV), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine parvovirus (PPV). Coinfection has even been described between different PCV2 genotypes. Also, it has been suggested that coinfections are associated with a greater severity of infection (41, 44).

The adverse effect of PCV2 coinfections with the aforementioned agents could be explained by the repercussions on the immune system

of pigs since the virus targets lymphoid tissues. The replication of PCV2 destroys the normal architecture of the lymphoid follicles, causing lymphoid depletion that is then replaced by histiocytes. Replication of the virus has been evidenced in organs such as the spleen, tonsils, lungs, kidney, liver and thymus; in the latter, PCV2 alters the selection of T lymphocytes, particularly in younger animals. It also infects dendritic cells, limiting their function; such effects generate severe lymphoid depletion and severe immunosuppression in pigs, increasing the probability of contracting other infections (41, 44).

There are also reports of the detection of PCV2 and PCV3 in dogs. To date, PCV2 has been discovered in other reservoirs, such as calves, goats, mice, and in carnivores, such as mink and foxes, indicating that transmission to nonporcine hosts is possible. Close contact between animals is probably the main route of transmission, particularly in multispecies farms and sites accessible to wildlife (45, 46). The reported studies of PCV2 in nonporcine hosts have associated the presence of the virus with gastrointestinal signs in dogs and with sterility in raccoons. However, the authors conclude on the need to continue with studies that allow defining the direct association between PCV2 and the clinical profile described. Similarly, the PCV3 genome has been detected in populations of domestic dogs, indicating its transmission to non-porcine hosts, and CPV/PCV3 coinfection has even been found in dogs (47, 48).

Similar to PCV2 infection, the pathogenesis of CanineCV and its participation as a coinfecting agent is not yet clearly defined. Current research suggests is that its role as a pathogen may be to exacerbate clinical conditions, like PCV2 infection, weakening the immune system and favoring the entry and dissemination of other viruses and bacteria. This is because, in the majority of the CanineCV detections performed, the virus has been found to be accompanied by other infectious agents, such as CPV with coinfection rates of up to 100% (22). To date, few reports confirmed CanineCV as a single agent in dog suffering acute gastroenteritis or hemorrhagic diarrhea (3, 21).

Based on the findings of the genetic material of CanineCV in lymphoid tissues, it has been proposed different hypotheses regarding the clinical manifestation of the CanineCV infection (6, 28). First, the replication of CanineCV in lymphoid tissues could be favored by previous infection with CPV, without apparent clinical manifestation or generation of disease. Second, the presence of a synergistic effect where CanineCV infection causes immunosuppression and allows the development of the clinical disease by CPV, even in vaccinated individuals, a situation that has been described in pigs as mentioned above.

It has been also evaluated the possible role of CanineCV in acute hemorrhagic diarrhea syndrome. According to the results, it has been reported a low probability that CanineCV acts as a putative agent of the syndrome, but CanineCV may be a predisposing element for bacterial or viral infections. The prevalence of CanineCV in the study was 4.6%, indicating that it could be only an incidental finding where the virus would be part of the normal intestinal microbiota of canines (28); this has also been described in pigs where PCV1 is present in asymptomatic animals as a nonpathogenic agent (49). The most significant finding of the study was the finding of a higher mortality in dogs that presented CPV2/ CanineCV coinfection. There are previous reports where a greater susceptibility or increased severity of infection was found when CPV2 manifests in coinfection with other pathogens, such as

enteric coronavirus. The authors suggest that the same can happen with CanineCV, as has been observed and reported in pigs in PCV2 infection.

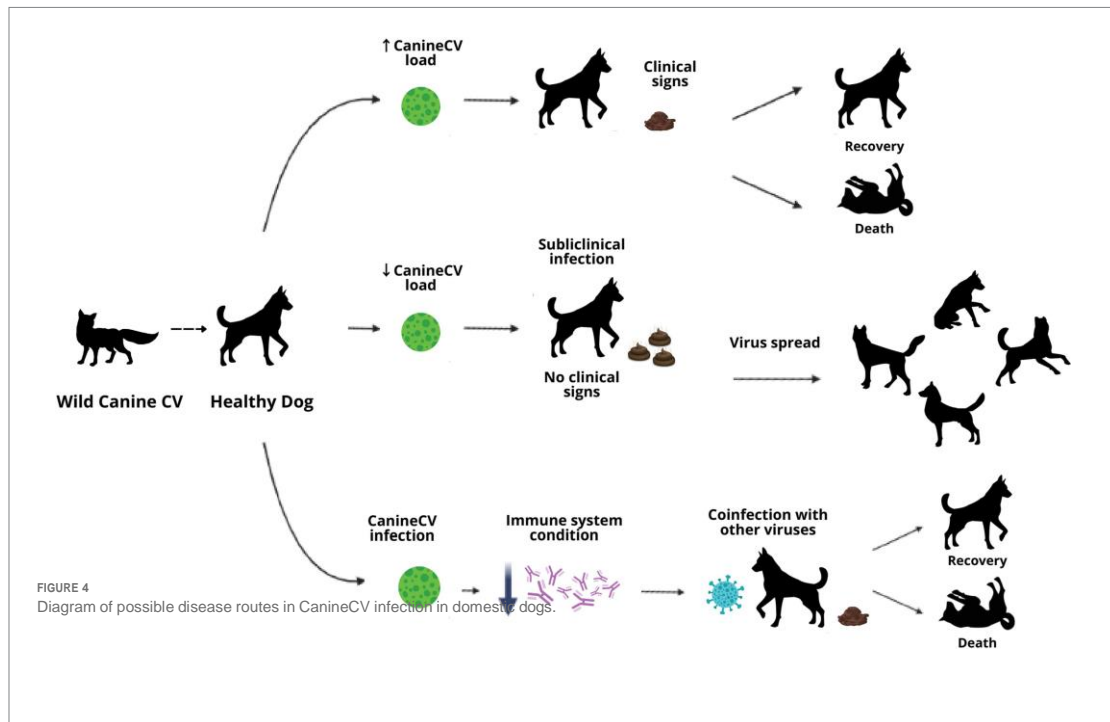
1. Final remarks

The discovery of emerging viruses such as CanineCV raises an important research topic in domestic and wild animals. The evidence of multiple gaps in the knowledge of this virus in aspects such as pathogenic and epidemiological characteristics raises the need to create and continue with studies that allow expanding and defining the knowledge about CanineCV infection. Scientific evidence supports that this virus poses a risk to the health and well-being of the canine population, so work must be done to define many concepts and gaps in the understanding of this emerging pathogen. Therefore, its necessary to strength the knowledge of veterinarians and clinicians about the possible manifestations as a disease not only as a single agent but also in coinfection with other pathogens. Additionally, the role of wild canids should be highlighted, since, according to recent research, it is evident that in this population, CanineCV seems to be more pathogenic, and its participation in the transmission of the virus to domestic canines seems to be relevant, especially because human invasion of wild habitats favors contact between both populations, which contributes to the transmission of interspecies pathogens.

The role of CanineCV as a primary agent or coinfecting in enteric diseases in canines remains uncertain; existing research suggests the importance of continuing with other study models that provide new information to define the concepts that remain doubtful until now. As can be observed in the development of this article, CanineCV could have different pathways of disease development in canines, either as a primary agent that leads to generating the clinical signs described or to cause subclinical infection where there are no signs but where the animal could spread the virus or contribute to the severity of the disease in coinfection with other agents. In addition, CanineCV, like the other circoviruses, could play an important role in the immune response of the animal, favoring the entry of other infectious agents or preventing its recovery (Figure 4).

2. Conclusion

The pathogenic and epidemiological characteristics of CanineCV are currently poorly understood, so CanineCV represents a multidisciplinary exploration challenge both in the field of research and in the clinic. Understanding the particularities of this new virus either in healthy animals or coinfecting with other agents could provide valuable information regarding prophylactic or therapeutic practices in enteric diseases in canines, contributing to the health and well-being of canine populations. Thus, it is necessary to continue carrying out research in different canine populations that allow the evaluation of the epidemiology of CanineCV in geographical sites not yet explored and its behavior in healthy or coinfecting animals, in



addition, to monitoring the clinical evolution of the infected animals to help to understand the pathogenesis of the CanineCV.

Author contributions

JR-S and JJ: conceptualization, validation, resources, and data curation. DG-B and DV-B: methodology, formal analysis, and investigation. DG-B: writing—original draft preparation. DG-B, DV-B, SG-R, JJ, and JR-S: writing—review and editing. SG-R: software and visualization. JR-S: supervision, project administration, and funding acquisition. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This research was funded by a CONADI-UCC grant to JR-S and the APC was funded by CONADI-UCC.

References

- Breitbart M, Delwart E, Rosario K, Segales J, Varsani A, Ictv Report C. ICTV virus taxonomy profile: Circoviridae. *J Gen Virol.* (2017) 98:1997–8. doi: 10.1099/jgv.0.000871
- Kapoor A, Dubovi EJ, Henriquez-Rivera JA, Lipkin WI. Complete genome sequence of the first canine circovirus. *J Virol.* (2012) 86:7018. doi: 10.1128/JVI.00791-12
- Li L, McGraw S, Zhu K, Leutenegger CM, Marks SL, Kubiski S, et al. Circovirus in tissues of dogs with vasculitis and hemorrhage. *Emerg Infect Dis.* (2013) 19:534–41. doi: 10.3201/eid1904.121390
- Hsu HS, Lin TH, Wu HY, Lin LS, Chung CS, Chiou MT, et al. High detection rate of dog circovirus in diarrheal dogs. *BMC Vet Res.* (2016) 12:116. doi: 10.1186/s12917-016-0722-8
- Piewbang C, Jo WK, Puff C, Van Der Vries E, Kesdangakonwut S, Rungsipat A, et al. Novel canine circovirus strains from Thailand: evidence for genetic recombination. *Sci Rep.* (2018) 8:7524. doi: 10.1038/s41598-018-25936-1
- Thaiwong T, Wise AG, Maes RK, Mullaney T, Kiupel M. Canine Circovirus 1 (CaCV-1) and canine parvovirus 2 (CPV-2): recurrent dual infections in a Papillon breeding Colony. *Vet Pathol.* (2016) 53:1204–9. doi: 10.1177/0300985816646430

Acknowledgments

Authors want to acknowledge the members of the GRICA lab at Medellín for meaningful discussions and feedback.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

1. Decaro N, Martella V, Desario C, Lanave G, Circella E, Cavalli A, et al. Genomic characterization of a circovirus associated with fatal hemorrhagic enteritis in dog. *Italy PLoS One*. (2014) 9:e105909. doi: 10.1371/journal.pone.0105909
2. Zaccaria G, Malatesta D, Scipioni G, Di Felice E, Campolo M, Casaccia C, et al. Circovirus in domestic and wild carnivores: an important opportunistic agent? *Virology*. (2016) 490:69–74. doi: 10.1016/j.virol.2016.01.007
3. Zhai SL, Chen SN, Xu ZH, Tang MH, Wang FG, Li XJ, et al. Porcine circovirus type 2 in China: an update on and insights to its prevalence and control. *Viral J*. (2014) 11:88. doi: 10.1186/1743-422X-11-88
4. Sun W, Zhang H, Zheng M, Cao H, Lu H, Zhao G, et al. The detection of canine circovirus in Guangxi, China. *Virus Res*. (2019) 259:85–9. doi: 10.1016/j.virusres.2018.10.021
5. Cheung AK. Porcine circovirus: transcription and DNA replication. *Virus Res*. (2012) 164:46–53. doi: 10.1016/j.virusres.2011.10.012
6. Faurez F, Dory D, Grasland B, Jestin A. Replication of porcine circoviruses. *Viral J*. (2009) 6:60. doi: 10.1186/1743-422X-6-60
7. Rodriguez-Carino C, Sanchez-Chardi A, Segales J. Subcellular immunolocalization of porcine circovirus type 2 (PCV2) in lymph nodes from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Comp Pathol*. (2010) 142:291–9. doi: 10.1016/j.jcpa.2009.12.001
8. Caddy SL. New viruses associated with canine gastroenteritis. *Vet J*. (2018) 232:57–64. doi: 10.1016/j.tvjl.2017.12.009
9. Pesavento PA, Murphy BG. Common and emerging infectious diseases in the animal shelter. *Vet Pathol*. (2014) 51:478–91. doi: 10.1177/0300985813511129
10. Cruz TF, Batista TN, Vieira EM, Portela LMF, Baccarin AM, Gradiz JJ, et al. Genomic characterization of canine circovirus detected in a dog with intermittent hemorrhagic gastroenteritis in Brazil. *Ciência Rural*. (2020) 50:e20190909. doi: 10.1590/0103-8478cr20190909
11. Misinzo G, Delputte PL, Lefebvre DJ, Nauwynck HJ. Increased yield of porcine circovirus-2 by a combined treatment of PK-15 cells with interferon-gamma and inhibitors of endosomal-lysosomal system acidification. *Arch Virol*. (2008) 153:337–42. doi: 10.1007/s00705-007-1092-0
12. Chen H-CG, Kuo T-Y, Yang Y-C, Wu C-C, Lai S-S. Highly permissive subclone of the porcine kidney cell line for porcine circovirus type 2 production. *J Virol Methods*. (2013) 187:380–3. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.11.013
13. Hosono S, Shiokawa M, Kobayashi T, Fukusho A, Aoki H. Porcine circovirus type 2 induces a strong cytopathic effect in the serum-free culture cell line CPK-NS. *J Virol Methods*. (2019) 273:113706. doi: 10.1016/j.jviromet.2019.113706
14. Niu L, Wang Z, Zhao L, Wang Y, Cui X, Shi Y, et al. Detection and molecular characterization of canine circovirus circulating in northeastern China during 2014–2016. *Arch Virol*. (2020) 165:137–43. doi: 10.1007/s00705-019-04433-4
15. Kotsias F, Bucafusco D, Nunez DA, Lago Borisovsky LA, Rodriguez M, Bratanich AC. Genomic characterization of canine circovirus associated with fatal disease in dogs in South America. *PLoS One*. (2019) 14:e0218735. doi: 10.1371/journal.pone.0218735
16. Giraldo-Ramirez S, Rendon-Marin S, Vargas-Bermudez DS, Jaime J, Ruiz-Saenz J. First detection and full genomic analysis of canine Circovirus in CPV-2 infected dogs in Colombia. *South America Sci Rep*. (2020) 10:17579. doi: 10.1038/s41598-020-74630-8
17. Urbani L, Tryland M, Ehrlich D, Fuglei E, Battilani M, Balboni A. Ancient origin and genetic segregation of canine circovirus infecting arctic foxes (*Vulpes lagopus*) in Svalbard and red foxes (*Vulpes vulpes*) in northern Norway. *Transbound Emerg Dis*. (2021) 68:1283–93. doi: 10.1111/tbed.13783
18. Beikpour F, Ndiana LA, Sazmand A, Capozza P, Nemat F, Pellegrini F, et al. Detection and genomic characterization of canine Circovirus in Iran. *Animals*. (2022) 12:507. doi: 10.3390/ani12040507
19. Faraji R, Sadeghi M, Mozghani S-H, Vasinioti V, Ndiana LA, Desario C, et al. Detection of canine circovirus in dogs infected with canine parvovirus. *Acta Trop*. (2022) 235:106646. doi: 10.1016/j.actatropica.2022.106646
20. Turan T, İşidan H. Molecular characterization of canine astrovirus, vesivirus and circovirus, isolated from diarrheic dogs in Turkey. *Iranian J vet res*. (2020) 21:172–9.
21. Wang L, Li Y, Guo Z, Yi Y, Zhang H, Shangguan H, et al. Genetic changes and evolutionary analysis of canine circovirus. *Arch Virol*. (2021) 166:2235–47. doi: 10.1007/s00705-021-05125-8
22. Anderson A, Hartmann K, Leutenegger CM, Prokx AL, Mueller RS, Unterer S. Role of canine circovirus in dogs with acute haemorrhagic diarrhoea. *Vet Rec*. (2017) 180:542. doi: 10.1136/vr.103926
23. Gentil M, Gruber AD, Müller E. Nachweishäufigkeit von dog circovirus bei gesunden und an Durchfall erkrankten Hunden. *Tierarzt Prax Ausg K Klientiere Heimtiere*. (2017) 45:89–94. doi: 10.15654/TPK-160701
24. Tuong NM, Piewbang C, Rungsipipat A, Techangamsuwan S. Detection and molecular characterization of two canine circovirus genotypes co-circulating in Vietnam. *Vet Q*. (2021) 41:232–41. doi: 10.1080/01652176.2021.1967511
25. Wang Z, Shi Y, Wang Y, Zhao L, Cui X, Wen S, et al. Detection of antibodies against canine Circovirus in naturally and experimentally infected canines by recombinant capsid enzyme-linked immunosorbent assay. *Front Vet Sci*. (2020) 7:294. doi: 10.3389/fvets.2020.00294
26. Dowgier G, Lorusso E, Decaro N, Desario C, Mari V, Lucente MS, et al. A molecular survey for selected viral enteropathogens revealed a limited role of canine circovirus in the development of canine acute gastroenteritis. *Vet Microbiol*. (2017) 204:54–8. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.04.007
27. Van Kruiningen HJ, Heishima M, Kerr KM, Garmendia AE, Helal Z, Smyth JA. Canine circoviral hemorrhagic enteritis in a dog in Connecticut. *J Vet Diagn Investig*. (2019) 31:732–6. doi: 10.1177/1040638719863102
28. Bexton S, Wiersma LC, Getu S, van Run PR, Verjans GM, Schipper D, et al. Detection of Circovirus in foxes with Meningoencephalitis, United Kingdom, 2009–2013. *Emerg Infect Dis*. (2015) 21:1205–8. doi: 10.3201/eid2107.150228
29. De Arcangeli S, Balboni A, Kaehler E, Urbani L, Verin R, Battilani M. Genomic characterization of canine Circovirus detected in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Italy using a new real-time PCR assay. *J Wildl Dis*. (2020) 56:239–42. doi: 10.7589/2018-11-270
30. Ouyang T, Zhang X, Liu X, Ren L. Co-infection of swine with porcine Circovirus type 2 and other swine viruses. *Viruses*. (2019) 11:185. doi: 10.3390/v11020185
31. Liu Y, Gong Q-L, Nie L-B, Wang Q, Ge G-Y, Li D-L, et al. Prevalence of porcine circovirus 2 throughout China in 2015–2019: a systematic review and meta-analysis. *Microb Pathog*. (2020) 149:104490. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104490
32. Segales J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res*. (2012) 164:10–9. doi: 10.1016/j.virusres.2011.10.007
33. Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, Koch MA. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature*. (1982) 295:64–6. doi: 10.1038/295064a0
34. Tischer I, Rasch R, Tochtermann G. Characterization of papovavirus- and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl Bakteriol Orig*. (1974) 226:153–67.
35. Meng XJ. Porcine circovirus type 2 (PCV2): pathogenesis and interaction with the immune system. *Annu Rev Anim Biosci*. (2013) 1:43–64. doi: 10.1146/annurev-animal-031412-103720
36. Palinski R, Piñeyro P, Shang P, Yuan F, Guo R, Fang Y, et al. A novel porcine Circovirus distantly related to known Circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure. *J Virol*. (2017) 91:e01879–16. doi: 10.1128/JVI.01879-16
37. Zhang H-H, Hu W-Q, Li J-Y, Liu T-N, Zhou J-Y, Oppriessnig T, et al. Novel circovirus species identified in farmed pigs designated as porcine circovirus 4, Hunan province, China. *Transbound Emerg Dis*. (2020) 67:1057–61. doi: 10.1111/tbed.13446
38. Ren L, Chen X, Ouyang H. Interactions of porcine circovirus 2 with its hosts. *Virus Genes*. (2016) 52:437–44. doi: 10.1007/s11262-016-1326-x
39. Herbst W, Willems H. Detection of virus particles resembling circovirus and porcine circovirus 2a (PCV2a) sequences in feces of dogs. *Res Vet Sci*. (2017) 115:51–3. doi: 10.1016/j.rvsc.2017.01.014
40. Song T, Hao J, Zhang R, Tang M, Li W, Hui W, et al. First detection and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 in raccoon dogs. *BMC Vet Res*. (2019) 15:107. doi: 10.1186/s12917-019-1856-2
41. Sun W, Wang W, Xin J, Cao L, Zhuang X, Zhang C, et al. An epidemiological investigation of porcine circovirus 3 infection in dogs in the Guangxi Province from 2015 to 2017. *China Virus Res*. (2019) 270:197663. doi: 10.1016/j.virusres.2019.197663
42. Zhang J, Liu Z, Zou Y, Zhang N, Wang D, Tu D, et al. First molecular detection of porcine circovirus type 3 in dogs in China. *Virus Genes*. (2018) 54:140–4. doi: 10.1007/s11262-017-1509-0
43. Ellis J, Clark E, Haines D, West K, Krakowka S, Kennedy S, et al. Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. *Vet Microbiol*. (2004) 98:159–63. doi: 10.1016/j.vetmic.2003.10.008

3. CAPÍTULO 2: TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

DETECCIÓN, CARACTERIZACIÓN GENÓMICA Y FRECUENCIA DE CIRCOVIRUS CANINO EN PERROS CON Y SIN SÍNDROME DIARREICO EN MEDELLÍN

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo General

Detectar Circovirus y parvovirus canino en perros con y sin síndrome diarreico atendidos en centros veterinarios en la ciudad de Medellín para determinar la frecuencia de ambos virus, la frecuencia de coinfección entre ambos, y caracterizar genómicamente las cepas de circovirus encontradas.

1.2 Objetivos específicos

1. Estimar la frecuencia molecular de circovirus canino mediante PCR convencional en muestras de heces en un grupo de caninos con diarrea y un grupo de animales asintomáticos.
2. Estimar la frecuencia molecular de parvovirus canino mediante PCR convencional en muestras de heces en un grupo de caninos con diarrea y un grupo de animales asintomáticos.
3. Estimar la frecuencia molecular de coinfección entre Circovirus y Parvovirus mediante PCR convencional en muestras de heces en un grupo de caninos con diarrea y un grupo de animales asintomáticos.
4. Caracterizar filogenéticamente las secuencias circulantes de Circovirus canino encontradas.
5. Explorar la asociación entre la frecuencia de Circovirus canino con las características epidemiológicas de los animales evaluados (sexo, edad, vigencia plan vacunal).

1.3 Hipótesis

Existe una alta frecuencia de CanineCV y su coinfección con CPV-2, en perros con diarrea de la ciudad de Medellín

2. Metodología

2.1 Consideraciones Bioéticas

El proyecto cuenta con el aval del Comité de Bioética de la Universidad Cooperativa de Colombia sede Bucaramanga, sin embargo, este estudio no generó ningún riesgo para los animales ya que la toma de las muestras no implicó manipulación alguna de ellos; no obstante, a los propietarios de los animales muestreados les fue entregado un consentimiento informado donde se indicaba la participación de la muestra de su animal en la investigación.

La ejecución de este proyecto está sustentada según lo expuesto en la resolución 8430 de 1993 “Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud”. La ley 84 de 1989 “Por la cual se adopta el estatuto nacional de protección de los animales y se crean unas contravenciones y se regula lo referente a su procedimiento y competencia”, ley 576 del 2000 “Por la cual se expide el Código de Ética para el ejercicio profesional de la medicina veterinaria, la medicina veterinaria y zootecnia y la zootecnia”, y la ley 1774 de 2016 “por medio de la cual se modifican el código civil, la ley 84 de 1989”. Por último, el Código Penal, artículo 1 “Los animales como seres sintientes no son cosas, recibirán especial protección contra el sufrimiento y el dolor, en especial, el causado directa o indirectamente por los humanos, por lo cual en la presente ley se tipifican como punibles algunas conductas relacionadas con el maltrato a los animales, y se establece un procedimiento sancionatorio de carácter policivo y judicial”.

2.2 Tipo de estudio, población de estudio y recolección de la muestra

Se realizó un estudio de corte transversal a conveniencia, en el que se colectaron un total de 103 muestras de heces, 80 de estas provenientes de caninos con heces blandas o diarreicas con puntuación 3,5-5 (según la escala de Waltham) (14), provenientes de diferentes laboratorios y centros veterinarios de la ciudad de Medellín en el periodo de octubre de 2021 a julio de 2022. Por otro lado, se colectaron aleatoriamente 23 muestras de heces de caninos con clasificación inferior a 3 (aparentemente sano). Se colectaron heces frescas, en tarros de

coprológico, sin cantidad determinada (la mayor cantidad que se pudiera coleccionar). Todas las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su procesamiento. Se recopiló además los siguientes datos de los caninos muestreados: edad, sexo y vigencia del plan vacunal (animal con las vacunas al día correspondientes a su edad).

2.3 Extracción de DNA

La extracción del ADN viral se realizó a partir de cada una de las muestras de materia fecal obtenidas utilizando el kit de extracción de QIAamp DNA Stool (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante: 1 gr de cada muestra de materia fecal se mezclaba con el buffer de inhibición, incubaba en calor y se mezclaba con los demás reactivos, finalmente el ADN era eluido de las columnas QIAMP una vez se realizarán los buffer de lavado. La calidad y cantidad del DNA extraído se determinó por medio de espectrometría con el equipo Nanodrop™One UV-Vis (Thermo Fisher Scientific®). Las alícuotas obtenidas de ADN se almacenaron a -20°C hasta su uso.

2.4 Detección de CanineCV y CPV-2

Para el diagnóstico de CanineCV se amplificó un fragmento del gen Rep de 533 pb, mediante PCR convencional utilizando un conjunto de primers reportados previamente por (Kotsias et al., 2018). Para cada reacción de PCR se agregaron 25 μl de DreamTaq™ Hot start Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific®), 3 μl del primer de 10 pmol For genomic (5'-ATGGCTCAAGCTCAGGTTG.3'), y 3 μl de 10 pmol del primer Rev 533 (5'-CCGCACAGAACCTCCACTTC-3'), el DNA utilizado para cada muestra fue normalizado a 500 ng según la medición en el Nanodrop y completado con agua de grado molecular para obtener un volumen total de 50 μl por muestra. Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador Proflex™ PCR system con el siguiente protocolo: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación de $51,8^{\circ}\text{C}$ por 30 segundos, extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Para el diagnóstico de CPV-2 se amplificó un fragmento del gen VP2 de 1600 pb, utilizando un conjunto de primers reportados previamente por (Faz et al., 2018) (3). Para las reacciones se siguió el mismo protocolo que con CanineCV, exceptuando el volumen de primers. Se

emplearon 4 μ l de 10 pmol del ParvoExt1F (5'-ATGAGTGATGGAGCAGTTCA-3'), y 4 μ l de 10 pmol del primer ParvoExt3R (5'-AGGTGCTAGTTGAGATTTTTCATATAC-3'), las reacciones de PCR se llevaron a cabo mediante el siguiente protocolo: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación de 50°C por 45 segundos, extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 5 minutos.

Para cada virus se utilizó como control positivo una muestra positiva previamente obtenida por el grupo de investigación y como control negativo agua de grado molecular. Los resultados de la amplificación por PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa horizontal al 1 % con la tinción SYBR safe DNA gel stain (Thermo Fisher Scientific). Se utilizó GeneRuler 100-bp DNA Plus Ladder (Thermo Fisher Scientific) como marcador de peso molecular. Los geles se visualizaron en el sistema de imágenes Gel Doc XR + de luz ultravioleta (Bio-Rad, Molecular imager, EE. UU.) utilizando el software ImageLab.

2.5 Amplificación del genoma de CanineCV

Se amplificó el genoma completo de CanineCV, mediante PCR convencional a partir de 3 muestras positivas utilizando 2 conjuntos de primers de secuenciación específicos informados por (Kotsias et al., 2018) y 2 conjuntos de primers informados por (Piewbang, et al., 2018) junto con el par de primers de diagnóstico. Las reacciones se realizaron en un volumen total de 50 μ l que 25 μ l DreamTaq™ Hot start Green PCR Máster Mix (Thermo Fisher Scientific®), y 3 μ l de 10 pmol de cada primer forward y cada primer reverse que conforman cada conjunto. Para cada reacción se utilizó 19 μ l de DNA para un obtener un volumen total de 50 μ l por reacción. En la tabla 1 se especifican los primers de secuenciación utilizados, con su respectivo protocolo de temperaturas para las PCR.

Tabla 1. Primers utilizados en la amplificación del genoma de CanineCV.

Autor	Primers	Tamaño de fragmento amplificado	Protocolo PCR
(Kotsias et al., 2018)	A.For456: (5'-CTTGCGCGAGCTGCTCCTTA-3') Rev 1055: (5'-AATAAACAGCCTCGAAGGGG-3')	599 bp	1X desnaturalización inicial: 94°C, 3' 35X desnaturalización: 94°C, 30" Hibridación: 51,8°C, 30" Extensión: 72°C, 1' Extensión final: 72°C, 10'
(Kotsias et al., 2018)	C.For 1734: (5'-GTTCCATAGCAACGGGGTCT-3') Rev genomic: (5'-GTCGGAGGAGCGGAGGTGT-3')	329 bp	1X desnaturalización inicial: 94°C, 3' 35X desnaturalización: 94°C, 30" Hibridación: 51,8°C, 30" Extensión: 72°C, 1' Extensión final: 72°C, 10'
(Piewbang, et al.,2018)	Forward (5'-AATGGTGGGAYGGYTACGATGG-3') Reverse (5'-AAGGGGGGTGAACAGGTAAAC-3')	437 bp	1X desnaturalización inicial: 98°C, 30" 45X desnaturalización: 98°C, 20" Hibridación: 50°C, 30" Extensión: 72°C, 1' Extensión final: 72°C, 7'
(Piewbang, et al.,2018)	Forward (5'-TTTACCTGTTACCCCCCTTCGA-3') Reverse (5'-GGAAGAGGYAATGCTACAAGATCA-3')	517 bp	1X desnaturalización inicial: 98°C, 30" 45X desnaturalización: 98°C, 20" Hibridación: 50°C, 30"

			Extensión: 72°C, 1' Extensión final: 72°C, 7'
--	--	--	-----------------------------------------------------

2.6 Secuenciación y análisis filogenético

Los amplicones obtenidos a partir de las muestras positivas de amplificación de genoma fueron enviados a Corea del sur para ser purificados y secuenciados por la empresa MacroGen™ Seoul-Korea. Los cromatogramas se analizaron y editaron con Chromas v2.6 (Technelysium, Helensvale, Australia) y los contigs de consenso se ensamblaron con la plataforma SeqMan Pro en Lasergene Software v.15 (Lasergene INC. Madison, Wisconsin, EE. UU.). Las secuencias de ADN se alinearon utilizando el método Mafft Alignment en Geneious Prime v. 10.1.2 (Dotmatics, New Zealand) donde se compararon con 80 secuencias de nucleótidos de genoma completo de CanineCV de perros domésticos y caninos silvestres obtenidas de GenBank®. La selección de las secuencias se basó en los siguientes criterios: secuencias de genoma completo, aisladas en diferentes países y secuencias de zorros.

El árbol filogenético se construyó bajo el modelo de maximum likelihood en el programa MEGA X para Windows, en el cual seleccionó el modelo de sustitución de nucleótidos que mejor se ajustaba GTR+G4+I con un bootstrap de 1000.

Para la filogeografía y tiempos de divergencia, el tiempo hasta el ancestro común más reciente (tMRCA), el origen geográfico y la dinámica espacial general de los principales clados de CanineCV se infirieron utilizando el enfoque bayesiano de MCMC en BEAUti/BEAST v1.8.430. El análisis se realizó empleando un reloj molecular estricto con un tamaño de población constante. Se ejecutaron 15 millones de generaciones para garantizar una población efectiva tamaño mayor a 200 para los parámetros evaluados en Tracer v1.730. El árbol de máxima credibilidad de se construyó con TreeAnnotator y se visualizó en FigTree V1.4.4

2.7 Análisis estadístico

Las frecuencias de CanineCV y CPV-2 en los individuos de los cuales se recolectaron las muestras fueron puntualizadas mediante estadística descriptiva, de igual forma que la frecuencia de CanineCV según el sexo de los animales evaluados, la edad y vigencia del plan sanitario. La asociación entre las características epidemiológicas y la frecuencia de CanineCV se realizó mediante análisis bivariados en el programa SPSS 2.7. Se evaluó la frecuencia de CanineCV con el sexo y la vigencia del plan vacunal mediante la prueba de Chi-cuadrado. De acuerdo con las pruebas de normalidad se emplearon pruebas no paramétricas para evaluar la frecuencia de CanineCV con la edad de los animales evaluados siendo significativa con un valor ($P < 0,05$).

3. Resultados

3.1 Población de estudio

En total se recolectaron 103 muestras de materia fecal divididas en 2 grupos: caninos con presentación de diarrea y caninos clínicamente sanos. Debido a que algunas muestras no cumplieron con las condiciones apropiadas para su procesamiento como cantidad y calidad de muestra o de ADN suficiente, se procesaron en total 90 de estas, 67 muestras del grupo de animales con diarrea y 23 del grupo de animales clínicamente sanos.

Los datos epidemiológicos: edad, sexo y vigencia del plan vacunal de ambos grupos se exponen a continuación en la tabla 2:

Tabla 2. Datos epidemiológicos de los grupos de caninos con diarrea y clínicamente sanos.

Grupo de animales con diarrea			Grupo de animales clínicamente sanos		
Sexo					
Machos	39	58,2%	Machos	14	60,80%
Hembras	28	41,8%	Hembras	9	39,20%
Total: 67			Total: 23		
Edad					
Grupo I: 0-1 año	41	61,2%	Grupo I: 0-1 año	1	4,3%
Grupo II: 2-5 años	14	22%	Grupo II: 2-5 años	10	43,4%
Grupo III: 6-10 años	8	11,9%	Grupo III: 6-10 años	6	26%
Grupo IV: >10 años	4	5,9%	Grupo IV: >10 años	7	30,7%
Vigencia del plan vacunal*					
Si	36	53,70%	Si	22	96%
No	31	46,20%	No	1	4%

*Al momento de la recolección de la muestra, el propietario o médico veterinario encargado verificaba si el animal contaba con el plan vacunal correspondientes a la fecha

3.2 Detección de CanineCV y CPV-2 mediante PCR convencional.

Del total de las 90 muestras procesadas, se detectaron 27 muestras positivas para CanineCV (30%); tres muestras positivas para CPV-2 (3,3%) y no se detectó ninguna coinfección (figura 1). En la figura 2, se muestra un gel de electroforesis en donde se evidencian muestras positivas a CanineCV correspondientes a un fragmento de 533 pb.

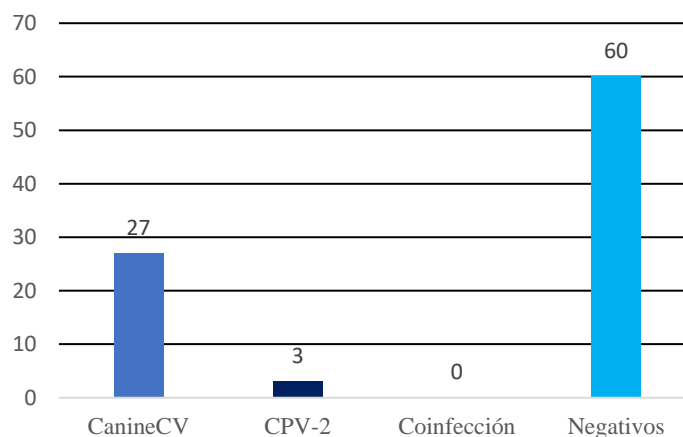


Figura 1. Porcentaje de muestras positivas a CanineCV, CPV-2, coinfección entre ambos virus y negativos.

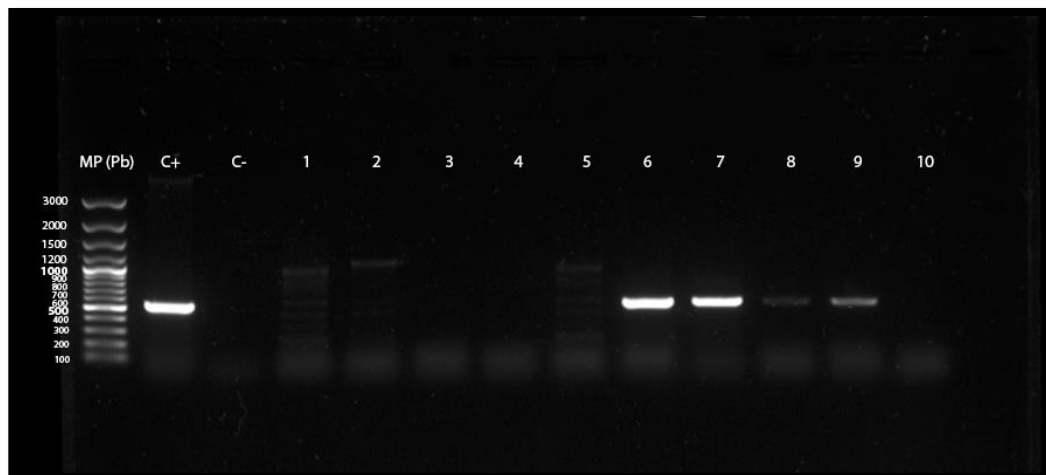


Figura 2. Gel de electroforesis representativo para PCR de CanineCV. Carriles positivos para CanineCV: 6, 7, 8 y 9 con amplicones de 533 pb. C+ Muestra control positivo; C- Agua de grado molecular; MP: marcador de peso molecular.

Al evaluar las muestras por grupo de desenlace clínico se encontró que el grupo que presentó mayor número de muestras positivas para CanineCV fue el de caninos con diarrea (n=22) y en menor medida en el de animales clínicamente sanos (n=4) (Figura 3).

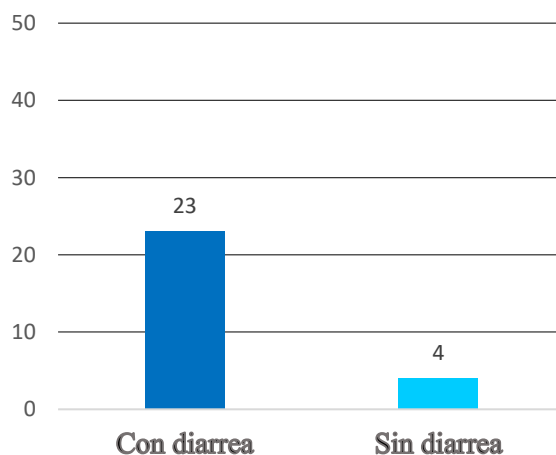


Figura 3. Frecuencia de CanineCV en el grupo de animales con diarrea y el grupo clínicamente sano.

Al analizar la variable sexo, del grupo de animales positivos a CanineCV el mayor porcentaje correspondió a los machos y en menor medida las hembras (Figura 4), sin encontrarse diferencias estadísticas significativas entre las dos variables.

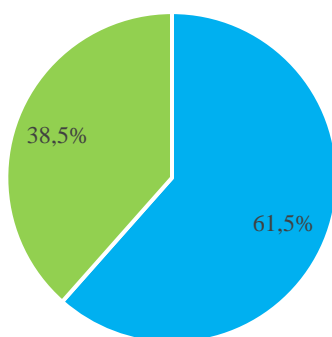


Figura 4. Frecuencia de CanineCV según el sexo de los caninos evaluados.

Los grupos etarios se clasificaron de la siguiente forma: Grupo I: animales de meses hasta un año, grupo II: animales de más de un año hasta los 5 años, grupo III: caninos de más de 5 años hasta los 10 y años y grupo IV: animales de más de 10 años. Al evaluar la variable edad, el grupo etario en el que se presentó mayor número de positivos a CanineCV fue el grupo I (0-1 año) (Figura 5).

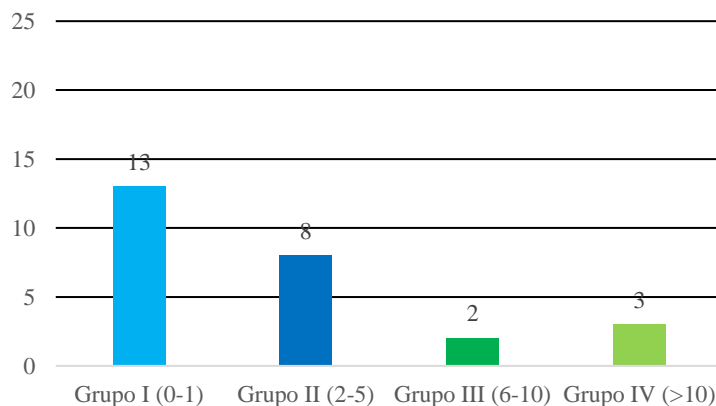


Figura 5. Frecuencia de CanineCV según la edad de los caninos evaluados. En paréntesis se presenta los grupos de edad.

Al evaluar la vigencia del plan vacunal, teniendo en cuenta los reportes realizados por los propietarios y/o por los médicos veterinarios tratantes, se encontró que en el grupo de caninos positivos a CanineCV, el 61,6% presentaban el plan vacunal vigente (Figura 6)

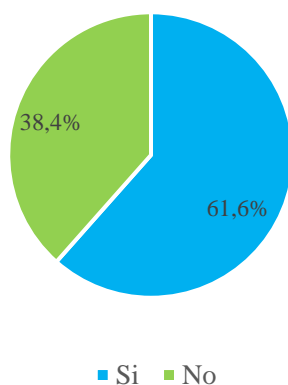


Figura 6. Frecuencia de CanineCV de acuerdo con la vigencia del plan vacunal de los animales evaluados. Si: plan vacunal vigente. No: plan vacunal no vigente.

3.3 Asociación entre la frecuencia de CanineCV con las características epidemiológicas de los animales evaluados

Para evaluar la asociación entre las características epidemiológicas de tipo cualitativo (sexo, vigencia del plan vacunal) de los caninos muestreados y la frecuencia de CanineCV se utilizó la prueba de chi-cuadrado de Pearson. Para ambas variables los resultados de esta prueba evidenciaron que se no presenta significancia estadística entre la frecuencia de CanineCV con el sexo ($P=0,813$) ni con la vigencia del plan vacunal ($P=0,619$) de los animales evaluados

Para evaluar la asociación entre la edad y la frecuencia de CanineCV, dado que es una variable de tipo cuantitativa se evaluó en primera instancia si las variables contaban con una distribución normal. En vista que la n de los datos era menor a 50, se analizó mediante la

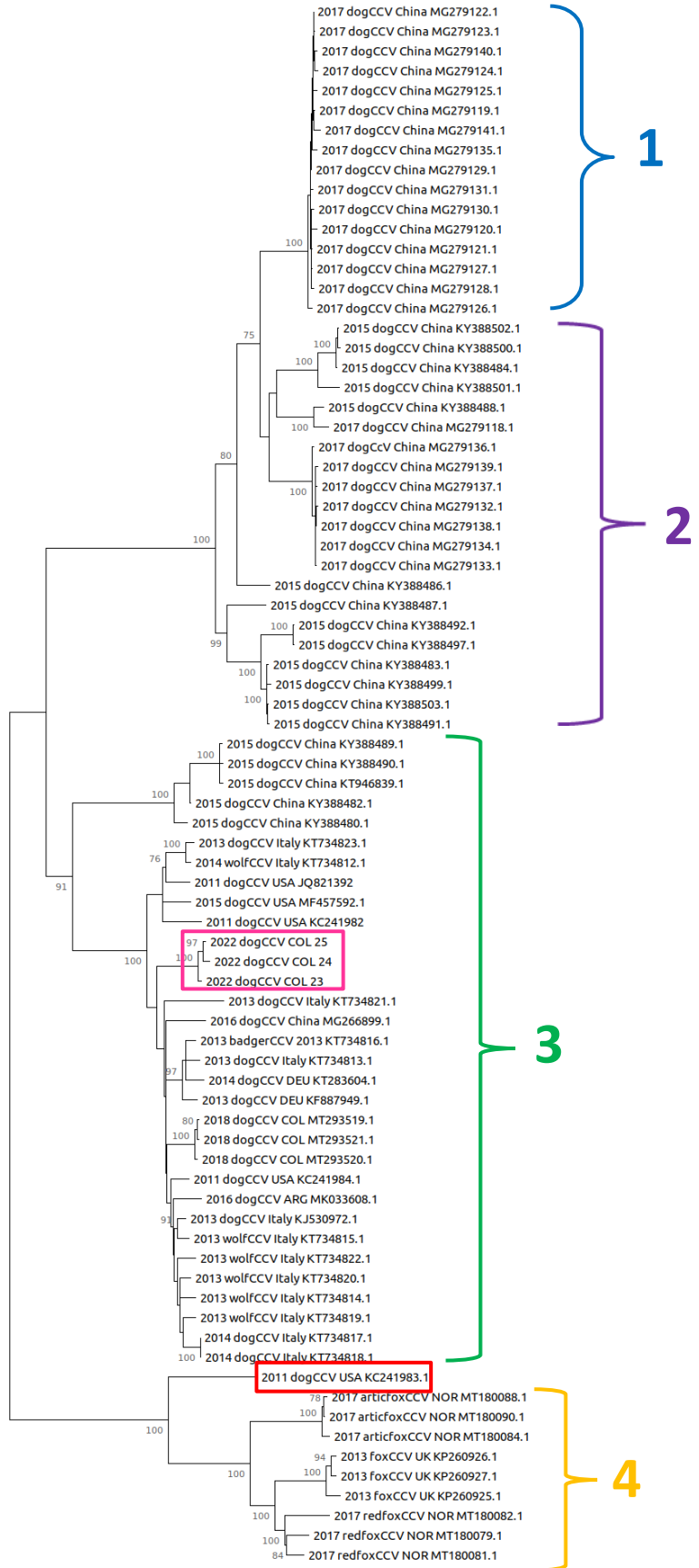
prueba de Shapiro-Wilk, la cual indicó que los datos no cumplían con una distribución normal. Por lo anterior, el análisis de asociación se hizo mediante pruebas no paramétricas como la prueba Kruskal-Wallis, la cual evidenció que no se presenta asociación ($P=0,814$) entre la frecuencia de CanineCV y la edad de los animales evaluados.

3.4 Filogenética, filogeografía y tiempos de divergencia de CanineCV.

Una búsqueda inicial en BLAST™ indicó que las secuencias de CanineCV obtenidas en este estudio mostraron una identidad máxima de nucleótidos del 96,5 - 97% con la cepa de Circovirus canino CanineCV-1367/2016 (GenBank: MT193166.1) que pertenece a una cepa en perros infectados con CPV-2 en Italia (artículo no publicado). Además, se determinó una identidad de nucleótidos del 96,5% con una de las cepas reportadas en Vietnam CanineCV-VN-8 (MT740200.1) (16) aislada de perros también infectados con CPV-2. Con las secuencias colombianas identificadas en 2020, las cepas de esta investigación comparten un porcentaje de identidad nucleotídica entre 96,3 y 96,5%, finalmente las tres secuencias obtenidas en el presente estudio mostraron una alta identidad nucleotídica entre ellas (99.7 - 99.9% nt).

En el árbol filogenético construido con base al alineamiento de secuencias de nucleótidos de genoma completo de CanineCV mediante el método de máxima verosimilitud (Maximum a likelihood), es posible evidenciar la segregación de las cepas en diferentes grupos como se ha reportado en otros estudios, incluyendo el de Colombia en 2020 (1,13,17) (Figura 7). El grupo denominado como 1 expone secuencias identificadas en perros en China en 2017; el grupo 2 incluye secuencias de China identificadas en 2015 en perros y algunas de 2017; el grupo 3, el más numeroso, contiene secuencias de perros identificadas en China en 2015, de lobos y perros de Italia, de perros en Alemania y Argentina y las secuencias de perros de Colombia; el grupo 4 exhibe secuencias aisladas de zorros de Noruega y Reino Unido. Finalmente, la secuencia identificada en Estados Unidos en 2011 (Genbank: KC241983) (recuadro rojo en la figura 7), no fue clasificada en ninguno de los grupos mencionados, tal como ha sido identificado previamente.

Finalmente el grupo 4 contiene exclusivamente secuencias identificadas en especies de zorros, que incluye cepas identificadas en Noruega en zorros árticos *Vulpes lagopus* y zorros rojos *Vulpes vulpes* al igual que secuencias identificadas en Reino Unido de igual forma en zorros rojos.



0.050

Figura 7. Árbol de máxima probabilidad basado en secuencias de genoma completo de CanineCV. Se muestra el árbol con la probabilidad logarítmica más alta, dibujado a escala, con las longitudes de las ramas medidas en número de sustituciones por sitio. El análisis incluyó 79 secuencias de nucleótidos y un total de 2063 posiciones en el conjunto de datos final. El cuadro rosa indica las secuencias colombianas identificadas en este trabajo y el cuadro rojo indica la secuencia de Estados Unidos que no se agrupa en ninguno de los clados. El análisis filogenético se realizó utilizando el programa Mega X, para Windows

La media estimada de tMRCA para el genoma CanineCV completo fue de 1871 (intervalo HDP 95% 1807-1924). El análisis filogeográfico evidencia el origen chino en perros domésticos de CanineCV y una división posterior a Estados Unidos y continuación en China, aproximadamente en el año 1909 (1860-1947). La segregación China dio lugar a las secuencias italianas, y el grupo de Estados Unidos en 1943 (1910-1968) para luego pasar a las secuencias de zorros en Noruega, dando así origen al clado de zorros, que incluye además cepas identificadas en Reino Unido; sin embargo, es llamativo que la secuencia de Estados Unidos, precedente a este grupo, es aquella que hasta la fecha no se ha establecido en ningún clado como tal (Figura 8). A pesar de que es evidente la organización de las secuencias chinas en un mismo clado, algunas representantes de este país procedieron del ancestro que dio comienzo a las cepas italianas evidenciando una distancia genética mucho más amplia y por tanto ubicándose en otro grupo, que en el párrafo anterior se designó como grupo 3. Por otra parte, se observa que las cepas del continente americano comparten un origen italiano al igual que las de Alemania.

Es posible evidenciar que existe una diferencia entre el ancestro de origen de las secuencias identificadas en Colombia en el año 2020, y las de este trabajo, distinguidas con el recuadro rosado (Figura 7). Por lo anterior, es posible considerarlas como parafiléticas, aunque todas provienen de un ancestro italiano; además, en la figura 8 es posible observar que las cepas del presente año poseen un origen de mayor ancestralidad en 1991 (1979-1999) que aquellas reconocidas en 2020 (1997) (1994-2006). Indicando probablemente dos orígenes temporales de ingreso del CanineCV a nuestro país.

4. Discusión

El presente trabajo representa la continuación de la investigación sobre CanineCV en Colombia iniciada en el año 2020 en la cual fue posible comprobar la circulación del virus en el país (1). El porcentaje de positividad de CanineCV de esta investigación fue del 30%, lo que es relevante con respecto a lo expuesto en la literatura existente a la fecha, en la cual, el estudio con mayor porcentaje de positivos para CanineCV fue en el reporte de Decaro et al en 2014 (2) con un 71,4%, ubicando el presente trabajo en segundo lugar.

Un aspecto relevante para destacar de este estudio es que a diferencia del primer reporte donde la detección de CanineCV se realizó a partir de muestras positivas a CPV-2 (1), esta investigación fue realizada a partir de muestras sin un diagnóstico previo de infección por CPV-2. Este contexto se relaciona con uno de los objetivos de la investigación, el cual consistió en evaluar la frecuencia de coinfección de CanineCV con CPV-2; esto se planteó debido a que en varios estudios como en el de Niu L, et al en 2020 (18); Gentil M et al y Anderson et al en Alemania (19,20) entre otros (2,9,21,22), reportan altas frecuencias de coinfección con CPV-2. Los resultados de este trabajo exponen que no se presenta tal coinfección en las muestras positivas para CanineCV al igual que en estudios previos como en Taiwán (14) y en Italia (11), en donde también se reporta CanineCV como agente único incluso al evaluar la presencia de otros patógenos virales y bacterianos.

Esta diferencia respecto al anterior trabajo en Colombia podría deberse a que el presente estudio buscó detectar ambos virus sin partir de muestras positivas a CPV-2. Así, se encontró que la frecuencia de CanineCV en animales con diarrea es mayor de la esperada, lo cual representa una constante en los resultados de las investigaciones en CanineCV incluyendo este trabajo, en el que la mayor cantidad de muestras positivas correspondió a individuos que presentaban signos gastrointestinales principalmente diarrea; lo cual indica que CanineCV puede causar enfermedad en caninos domésticos. Sin embargo, un aspecto que ha impedido el poder correlacionar definitivamente a CanineCV con cuadros clínicos de enfermedad gastrointestinal es el hecho de encontrarse en muestras de animales clínicamente sanos, lo que se evidenció en este estudio donde en el grupo de caninos sin diarrea se detectaron cuatro muestras positivas para CanineCV (15%). Este contexto es posible contrastarlo con la literatura actual en donde Li L et al en 2013 en Estados Unidos (12) estableció una

prevalencia de 11.3% en perros con diarrea y 6.9% en perros sanos siendo esta diferencia no significativa estadísticamente. Por el contrario, en Taiwán, Hsu H et al (14) encontraron una correlación altamente significativa entre la presencia de diarrea y CanineCV con una prevalencia de 28,02% en perros con diarrea y 11,9% en perros sanos (14). Niu L et al (18) definió en el Nordeste de China una prevalencia de CanineCV de 15,6% en perros con diarrea y de 6,7% en perros sanos encontrando también una diferencia significativa entre ambas prevalencias. En Alemania, Gentil M et al (19) estableció una prevalencia de CanineCV de 20,1 % en perros con diarrea y de 7,3% en perros sanos, definiendo que el virus puede encontrarse de forma más frecuentemente en perros con diarrea. Por otra parte, Anderson et al en Alemania (20) definieron que no se presenta diferencia significativa entre la detección de CanineCV en perros sanos y perros con diarrea hemorrágica con una prevalencia de 4,5% y 3,6% respectivamente. En Vietnam el 19,8% de las muestras resultaron positivas para circovirus canino procedentes de cachorros con diarrea (21) y en Irán se reportó una prevalencia de 6,4% en perros con diarrea.(23).

Los signos clínicos en animales positivos se han asociado con hallazgos histopatológicos como vasculitis fibronectinante en intestino y bazo, linfadenitis granulomatosa y cambios histiocíticos y necrosis en placas de Peyer y linfonodos, pérdida de las microvellosidades y necrosis en células de las criptas, y necrosis en linfonodos mesentéricos y bazo,(9,12,22,24). Tales hallazgos asociados a CanineCV guardan una estrecha similitud con lo reportado en la infección por PCV2 en cerdos (24,25). En relación con este aspecto y con base en lo estudiado en PCV, como modelo de la familia *Circoviridae* (26–29), lo que se ha sugerido es que su papel patógeno puede ser el de predisponer al cerdo a contraer otros agentes infecciosos o bien, aumentar la severidad del cuadro clínico impidiendo una adecuada recuperación del individuo al disminuir la capacidad de respuesta del sistema inmune (30–33). Este concepto podría ser extensivo al CanineCV a través de lo expuesto por Hao X et al en 2022 (34) quienes reportan que CanineCV suprime la expresión de interferón I (IFN-I), de genes estimulados por interferón (ISG) e inhibe la expresión de proteínas lo que facilita la replicación de CPV-2. Por lo tanto, la coinfección con CPV-2 y CanineCV puede provocar síntomas clínicos más graves que la infección solamente con CPV-2 inclusive en animales vacunados (34).

Con lo reportado en la literatura y los resultados de este trabajo, es posible proponer que CanineCV pudiera formar parte de la microbiota intestinal de algunos caninos y comportarse como agente oportunista en casos de infección por otros agentes o factores que afecten la inmunidad del animal como el estrés, lo cual ha sido descrito en cerdos (29,35,36) y planteado reiteradamente por otros para el caso de la infección por CanineCV en caninos domésticos (2,20,22,37).

En la evaluación de la asociación de las características epidemiológicas de los animales evaluados con la frecuencia de CanineCV, con el fin de estudiar posibles factores predisponentes; con relación al sexo, es posible mencionar que no ha sido una variable tomada en cuenta en los reportes actuales de CanineCV, los resultados de este trabajo exponen que quienes presentaron mayor porcentaje de positivos fueron los machos (61,5%), sin embargo, este resultado puede estar sesgado por el hecho de que las muestras provenientes de machos estaban en mayor proporción (n=53) respecto a la cantidad de procedentes de hembras (n=37), además, la prueba de chi cuadrado indicó que no se presentaba asociación entre ambas variables.

En cuanto a la vigencia del plan vacunal autores como Thaiwong et al en 2016 (9) mencionado además en el primer reporte de CanineCV en Colombia (1), proponen un efecto sinérgico entre CanineCV y CPV-2 que permite el desarrollo de enfermedad clínica en perros, aunque estos cuenten con la respectiva vacunación vigente contra CPV-2. Este efecto ha sido reportado entre ambos virus en infecciones en cerdos (38–40) y es consecuente con la descripción que tienen los circovirus al tener como blanco el sistema inmune y favorecer la afección por otros agentes (2,11,22). Además, con el hecho de encontrar material genético de CanineCV en tejidos linfoides, los autores han sugerido que la replicación de CanineCV puede favorecerse por la infección previa con CPV2, sin manifestación clínica aparente o generación de enfermedad (9).

A pesar de este panorama, en el actual trabajo no fue posible exponer esta situación al no presentarse resultados de coinfección, el 61,6% (n=17) de los individuos positivos para CanineCV contaban con el plan vacunal al día, sin embargo, al igual que con el sexo la prueba de chi cuadrado indicó que no se presentaba asociación entre ambas variables.

En relación con la edad y la frecuencia de CanineCV, el grupo con mayor porcentaje de positivos fue aquel en donde se ubicaron los animales de días de nacidos hasta un año; esto concuerda con lo reportado por Decaro et al, 2014; Thaiwong et al., 2016; y Zaccaria et al en 2016 (9,11,22,37) y en Colombia en 2020 (1). Lo anterior se correlaciona con el hecho de que los animales jóvenes, principalmente en el primer año, tienen un sistema inmune en proceso de desarrollo que los hace más susceptibles a infecciones por microorganismos infecciosos (2,3). Esto explica el hecho de que la mayor prevalencia de CPV-2 está en este grupo etario (41), lo que es concordante con el efecto sinérgico antes mencionado entre CanineCV y CPV-2. No obstante, en el reporte de Beikpour et al (23) detectaron CanineCV con mayor frecuencia en perros adultos difiriendo de nuestros resultados; los autores indican que la disminución de la prevalencia de CanineCV relacionada con la edad puede deberse al desarrollo de una respuesta inmunitaria específica inducida por infecciones previas asociadas con una eliminación progresiva del agente infeccioso. Por esta razón, esta situación inmunitaria podría explicar un posible papel de los animales adultos como portadores asintomáticos de CanineCV (23). Al igual que las demás características epidemiológicas evaluadas en este estudio la prueba estadística de Kruskal Wallis no mostró asociación estadísticamente significativa entre la edad y frecuencia de CanineCV. Aunque en el presente trabajo las pruebas estadísticas no mostraron asociación entre las variables epidemiológicas y la presencia de CanineCV, los resultados podrían variar en un estudio que cuente con mayor cantidad de muestras positivas.

Respecto al análisis filogenético del virus, el presente trabajo confirma la separación genotípica de CanineCV en distintos clados, lo cual, se ha reportado en estudios previos como en Tailandia, China, Taiwán, Noruega y el primer reporte en Colombia (1,13,14,21). Como se puede observar en la figura 7, las secuencias tienden a organizarse de acuerdo con el área geográfica en donde fueron identificadas por lo cual los autores denominaban los clados en base a la ubicación, o en el caso de Urbani et al, 2021 (42) de acuerdo con la especie de la que fue aislado el genoma. Giraldo et al, 2020 (1) reporta esta distribución como un patrón geográfico identificado también en otros virus, no obstante, en el caso de CanineCV que cuenta relativamente aún con pocos reportes y sitios reconocidos de circulación tal segregación puede tan solo reflejar el lugar en donde se escogieron los individuos para el

muestreo, ya que al ser secuencias provenientes de animales cercanos muestran una relación filoevolutiva contigua, que se evidencia en la figura 7 y 8.

Respecto a la segregación por especies de cánidos, se observa que la separación de los grupos no se da con base a la especie en la que fue identificada la secuencia, a excepción del clado que comprende las secuencias aisladas en zorros (clado 4). Estudios reportados como los de Arcangeli et al, 2020 (43); Bexton et al, 2015 (44) y Urbani et al, 2021 (13) mostraron una alta prevalencia de CanineCV en zorros, a diferencia de lo que se ha reportado en perros domésticos; esto sugiere que las cepas adaptadas a estos animales pueden tener características de patogenicidad diferentes como mayor transmisibilidad, adhesión a las células hospederas, mayor invasión de células y tejidos, y la capacidad de evadir o sobrevivir al sistema inmunitario (41,42,45,46) comparado con las que se presentan en Cánidos domésticos. Por otra parte, Urbani et al en 2021 (13), con base en los resultados en su estudio de detección de ADN de CanineCV en zorros árticos muestreados entre 1996 y 2001, indican que el virus circuló en zorros árticos al menos quince años antes de su primer descubrimiento en sueros de perros domésticos en Estados Unidos (47), dicho aspecto es soportado en la filogeografía de este trabajo donde se observa un ancestro del virus en perros domésticos desde el año 1871 (1807-1924), es decir, años antes de su identificación inicial en la misma especie. Urbani et al (13) sugieren que los carnívoros salvajes pueden haber albergado un antepasado de CanineCV y de allí haber pasado a individuos domésticos, sin embargo, en la figura 8 se puede observar que la división de linajes se presentó alrededor de 1943 (1910-1968) a partir un ancestro en perros domésticos en Estados Unidos, indicando que el salto de especie se presentó de individuos domésticos a silvestres.

Bajo este contexto hay varios aspectos a tener en consideración. A lo largo de la evolución de los microorganismos infecciosos, ha sido frecuente la transmisión de estos de especies silvestres a domésticas, principalmente por la ocupación de los humanos de nichos ecológicos y la invasión de ecosistemas (37,43). En este caso la filogeografía indica que el salto de especie se presentó de individuos domésticos a especies silvestres, esto podría haberse por la misma razón antes mencionada, por perros de caza o establecimientos humanos (37,43). Sin embargo, es importante indicar que la cantidad de secuencias de perros supera extensamente a la de animales silvestres siendo esto un sesgo propio del análisis ante la falta de suficientes

secuencias de Carnívoros silvestres, por lo cual, los resultados pueden variar en torno a este aspecto, por lo que investigaciones en otros cánidos salvajes podrían evidenciar orígenes diferentes hecho que se ha evidenciado en otros virus como CPV-2 y el virus del distemper canino (CDV) (3,37,43,48).

Respecto a lo identificado en las secuencias de Colombia, la búsqueda en BLAST indicó que las secuencias de CanineCV obtenidas en este estudio mostraron una identidad máxima de nucleótidos del 96,5 - 97% con la cepa de Circovirus canino CanineCV-1367/2016 a diferencia de las cepas identificadas en 2020 que compartían mayor identidad (97,53%) con la cepa Canine circovirus cepa Bari/411-13 (Genbank: KJ530972.1) (1) a pesar de que ambas cepas proceden de Italia, le otorgan a las cepas colombianas una ubicación diferente en el árbol filogenético aunque comparten un porcentaje de identidad con las secuencias entre el 96,3-96,5%, por lo cual, es posible sugerir que la conformación parafilética indica diferentes momentos y ancestros que introdujeron el virus en el país, evidenciándose en el resultado de la filogeografía donde se observa que las secuencias identificadas en el año 2020 (1) muestran un momento de introducción al país en 1997 (1994-2006), mientras que las encontradas en este estudio indican su introducción en 1991 (1979-1999).

En el trabajo realizado por Giraldo et al (1) se propuso que la transmisión de CanineCV desde Europa (Italia) hacia Sudamérica coincidía con la segunda ola migratoria a Ecuador del clado Europa I de CPV-2 desde Italia principios del año 2000. Estos datos permiten proponer que la entrada de CanineCV ocurrió en coinfección con CPV-2 en esta temporada (1,3) lo cual coincide con lo expuesto en el presente trabajo en el que las secuencias identificadas muestran una introducción en Colombia al inicio de la década de dicho año 1991 (1994-2006). Dado el anterior panorama, ambos trabajos demuestran la importancia de continuar con investigaciones sobre CanineCV en vista que la circulación de CanineCV en Colombia parte de diferentes momentos y distinto origen, abre el panorama para realizar nuevas investigaciones con el fin de obtener secuencias de animales ubicados en otras regiones del país y también en animales silvestres.

5. Conclusión

Durante la última década a partir del primer reporte de CanineCV, los estudios han intentado dilucidar los mecanismos epidemiológicos y patogénicos que tiene el virus con el fin de entender cuál es su rol en las enfermedades entéricas en Caninos. Sin embargo, a la fecha permanecen varios conceptos por puntualizar y que con las investigaciones realizadas aún no se logran definir. El presente trabajo, muestra que la frecuencia de CanineCV es elevada en animales con diarrea respecto a lo que se esperaba, sin requerir la coinfección con CPV-2, lo que expone el sub-diagnóstico que existe del virus. Por otra parte, los análisis filogenéticos mostrados aquí, resaltan la necesidad de realizar evaluaciones en especies silvestres y en otras regiones de Colombia, dado que la cantidad de secuencias de perros en esta investigación superó extensamente a la de animales silvestres; por lo que investigaciones en otros cánidos salvajes podrían evidenciar orígenes diferentes. Además, la realización de trabajos en otras regiones y lugares de Colombia pueden dar cuenta de otras cepas circulantes del virus al igual que sus respectivos orígenes.

6. Bibliografía

1. Giraldo-Ramirez S, Rendon-Marin S, Vargas-Bermudez DS, Jaime J, Ruiz-Saenz J. First detection and full genomic analysis of Canine Circovirus in CPV-2 infected dogs in Colombia, South America. *Sci Rep.* 2020 Dec 1;10(1).
2. Faraji R, Sadeghi M, Mozhgani SH, Vasinioti V, Ndiana LA, Desario C, et al. Detection of canine circovirus in dogs infected with canine parvovirus. *Acta Trop.* 2022 Nov 1;235.
3. Faz M, Martínez JS, Gómez LB, Quijano-Hernández I, Fajardo R, Del Ángel-Caraza J. Origin and genetic diversity of canine parvovirus 2c circulating in Mexico. *Arch Virol.* 2019 Feb 1;164(2):371–9.
4. Kapoor A, Dubovi EJ, Henriquez-Rivera JA, Lipkin WI. Complete Genome Sequence of the First Canine Circovirus. *J Virol.* 2012;86(12):7018–7018.
5. Li L, McGraw S, Zhu K, Leutenegger CM, Marks SL, Kubiski S, et al. Circovirus in tissues of dogs with vasculitis and hemorrhage. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(4):534–41.
6. Piewbang C, Jo WK, Puff C, van der Vries E, Kedsangsakonwut S, Rungsipipat A, et al. Novel canine circovirus strains from Thailand: Evidence for genetic recombination. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–9.
7. Hsu HS, Lin TH, Wu HY, Lin LS, Chung CS, Chiou MT, et al. High detection rate of dog circovirus in diarrheal dogs. *BMC Vet Res [Internet].* 2016;12(1):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12917-016-0722-8>
8. Anderson A, Hartmann K, Leutenegger CM, Proksch AL, Mueller RS, Unterer S. Role of canine circovirus in dogs with acute haemorrhagic diarrhoea. *Veterinary Record.* 2017;180(22):1–5.
9. Thaiwong T, Wise AG, Maes RK, Mullaney T, Kiupel M. Canine Circovirus 1 (CaCV-1) and Canine Parvovirus 2 (CPV-2): Recurrent Dual Infections in a Papillon Breeding Colony. *Vet Pathol.* 2016 Nov 1;53(6):1204–9.
10. Kotsias F, Bucafusco D, Nuñez DA, Lago Borisovsky LA, Rodriguez M, Bratanich AC. Genomic characterization of canine circovirus associated with fatal disease in dogs in South America. *PLoS One.* 2018 Aug 1;14(6).
11. Decaro N, Martella V, Desario C, Lanave G, Circella E, Cavalli A, et al. Genomic characterization of a circovirus associated with fatal hemorrhagic enteritis in dog, Italy. *PLoS One.* 2014 Aug 22;9(8).
12. Li L, McGraw S, Zhu K, Leutenegger CM, Marks SL, Kubiski S, et al. Circovirus in tissues of dogs with vasculitis and hemorrhage. *Emerg Infect Dis.* 2013 Apr;19(4):534–41.

13. Urbani L, Tryland M, Ehrlich D, Fuglei E, Battilani M, Balboni A. Ancient origin and genetic segregation of canine circovirus infecting arctic foxes (*Vulpes lagopus*) in Svalbard and red foxes (*Vulpes vulpes*) in Northern Norway. *Transbound Emerg Dis*. 2021 May 1;68(3):1283–93.
14. Hsu HS, Lin TH, Wu HY, Lin LS, Chung CS, Chiou MT, et al. High detection rate of dog circovirus in diarrheal dogs. *BMC Vet Res*. 2016 Jun 17;12(1).
15. Kotsias F, Bucafusco D, Nuñez DA, Lago Borisovsky LA, Rodriguez M, Bratanich AC. Genomic characterization of canine circovirus associated with fatal disease in dogs in South America. *PLoS One*. 2018 Aug 1;14(6).
16. Tuong NM, Piewbang C, Rungsipipat A, Techangamsuwan S. Detection and molecular characterization of two canine circovirus genotypes co-circulating in Vietnam. *Veterinary Quarterly*. 2021;41(1):232–41.
17. Piewbang C, Jo WK, Puff C, Van Der Vries E, Kedsangsakonwut S, Rungsipipat A, et al. Novel canine circovirus strains from Thailand: Evidence for genetic recombination. *Sci Rep*. 2018 Dec 1;8(1).
18. Niu L, Wang Z, Zhao L, Wang Y, Cui X, Shi Y, et al. Detection and molecular characterization of canine circovirus circulating in northeastern China during 2014–2016. *Arch Virol*. 2020 Jan 1;165(1):137–43.
19. Gentil M, Gruber AD, Müller E. Nachweishäufigkeit von Dog circovirus bei gesunden und an Durchfall erkrankten Hunden. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere - Heimtiere*. 2017;45(2):89–94.
20. Anderson A, Hartmann K, Leutenegger CM, Proksch AL, Mueller RS, Unterer S. Role of canine circovirus in dogs with acute haemorrhagic diarrhoea. *Veterinary Record*. 2017 Jun 3;180(22).
21. Tuong NM, Piewbang C, Rungsipipat A, Techangamsuwan S. Detection and molecular characterization of two canine circovirus genotypes co-circulating in Vietnam. *Veterinary Quarterly*. 2021;41(1):232–41.
22. Dowgier G, Lorusso E, Decaro N, Desario C, Mari V, Lucente MS, et al. A molecular survey for selected viral enteropathogens revealed a limited role of Canine circovirus in the development of canine acute gastroenteritis. *Vet Microbiol*. 2017 May 1;204:54–8.
23. Beikpour F, Ndiana LA, Sazmand A, Capozza P, Nemati F, Pellegrini F, et al. Detection and Genomic Characterization of Canine Circovirus in Iran. *Animals*. 2022 Feb 1;12(4).
24. Van Kruiningen HJ, Heishima M, Kerr KM, Garmendia AE, Helal Z, Smyth JA. Canine circoviral hemorrhagic enteritis in a dog in Connecticut. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2019 Sep 1;31(5):732–6.

25. Segalés J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. Vol. 164, *Virus Research*. 2012. p. 10–9.
26. Arumugasami C. Porcine Circovirus 2 [Internet]. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/346220681>
27. Cheung AK. Porcine circovirus: Transcription and DNA replication. Vol. 164, *Virus Research*. 2012. p. 46–53.
28. Ren L, Chen X, Ouyang H. Interactions of porcine circovirus 2 with its hosts. Vol. 52, *Virus Genes*. Springer New York LLC; 2016. p. 437–44.
29. Ge X, Wang F, Guo X, Yang H. Porcine circovirus type 2 and its associated diseases in China. Vol. 164, *Virus Research*. 2012. p. 100–6.
30. Piewbang C, Jo WK, Puff C, van der Vries E, Kesdaangakonwut S, Rungsipipat A, et al. Novel canine circovirus strains from Thailand: Evidence for genetic recombination. *Sci Rep*. 2018 Dec 1;8(1).
31. Thaiwong T, Wise AG, Maes RK, Mullaney T, Kiupel M. Canine Circovirus 1 (CaCV-1) and Canine Parvovirus 2 (CPV-2): Recurrent Dual Infections in a Papillon Breeding Colony. *Vet Pathol*. 2016 Nov 1;53(6):1204–9.
32. Decaro N, Martella V, Desario C, Lanave G, Circella E, Cavalli A, et al. Genomic characterization of a circovirus associated with fatal hemorrhagic enteritis in dog, Italy. *PLoS One*. 2014 Aug 22;9(8).
33. Anderson A, Hartmann K, Leutenegger CM, Proksch AL, Mueller RS, Unterer S. Role of canine circovirus in dogs with acute haemorrhagic diarrhoea. *Veterinary Record*. 2017 Jun 3;180(22).
34. Hao X, Li Y, Chen H, Chen B, Liu R, Wu Y, et al. Canine Circovirus Suppresses the Type I Interferon Response and Protein Expression but Promotes CPV-2 Replication. *Int J Mol Sci*. 2022 Jun 1;23(12).
35. Ellis J, Clark E, Haines D, West K, Krakowka S, Kennedy S, et al. Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. In: *Veterinary Microbiology*. Elsevier; 2004. p. 159–63.
36. Meng XJ. Porcine circovirus type 2 (PCV2): Pathogenesis and interaction with the immune system. *Annu Rev Anim Biosci*. 2013;1:43–64.
37. Zaccaria G, Malatesta D, Scipioni G, Di Felice E, Campolo M, Casaccia C, et al. Circovirus in domestic and wild carnivores: An important opportunistic agent? *Virology*. 2016 Mar 1;490:69–74.
38. Antonia M, Monroy R. Circovirosis porcina en Colombia: Aspectos moleculares y caracterización biológica de cepas de campo. 2014.

39. Rincón Monroy MA, Ramirez-Nieto GC, Vera VJ, Correa JJ, Mogollón-Galvis JD. Detection and molecular characterization of porcine circovirus type 2 from piglets with Porcine Circovirus Associated Diseases in Colombia. *Virology*. 2014 Aug 8;11(1).
40. Ge X, Wang F, Guo X, Yang H. Porcine circovirus type 2 and its associated diseases in China. Vol. 164, *Virus Research*. 2012. p. 100–6.
41. Faz M, Martínez JS, Gómez LB, Quijano-Hernández I, Fajardo R, del Ángel-Caraza J. Origin and genetic diversity of canine parvovirus 2c circulating in Mexico. *Arch Virol*. 2019 Feb 1;164(2):371–9.
42. Urbani L, Tryland M, Ehrich D, Fuglei E, Battilani M, Balboni A. Ancient origin and genetic segregation of canine circovirus infecting arctic foxes (*Vulpes lagopus*) in Svalbard and red foxes (*Vulpes vulpes*) in Northern Norway. *Transbound Emerg Dis*. 2021 May 1;68(3):1283–93.
43. De Arcangeli S, Balboni A, Kaehler E, Urbani L, Verin R, Battilani M. Genomic characterization of canine circovirus detected in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Italy using a new real-time PCR assay. *J Wildl Dis*. 2020 Jan 1;56(1):239–42.
44. Bexton S, Wiersma LC, Getu S, van Run PR, Verjans GMGM, Schipper D, et al. Detection of circovirus in foxes with meningoencephalitis, United Kingdom, 2009–2013. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(7):1205–8.
45. Zaccaria G, Malatesta D, Scipioni G, di Felice E, Campolo M, Casaccia C, et al. Circovirus in domestic and wild carnivores: An important opportunistic agent? *Virology*. 2016 Mar 1;490:69–74.
46. Bexton S, Wiersma LC, Getu S, van Run PR, Verjans GMGM, Schipper D, et al. Detection of circovirus in foxes with meningoencephalitis, United Kingdom, 2009–2013. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(7):1205–8.
47. Kapoor A, Dubovi EJ, Henriquez-Rivera JA, Lipkin WI. Complete Genome Sequence of the First Canine Circovirus. *J Virol*. 2012 Jun 15;86(12):7018–7018.
48. Duque-Valencia J, Forero-Muñoz NR, Díaz FJ, Martins E, Barato P, Ruiz-Saenz J. Phylogenetic evidence of the intercontinental circulation of a Canine distemper virus lineage in the Americas. *Sci Rep*. 2019 Dec 1;9(1).