



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2 EN CHILE

JORGE ANDRÉS NORIEGA ALVARADO

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico
Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

PROFESOR GUIA: DR. SERGIO BUCAREY VIVANCO

SANTIAGO, CHILE
2008



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2 EN CHILE

JORGE ANDRÉS NORIEGA ALVARADO

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico
Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : DR. SERGIO BUCAREY
PROFESOR CONSEJERO : DR. LEONARDO SÁENZ
PROFESOR CONSEJERO : DRA. Ma. ORFELIA CELEDÓN

SANTIAGO, CHILE
2008

Dedicatoria

“...Para mi madre, quien me ha apoyado toda la vida, por su infinito amor, cariño y comprensión. Por soportar estos años lejos de ella, por acompañarme en los buenos y malos momentos. Por incentivarme a que este momento llegara...”

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a mi Director de tesis, Dr. Sergio Bucarey Vivanco por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad, fundamentales para la concreción de este trabajo. Además, quiero agradecer al Dr. Leonardo Sáenz por su colaboración y guía desinteresada. También agradezco la colaboración de la doctora Cecilia Estrada del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) por haber otorgado información primordial para mi proyecto, al Dr. Iñigo Díaz y a la doctora Pamela Ruiz por facilitar muestras para este estudio. Deseo destacar el apoyo y la buena disposición recibida por parte de Paulina Reyes quien fue una pieza clave en esta realización. A mis amigos incondicionales Marlies, Maria José y Gonzalo quienes me acompañaron y fueron testigos de las angustias y satisfacciones de este proceso. Sin la ayuda de estas personas no hubiera podido lograrlo.

Gracias

Este presente trabajo de memoria fue financiado por los proyectos: Bicentenario Banco Mundial-Conicyt PSD2; Iniciación en Investigación de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Chile VID I07/15-2 y el Fondo de Investigación Veterinaria FIV 2007 de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Índice

Agradecimientos	1
Índice	2
Resumen	4
Summary	6
Introducción	8
Revisión Bibliográfica	10
Reseña histórica del circovirus porcino.....	10
Clasificación taxonómica.....	11
Circovirus porcinos.....	12
• Características físico-químicas de los PCVs.....	12
• Características del genoma del PCVs.....	12
Circovirus porcino tipo 2.....	14
• Epidemiología del PCV2.....	14
• Distribución geográfica de PCV2.....	14
• Transmisión del PCV2.....	14
• Rutas de diseminación.....	15
• Inmunidad frente a PCV2.....	16
• Linfopenia y células blanco.....	16
• Infección de células dendríticas por PCV2.....	18
• Patogenicidad del PCV2.....	18

• Detección del PCV2.....	19
• Detección de anticuerpos frente a PCV2.....	20
• Caracterización genotípica.....	21
• Prevención y control.....	22
Hipótesis.....	25
Objetivo general y específico.....	25
Materiales y Métodos.....	26
Resultados.....	34
Discusión.....	46
Conclusiones.....	51
Bibliografía.....	52
Anexos.....	69

Resumen

El circovirus porcino tipo 2 (PCV2, del Inglés *Porcine Circovirus Type 2*) pertenece a la familia *circoviridae*, la cual está constituida por virus pequeños y sin envoltura, con un genoma de ADN circular de hebra simple. El genoma de PCV2 codifica en forma divergente para dos marcos de lectura abiertos (ORFs, del Inglés *Open Reading Frames*) involucrados en la formación de la cápside (*cap*) y el complejo de replicación viral. Este virus es considerado el agente etiológico principal de una enfermedad emergente en nuestro país, denominada Síndrome del Desmedro Multisistémico Postdestete (PMWS, del Inglés *Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome*) en cerdos, el cual se caracteriza por generar una inmunosupresión severa, con pérdida progresiva de peso y deterioro general de la condición corpórea, lo que acompañado por una serie de infecciones concomitantes, llevan a la muerte prematura del animal, con las consecuentes pérdidas económicas en los países productores.

Si bien es un síndrome ampliamente distribuido en el mundo y muy común en todos los planteles productores de cerdos, la presencia de PCV2 en Chile no ha sido del todo demostrada. El objetivo de esta memoria de título fue detectar la presencia de circovirus porcino tipo 2 en Chile y caracterizar su genotipo.

La detección del virus se realizó por medio de PCR desde muestras de linfonodos inguinales superficiales de cerdos con signología PMWS, pertenecientes a 3 planteles porcinos de la zona central de Chile, analizándose al menos 5 casos por plantel.

El gen *orf2* del virus fue detectado en el 100 % de las muestras analizadas, tanto por PCR simple como por PCR semi-cuantitativo. Por otra parte, con el fin de realizar una caracterización genotípica del virus, el gen *orf2* fue sometido a un análisis de la longitud de los polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP, del inglés *restriction fragment length polymorphism*), no encontrándose diversidad genética, intra- e inter-planteles, entre las muestras analizadas, las cuales presentaron un patrón RFLP igual a un clon europeo usado como control.

Posteriormente se realizó la secuenciación nucleotídica en ambos sentidos, tras el clonamiento, de cuatro secuencias aisladas de los diferentes predios. Las secuencias presentaron un 94% de identidad nucleotídica entre si y su análisis filogenético las agrupó en un clado específico, junto con aislados suecos y algunos aislados chinos. Además, este análisis junto a revisión bibliográfica reciente, permitió diferenciar las secuencias en dos subgrupos o subgenotipos del virus, 1 y 2. De esta manera fue posible concluir que el circovirus porcino tipo 2 esta presente en nuestro país y que las cepas analizadas corresponden al subgrupo 1, presentando una estrecha relación con genotipos de origen Europeo.

Summary

Porcine Circovirus pig type 2 belong to the family circoviridae, constituted by small virus without envelope, with a simple circular strand DNA genome, which codifies in divergent form for two open reading frames (ORFs) involved in the capsid formation (Cap) and the viral replication complex. This virus is considered the mayor the etiologic agent of an emergent disease in our country, denominated Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome, PMWS, in pigs, which is characterized to generate a severe immunosuppression, with a progressive weight loss and general decline in the fitness condition, which is accompanied by a series of concomitant infections, with the premature death of the animal, and the consequent economic losses in the pig-producing countries. Although it is a syndrome wide world distributed and very common in all the pig-producing establishments, the presence of PCV2 in Chile has not absolutely been demonstrated. The goal of this thesis was to detect the presence of porcine circovirus type 2 in Chile and to characterize its genotype.

The detection of the virus was performed by PCR from lymph nodes samples of PMWS-pigs, bellowing to 3 pig- producing establishments from the central zone of Chile, analyzing 5 cases per establishment at least. The *orf2* gene virus was detected in 100% of the analyzed samples, by simplex PCR and by semi-quantitative PCR. On the other hand, in order to perform the virus genotypic characterization, the *orf2* gene amplified was analyzed by RFLP, not founding genetic diversity among the analyzed samples intra- and inter-establishments; which presented the same RFLP pattern than european isolated clone used as ingroup.

The nucleotide sequenciation, after cloning, was performed in both strand in four isolated sequences from different pig-producing establishment. The sequences presented a 94% of nucleotidic identity each other. The phylogenetic analysis clustered them in specific clade, near to some swedish and chinese isolated. This analysis, together to recent bibliographical revision, allowed to differentiate the sequences in two sub-groups, 1 and 2. Taken together these results shows that porcine circovirus type 2 is present in

our country and that the analyzed isolated correspond to sub-group 1, presenting a near relation with european isolated.

Introducción

El circovirus porcino tipo 2 (PCV2, del inglés *porcine circovirus type 2*), es el agente etiológico principal de una enfermedad emergente en cerdos, llamada síndrome de desgaste multisistémico posdestete (PMWS, del inglés *Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome*). Además, ha sido asociado a una amplia gama de patologías porcinas, como el síndrome de dermatitis y nefropatía porcina (PDNS, del inglés *Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome*), falla reproductiva, complejo respiratorio porcino (PRDC, del inglés *Porcine Respiratory Disease Complex*), neumonía proliferativa y necrotizante (PNP, del inglés *Proliferative and Necrotizing Pneumonia*) y tremor congénito tipo AII (CT-AII, del inglés *Congenital Tremors-AII*). Por otra parte, el PCV2 es capaz de potenciar diversas enfermedades causadas por otros agentes como el síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS, del inglés *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome*) y la fiebre clásica porcina (FCP), entre otras. En conjunto estas patologías están agrupadas como enfermedades asociadas a circovirus (PCVAD, del inglés *Porcine Circoviruses Associated Diseases*).

El circovirus porcino tipo 2 se encuentra ampliamente difundido a nivel mundial, y es el responsable de grandes pérdidas económicas para la industria porcina. La detección de nuevos casos ha ido rápidamente creciendo desde su descubrimiento en Canadá en el año 1991, abarcando prácticamente todos los continentes. Desde entonces, numerosos estudios se han realizado para determinar la secuencia nucleotídica de su genoma, describiéndose hasta la fecha una amplia variedad de subgenotipos distintos.

Actualmente, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) tiene identificada la presencia del virus en Chile por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa* (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*), abriendo la posibilidad de que el PCV2 esté presente en gran parte de los plantales porcinos de nuestro país. Por este motivo, el

aislar y caracterizar el genoma de PCV2 en Chile, permitirá obtener datos epidemiológicos relevantes para evaluar la factibilidad de la introducción de una vacuna contra PCV2 o la necesidad de generar una auto-vacuna nacional contra este patógeno.

*Comunicación personal: Dra. Patricia Avalos Moreno. Jefa Departamento Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias. SAG.

Revisión Bibliográfica

1. Reseña histórica del circovirus porcino

El circovirus porcino (PCV, del Inglés *porcine circovirus*) fue descrito por primera vez por investigadores Alemanes en el año 1974 como un virus contaminante de la línea celular de riñón de cerdo PK-15 (ATCC-CCL33) (Tischer *et al.*, 1974). Esta línea celular se encontraba infectada por dos virus distintos, uno similar a un *picornavirus* que fue denominado *picornavirus-like*, y otro morfológicamente parecido a un *papovirus* (*papovirus-like*). El *picornavirus-like* se aislaba sistemáticamente de los subcultivos de todas las líneas PK-15 y siempre estaba presente en grandes cantidades en cada pasaje de células que se realizaba. Al contrario, la cantidad de *papovirus-like* disminuía en cada pasaje que se realizaba en la línea celular PK-15; durante los primeros 40 pasajes se detectaba el virus, pero en los siguientes pasajes se aislaba en muy baja cantidad o bien desaparecía. El origen de ambos virus era desconocido, y ninguno de los dos producía efecto citopático sobre esta línea celular. El *picornavirus-like* se definió inicialmente como un virus RNA, con un diámetro de 17 nm, gradiente de densidad de 1,37g/cm³ en cloruro de cesio (CsCl) y termoestable. Estudios posteriores revelaron que se trataba de un pequeño virus DNA de hebra simple y circular, sin envoltura, icosaédrico y con un diámetro de 17 nm (Tischer *et al.*, 1982). Estos investigadores observaron que este virus no había sido descrito previamente y fue denominado circovirus porcino (PCV).

Posteriormente, se realizaron estudios epidemiológicos y de patogenicidad del PCV, demostrándose que los cerdos presentaban anticuerpos circulantes contra este virus sin presentar ninguna enfermedad. También se realizaron estudios serológicos para detectar anticuerpos contra PCV en conejos, vacas y en la especie humana que resultaron negativos, por lo que se sugirió que el agente era originario de los cerdos y aparentemente no había traspasado la barrera inter-especie (Tischer *et al.*, 1982).

En el año 1997 el PCV fue asociado a una enfermedad que afectaba a cerdos de transición conocida como síndrome multisistémico de adelgazamiento postdestete (PMWS, del Inglés *Postweaning multisystemic wasting syndrome*) (Clark, 1997). Esta

enfermedad era ya conocida desde 1991 en Canadá, pero se consideraba de etiología desconocida (Harding, 1996; Clark 1997; Harding y Clark 1997; Harding *et al.*, 1998). Los síntomas observados eran pérdida de peso, palidez corporal, alteraciones respiratorias y, en algunos casos, diarrea e ictericia. Las lesiones más frecuentemente observadas eran neumonía intersticial y linfadenopatía generalizada, especialmente en los nódulos linfáticos inguinales superficiales. Otras lesiones que se observan con menor frecuencia son hepatitis, nefritis y pancreatitis no supurativas (Harding, 1996; Clark 1997; Harding y Clark 1997; Harding *et al.*, 1998; Rosell *et al.*, 1999). En los tejidos lesionados se observaba sistemáticamente una gran cantidad de antígeno y ácido nucléico de PCV (Clark, 1997; Rosell *et al.*, 1999).

El PCV estaba clasificado por el Comité Internacional Taxonómico de Virus (ICTV) en una nueva familia de virus, la familia *Circoviridae* (Lukert *et al.*, 1995). Estudios posteriores de secuenciación genómica demostraron que el PCV presente en cerdos afectados con PMWS era diferente al PCV que afectaba persistentemente la línea celular PK-15 (Hamel *et al.*, 1998; Meehan *et al.*, 1998). Por ello se sugirió la denominación de PCV tipo 1 (PCV1) para el circovirus de la línea celular PK-15, considerado apatógeno, y PCV tipo 2 (PCV2) para el circovirus asociado a PMWS (Allan *et al.*, 1998; Meehan *et al.*, 1998). Por ello, en adelante se utilizará la nomenclatura PCV1 y PCV2 para designar a los dos agentes virales.

2. Clasificación taxonómica

Los circovirus porcinos (PCVs) pertenecen a la familia *Circoviridae*, la cual está dividida en dos géneros, *Gyrovirus* y *Circovirus*. El género *Circovirus* contiene el PCV1, PCV2, el virus de la enfermedad del pico y de las plumas de las psitácidas (BFDV, del Inglés *Beak and Feather Disease Virus*) (Bassami *et al.*, 1998; Niegro *et al.*, 1998), el circovirus de la paloma (PiCV, del Inglés *Pigeon Circovirus* o CoCV, del Inglés *Columbid Circovirus*) (Mankertz *et al.*, 2000), el circovirus del ganso (GCV, del inglés *Goose Circovirus*) (Todd *et al.*, 2001), el circovirus del canario (CaCV, del Inglés

Canary Circovirus) (Phenix *et al.*, 2001) y el circovirus de gaviotas (GuCV, del Inglés *Gull Circovirus*) (Jestin *et al.*, 2001). Al género *Gyrovirus* pertenece el virus de la anemia del pollo (CAV, del Inglés *Chicken Anemia Virus*) (Todd *et al.*, 1990).

3. Circovirus Porcinos (PCVs)

3.1. Características físico-químicas de los PCVs

Los circovirus porcinos son un diverso grupo de pequeños virus de DNA circular de hebra simple, simetría icosaédrica, sin envoltura, de aproximadamente 17 nm de diámetro y de 1,7 kb (Tischer *et al.*, 1982). Estos virus tienen una longitud de cadena de 1759 a 1768 nucleótidos (nt) (Meehan *et al.*, 1997; Hamel *et al.*, 1998), un peso molecular de $36 \pm 2,3$ kDa, una densidad de sedimentación en CsCl entre 1,33 y 1,37 g/cm³ y un coeficiente de sedimentación de 52S (Tisher *et al.*, 1974). Según datos referidos a PCV1 indican que se trata de un virus resistente a la inactivación por cloroformo, al pH ácido y termoestable a 70 °C durante 15 minutos (Allan *et al.*, 1994).

3.2. Características del genoma del PCV2

Estudios de secuenciación indican que el genoma del PCV2 contiene 1767-1768 nt (Hamel *et al.*, 1998; Meehan *et al.*, 1998; Mankertz *et al.*, 2000). Además, se ha descrito más de un 94% de similitud para los PCV2, aislados tanto desde cerdos enfermos como sanos, alrededor del mundo (Mehhan *et al.*, 1998; Mankertz *et al.*, 2000; Larochele *et al.*, 2002). Sin embargo, al comparar las secuencias genómicas de aislados de PCV2 con respecto a PCV1, se muestra sobre un 80% de identidad entre ambos tipos de circovirus. El genoma de los circovirus se caracteriza por tener una región que codifica proteínas o marcos de lectura abiertos (ORFs, del Inglés *Open Reading Frames*) y una región con secuencias de nucleótidos que no codifican

proteínas pero que pueden regular la transcripción y replicación del virus (Hamel *et al.*, 1998). Se han potencialmente descrito 6 ORFs con más de 200 nucleótidos para el genoma de PCV2 (Hamel *et al.*, 1998; Meehan *et al.*, 1998), pero las proteínas esenciales para la replicación y para la conformación estructural del virus parecen ser expresadas principalmente por ORF1 y ORF2 respectivamente, siendo éstos fragmentos los más estudiados y caracterizados (Segalés *et al.*, 2005). La proteína de la cápside viral (*Cap*) es codificada tras un proceso de “splicing” por la hebra complementaria del ORF2 (Cheung, 2002). Como es de esperar en una proteína estructural de virus, el ORF2 presenta las más altas tasas de variación de todos los aislados de PCV caracterizados hasta la fecha (Hamel *et al.*, 1999). Por otra parte, el ORF1 codifica para una proteína esencial para la replicación viral (*RepP*), la cual es transcrita en sentido inverso al ORF2 (Cheung, 2002). Al comparar las semejanzas de las secuencias de ORF1 de PCV1 y PCV2, se ha demostrado un 83% de homología entre sus nucleótidos y un 86% en la secuencias aminoacídicas predichas de sus proteínas. Por otra parte, se describe que la similitud en las secuencias de ORF2 entre PCV1 y PCV2 presenta un 67% de homología para los nucleótidos y un 65% en la secuencias aminoacídicas predichas de sus proteínas (Mankertz *et al.*, 2000). Las diferencias entre los genomas de PCV1 y PCV2 serían, aparentemente, la causa de la diferencia en virulencia entre PCV1 y PCV2 (Hamel *et al.*, 1998). Recientemente, un tercer gen viral llamado ORF3 ha sido descrito y caracterizado. Las proteínas de ORF3 parecen ser altamente conservadas entre cepas de PCV2 presentando más de un 95% de identidad a nivel de sus aminoácidos (Liu *et al.*, 2005). Poco se conoce respecto a la significancia del resto de los pequeños ORFs.

4. Circovirus Porcino Tipo 2 (PCV2)

4.1. Epidemiología de PCV2

4.1.1. Distribución geográfica de PCV2

PCV2 es considerado un virus ubicuo, presente en países en donde se han descrito o no enfermedades asociadas al circovirus porcino (PCVDs, del Inglés, *Porcine Circovirus Diseases*) (Allan y Ellis, 2000).

Hasta la fecha, la infección por PCV2 ha sido informada en Norte América, Europa (España, Francia, Reino Unido, Bélgica, Irlanda), Latino América, Asia y África (Allan y Ellis, 2000). Estudios retrospectivos mostraron que el PCV2 ha estado presente en Europa desde 1969 y en Canadá desde 1985. Las infecciones con PCV2 han sido prevalentes en porcinos domésticos en todo el mundo desde algunas décadas y comúnmente el virus está endémicamente presente en todos los países con industria porcina intensiva (Nauwynck *et al.*, 2007).

4.1.2. Transmisión del PCV2

Estudios experimentales, a la fecha, sugieren que el PCV2 es de transmisión horizontal, por contacto directo, siendo considerada la vía oro-nasal la ruta más frecuente de infección entre animales infectados y susceptibles (Segalés *et al.*, 2005). En granjas comerciales, la mayoría de los cerdos seroconvierten al PCV2 entre los 2 y 4 meses de edad (Larochelle *et al.*, 2003), indicando que la transmisión horizontal del PCV2 entre cerdos es muy eficiente y ha sido demostrada bajo condiciones experimentales en donde se pone en contacto a cerdos susceptibles con cerdos infectados (Albina *et al.*, 2001; Bolin *et al.*, 2001).

Las rutas de inoculación del PCV2 tanto intranasal como subcutánea han sido usadas en intentos de reproducir experimentalmente el PMWS (Pogranichniy *et al.*, 2000; Bolin *et al.*, 2001).

La transmisión transplacentaria del PCV2 ha sido recientemente demostrada mediante el seguimiento de infecciones experimentales intranasales en cerdos (Park *et al.*, 2005), indicando que la transmisión vertical de PCV2 es factible. Sin embargo, la frecuencia de estas alteraciones reproductivas bajo condiciones de campo es aparentemente variable, siendo raramente reportadas en Europa (Pensaert *et al.*, 2004; Maldonado *et al.*, 2005), pero en Corea en cambio, se han descrito infecciones por PCV2 en aproximadamente un 13% de los fetos abortados y nacidos muertos (Kim *et al.*, 2004).

Experimentalmente, se ha detectado excreción de PCV2 en semen de verracos previamente inoculados con PCV2. No obstante, se desconoce si las cantidades de PCV2 presente en semen pueden realmente producir la infección de las cerdas, ya sea por monta natural o por inseminación artificial (Larochelle *et al.*, 2000), sin embargo, estas vías de infección deben ser consideradas como potenciales rutas de diseminación.

4.1.3. Rutas de diseminación

El PCV2 puede ser detectado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras de la cavidad nasal, tonsilas, secreciones bronquiales, heces y orina (Calsamiglia *et al.*, 2004) tanto en cerdos afectados como libres de PMWS, pero la carga viral del virus en las secreciones es mucho mayor en cerdos afectados con PMWS (Calsamiglia *et al.*, 2004). El virus puede ser aislado o detectado por PCR desde la cavidad nasal, rectal, vías urinarias, saliva, secreciones oculares y tonsilares (Krakowka *et al.*, 2000; Bolin *et al.*, 2001; Shibata *et al.*, 2003). Sin embargo, aunque se sabe que el PCV2 puede ser detectado en la cavidad nasal y en la tonsila de cerdos cursando PMWS por Hibridación *In situ* (HIS), no se ha probado definitivamente si la carga viral obtenida por estas vías corresponde a excreción viral o si es debida a la presencia del virus en el ambiente, el cual alcanza esta localización (Segalés *et al.*, 2004).

4.2. Inmunidad frente a PCV2

Desde un punto de vista experimental, la seroconversión ocurre entre los 14 y 28 días post-infección (PI), no exhibiendo diferencias entre cerdos afectados subclínicamente con PCV2 y cerdos cursando con PMWS (Krakowka *et al.*, 2000; Pogranichniy *et al.*, 2000; Resendes *et al.*, 2001). Estudios de campo han demostrado que la seroconversión es usualmente detectada entre las 7 y 12 semanas de edad, como máximo hasta las 28 semanas. Aunque la respuesta humoral ocurra, un porcentaje variable de cerdos seropositivos pueden permanecer virémicos, sugiriendo que los anticuerpos detectados por la técnica de inmunoperoxidasa en monocapa de células (IPMA, del Inglés *Inmunoperoxidase Monolayer Assay*) o por el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, del Inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) no son protectivos (Rodríguez-Arrijoja *et al.*, 2002).

Algunos estudios han demostrado cambios significativos en las subpoblaciones de células sanguíneas periféricas como las células mononucleares de cerdos enfermos. En un estudio realizado en cerdos afectados con PMWS, se demostró un incremento de los monocitos circulantes, reducción de las células T (principalmente CD4⁺) y de los linfocitos B y presencia de granulocitos inmaduros en baja densidad comparado con un cerdo clínicamente sano, no infectado por PCV2 (Nielsen *et al.*, 2001; Segalés *et al.*, 2001). En conclusión, estos resultados sugieren una incapacidad de cerdos severamente infectados con PCV2 para desarrollar una respuesta inmune efectiva.

4.2.1. Linfopenia y células blanco

Aunque hay certeza de que los síntomas clínicos se relacionan con desórdenes inmunopatológicos, los cerdos pueden ser asintómicamente infectados. Algunos de los signos como la linfopenia sólo pueden evidenciarse en animales desarrollando PMWS. Sin embargo, los animales que logran sobrevivir a la infección por PCV2 desarrollan inmunidad contra el virus (McCullough *et al.*, 2007).

La linfopenia asociada a cerdos desarrollando enfermedades asociadas al circovirus porcino tipo 2 (PCVD) como PMWS, es detectable antes del comienzo de

los síntomas clínicos (Nielsen *et al.*, 2003; Shibahara *et al.*, 2000). La linfopenia se manifiesta principalmente en los linfocitos B, seguido de los linfocitos T, pero estos linfocitos (B y T) raramente cargan el antígeno viral. Análisis *in vivo* han demostrado que el PCV2 infecta con mayor frecuencia a células monocíticas (monocitos, macrófagos y células dendríticas). Además, de esta asociación persistente con las células dendríticas mielomonocíticas, los antígenos de PCV2 pueden ser ocasionalmente encontrados en células endoteliales, células epiteliales y, como se mencionó anteriormente, en linfocitos (Darwich *et al.*, 2004). Mientras que la infección *in utero* puede llevar a la acumulación de antígenos virales en los cardiomiocitos (Sanchez *et al.*, 2003).

La infección del virus en los linfocitos no se observa en todos los animales analizados y se manifiesta de manera transitoria ya que el virus desaparece de los linfocitos a medida que el cerdo crece. Ésta pérdida de la antígeno-positividad de los linfocitos se puede deber a la linfopenia resultado de la remoción de células positivas al virus. En contraste, todos los animales infectados por PCV2, muestran antígenos virales en macrófagos y células dendríticas, los cuales aparentemente permanecen viables resultando una asociación persistente de estas células con el virus (Darwich *et al.*, 2004). Análisis *in vitro* han confirmado la predilección del PCV2 por las células mielomonocíticas. Es más, estas células pueden albergar al antígeno viral por prolongados periodos, mientras que los linfocitos en un mismo cultivo permanecen sin infección. Además, el virus no aparenta replicar en las células dendríticas (Vincent *et al.*, 2003; Gilpin *et al.*, 2003). Entonces surge la pregunta de donde debería replicarse el virus para producir suficiente antígeno para mantener la alta carga viral encontrada en los macrófagos y células dendríticas. La respuesta se encuentra en estudios realizados *in vitro* en los cuales el PCV2 va a infectar y replicarse en células del endotelio y epitelio intestinal de los cerdos, particularmente cuando éstas células están cursando con algún tipo de respuesta inflamatoria local (Steiner *et al.*, 2007). La influencia de señales secundarias como la presencia de co-infecciones, inmunoestimulación o inmunosupresión, resultan esenciales para afectar la

inmunocompetitividad de los linfocitos ante una infección por PCV2 (Allan *et al.*, 2004; Segalés *et al.*, 2005; Ellis *et al.*, 2004; Ellis *et al.*, 1999).

4.2.2. Infección de células dendríticas por PCV2

Las células dendríticas (CD) son las células presentadoras de antígeno más potentes del sistema inmune y tienen un rol muy importante en la inmunidad protectora contra infecciones virales (Banchereau y Steinman, 1998). Como se dijo anteriormente, el PCV2 es un virus que tiene tropismo por las células dendríticas, sin embargo no induce la muerte celular de éstas, ni la de los linfocitos co-cultivados con células dendríticas infectadas, por lo que no existe evidencia de transmisión del virus desde las CD infectadas a los linfocitos, incluso cuando éstos están activados (Vincent *et al.*, 2003).

4.3. Patogenicidad del PCV2

El PCV2 ha sido asociado a un gran número de enfermedades y síndromes en cerdos, siendo el responsable de causar PMWS en cerdos (Allan y Ellis, 2000). En el año 1996 se reportó una asociación del PCV2 con neumonía intersticial y linfadenopatía en cerdos de 6 semanas de California, concluyendo que este virus era el agente etiológico de estos síndromes (Daft *et al.*, 1996). Además, el PCV2 ha sido asociado a otras patologías como son el Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina (PDNS) (Rosell *et al.*, 2000), Fallas reproductivas (West *et al.*, 1999; Ohlinger *et al.*, 2000), Neumonía Proliferativa Necrotizante (PNP) (Pesch *et al.*, 2000) y Tremor Congénito Tipo A-2 (CT-AII) (Stevenson *et al.*, 2001).

4.4. Detección de PCV2

Inmunohistoquímica (IH)

La IH es una técnica utilizada para detectar el antígeno de PCV2 en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina (Rosell *et al.*, 1999; Allan y Ellis, 2000). Además es una prueba de alta sensibilidad (incluso más que HIS), específica, económica, rápida y sencilla (McNeilly *et al.*, 1999).

Hibridación *in situ* (HIS)

La HIS es una técnica utilizada para detectar el antígeno de PCV2 sobre secciones de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, mediante el empleo de una secuencia de DNA complementaria a la secuencia del genoma de PCV2 (Rosell *et al.*, 1999; Choi y Chae, 1999), permitiendo así, detectar la ubicación del ácido nucleico dentro de la célula y su distribución en los tejidos, además, permite correlacionar las lesiones microscópicas observadas con la presencia de PCV2 (Rosell *et al.*, 2000).

IFI

Esta técnica detecta el antígeno viral en cultivos celulares mediante el uso de anticuerpos monoclonales y policlonales (Allan *et al.*, 1999). Se caracteriza por ser una técnica altamente específica, sensible, económica y sencilla (Rosell *et al.*, 1999).

PCR

Para el diagnóstico del virus se ha utilizado ampliamente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual resulta ser muy útil para la detección de rutina ya que permite detectar de manera rápida la presencia del ácido nucleico viral con alta sensibilidad y especificidad (Hamel *et al.*, 1999), además permite cuantificar la presencia del genoma viral (Liu *et al.*, 2000). Mediante la técnica de PCR es posible detectar el PCV2 a partir de muestras de tejido y secreciones orgánicas (Hamel *et al.*, 2000).

Los genomas detectados por medio de PCR también pueden ser secuenciados y, como se mencionó anteriormente, mediante la utilización de la técnica de polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP, del Inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*), es posible la caracterización y clasificación de cada PCV estudiado (Morozov *et al.*, 1998; Hamel *et al.*, 1999; Hamel *et al.*, 2000; Mankertz *et al.*, 2000).

Aislamiento viral

La línea celular de riñón de cerdo PK-15 es la más utilizada para el aislamiento de PCV2, aunque también es posible su replicación en otras líneas de origen porcino como son las diversas líneas celulares de riñón de cerdo (RPS, SK o IBR-S2), células de testículo de cerdo (ST) y línea celular Vero (células de riñón de mono) (Tischer *et al.*, 1982).

Microscopía electrónica

Esta técnica permite diagnosticar el PCV2 por la observación de partículas víricas compatibles morfológicamente mediante inmunotinción (Mankertz *et al.*, 2000). Además, es posible detectar la locación ultraestructural específica dentro de las células, principalmente en el citoplasma de los macrófagos, como partículas de un diámetro de 17nm aproximadamente, electrodensas, de forma redondeada a ovoide, con márgenes irregulares (Ellis *et al.*, 1998; Mankertz *et al.*, 2000).

4.5. Detección de anticuerpos frente a PCV2

La detección de anticuerpos de PCV2 se puede realizar mediante diversas técnicas como son la técnica de IPMA, IFI y ELISA. Para la técnica de ELISA se utilizan proteínas de la cápside del virus (producto del ORF2) como sustrato específico, un cultivo celular con PCV2 y un anticuerpo monoclonal específico el cual actúa como agente competitivo específico (Balasch *et al.*, 1999; Nawagitgul *et al.*, 2002).

4.6. Caracterización genotípica del PCV2

El PCV2 puede ser categorizado en diferentes genotipos de acuerdo a su secuencia nucleotídica y según el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, del inglés *restriction fragment length polymorphism*) de su genoma, siendo una herramienta útil para la caracterización de los distintos aislados de PCV (Hamel *et al.*, 1999). Estudios previos indican que las variaciones genéticas del PCV2 deberían estar asociadas al origen geográfico más que con el tropismo celular o virulencia (Wen *et al.*, 2005).

Desde la primera secuencia de PCV2 descrita por Hamel *et al.* (1999), hasta Septiembre del 2007, se han publicado aproximadamente 60 genotipos distintos de PCV2 en *GenBank*, los cuales han sido aislados en distintos países y continentes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Recientemente, en China se realizó un estudio en donde se analizaron muestras de tejido de cerdos de distintas granjas, la presencia de PCV2 fue detectada por PCR en un 59.9% de las muestras analizadas (de diferentes regiones geográficas del país), estas se sometieron posteriormente a análisis RFLP, distinguiéndose 9 patrones genéticos distintos del marco de lectura ORF2. El análisis filogenético de estos genotipos muestra que el PCV2 de mayor prevalencia en China comprende tres grupos diferentes (Wen *et al.*, 2005). Un estudio de similares características fue realizado ante un brote de PMWS en Croacia en cuatro pequeños criaderos de cerdos, reportándose 4 secuencias del genoma de PCV2 originadas de los aislados de campo (2099-M, 2099-1, 2099-2 y 2099-3). La región que codifica para la cápside (ORF2) fue secuenciada, ya que es la más adecuada para la tipificación genética por ser la más variable dentro del genoma del PCV2, el análisis filogenético de esos cuatro aislados los agrupó en un origen común, el cual está estrechamente relacionado con los genotipos de los aislados en Nueva Zelanda, Francia, China, UK y Eslovenia publicadas en *GenBank* (Jemersic *et al.*, 2004).

Por otra parte, en Hungría, los genomas de PCV2 aislados desde cerdos salvajes fueron divididos en 7 grupos (WB-H1-7), tres de los cuales tenían un genoma de 1767 bp y los cuatro restantes 1768 bp de longitud. El análisis filogenético de las secuencias originó distintos tipos de árboles filogenéticos dependiendo de la fuente usada para la comparación. Interesantemente, el segmento *rep* (ORF1) se mantiene similar entre los distintos grupos, mientras que al comparar el segmento *cap* (ORF2) se revelan diferencias entre los grupos, sugiriendo la posibilidad de recombinación genómica entre distintos genotipos de PCV2 (Cságola *et al.*, 2005).

4.7. Prevención y control

Debido a que la infección por PCV2 es ubicua y no se describen tratamientos específicos contra éste síndrome, la prevención juega un rol esencial para controlar la infección. Entre las PCVDs, el PMWS es la enfermedad con el mayor impacto económico en producción porcina. Como se definió anteriormente, ésta es una enfermedad multifactorial en la que es necesaria la infección de los cerdos con PCV2, pero, además, la influencia de factores infecciosos y no infecciosos que actúen como gatillantes para el desarrollo de la forma clínica del síndrome. Por consiguiente, las medidas de control efectivas contra el PMWS se han centrado principalmente en el entendimiento de los co-factores que afectan a cada granja en particular y en el control y erradicación de éstos (Segalés *et al.*, 2005).

Estudios llevados a cabo en Francia desde 1998 han demostrado que las condiciones ambientales son necesarias, en asociación con PCV2, para la expresión clínica de la enfermedad (Madec *et al.*, 2000). A su vez, los circovirus porcinos son altamente resistentes a la inactivación con detergentes y desinfectantes comunes, haciendo difícil la descontaminación de los predios infectados, si es que no imposible (Allan y Ellis, 2000). Es interesante destacar que el primer brote de PCV2 relacionado a PMWS descrito en Canadá, ocurrió en un predio de cerdos libres de patógenos (SPF, del Inglés *Specific Pathogen Free*) y con altas medidas de bioseguridad (Ellis *et al.*, 1998; Harding, 1996; Harding *et al.*, 1998). La implementación de lo que hoy en día es

conocido como el plan de 20 pasos de Madec, (lista de medidas de manejo que buscan disminuir el impacto de la enfermedad) ha disminuido significativamente el porcentaje de mortalidad en granjas severamente afectadas (Madec *et al.*, 2001). Estas medidas fueron designadas para reducir la presión de infección en relación al PCV2 y otras infecciones, a través de medidas de higiene y de reducción del estrés en las diferentes etapas de producción (Madec *et al.*, 2000; Madec y Waddilove, 2002).

En los últimos años se han elaborado distintas vacunas que ayudan a la prevención de la infección por PCV2. Actualmente, en EEUU, Canadá y Europa, se están ensayando 4 vacunas (*Ingelvac* de Boehringer; *Suvaxyn* de Fort Dodge; *Circovac* de Merial y una de Intervet, sin nombre). Éstas están basadas en quimeras de versiones atenuadas del virus completo o subunidades proteicas recombinantes que involucran tanto a la proteína de la cápside (ORF2) como a la proteína que participa en la replicación viral (ORF1). En todos los casos se ha logrado la protección de lotes de cerdos vacunados aunque los resultados no son totalmente concluyentes. En Europa por ejemplo, la vacuna más usada actualmente es *Circovac* (virus atenuado), disponible bajo licencia provisional y está empezando a exportarse al Reino Unido bajo un certificado de importación especial. En EEUU se está usando *Ingelvac*, la cual ha probado disminuir la mortalidad de los cerdos por PCV2 significativamente. En la mayoría de los casos se ha observado un aumento en la tasa de crecimiento y una disminución en la tasa de mortalidad debido a la estimulación del sistema inmune adaptativo y el traspaso de grandes niveles de anticuerpos maternos a los lechones (Burch, 2007).

Aparentemente, una buena bioseguridad no asegura estar libre de las enfermedades asociadas al PCV2. Un diagnóstico rápido, la pronta remoción de los animales enfermos de las granjas y buenas prácticas de manejo serían las únicas medidas para controlar las pérdidas atribuidas a la infección por PCV2 (Allan y Ellis, 2000). Por otra parte, como se señaló anteriormente, las variaciones genéticas que presenta el PCV2 estarían asociadas principalmente a un origen geográfico, dando paso a una gran diversidad de subgrupos específicos según la región donde se encuentre,

pudiendo determinar, esta diversidad, distintas características antigénicas y de patogenicidad, las cuales se traducirían en diferencias en la presentación de PMWS y patologías asociadas. Por este motivo, sería de gran utilidad determinar la variante de PCV2 presente en Chile mediante la caracterización genotípica, para así poder tomar las medidas adecuadas de inmunización y prevención contra esta amenaza emergente.

Hipótesis

La aplicación de un ensayo de PCR-RFLP para PCV2 a partir de muestras de cerdos con signología PMWS de distintos planteles, permitirá detectar y caracterizar genótipicamente el virus presente en Chile.

Objetivo General

Detectar y genotipificar el genoma de PCV2 desde muestras provenientes de cerdos de distintos planteles en Chile.

Objetivos Específicos

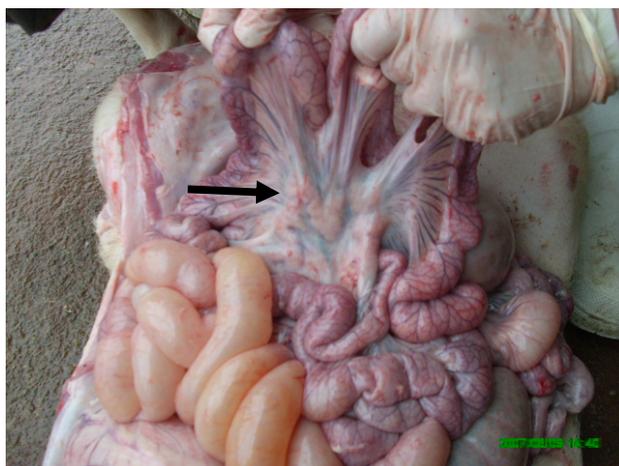
- Detectar por PCR el gen *cap* usando como templado el DNA genómico extraído desde ganglios y/o suero de cerdos con signología PMWS, de distintos planteles Chilenos.
- Genotipificar el gen *cap* amplificado, por medio de RFLP.
- Secuenciar los genotipos más comúnmente aislados en el estudio.
- Comparar filogenéticamente las secuencias obtenidas con las disponibles en bases de datos.

Materiales y Métodos

Recolección de muestras:

Se seleccionaron cerdos que presentaban signología compatible con PMWS provenientes de 3 predios de la zona central de Chile: A, B y C. Se recolectaron muestras de 5 animales por cada plantel. Los cerdos fueron sometidos a necropsia con el fin de hallar lesiones que nos confirmaran que estábamos ante un caso de PMWS, tales como: canal caquética y pálida, linfonodosb periféricos pálidos y aumentados de tamaño, principalmente los inguinales y mesentéricos (fig.1), ascitis, congestión hepática, estómago e intestino sin comida, pero llenos de líquido, edemas en mesenterio y úlceras gástricas, aunque estas últimas no se presentan en todos los casos. A cada individuo se le extrajeron los ganglios inguinales superficiales. Una vez obtenidas las muestras estas fueron colocadas en tubos con etanol 95% y guardadas en el laboratorio a -20°C hasta su utilización.

A)



B)



Fig.1: Necropsia realizada a un cerdo con signología clínica compatible con PMWS. En el panel A, la flecha indica los ganglios mesentéricos aumentados de tamaño. En el panel B, se puede observar el aumento de tamaño del ganglio inguinal superficial (flecha).

Extracción de DNA:

Se extrajeron 20 a 30 mg de tejido ganglio inguinal superficial de cerdo y fueron colocados en tubos Eppendorf de 1,5 ml a los cuales se les agregó 800 μ l de tampón de lisis de DNA (50 mM Tris ácido clorhídrico pH8, 50 mM ácido etileno diamino tetraacético (EDTA, del inglés *Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*) y 400 mM cloruro de sodio (NaCl), luego se adicionaron 100 μ l de dodecil sulfato de sodio (SDS, del inglés *Sulfate Dodecil Sodio*) 10% y 20 μ l de proteinasa K 20 mg/ml. Se agitaron en el vortex por 10 segundos, luego se realizó una digestión a 70°C por 3 horas agitando cada 20 minutos. Posteriormente, el producto o muestra se mezcló 3 veces con 500 μ l de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó durante 10 minutos a 15000 x g. Luego de centrifugar se extrajo la fase acuosa (600 μ l), se

depositó en otro tubo Eppendorf y luego se precipitó el DNA adicionando 60 µl de acetato de sodio 3M pH 5,2 y 360 µl de isopropanol. Se mantuvo a -20°C entre 1 y 16 horas, luego se centrifugó a 15000 x g por 30 minutos y posteriormente se lavó el sedimento con etanol al 70%. El sedimento se resuspendió en 50 ml de agua libre de nucleasas.

La integridad del DNA se monitoreó en geles de agarosa al 0,8 o 1% en solución de amortiguador TAE (Tris, Acetato, EDTA) y se calculó su concentración midiendo la absorvancia (abs) a 260 nm de acuerdo a la siguiente fórmula:

DNA (µg/ml) = (abs 260) x (factor de dilución) x (50 µg DNA/ml)/(1 unidad de abs 260).

La pureza fue estimada de acuerdo a la razón de absorvancia 260 /280 nm (Maniatis *et al.*, 1982).

PCR:

Los partidores que se usaron para la detección de PCV2 amplificaron el marco de lectura *orf2* completo. Estos partidores fueron diseñados con el programa DS Gene 1.1 Trial, de acuerdo a las secuencias publicadas por el NCBI (del inglés *National Center for Biotechnology Information*), y su secuencia fue la siguiente:

5'-CCCAAGCTTCGATGACGTACCCAAGGAGGCG-3' para cap F ("forward").

5'-CGGGGTACCTTATGGTTTAAGTGGGGGGTC-3' para cap R ("reverse").

Al final, la longitud de los productos amplificados fue de 700 pares de bases. La amplificación por PCR fue efectuada en presencia de 2 µl de MgCl₂ 50 mM, 10 µl tampón de PCR 10X, 81 µl de agua libre de nucleasas, 2 µl de DNA, 2 µl de desoxinucleósido trifosfato 10 mM (dNTP, del inglés *deoxynucleoside triphosphate*) 10 mM, 1µl de partidor F 10 pmoles /µl ("forward") y 1 µl de partidor R 10 pmoles /µl ("reverse") y 1 µl de la enzima Taq polimerasa 5U/µl (Invitrogen®). El protocolo de la

reacción de amplificación fue el siguiente: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de -desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineamiento de los partidores a 48°C por 1 minuto y polimerización a 72°C por 1 minuto- y un ciclo de extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos del PCR fueron separados por electroforesis horizontal en gel de agarosa en solución tampón TBE (del inglés *Tris base*, *Boric acid* y *EDTA*) 1% (Maniatis *et al.*, 1982); teñidos con bromuro de etidio y visualizados sobre transiluminador UV, donde fueron fotografiados con una cámara *Samsung digimax 370* de 3.2 mega pixels.

Paralelamente, para obtener mayor información de la presencia de PCV2 en los cerdos infectados, se realizaron las siguientes técnicas:

- a) **PCR múltiple semicuantitativo.** Para esta técnica se realizó la amplificación en forma simultánea de *orf2* y un fragmento interno del gen de β -actina de *Sus scrofa*, como estándar interno. Con esta reacción se procedió a determinar, en forma aproximada, la carga viral de PCV2 en 5 individuos pertenecientes al plantel C. La secuencia de los partidores empleados para amplificar un fragmento el gen de actina fue la siguiente:

5'-GGTGCTGTGGGTGTATAGGTAC-3' β -act F ("forward").

5'-TGAGGTAGTCGGTCAGGTCC-3' β -act R ("reverse").

La longitud de los productos amplificados fue de 700 pares de bases para *orf2* y 400 pb para el fragmento interno del gen de β -actina. Ésta reacción fue efectuada en presencia de 1 μ l de ambos partidores F 10 pmoles/ μ l (para *orf 2* y β -actina) y 1 μ l de ambos partidores R 10 pmoles/ μ l (para *orf 2* y β -actina), junto a 2 μ l de MgCl₂ 50 mM, 10 μ l de tampón de PCR 10X, 81 μ l de agua libre de nucleasas, 2 μ l de DNA templado, 2 μ l de dNTP 10 mM, y 1 μ l de la enzima Taq polimerasa 5U/ μ l (Invitrogen®). El protocolo de la reacción de amplificación fue el siguiente: Desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 20

ciclos de desnaturalización 94°C por 1 minuto, alineamiento de los partidores a 47°C por 1 minuto, polimerización a 72°C por 1 minuto, y un ciclo de extensión final a 72°C por 10 minutos. Los 20 ciclos de amplificación fueron escogidos en base a una estandarización previa probando diferentes números de ciclos de amplificación (10, 15, 20 y 30 ciclos). Los productos del PCR fueron separados por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% en solución de tampón TBE; teñidos con bromuro de etidio y visualizados sobre transiluminador UV.

- a) **Dilución límite de PCV2.** La concentración inicial de DNA de PCV2 (genotipo N1), clonado en un vector plasmidial, fue medida mediante espectrofotometría UV. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas 1:10 del DNA inicial en agua libre de nucleasas y suero fetal bovino. Posteriormente, las diluciones fueron sometidas al protocolo de PCR para amplificación de *orf2*, utilizando los partidores y protocolos anteriormente señalados, con la diferencia que se emplearon sólo 20 ciclos de desnaturalización/renaturación térmica.

RFLP:

Los sitios de restricción dentro del gen *orf2* de PCV2 fueron examinados en detalle usando el programa *Vector NTI* en base a la secuencia nucleotídica del aislado N1 de PCV2, el cual esta disponible en nuestro laboratorio. Las enzimas de restricción que se usaron en este estudio fueron escogidas en base a polimorfismos descritos para *orf2*. Los productos amplificados por PCR para cada muestra fueron sujetos a digestión según el siguiente protocolo: 15 µl de cada producto de PCR fue digerido en un volumen final de 20 µl, con 1 µl de cada endonucleasa (MboI y MseI).

Después de una incubación de 4 horas a 37°C los productos digeridos fueron analizados por electroforesis en geles de acrilamida-urea 8% (Maniatis *et al.*, 1982).

Genotipado y secuenciación nucleotídica:

Después de haber obtenido por RFLP los perfiles de banda, éstos se analizaron desarrollando matrices binarias en base a presencia o ausencia de bandas polimórficas obtenidas de cada muestra. Posteriormente, algunos aislados fueron secuenciados, utilizando el secuenciador automático marca ABI modelo Pris 3100 (servicio solicitado a la facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Católica).

Para la purificación y aislamiento del DNA, previo a su secuenciación, se emplearon los siguientes métodos:

- a) **Purificación de banda desde geles de agarosa y secuenciación directa.** La purificación de DNA desde gel se llevo a cabo con el kit Ultra Clean™ 15 DNA Purification de MO BIO® bajo las recomendaciones del fabricante. Una vez obtenidos los fragmentos aislados de *orf2*, de 700 pb, éstos fueron visualizados en gel de agarosa TBE 0,8 % para calcular en forma aproximada su concentración. El producto, posteriormente, fue sometido a secuenciación directa, sin embargo, el resultado de la reacción de secuenciación no abarcó todo el marco de lectura del gen *orf2*.
- b) **Reamplificación del producto por PCR con partidores internos.** Consiste en una variante del PCR convencional que comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de partidores en cada una, con el fin de incrementar la sensibilidad de detección y por lo tanto de la reacción de secuenciación. Primero, se realizó una reacción con los partidores externos con el fin de amplificar una región más externa de *orf2*. Después, con este producto de amplificación, se ejecuta la reacción de secuenciación con los partidores internos para aumentar la eficiencia de la reacción. Los partidores utilizados fueron los siguientes:

5'-ATGACGTACCCAAGGAGGCGTTACC-3' CAPNEST F ("forward").

5'-TTATGGTTTAAGTGGGGGGTCTTTA-3' CAPNEST R ("reverse").

Con esta técnica, el resultado de la reacción de secuenciación no abarcó todo el marco de lectura del gen *orf2*.

- c) **Clonamiento de *orf2* en el vector pTopo.** Para esta técnica se debió ligar los productos de PCR de *orf2* al vector pTopo, para lo cual a un tubo Eppendorf de 1ml se le agregaron 4 μ l de amplificado más 1 μ l de *Salt Solution*, 0,5 μ l de agua sin nucleasas, 0,5 μ l de vector pTopo y se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente. Con la mezcla de ligación resultante se transformo, por medio de quimio-transformación, la cepa *Escherichia coli* DH5 α . Para lo esto se mezclaron 200 μ l de células quimiocompetentes (tratadas con CaCl₂) con 10 μ l de la mezcla de ligación diluida 1:10, el producto obtenido se incubó en hielo por 45 minutos y luego se le dio un pulso de 42°C por 60 segundos, inmediatamente se puso en hielo por 30 segundos. Enseguida, se agregó 1 ml de caldo Luria (10 gr. de Triptona, 5 gr. de levadura y 5 gr. de NaCl) y se incubó a 37°C por 60 minutos, con agitación, para conseguir expresión fenotípica. Luego se recolectaron 200 μ l de cultivo y se sembraron en placas de Agar Luria (10 gr. de Triptona, 5 gr. de levadura, 5 gr. de NaCl y 15 gr. de Agar) con Ampicilina 100 μ g/ml, y se incubaron 37°C por 24 hrs. Una vez crecidas las colonias transformadas, éstas se trasladaron a 3 ml de caldo de cultivo con ampicilina y se incubaron a 37°C con agitación por toda la noche. Posteriormente, se procedió a purificar el plasmidio recombinante desde las bacterias utilizando el kit AxyPrepTM Plasmid Miniprep de Axygen®. Una vez obtenidos los plasmidios, se procedió a determinar, por PCR, cual contenía insertado el gen *orf2*.

Los clones que contenían el gen insertado, fueron posteriormente secuenciados en ambos sentidos de replicación, de esta forma, se abarcó con éxito todo el marco de lectura del gen *orf2*.

Comparación filogenética:

Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas, éstas se compararon según su grado de divergencia con las secuencias del gen *cap* (ORF2) presentes en bases de datos publicadas por la NCBI (*del inglés, National Center for Biotechnology Information*), esto se realizó a través del programa *Vector NTI*, bajo el algoritmo de máxima parsimonia, utilizando como *outgroup* la secuencia de *orf2* de PCV1.

Resultados

1. Determinación de la dilución límite de PCV2 que permite la amplificación de *orf2* por PCR:

Con el fin de establecer el límite de detección de la técnica de PCR, se empleó DNA de PCV2 perteneciente un aislado control (N1), el cual se encuentra clonado en un vector plasmidial. Se efectuaron diluciones seriadas del DNA plasmidial de PCV2 en agua libre de nucleasas. El primer paso, consistió en la determinación mediante espectrofotometría UV la concentración inicial de DNA utilizado como templado, ésta correspondió a una concentración de 20 µg/ml. La visualización de los productos de amplificación, en el gel de Agarosa TBE 1X, rebeló distintas intensidades de la banda, correspondiente a *orf2* (700 pb) (Fig.2). Estas diferencias de intensidad de banda, son función de las distintas concentraciones a las cuales fue diluido el genoma de PCV2 templado, alcanzándose en algunos segmentos una función lineal entre la densidad de banda obtenida y la dilución del genoma. La dilución límite, la cual corresponde a la mayor dilución de templado que presentó amplificación, fue 10^{-6} , la cual representa a una concentración 20 pg/ml de DNA plasmidial, lo que equivale aproximadamente a 60 copias de genoma de PCV2. Estos resultados fueron similares, tanto para las muestras diluidas en agua libre de nucleasas (Fig.2), como para las diluidas en suero fetal bovino (dato no mostrado).

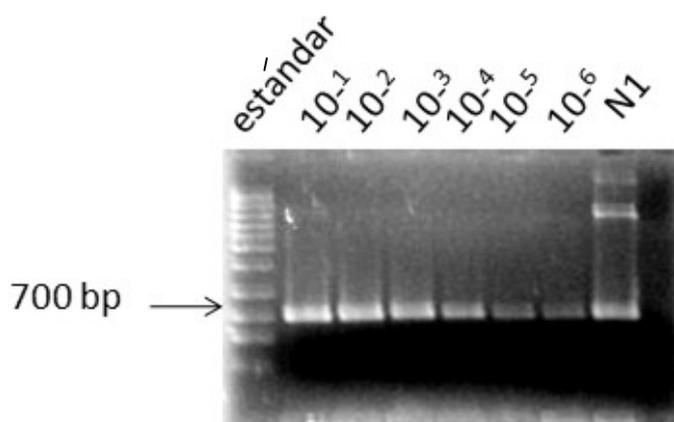


Fig. 2. Límite de detección por PCR del gen *orf2*. Gel de Agarosa 1 % TBE, donde se visualiza la dilución límite del clon plasmidial N1 de PCV2, capaz de ser detectada por la técnica de PCR. Los fragmentos amplificados corresponden a un tamaño esperado de 700 pb.
*Nota: En el control sin diluir (N1) se observa la amplificación de *orf2* y una amplificación inespecífica.*

1.1. Amplificación por PCR del gen *cap* desde muestras de cerdos con signología PMWS

De todas las muestras provenientes de las necropsias de cerdos con signología PMWS, de tres planteles distintos (A, B y C), el 100% de las muestras resultaron positivas a PCV2 por la técnica de PCR (Fig.3). Éstas amplificaron una banda esperada de 700 pb, con distintas intensidades.

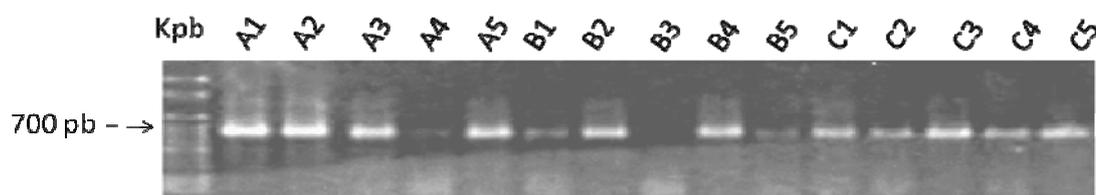


Fig.3. Amplificación por PCR del gen *orf2* desde muestras problema. Las muestras corresponden a ganglios provenientes de cerdos con signología PMWS. La banda de 700 pb corresponde al segmento *orf2*. Gel de Agarosa 1 % TBE.

1.2. Determinación aproximada de la carga de PCV2 por PCR semicuantitativo de *orf2*:

Con el fin de estandarizar la técnica de detección de PCV2 y para determinar en forma aproximada la carga viral presente en cada individuo, se realizó el montaje de un PCR semicuantitativo, amplificando en forma simultanea el gen *orf2* de PCV2 y el gen de actina de *Sus scrofa*, este último usado como control interno de amplificación. Los resultados arrojados por los cerdos analizados, pertenecientes al plantel C (Fig.4), muestran que además de ser detectado el virus, se encuentran diferencias notables en la carga viral entre individuos del mismo plantel, lo cual es evidenciado por las distintas

intensidades de bandas, con respecto al gen de β -actina, que presentaban los cerdos infectados.

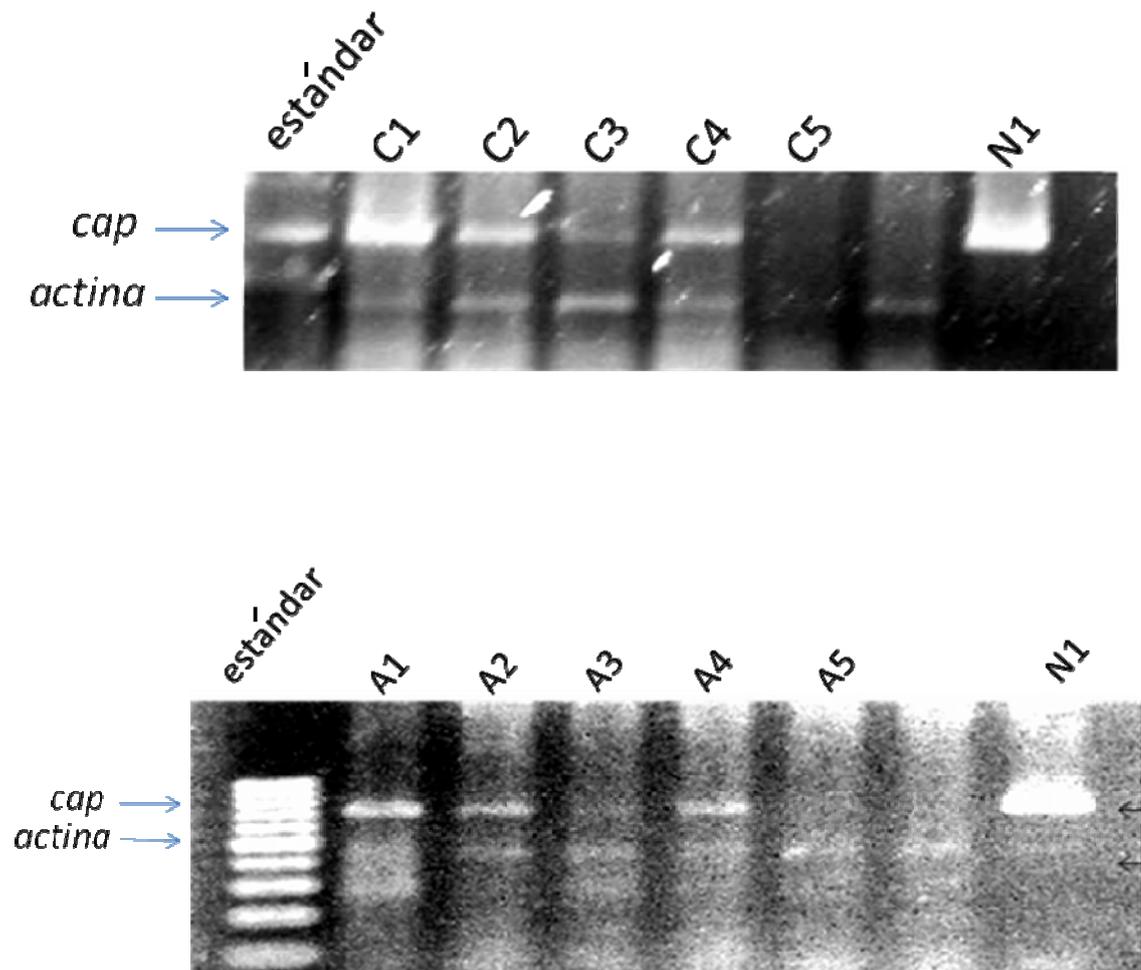


Fig.4. PCR semicuantitativo. Gel de Agarosa 1 % TBE 1X. Análisis realizado a cerdos pertenecientes al plantel C (arriba) y al plantel A (abajo). El carril 1(c) presenta una mayor carga viral. La banda de 400 pb corresponde a un fragmento interno del gen de β -actina, utilizado como estándar interno.

2. Genotipificación del gen *cap* por medio de RFLP:

Para determinar el genotipo de los distintos clones de PCV2 encontrados en los tres predios analizados, el gen *orf2* (*cap*) fue amplificado por PCR desde ganglios y posteriormente el producto fue digerido con las enzimas de restricción de corte frecuente, MboI y MseI. Los fragmentos de restricción esperados corresponden a: 62 pb, 267 pb y 433 pb para la endonucleasa MboI; y 6 pb, 15 pb, 75 pb, 227 pb y 369 pb para la endonucleasa MseI (Fig. 5).

El patrón de largos de los fragmentos de restricción obtenidos, fueron idénticos en las 15 muestras analizadas, no observándose diferencias en los patrones de banda con respecto al aislado control (genotipo N1, usado como control) en ninguno de los individuos analizados (Fig. 6).

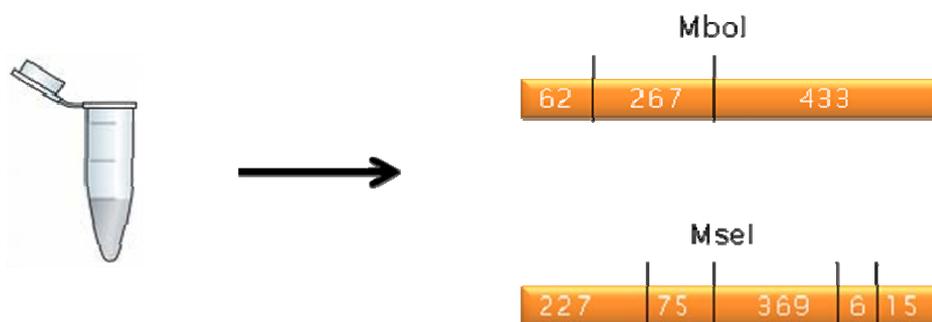


Fig.5. Esquema representativo de los cortes efectuados a *orf2* por las enzimas de restricción: MboI y MseI. A) La enzima de restricción MboI corta a *orf2* en 2 sitios, dando origen a 3 fragmentos de 433pb, 267pb y 62pb respectivamente. B) La enzima de restricción MseI corta a *orf2* en 4 sitios distintos, dando origen a 5 fragmentos de 369pb, 227pb, 75pb, 15pb y 6pb respectivamente.

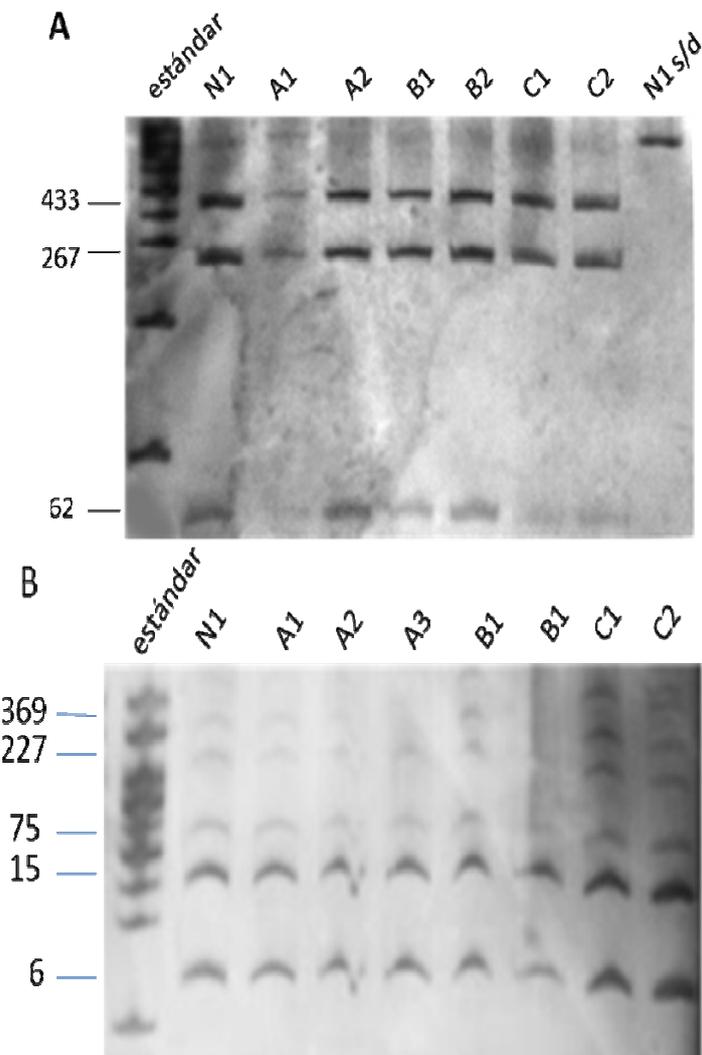


Fig.6. Geles RFLP Geles representativos de acrilamida-urea donde se visualizan los fragmentos de *orf2* generados por las enzimas de restricción MboI (panel A) y MseI (panel B). Los individuos analizados presentan el mismo patrón de restricción que el aislado control (N1).

Nota: En el panel B los tamaños de los fragmentos de corte esperados no se corresponden con el peso molecular estándar.

3. Secuenciación nucleotídica de algunos clones aislados en el estudio:

De acuerdo al análisis RFLP, los clones obtenidos no presentaron patrones distintos entre ellos, ni tampoco con el genotipo control N1. Con este resultado, posteriormente se procedió a clonar y secuenciar 4 productos de PCR escogidos al azar desde los tres planteles muestreados. Las secuencias fueron analizadas y editadas para posteriormente publicarlas en la base de datos de *GenBank*, bajo los siguientes números de acceso EU750909, EU519224, EU519223,(fig.7).

Plantel A

Clon I2

```
gene 1..702
/gene="cap"
CDS 1..702
/gene="cap"
/note="orf2"
/codon_start=1
/product="capsid protein"
/protein_id="ACE77633"
/translation="MTYPRRPYLRLDETPPLAAILGQILRRRPWLVHPRHRYRWRKNG
IFNTRLRSRTFGYTIKRTTVKTPSWAVDMMRFNINDFLPPGGGSNPRSVPFEYYRIRKV
KVEFWPCSPITQGDRGVGSSAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRHTITQSFSYHSR
YFTP KPADSTIDYFQPNNKRNQLWLR LQTAGNV DHVGLGTAFENSIYDQEYNIRVTMY
VQFREFNLKDPPLKP"
```

ORIGIN

```
1 atgacgtacc caaggaggcc ttacctgcca gacgagacac cgcccctcgc agccatctta
61 ggccagatcc tccgcccgcg cccctggctc gtccaccccc gccaccgta ccgctggaga
121 aggaaaaatg gcatcttcaa caccgcctc tcccgcacct tcggatatac tatcaagcga
181 accacagtca aaacgcctc ctggcggtg gacatgatga gattcaatat taatgacttt
241 cttccccag gagggggctc aaacccccgc tctgtgcctt ttgaatacta cagaataaga
301 aaggttaagg ttgaattctg gccctgctcc ccgatcacc agggtgacag gggagtgggc
361 tccagtgctg ttattctaga tgataacttt gtaacaaagg ccacagcctt cacctatgac
421 ccctatgtaa actactcctc ccgccatacc ataaccagc ccttctccta cactcccgc
481 tactttaccc ccaaacctgc agattccact attgattact tccaacaaaa caacaaaaga
541 aatcagctgt ggctgagact acaaactgct ggaaatgtag accacgtagg cctcggcact
601 gcattcgaaa acagtatata cgaccaggaa tacaatatcc gtgtaacat gtatgtacaa
661 ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaaaccat aa
```

Plantel B

Clon I

[gene](#) 1..702

/gene="cap"

[CDS](#) 1..702

/gene="cap"

/note="Cap; orf2"

/codon_start=1

/product="capsid protein"

/protein_id="[ACB12408.1](#)"

/db_xref="GI:170284202"

/translation="MTYPRRLKSRDTAPAAILARSSAAAPGLVHPRHRYRWRKNGI
FNTRLRSRTFGYTIKRTTVKTPSWAVDMMRFNINDFLPPGGGSNPRSVPFEYYRIRKVK
VEFWPCSPITQGDRGVGSSAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRHTITQPFSYHSRY
FTPKPVLDSTIDYFQPNNKRNQLWLRLQTAGNVDHVGLGTAFENSIYDQEYNIRVTMY
VQFREFNLKDPPLKP"

ORIGIN

```
1 atgacgtacc caaggaggcg tttaaagagt agagacaccg cccccgcagc catcttggcc
61 agatcctccg ccgccgcccc tggctctcgtc cccccccgcc accggtaccg ctggagaagg
121 aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccttcg gatatactat caagcgaacc
181 acagtcaaaa cgccctcctg ggcgggtggac atgatgagat tcaatattaa tgactttctt
241 ccccaggag ggggctcaaa cccccgctct gtgccctttg aatactacag aataagaaag
301 gttaagggtg aattctggcc ctgctccccg atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc
361 agtgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca cagccctcac ctatgacccc
421 tatgtaaact actcctcccg ccataccata acccagcct tctcctacca ctcccgtac
481 tttaccccc aacctgtcct agattccact attgattact tccaaccaa caacaaaaga
541 aatcagctgt ggctgagact acaaactgct ggaaatgtag accacgtagg cctcggcact
601 gcattcgaaa acagtatata cgaccaggaa tacaatatcc gtgtaacat gtatgtacaa
661 ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaaaccat aa
```

Plantel C

Clon 1

[gene](#) 1..705

/gene="cap"

[CDS](#) 1..705

/gene="cap"

/note="Cap; orf2"

/codon_start=1

/product="capsid protein"

/protein_id="[ACB12409.1](#)"

/db_xref="GI:170284204"

translation="MTYPRRRYTERDTAPAAISGQILRRRPLLLVHPRHRYRWRKNG
IFNTRLRSRTFGYTIKRTTVKTPSWAVDMMRFNINDFLPPGGGSNPRSVPFEYYRIRKV
KVEFWPCSPITQGDRGVGSSAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRHTITQPFSYHSR
YFTPKPVLDSTIDYFQPNNKRNQLWLRLQTAGNVDHVGLGTAFENSIYDQEYNIRVTM
YVQFREFNLKDPPLNH

ORIGIN

```

1   atgacgtatc caaggaggcg ttacacggag agagacaccg cccccgcagc catctctggc
61  cagatcctcc gccgccgccc cttgttgctc gtccaccccc gccaccgtta ccgctggaga
121 aggaaaaatg gcatcttcaa cccccgcctc tcccgcacct tcggatatac tatcaagcga
181 accacagtca aaacgccttc ctggggcgtg gacatgatga gattcaatat taatgacttt
241 cttccccccag gaggggggctc aaacccccgc tctgtgcctt ttgaatacta cagaataaga
301 aaggттаagg ttgaattctg gccctgctcc ccgatcacc agggtgacag gggagtgggc
361 tccagtgctg ttatactaga tgataacttt gtaacaaagg ccacagccct cacctatgac
421 ccctatgtaa actactcctc ccgccatacc ataaccagc ccttctccta cactcccgc
481 tactttacc ccaaacctgt cctagattcc actattgatt actccaacc aaacaacaaa
541 agaaatcagc tgtggctgag actacaaact gctggaaatg tagaccacgt aggccttggc
601 actgcgttcg aaaacagtat atacgaccag gaatacaata tccgtgtaac catgtatgta
661 caattcagag aatttaatct taaagacccc cacttaacc attaa

```

Fig. 7: Las secuencias corresponde a secuencias nucleotídicas obtenidas, más la secuencia aminoacídica predicha, de 3 individuos provenientes de los 3 planteles analizados.

Como se mostró en la figura 4, al determinar la carga de PCV2 por PCR semicuantitativo de *orf2*, el carril C1 (clon C) fue el que presentó la mayor intensidad de la banda de 700 pb entre de los individuos analizados en el plantel C, y entre otros planteles. Por esta razón, posteriormente, se procedió a clonar y secuenciar los productos de PCR del clon C (Fig.8). La secuencia fue analizada y editada para posteriormente publicarlas en la base de datos de *GenBank* , bajo el siguientes número se acceso EU186062 (fig.7).

Plantel C

Clon C

```

CDS           1..>702
/codon_start=1
/product="capsid protein"
/protein_id="ABW72700.1"
/db_xref="GI:158536324"
/translation="MTYPRRRYRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLVHPRHRYRWRKNGI
FNTRLSRTFGYTIKRTTVKTPSWAVDMMRFNINAFLLPPGGGSNPRSVPFYYRIRKVK
VEFWPCSPITQDGRGVGSSAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRHTITQPFSYHSRY
FTPKPVLVDSTIDYFQPNNKRNQLWLRQLQTAGNVDHVGLGTAFENSIYEKEYNIRVTME
VNQRINLEKDPPLKPL"

```

ORIGIN

```

1   atgacgtacc caaggaggcg ttaccggaga agaagacacc gcccccgag ccatcttggc
61  cagatcctcc gccgcccgcc ctggctcgtc ccccccgcc accgttaccg ctggagaagg
121 aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccttcg gatatactat caagcgaacc
181 acagtcaaaa cgccctcctg ggcgggtggac atgatgagat tcaatataa tgcttttctt
241 ccccaggag  ggggctcaaa cccccgctct gtgccctttg aatactacag aataagaaag
301 gttaaggttg aattctggcc ctgctccccg atcaccagg  gtgacagggg agtgggctcc
361 agtgctgtta tactagatga taactttgta acaaaggcca cagccctcac ctatgacccc
421 tatgtaaact actcctcccg ccataccata acccagccct tctcctacca ctcccgtac
481 ttaccacca aacctgtcct agattccact attgattact tccaaccaa caacaaaaga
541 aatcagctgt ggctgagact acaaactgct ggaaatgtag accacgtagg ccttggcact
601 gcgttcgaaa acagtatata cgagaaggaa tacaatatcc gtgtaacat  ggaagtcaat
661 cagagaatta atctagaaaa agacccccca cttaaaccat ta

```

Fig.8: Las secuencias corresponden a secuencias nucleotídicas obtenidas, más la secuencia aminoácídica predicha, del individuo que presentó la mayor carga viral, correspondiente al plantel C.

4. Análisis nucleotídico de la secuencias obtenidas

Al alinear las secuencias obtenidas al programa *Vector NTI*, se determinó que presentan un 94 % de identidad nucleotídica entre sí. Paralelamente, el análisis filogenético de las secuencias obtenidas, realizado programa *Cluster W*, las agrupó en un clado específico, junto con aislados Suecos y algunos aislados Chinos. Además, este análisis, junto a revisión bibliográfica reciente, permitió diferenciar las secuencias en dos subgrupos o subgenotipos de PCV2 (1 y 2). De esta manera, fue posible concluir que las cepas nacionales analizadas corresponden al subgrupo 1, presentando una estrecha relación con genotipos de origen Europeo.

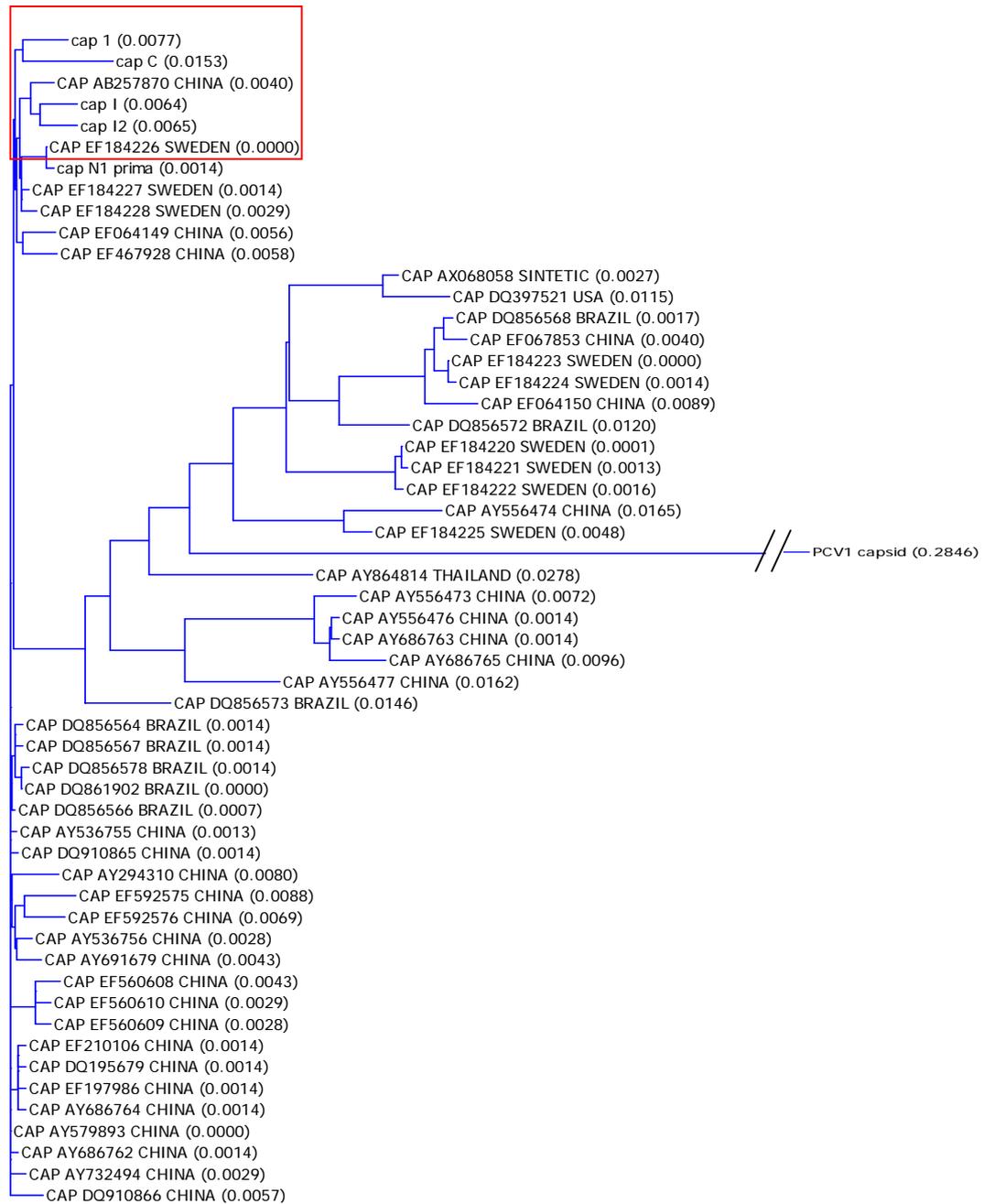


Fig.9. Árbol filogenético en donde se observa el grado de divergencia genética que existe entre las secuencias nacionales y otras secuencias publicados en *GenBank*. En el recuadro rojo se destacan las cuatro secuencias aisladas en Chile. El gen *orf2* de PCV-1 fue usado como *outgroup*,

Al analizar las secuencias ingresadas al programa *Cluster W*, fue posible establecer la distribución de la frecuencia de polimorfismos, los cuales se localizan principalmente entre los nucleótidos 250-300 y 400-450 (gráfico 1). Por otra parte, el alineamiento de las secuencias aminoacídicas predichas del gen *orf2* provenientes de los distintos aislados de PCV2 publicados en *GenBank*, incluyendo los aislados nacionales (Anexo 3), presentó una identidad de 95% con respecto a la secuencia consenso. Los aislados nacionales presentan la mayor divergencia en una región específica del extremo N-terminal de la proteína, localizada entre los residuos aminoacídicos 10 y 20.

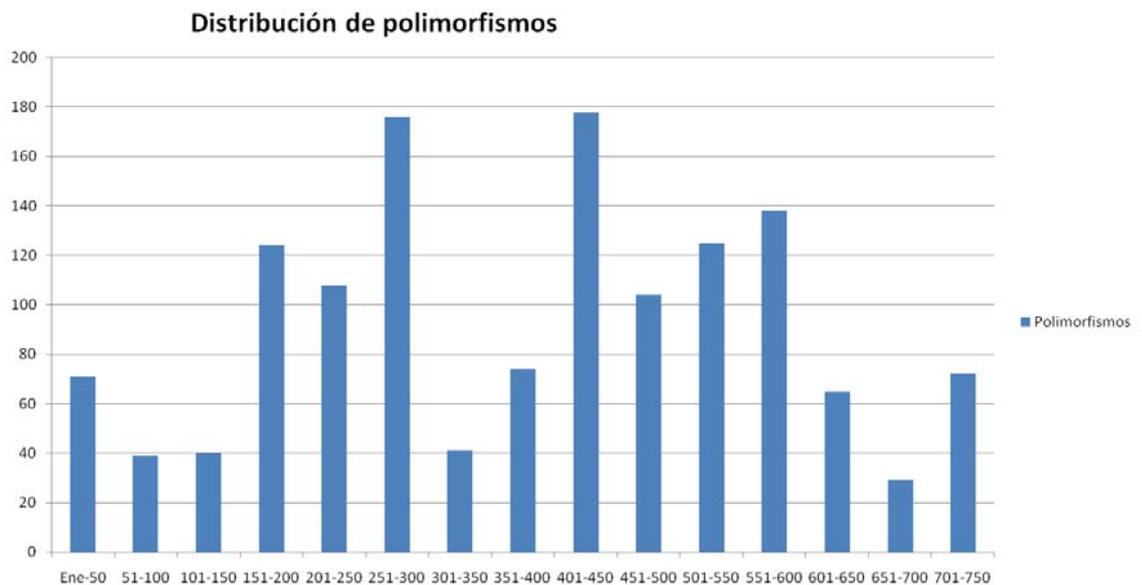


Gráfico 1. La secuencia nucleotídica del gen *orf2* de cada aislado fue dividida arbitrariamente en segmentos de 50 pb, en cada uno de los cuales se registro el número de secuencias que presentaron polimorfismos. Se puede observar que la mayor frecuencia de los polimorfismos entre 80 secuencias analizadas se localiza a nivel de los 250-300 y 400-450 pb del gen *orf2* de PCV-2.

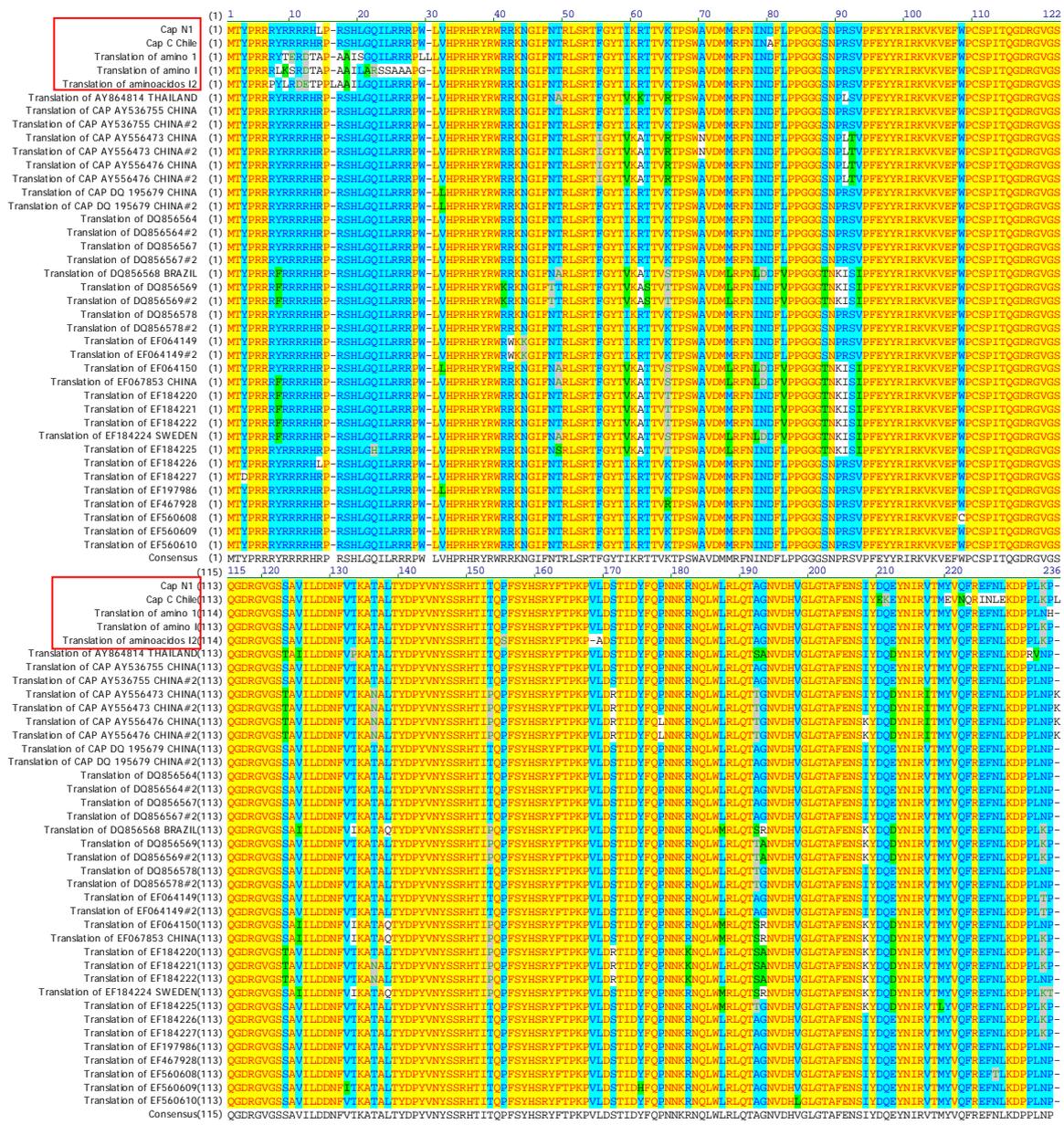


Fig.10. El alineamiento fue realizado con el software Vector NTI, usando el algoritmo de máxima parsimonia. En amarillo se muestran los motivos que presentan identidad total, en celeste se muestran los motivos con identidad parcial, en verde se muestran los motivos similitud, en plomo se muestran motivos débilmente similares y en blanco se indica la ausencia total de similitud. Como resultado, la secuencia aminoacídica predicha para el gen *orf2* de la cepas nacionales presentan una identidad de 90% con respecto a la secuencia consenso, encontrándose la mayor divergencia en extremo N-terminal de la proteína. *Nota: para mayor detalle revisar anexo.*

DISCUSIÓN

En este trabajo de memoria de título se detectó la presencia del circovirus porcino tipo 2 (PCV2) en cerdos provenientes de 3 planteles de la región central de Chile (A, B y C). Los signos que predominaban en los individuos afectados fueron principalmente pérdida de peso, aumento del tamaño de los linfonodos inguinales superficiales, alteraciones respiratorias y digestivas; los cuales son signos asociados mundialmente a PMWS (Ellis *et al.*, 1998; Calsamiglia *et al.*, 2002; Larochelle *et al.*, 2002; Thomson *et al.*, 2002). Para efectuar la detección molecular del PCV2 escogimos la técnica de PCR, ya que, esta técnica ha demostrado ser una herramienta muy útil para el reconocimiento temprano del virus en muestras de tejidos de distintos órganos (Toplak *et al.*, 2002) y para diferenciar a la variante no-patógena (PCV1) de los aislados patógenos (PCV2) (Morozov *et al.*, 1998; Hamel *et al.*, 2000).

En nuestro estudio, el 100 % de las muestras analizadas resultaron ser positivas a PCV2 por medio de esta técnica, sin embargo, al someter las mismas muestras a PCR semicuantitativo no todas arrojaron la misma carga viral, es más, el individuo utilizado como control por no presentar desmedro, resultó ser el que portaba la mayor carga viral de todos los individuos analizados, por lo cual, se podría pensar en la existencia de cepas de distinta virulencia afectando a un mismo plantel o bien factores del hospedero que hacen más permisible la replicación viral.

Estudios previos del genoma de circovirus han demostrado que *orf2* es adecuado para la genotipificación, ya que, es la secuencia con mayor variabilidad del genoma de PCV2 (Mahé *et al.*, 2000). Con el propósito de definir la diversidad genética entre los distintos aislados identificados en Chile, y compararlo con un genotipo Europeo, usado como control, y otros genotipos aislados en el mundo, se llevó a cabo una tipificación genética. El clon de DNA control fue donado por la Universidad de Uppsala (Suecia), éste corresponde al genotipo más comúnmente aislado en Europa (Timmusk *et al.*, 2008).

En primer lugar se realizó un análisis RFLP de las muestras obtenidas, éstas presentaron un patrón de cortes de restricción idéntico al aislado Europeo (denominado N1). Además, no se observó diversidad genética entre los aislados nacionales. Es importante destacar que en este análisis se utilizaron sólo dos endonucleasas de restricción de corte frecuente, MboI y MseI, y es muy probable que este resultado hubiese sido distinto al incorporar en este estudio más enzimas de restricción con sitios de corte en regiones polimórficas.

En segundo lugar, cuatro muestras de DNA amplificado para *orf2*, representantes de los tres planteles analizados, fueron clonadas y secuenciadas a lo largo de todo el marco de lectura abierto que codifica para la proteína de la cápside viral de PCV2. Estas secuenciaciones fueron realizadas en los dos sentidos de replicación y su análisis mostró un alto grado de identidad nucleotídica (94%) entre los aislados de PCV2 encontrados en este estudio. Al construir un árbol filogenético con las secuencias encontradas en Chile y las secuencias reportadas en otras partes del mundo; se encontró que las secuencias nacionales agrupan en un clado específico, con muy poca divergencia con respecto a dos secuencias reportadas en China y Europa. En este clado, además, se encuentra la secuencia de la cepa control N1. Además, este clado se localiza independiente de las cepas del resto del mundo con las que comparte un 91 % de identidad genética. Este resultado revela la existencia de subvariantes genéticas o subgenotipos del virus presente en los cerdos nacionales, las cuales estarían filogenéticamente muy ligadas con algunas cepas Europeas y Chinas.

Por otra parte, un reciente estudio ha dividido el genoma de PCV2 en 2 subgrupos (Olvera *et al.*, 2007; Cheung *et al.*, 2007). Esta clasificación se basa en las secuencias de *orf2* a nivel de los nucleótidos 262-267 y los correspondientes aminoácidos 88-89. El grupo 1 (genotipo PCV2, subgenotipo 1), posee la secuencia nucleotídica CCCCCG, en esta posición, la cual codifica para los aminoácidos prolina y arginina. Por otro lado, algunos representantes del grupo 1, además incluyen la secuencia CCCCTC, la cual codifica para los aminoácidos prolina y leucina. De esta manera, de acuerdo a esta clasificación, pertenecen al grupo 1 los subgenotipos que

porten la secuencia CCCCCG/TC, en esta posición. Por otra parte, el grupo 2 (genotipo PCV2, subgenotipo 2), portan la secuencia de nucleótidos AAAATC, que codifica para lisina e isoleusina, en esta posición. Las últimas evidencias señalan que cepas originarias de Nueva Zelandia, Tailandia y el Reino Unido poseen sólo la secuencia nucleotídica CCCCCG/TC (subgenotipo 1). Mientras que cepas de Japón, Canadá, España, Taiwán y Sudáfrica poseen sólo la secuencia AAAATC (subgenotipo 2). En contraste, cepas provenientes de Corea, Francia, Hungría, Austria, Alemania, Brasil y Estados Unidos comparten los 2 tipos de secuencias nucleotídicas (CCCCG/TC y AAAATC) (Dong-jun *et al.*, 2007).

Los genomas de *orf2* encontrados en este estudio tienen un rango promedio de 702 pb, y de acuerdo a las secuencias encontradas entre los nucleótidos 262-267, el genotipo nacional perteneciente al plantel B se clasificaría dentro del subgenotipo 1, al igual que el clon C, perteneciente al plantel C. Sin embargo, otro de los genotipos pertenecientes al plantel C y al plantel A, que fueron secuenciados, presentarían una combinación del subgenotipo 1 con el subgenotipo 2, ya que a nivel de los nucleótidos 262-267 la secuencia encontrada fue AACCCC (Anexo 1). Esto se explicaría porque estas secuencias presentan una delección de 3 pares de bases, río arriba de esta región, lo que hace que se produzca un desfase, en un codón, en la lectura de la secuencia, sin cambiar el marco de lectura abierto de ésta.

Análisis filogenéticos de las secuencias de PCV2 reportadas en *GenBank* sugieren que la secuencia genética de *orf2* es la más apropiada para separar los aislados del virus en subgrupos, pero hasta la fecha, no existe una asociación clara de genotipos específicos con enfermedad o área geográfica (Olvera *et al.*, 2007). Se ha especulado que las diferentes presentaciones clínicas que acompañan a la infección por el virus se deberían a variaciones genéticas entre los aislados de PCV2 que se manifestarían con distintos grados de virulencia (Opriessnig *et al.*, 2006). Es más, el estudio realizado por Opriessnig *et al.* (2006), sugiere que pequeñas diferencias en el genotipo de PCV2

podrían manifestarse en considerables diferencias en su virulencia. Un análisis filogenético de *orf2* realizado en Suecia, utilizando secuencias de granjas libres y afectadas con PMWS, demostró la existencia de 3 subgrupos de PCV2 (SG1-3), de acuerdo a un polimorfismo localizado en la posición 86-91 de la secuencia aminoacídica de la proteína Cap. Según este estudio, sólo el subgrupo SG3 fue encontrado en cerdos enfermos (Timmusk *et al.*, 2008). Anteriormente, la secuencia aminoacídica de *orf2* en esta misma posición (86-91) había sido propuesta por Cheung *et al.* (Cheung *et al.*, 2007) como un marcador genético para poder discriminar entre genogrupos “viejos” y “nuevos” de PCV2 presentes en Estados Unidos. Los resultados del estudio de Timmusk *et al.* 2008 reafirmarían de alguna manera esta hipótesis, ya que, el marcador se corresponde con una de las regiones que facilita la diferenciación de los subgrupos de PCV2 pertenecientes a SG3, de los pertenecientes a SG2 o SG1. Dentro de la diferenciación única de aminoácidos para SG3, ocho se localizan entre las posiciones 57-91. En específico el lugar 88 y 89 se reemplaza el aminoácido lisina (K) e isoleucina (I), presentes en SG1 y SG2, por prolina (P) y arginina (R) presente exclusivamente en SG3, reflejando así un cambio de nucleótidos de AAA ATC a CCC CGC, constituyendo una característica única y representativa de SG3 (Timmusk *et al.*, 2008). Los aislados nacionales de PCV2 de los planteles A, B y C muestran una identidad de 90% con respecto a la secuencia consenso encontrándose la mayor divergencia en extremo N-terminal de la proteína, entre los residuos 10 y 20 (nucleótidos 30 a 60) (Fig. 10). Sin embargo, la mayor presencia de polimorfismos, analizando todas las secuencias disponibles en *Genbank*, la encontramos a nivel de los nucleótidos 250-300 y 400-450 (gráfico 1), lo cual se corresponde con las clasificaciones de subgenotipos que incluyen los nucleótidos 262-267. Los aislados nacionales presentan una relación con el subgrupo Sueco SG3, ya que a nivel del aminoácido 88 y 89 poseen prolina (P) y arginina (R) (por lo menos en las muestras B y C). Sin embargo, una vez más, las muestras A y clon C presentan una configuración distinta de los aminoácidos 88 y 89, ya que en estos sitios se encuentra aspargina (N) y prolina (P) (Anexo 2), lo cual difiere de los aminoácidos hallados en los subgrupos patógenos de SG3, por lo tanto se podría nuevamente

especular que estamos ante la presencia de un nuevo subgrupo, dado por la delección específica en un codón que desplaza la lectura en ambas secuencias.

Ha sido sugerido que las sustituciones aminoacídicas en estas regiones han sido seleccionadas bajo la influencia de la respuesta inmune humoral del hospedero, sin embargo, aún no ha sido determinado si estas posiciones son importantes para el desarrollo de anticuerpos neutralizantes. Existe una correlación clara entre la carencia de anticuerpos neutralizantes contra PCV2 y el desarrollo de PMWS, la cual ha sido demostrada por comparación de los niveles de anticuerpos en cerdos subclínicamente infectados y los que han desarrollado PMWS (Meerts *et al.*, 2006). La importancia de la respuesta de anticuerpos contra PCV2 en la protección contra PMWS es además, respaldada por el valor protector que poseen los anticuerpos maternos contra PCV2 (McKeown *et al.*, 2005).

Existe evidencia creciente para la asociación de genogrupos específicos con diferentes características de crecimiento *in vitro*, patogenicidad *in vivo* y, tal vez lo más importante, diferencias epizoóticas de PMWS en el campo (Wen *et al.*, 2005; Cheung *et al.*, 2007; Chae, 2005). Los crecientes volúmenes de información de secuenciaciones disponibles y el concurrido uso de diferentes designaciones para la clasificación genotípica, vislumbran el requerimiento de acordar una nomenclatura internacional de genogrupos de PCV2, la cual facilitaría enormemente la comparación entre los laboratorios de todo el mundo.

Conclusiones

- En Chile se encuentra el Circovirus Porcino Tipo 2 (PCV2) causando el Síndrome del Desmedro Multisistémico Postdestete (PMWS) en cerdos.
- Un ensayo de PCR-RFLP fue capaz de detectar e identificar la presencia de DNA de PCV2 a partir de muestras de cerdos con signología PMWS, de distintos planteles de la zona central de Chile, sin embargo, este ensayo no fue capaz de detectar diferencias polimórficas entre los aislados chilenos y el DNA usado como control, el cual representa el genotipo más comúnmente aislado en Europa.
- La secuenciación nucleotídica completa de *orf2* reveló la existencia de subgenotipos o subgrupos de PCV2 causando la enfermedad. Éstos pertenecerían al subgrupo 1 y a un nuevo subgrupo que sería un híbrido entre el subgrupo 1 y subgrupo 2, producto de una deleción específica en extremo 5' prima de las secuencias.
- El análisis filogenético de las secuencias *orf2* provenientes de aislados nacionales, revela una estrecha relación con subgenotipos de origen europeo.

Bibliografia

ALBINA, E.; TRUONG, C.; HUTET, E.; BLANCHARD, P.; CARIOLET, R.; L'HOSPITALIER, R.; MAHE, D.; ALLEE, C.; MORVAN, H.; AMENNA, N.; LeDIMMA, M.; MADEC, F.; JESTIN, A. 2001. An experimental model for post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in growing piglets. *Journal of Comparative Pathology*. 125: 292–303.

ALLAN, G.; PHENIX, K.; TODD, D.; McNULTY, M. 1994. Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. *Journal of Veterinary Medicine B*. 41: 17-26.

ALLAN, G.; McNEILLY, F.; KENNEDY, S.; DAFT, B.; CLARK, E.; ELLIS, J.; HAINES, D.; MEEHAN, B.; ADAIR, B. 1998. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 10: 3–10.

ALLAN, G.; McNEILLY, F.; MEEHAN, B.; KENNEDY, S.; MACKIE, D.; ELLIS, J.; CLARK, E.; ESPUÑA, E.; SAUBI, N.; RIERA, P.; BOTNER, A.; CHARREYRE, C. 1999. Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. *Veterinary Microbiology*. 66: 115–123.

ALLAN, G.; ELLIS, J. 2000. Porcine circoviruses: A review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 12: 3-14.

ALLAN, G.; MCNEILLY, F.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; BOTNER, A.; McCULLOUGH, K.; NAUWYNCK, H.; KENNEDY, S.; MEEHAN, B.;

CHARREYRE, C. 2004. PMWS: experimental model and co-infections. *Veterinary Microbiology*. 98: 165-168.

BALASCH, M.; SEGALES, J.; ROSELL, C.; DOMINGO, M.; MANKERTZ, A.; URNIZA, A.; PLANA-DURAN, J. 1999. Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Comparative Pathology* 121: 139–148.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 392: 245-252.

BASSAMI, M.; BERRYMAN, D.; WILCOX, G.; RAIDAL, S. 1998. Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses, and chicken anaemia virus. *Virology*. 249: 453-459.

BOLIN, S.; STOFFREGEN, W.; NAYAR, G.; HAMEL, A. 2001. Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrums deprived piglets with type 2 porcine circovirus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 13: 185–194.

BURCH, D.; 2007. PCV2 vaccines are on their way. [En línea]. <<http://www.octagon-services.co.uk/articles/PCV2vaccines.htm>> [consulta: 29- 07-2007].

CALSAMIGLIA, M.; SEGALES, J.; QUINTANA, J.; ROSELL, C.; DOMINGO, M. 2002. Detection of porcine circovirus type 1 and 2 in serum and tissue samples of pigs with or without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*. 40: 1848-1850.

CALSAMIGLIA, M.; OLVERA, A.; SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. 2004. Quantification of PCV2 in different routes of excretion: possible transmission routes and correlation with presence of PMWS characteristic lesions. *Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress*. p. 11.

CHAE, C. 2005. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Veterinary Journal*. 169: 326-336.

CHEUNG, A. K. 2002. Transcriptional Analysis of Porcine Circovirus Type 2. *Journal of Virology*. 305: 168-180.

CHEUNG, A.; LAGER, K.; KOHUTYUK, O.; VINCENT, A.; HENRY, S.; BAKER, R.; ROWLAND, R.; DUNHAM, A. 2007. Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. *Archives of Virology*. 152: 1035-1044.

CHOI, C.; CHAE, C. 1999. In-situ hybridization for the detection of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Comparative Pathology*. 121: 265–270.

CLARK, E. 1997. Post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Proceedings of the American Association of Swine Practitioners*. 28: 499-501.

CSÁGOLA, A.; KECSKEMÉTI, S.; KISS, I.; TUBOLY, T. 2005. Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boars. *Archives of Virology*. 151:495- 507.

DAFT, B.; NORDHAUSEN, R.; LATIMER, K.; NIAGRO, F. 1996. Interstitial pneumonia and lymphadenopathy associated with circoviral infection in a six week-old pig. *American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*. 39:32.

DARWICH, L.; SEGALÉS, J.; MATEU, E. 2004. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by porcine circovirus 2: an immune riddle. *Archives of Virology*. 149: 857-874.

DONG-JUN, A.; IN-SOON, R.; DAE-SUB, S.; CHOI-KYU, P.; BONG-KYUN, P. 2007. Phylogenetic characterization of porcine circovirus type 2 in PMWS and PDNS Korean pigs between 1999 and 2006. *Virus Research*. 129: 115-122.

ELLIS, J.; HASSARD, L.; CLARK, E.; HARDING, J.; ALLAN, G.; WILLSON, P.; STROKAPPE, J.; MARTIN, K.; McNEILLY, F.; MEEHAN, B.; TODD, D.; HAINES, D. 1998. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Canadian Veterinary Journal*. 39: 44–51.

ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; LAIRMORE, M.; HAINES, D.; BRATANICH, A.; CLARK, E.; ALLAN, G.; KONOBY, C.; HASSARD, L.; MEEHAN, B.; MARTIN, K.; HARDING, J.; KENNEDY, S.; McNEILLY, F. 1999. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 11: 3-14.

ELLIS, J.; CLARK, E.; HAINES, D.; WEST, K.; KRAKOWKA, S.; KENNEDY, S.; ALLAN, G. 2004. Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. *Veterinary Microbiology*. 98: 159-163.

GILPIN, D.; McCULLOUGH, K.; MEEHAN, B.; McNEILLY, F.; McNAIR, I.; STEVENSON, L.; FOSTER, J.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; ADAIR, B.; ALLAN, G. 2003. In vitro studies on the infection and replication of porcine circovirus type 2 antigen in cells of the porcine immune system. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 94: 149-161.

HAMEL, A.; LIN, L.; NAYAR, G. 1998. Nucleotide sequence of porcine circoviruses associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Journal of Virology*. 72: 5262-5267.

HAMEL, A.; LIN, L.; SACHVIE, C.; GRUDESKI, E.; NAYAR, G. 1999. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 64: 44-52.

HAMEL, A.; LIN, L.; SACHVIE, C.; GRUDESKI, E.; NAYAR, G. 2000. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *Canadian Journal of Veterinary Research.* 64: 44–52

HARDING, J. 1996. Post-weaning multisystemic wasting syndrome: preliminary epidemiology and clinical findings. *Proceedings of the Western Canadian Association of Swine Practitioners.* P. 21.

HARDING, J.; CLARK, E. 1997. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health Prod.* 5: 201-203.

HARDING, J; CLARK, E.; STROKAPPE, J. 1998. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): epidemiology and clinical presentation. *Swine Health Prod.* 6: 249-254.

JEMERSIC, L.; CVETNIC, Z.; TOPLAK, I.; SPICIC, S.; GROM, S.; BARLIC-MAGANJA, D.; TERZIC, S.; HOSTNIK, P.; LOJKIC, M.; HUMSKI, A.; HABRUN, B.; KRT, B. 2004. Detection and genetic characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from Croatia. *Journal of Veterinary Science.* 77: 171-175.

JESTIN, A.; MAHE, D.; BLANCHARD, P.; BOISSESON, C. 2001. Porcine circoviruses. *Proceedings of the ssDNA Viruses of plants, birds, pigs and primates: porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome.* European Society of Veterinary Virology. 32.

KIM, J.; JUNG, K.; CHAE, C. 2004. Prevalence of porcine circovirus type 2 in aborted fetuses and stillborn piglets. *Veterinary Record*. 155: 489–492.

KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.; MEEHAN, B.; KENNEDY, S.; McNEILLY, F.; ALLAN, G. 2000. Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Veterinary Pathology*. 37: 254–263.

LAROCHELLE, R.; BIELANSKI, A.; MULLER, P.; MAGAR, R. 2000. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 4629–4632.

LAROCHELLE, R.; MAGAR, R.; D'ALLAIRE, S. 2002. Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions. *Virus Research*. 90: 101-112.

LAROCHELLE, R.; MAGAR, R.; D'ALLAIRE, S. 2003. Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 67: 114-120.

LIU, Q; WANG, L.; WILLSON, P.; BABIUK, L. 2000. Quantitative, competitive PCR analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 3474–3477.

LIU, J.; CHEN, I.; KWANG, J. 2005. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2 infected cells and its role in virus induced apoptosis. *Journal of Virology*. 79: 8262-8274.

LUKERT, P.; DE BOER, G.; DALE, J.; 1995. The Circoviridae: Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Virus Taxonomy*. 166-168.

MADEC, F.; EVENO, E.; MORVAN, P.; HAMON, L.; BLANCHARD, P.; CARIOLET, R.; AMENNA, N.; MORVAN, H.; TRUONG, C.; MAHE, D.; ALBINA, E.; JESTIN, A. 2000. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. *Livestock Production Science* 63: 223–233.

MADEC, F.; ROSE, N.; EVENO, E.; MORVAN, P.; LAROUE, G.; JOLLY, J.; Le DIGUERHER, G.; CARIOLET, R.; Le DIMNA, M.; BLANCHARD, P.; JESTIN, A. 2001. PMWS: on-farm observations and preliminary analytic epidemiology. In: *Proceedings of the ssDNA Viruses Plants, Birds, Pigs and Primates (ESVV) Meeting*. 86–87.

MADEC, F.; WADDILOVE, J. 2002. Control PCV2 or control other factors? Several approaches to a complex problem. In: *PMWS and PCV2 Diseases: Beyond the Debate*. Meril Symposium, Ames, IA, USA, pp. 45–53.

McCULLOUGH, C.; VINCENT, E.; SUMMERFIELD, A.; KRAKOWKA, S.; ELLIS, A.; SEGALÉS, J.; ALLAN, G. 2007. The immunology of PCV2 infections. *American Association of Swine Veterinarians*. 497-500.

McKEOWN, N.; OPRIESSNIG, T.; THOMAS, P.; GUENETTE, F.; ELVINGER, M.; FENAUX, M.; HALBUR, P.; MENG, X. 2005. Effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) maternal antibodies on experimental infection of piglets with PCV2. *Clinical Diagnostic and Laboratory Immunology*. 12: 1347-1351.

McNEILLY, F.; KENNEDY, S.; MOFFETT, D.; MEEHAN, B.; FOSTER, J.; CLARKE, E.; ELLIS, J.; HAINES, D.; ADAIR, B.; ALLAN, G. 1999. A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Journal of Virological Methods*. 80: 123–128.

MAHE, D.; BLANCHARD, P.; TRUONG, C.; ARNAULD, C.; Le CANN, P.; CARIOLET, R.; MADEC, F.; ALBINA, E.; JESTIN, A. 2000. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *Journal of General Virology*. 81: 1815-1824.

MALDONADO, J.; SEGALÉS, J.; MARTINEZ-PUIG, D.; CALSAMIGLIA, M.; RIERA, P.; DOMINGO, M.; ARTIGAS, C. 2005. Identification of viral pathogens in aborted fetuses and stillborn piglets from cases of swine reproductive failure in Spain. *Veterinary Journal*. 169: 454–456.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E.; SAMBROOK, J. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 1^a Ed., Coldspring Harbor Laboratory, C.S.H., New York.

MANKERTZ, A.; DOMINDO, M.; FOLCH, J.; LeCANN, P.; JESTIN, A.; SEGALÉS, J.; CHMIELEWICZ, B.; PLANA-DURÁN, J.; SOIKE, D. 2000. Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Research*. 66: 65-77.

MEEHAN, B.; CREELAN, J.; McNULTY, M.; TODD, D. 1997. Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. *Journal of General Virology*. 78: 221-227.

MEEHAN, B.; Mc NEILLY, F.; TODD, D.; KENNEDY, S.; JEWHRST, V.; ELLIS, J.; HASSARD, L.; CLARK, E.; HAINES, D.; ALLAN, G. 1998. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *Journal of General Virology* 79: 2171–2179.

MEERTS, P.; MISINZO, G.; LEFEBVRE, D.; NIELSEN, J.; BOTNER, A.; KRISTENSEN, C.; NAUWYNCK, H. 2006. Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus type 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2 associated diseases. *BMC Veterinary Research*. 2: 6.

MOROZOV, I.; SIRINARUMITR, T.; SORDEN, S.; HALBUR, P.; MORGAN, M.; YOON, K.; PAUL, P. 1998. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 2535-2541.

NAUWYNCK, H.; LEFEBVRE, D.; MISINZO, G.; MEERTS, P.; MATEUSEN, B.; SANCHEZ, R.; DELPUTTE, P. 2007. Pathogenesis of porcine circovirus 2 infections. American Association of Swine Veterinarians. 489-493.

NAWAGITGUL, P.; HARMS, P.; MOROZOV, I.; THACKER, B.; SORDEN, S.; LEKCHAROENSUK, C.; PAUL, P. 2002. Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. *Clinical Diagnostic and Laboratory Immunology*. 9: 33–40.

NIEGRO, F.; FORSTHOEFEL, A.; LAWThER, R. 1998. Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes; intermediates between the geminiviruses circoviruses. *Archives of Virology*. 143: 1723-1744.

NIELSEN, J.; VINCENT, E.; LADEKJAER-MIKKELSEN, A.; ALLAN, G.; McCULLOUGH, K.; BOTNER, A. 2001. Experimental infection of 3-week-old piglets with PCV2 altered the level of various peripheral blood leukocyte population. *Proceedings of the ssDNA Viruses of Plants, Birds, Pigs and Primates: porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome*. European Society of Veterinary Virology. P: 96.

NIELSEN, J.; VINCENT, E.; BOTNER, A.; LADEKJAER-MIKKELSEN, A.; ALLAN, G.; SUMMERFIELD, A.; McCULLOUGH, C. 2003. Association of lymphopenia with porcine circovirus type 2 induced postweaning

multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 92: 97-111.

OHLINGER, V.; SCHMIDT, U.; PESCH, S. 2000. Studies on pathogenic aspects of the post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Proceedings of the 16th International Pig Veterinary Society Congress*.

OLVERA, A.; CORTEY, M.; SEGALES, J. 2007. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: Phylogeny and clonality. *Virology*. 357: 175-185.

OPRIESSNIG, T.; McKOWN, N.; ZHON, E.; MONG, X.; HALBUR, P.; GEN, J. 2006. Genetic and experimental comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates from cases with and without PCV2-associated lesions provides evidence for differences in virulence. *Journal of General Virology*. 87: 2923-2932.

PARK, J.; KIM, J.; HA, Y.; JUNG, K.; CHOI, C.; LIM, J.; KIM, S.; CHAE, C. 2005. Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. *Journal of Comparative Pathology* 132: 139–144.

PENSAERT, M.; SANCHEZ, Jr R.; LADEKJAER-MIKKELSEN, A.; ALLAN, G.; NAUWYNCK, H. 2004. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. *Veterinary Microbiology*. 98: 175–183.

PESCH, S.; SCHMIDT, U.; OHLINGER, U. 2000. Proliferative necrotizing pneumonia (PNP) is a result of coinfection with porcine reproductive and respiratory disease virus (PRRS) and porcine circovirus type 2 (PCV2). Proceedings of the 16th International Pig Veterinary Society Congress. 581.

PHENIX, K.; WESTON, J.; YPELAAR, I.; LAVAZZA, A.; SMITH, J.; TODD, D.; WILCOX, G.; RAIDAL, S. 2001. Nucleotide sequence analysis of a novel circovirus of canaries and its relationship to other members of the genus circovirus of the family circoviridae. *Journal of General Virology*. 82: 2805-2809.

POGRANICHNIY, R.; YOON, K.; HARMS, P.; SWENSON, S.; ZIMMERMAN, J.; SORDEN, S. 2000. Characterization of immune response of young pigs to porcine circovirus type 2 infection. *Viral Immunology*. 13: 143-153.

RESENDES, A.; BALASCH, M.; CALSAMIGLIA, M.; SEGALÉS, J.; SIBILA, M.; MANKERTZ, A.; PLANA-DURÁN, J.; DOMINGO, M. 2001. Experimental co-inoculation of porcine circovirus type 2 (PCV2) and a vaccine adjuvant in conventional pigs. Proceedings of the ssDNA Viruses of Plants, Birds, Pigs and Primates: porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome. *European Society of Veterinary Virology*. P: 134.

RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G.; SEGALÉS, J.; CALSAMIGLIA, M.; RESENDES, A.; BALASCH, M.; PLANA-DURÁN, J.; CASAL, J.; DOMINGO, M. 2002. Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd

of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *American Journal of Veterinary Research*. 63: 354–357.

ROSELL, C.; SEGALÉS, J.; PLANA-DURÁN, J.; BALASCH, M.; RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G.; KENNEDY, S.; ALLAN, G.; Mc NEILLY, F.; LATIMER, K.; DOMINGO, M. 1999. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *Journal of Comparative Pathology*. 120: 59–78.

ROSELL, C.; SEGALÉS, J.; RAMOS-VARA, J.; FOLCH, J.; RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G.; DURAN, C.; BALASCH, M.; PLANA-DURÁN, J.; DOMINGO, M. 2000. Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Veterinary Record*. 146: 40-43.

SÁNCHEZ, R.; MEERTS, P.; NAUWYNCK, H.; PENZAERT, M. 2003. Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life. *Veterinary Microbiology*. 95: 15-25.

SEGALÉS, J.; ALONSO, F.; ROSELL, C.; PASTOR, J.; CHIANINI, F.; CAMPOS, E.; LÓPEZ-FUERTES, L.; QUINTANA, J.; RODRIGUEZ-ARRIOJA, G.; CALSAMIGLIA, M.; PUJOLS, J.; DOMINGUEZ, J.; DOMINGO, M. 2001. Changes in peripheral blood leukocyte populations in pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 81: 37–44.

SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; DOMINGO, M. 2004. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Veterinary Microbiology*. 98: 137–149.

SEGALÉS, J.; ALLAN, G.; DOMINGO, M. 2005. Porcine circovirus diseases. *Animal Health Research Reviews*. 6: 119- 142.

SHIBAHARA, T.; SATO, K.; ISHAKAWA, Y.; KADOTA, K. 2000. Porcine circovirus induces B lymphocyte depletion in pigs with wasting disease syndrome. *Journal of Veterinary Medical Science*. 62: 1125–1131.

SHIBATA, I.; OKUDA, Y.; YAZAWA, S.; ONO, M.; SASAKI, T.; ITAGAKI, M.; NAKAJIMA, N.; OKABE, Y.; HIDEJIMA, I. 2003. PCR detection of porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, nasal swab, and feces from experimentally infected pigs and field cases. *Journal of Veterinary Medical Science*. 65: 405–408.

STEINER, E.; BALMELLI, C.; VINCENT, E.; SUMMERFIELD, A.; MCCULLOUGH, K. 2007. Multipotent cell targeting by PCV2. *Journal of Virology*. (Submitted for publication).

STEVENSON, G.; KIUPEL, M.; MITTAL, S.; CHOI, J.; LATIMER, K.; KANITZ, L. 2001. Tissue distribution and genetic typing of porcine circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tremors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 13: 57–62.

THOMSON, J.; HIGGINS, R.; SMITH, W.; DONE, S. 2002. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome clinical and pathological features of cases in the United Kingdom (1993-1998). *Journal of Veterinary Medicine*. 49: 430-437.

TIMMUSK, S.; WALLGREN, P.; BRUNBORG, I.; WIKSTROM, F.; ALLAN, G.; MEEHAN, B.; McMENAMY, M.; McNEILLY, F.; FUXLER, L.; BELAK, K.; PODEROSOO, D.; SAAR, T.; BERG, M.; FOSSUM, C. 2008. Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) pre- and post-epizootic postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Virus Genes*. 36: 509-520.

TISCHER, I.; RASH, R.; TOCHTERMANN, G. 1974. Characterization of papovavirus- and picornavirus- like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene A*. 226: 153- 167.

TISCHER, I.; GELDERBLOM, H.; VETTERMANN, W.; KOCH, M. 1982. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature*. 295: 64-66.

TODD, D.; CREELAN, J.; L., MACKIE, D.; RIXON, F.; McNULTY, M. 1990. Purification and biochemical characterisation of chicken anaemia agent. *Journal of General Virology*. 71: 819-823.

TODD, D., WESTON, J.; SOIKE, D.; SMYTH, J. 2001. Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. *Virology*. 286: 354-362.

TOPLAK, I.; GROM, J.; HOSTNIK, P.; BARLIC-MAGANJA, D. 2002. Detection and differentiation of porcine circovirus types 1 and 2 in Slovenia using “multiplex PCR”. 3rd Slovenian Veterinary Congress, Proceedings. 6: 227-231.

VINCENT, E.; CARRASCO, C.; HERRMANN, B.; MEEHAN, M.; ALLAN, G.; SUMMERFIELD, A.; McCULLOUGH, K. 2003. Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus. *Journal of Virology*. 77: 13288- 13300.

WEN, L.; GUO, X.; YANG, H. 2005. Genotyping of porcine circovirus type 2 from a variety of clinical conditions in China. *Journal of Veterinary Microbiology*. 110: 141-146.

WEST, K.; BYSTROM, J.; WOJNAROWICZ, C.; SHANTZ, N.; JACOBSON, M.; ALLAN, G.; HAINES, E.; CLARK, E.; KRAKOWKA, S.; McNEILLY, F.; KONOBY, C.; MARTIN, K.; ELLIS, J. 1999. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 11: 530-532.

Anexos

Anexo 1: Análisis de las secuencias obtenidas en los planteles A, B y C. en donde se muestran los motivos de reconocimiento utilizados para la clasificación de los subgenotipos de PCV2. En color rojo se destacan los genotipos pertenecientes al subgenotipo 1 y en amarillo los genotipos que presentan motivos híbridos entre el grupo 1 y 2.

Plantel A	<pre> 1 atgacgtacc caaggaggcc ttacctgcca gacgagacac cgcccctcgc agccatctta 61 ggccagatcc tccgcccgcg cccttggtc gtccaccccc gccaccgta cgcctggaga 121 aggaaaaatg gcatcttcaa cacccgcctc tcccgcacct tcggatatac tatcaagcga 181 accacagtca aaacgcccctc ctggggcgtg gacatgatga gattcaatat taatgacttt 241 cttccccag gagggggctc aaaccccgcg tctgtgcctt ttgaatacta cagaataaga 301 aaggttaagg ttgaattctg gccttgctcc cccgatcacc agggtgacag gggagtgggc 361 tccagtgctg ttattctaga tgataacttt gtaacaaagg ccacagccct cacctatgac 421 ccctatgtaa actactcctc ccgccatacc ataaccagct ccttctccta ccaactccgc 481 tactttacc ccaaactcgc agattccact attgattact tccaaccaa caacaaaaga 541 aatcagctgt ggctgagact acaaactgct ggaaatgtag accacgtagg cctcggcact 601 gcattcgaaa acagtatata cgaccaggaa tacaatatcc gtgtaacat gtatgtacaa 661 ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaaaccat aa </pre>
Plantel B	<pre> 1 atgacgtacc caaggaggcg tttaaagagt agagacaccg cccccgcagc catcttggcc 61 agatcctccg ccgcccgcgc tggctctcgt caccoccgcc accgttacgc ctggagaagg 121 aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccttcg gatatactat caagcgaacc 181 acagtcaaaa cgccctcctg ggcgggtgac atgatgagat tcaatattaa tgactttott 241 cccccaggag ggggtcmeta cccccgcctc gtgccctttg aatactacag aataagaaaag 301 gttaaaggttg aattctggcc ctgctccccg atcaccaggg gtgacagggg agtgggctcc 361 agtgcgtgta ttctagatga taactttgta acaaaggcca cagccctcac ctatgacccc 421 tatgtaaact actcctcccg ccataccata acccagccct tctctacca ctcccgtac 481 tttaccccc aacctgtcct agattccact attgattact tccaaccaa caacaaaaga 541 aatcagctgt ggctgagact acaaactgct ggaaatgtag accacgtagg cctcggcact 601 gcattcgaaa acagtatata cgaccaggaa tacaatatcc gtgtaacat gtatgtacaa 661 ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaaaccat aa </pre>
Plantel C	<pre> 1 atgacgtatc caaggaggcg ttacacggag agagacaccg cccccgcagc catctctggc 61 cagatcctcc gccgcccgcg cttggttgct gtccaccccc gccaccgta cgcctggaga 121 aggaaaaatg gcatcttcaa cacccgcctc tcccgcacct tcggatatac tatcaagcga 181 accacagtca aaacgcccctc ctggggcgtg gacatgatga gattcaatat taatgacttt 241 cttccccag gagggggctc aaaccccgcg tctgtgcctt ttgaatacta cagaataaga 301 aaggttaagg ttgaattctg gccttgctcc cccgatcacc agggtgacag gggagtgggc 361 tccagtgctg ttatactaga tgataacttt gtaacaaagg ccacagccct cacctatgac 421 ccctatgtaa actactcctc ccgccatacc ataaccagc ccttctccta ccaactccgc 481 tactttacc ccaaactcgt cctagattcc actattgatt acttccaacc aaacaacaaa 541 agaaatcagc tgtggctgag actacaaact gctggaaatg tagaccacgt aggccttgcc 601 actgcgttcg aaaaacagt atacgaccag gaatacaata tccgtgtaac catgtagta 661 caattcagag aatttaact taagaccccc ccacttaacc ata </pre>

clon C	1	atgacgtacc	caaggaggcg	ttaccggaga	agaagacacc	gccccgcag	ccatcttggc
	61	cagatcctcc	gcccgcgccc	ctggctcgtc	cacccccgcc	accgttaccg	ctggagaagg
	121	aaaaatggca	tcttcaacac	ccgcctctcc	cgcaccttcg	gatatactat	caagcgaacc
	181	acagtcaaaa	cgccctcctg	ggcgggtggac	atgatgagat	tcaatattaa	tgcttttctt
	241	ccccaggag	ggggctcaaa	ccccgctct	gtgccctttg	aatactacag	aataagaaa
	301	gttaaggttg	aattctggcc	ctgctccccg	atcaccagg	gtgacagggg	agtgggctcc
	361	agtgctgta	tactagatga	taactttgta	acaaaggcca	cagccctcac	ctatgacccc
	421	tatgtaaact	actcctcccg	ccataccata	accagccct	tctcctacca	ctcccgtac
	481	tttaccacca	aacctgtcct	agattccact	attgattact	tccaacaaaa	caacaaaaga
	541	aatcagctgt	ggctgagact	acaaactgct	ggaaatgtag	accacgtagg	ccttggcaat
	601	gcgttcgaaa	acagtatata	cgagaaggaa	tacaatatcc	gtgtaacat	ggaagtcaat
	661	cagagaatta	atctagaaaa	agacccccca	cttaaaccat	ta	

Anexo 2: Análisis de la secuencia aminoacídica predicha para *orf2* de los aislados secuenciados en los planteles A, B y C. Se observa que los planteles B y C presentan en la posición 88 y 89 los aminoácidos P y R. Las muestras A y clon C en cambio presentan en esta posición los aminoácidos N y P.

Plantel A	MTYPRRPYL RDET PPLAA ILGQILRRRPWL VHPRHRYR WRRKNGI FNTRL SRTFGYTIKR TTVKTPSWAVDMMRFNINDFLPPGGGSN P RSVPF EYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVG SSAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRHTITQSF SYHSRYFTPKPADSTIDYFQPNNKR NQLWLRLQTAGNVDHVGLGTAFENSIYDQEYNIRVTMYVQFREFNLKDPPLKP
Plantel B	MTYPRRLKSRDTAPAAI LARSSAAAPGLVHPRHRYR WRRKNGI FNTRL SRTFGYTIKRT TVKTPSWAVDMMRFNINDFLPPGGGSN P RSVPF EYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGS SAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRHTITQPF SYHSRYFTPKPVL DSTIDYFQPNNKR NQLWLRLQTAGNVDHVGLGTAFENSIYDQEYNIRVTMYVQFREFNLKDPPLKP
Plantel C	MTYPRRRYRRRRHRPRSHLGQILRRRPWL VHPRHRYR WRRKNGI FNTRL SRTFGYTIKRT TVKTPSWAVDMMRFNINAF LPPGGGSN P RSVPF EYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGS SAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRHTITQPF SYHSRYFTPKPVL DSTIDYFQPNNKR NQLWLRLQTAGNVDHVGLGTAFENSIYEKEYNIRVTMEVNQRINLEKDPPLKPL
Clon C	MTYPRRRYTERDTAPAAI SGQILRRRP LLLVHPRHRYR WRRKNGI FNTRL SRTFGYTIKR TTVKTPSWAVDMMRFNINDFLPPGGGSN P RSVPF EYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVG SSAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRHTITQPF SYHSRYFTPKPVL DSTIDYFQPNNK RNQLWLRLQTAGNVDHVGLGTAFENSIYDQEYNIRVTMYVQFREFNLKDPPLNH

