



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

**RELACIÓN DEL TORQUE TENO SUS VIRUS 1 (TTSuV1) EN LA ENFERMEDAD ASOCIADA
A CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2**

TRABAJO DE TESIS

**PARA OBTENER EL TITULO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
ALEJANDRO VARGAS RUIZ**

Tutor (a):

Dra. Lucía Angélica García Camacho

Comité tutorial:

Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo

Dr. Humberto Ramírez Mendoza

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN

El Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) es un virus ADN pequeño de cadena circular de reciente descripción. La co-infección del circovirus porcino tipo 2 (PCV2) con el TTSuV1 ha sido reportada ampliamente con enfermedad asociada a PCV2 (PCVAD). Hasta el momento no se ha documentado su relación con falla reproductiva asociada a PCV2 (FR-PCV2). En México, existe una alta proporción de PCVAD, particularmente de FR-PCV2. Con el fin de establecer la presencia del TTSuV1 en casos de PCVAD durante el periodo de 2001-2009, 100 muestras de tejidos incluidos en parafina (68 con lesiones características y positivos a PCV2 por hibridación *in situ* y 32 tejidos no afectados por PCV2) fueron evaluados para la presencia de TTSuV1 mediante PCR anidado utilizando iniciadores degenerados. Los productos amplificados fueron purificados y secuenciados para corroborar la presencia de TTSuV1. Los casos de PCVAD fueron representativos de una forma clínica particular. Se realizaron tablas de contingencia de 2X2, considerando el estatus de PCVAD y la presencia de TTSuV1 para la evaluar la relación por prueba de J^2 . Se obtuvieron productos cuyas secuencias correspondieron a TTSuV1. En total, 35% de los casos fueron positivos a TTSuV1, de los cuales 25/68 (36.8%) fueron positivos a PCVAD. En conjunto, 43.5% (10/23) de los casos de PMWS y PDNS fueron positivos a TTSuV1 mientras que sólo 33% (15/45) de los casos FR-PCV2 fueron positivos a TTSuV1. Por el contrario, 10/32 (31.2%) del total de tejidos no afectados por PCV2 y 7/18 (39%) de los corazones fetales no afectados fueron positivo a TTSuV1. No existe una relación estadísticamente significativa entre la observación de PCVAD y la presencia de TTSuV1 ($J^2 < 0.01$). Independientemente del estatus de PCV2, los resultados exhiben una menor frecuencia de TTSuV1 que la descrita en otros países. Dada la variabilidad genómica del TTSuV1, es posible que las cepas en México compartan una menor identidad en secuencia de nucleótidos que puedan explicar una diferencia en el potencial patogénico. Actualmente, se está realizando la comparación filogenética de las secuencias amplificadas para explorar estas diferencias.

ABSTRACT

Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) is a small circular strand ADN virus. Co-infection of porcine circovirus type 2 (PCV2) with TTSuV1 has been widely reported in association with PCV2 associated disease (PCVAD). At present, its relationship regarding PCV2-associated reproductive failure (PCV2-RF) has not been documented. In Mexico, there is a high proportion of PCVAD, particularly PCV2-RF. In order to assess the presence of TTSuV1 in positive cases of PCVAD recorded from 2001 to 2009 in Mexico, 100 paraffin embedded tissues (68 with characteristic microscopic lesions and PCV2-positive by in-situ hybridization, and 32 non-PCV2-affected), were evaluated for TTSuV1 by nested PCR using degenerate primers. The amplified products were purified, and sequenced to corroborate the presence of TTSuV1. The PCVAD cases were representative of a particular clinical presentation. Two by two contingency tables were made, considering PCVAD and TTSuV1 status in order to evaluate the relationship by χ^2 test. Products whose sequences belong to TTSuV1 were obtained. Overall, 35% was positive to TTSuV1 of which 25/68 (36.8%) were positive to PCVAD. Altogether, 10/23 (43.5%) of PMWS and PDNS cases were TTSuV1-positive while only 15 out of 45 (33%) PCV2-RF cases were positive to TTSuV1. Conversely, 10/32 (31.2%) of total PCV2 non-affected tissues, and 7/18 (39%) of non-affected fetal hearts were positive to TTSuV1. Statistically, there is no relationship between the observation of PCVAD and the presence of swTTV1 ($J^2 < 0.01$). Regardless of PCV2-status, the results depict a lower frequency of swTTV-1 than frequencies in other countries. Given the genomic variability of TTSuV1, it is feasible that available TTSuV1 strains in Mexico share a lower nucleotide sequence identity that may account for a different pathogenic potential. Currently, a phylogenetic comparison is being performed from amplified sequences to further explore such differences.

INDICE

I.	Resumen	1
II.	Abstract	2
III.	Índice	3
IV.	Abreviaturas	4
V.	Índice de tablas y figuras	5
VI.	Introducción	7
VII.	Objetivos	14
VIII.	Hipótesis	14
IX.	Material y métodos	
	a. Diseño experimental	15
	b. Selección de casos	15
	c. Extracción de ADN a partir de tejidos parafinizados	16
	d. Diseño de iniciadores	21
	e. PCR anidado	21
	f. Visualización de productos	22
	g. Recuperación de productos amplificados	22
	h. Secuenciación	23
	i. Análisis de resultados	23
X.	Resultados	24
XI.	Discusión	33
XII.	Conclusiones	40
XIII.	Bibliografía	41

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

EG: Enteritis granulomatosa

EMCV: Virus de la encefalomiocarditis

FR-PCV2: Falla reproductiva asociada a PCV2

HIS: Hibridación in situ

HP: Histopatología

IL: Interleucina

M: Mol o moles

MgCl₂: Cloruro de magnesio

ml: Mililitros

μl: Microlitros

mM: Milimolar

ORF: Marco de lectura abierta

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PCVAD: Enfermedad Asociada a Circovirus Porcino tipo 2

PCV2: Circovirus porcino tipo 2

PDNS: Síndrome de dermatitis y nefropatía porcina

PMWS: Síndrome multisistémico de emaciación post destete

TTSuV: Torque teno sus virus

TTSuV1: Torque teno sus virus 1

vPPV: Parvovirus porcino

vPRRS: Virus del Síndrome respiratorio y reproductivo porcino

ÍNDICE DE TABLAS

☞ Tabla 1. Secuencia de los iniciadores para TTSuV1 descritos por McKweon et al, 2004 y los diseñados en BioEdit.	22
☞ Tabla 2. Cuadro de contingencia de 2x2 para los datos obtenidos de la PCR anidada para PCVAD.	32
☞ Tabla 3. Cuadro de contingencia de 2x2 para los datos obtenidos de la PCR anidada en casos de PMWS/PDNS.	32
☞ Tabla 4. Cuadro de contingencia de 2x2 para los datos obtenidos de la PCR anidada en casos de FR-PCV2.	32

ÍNDICE DE FIGURAS

☞ Figura 1. PMWS: Depleción linfoide y linfadenitis granulomatosa.	17
☞ Figura 2. PMWS: Patrón difuso de hibridación.	17
☞ Figura 3. PDNS: Depleción linfoide multifocal y linfadenitis granulomatosa.	18
☞ Figura 4. Acercamiento del inserto de la figura 3.	18
☞ Figura 5. PDNS: Patrón multifocal de hibridación positiva a PCV2.	19
☞ Figura 6. Cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos basofílicos en racimo en macrófagos.	19
☞ Figura 7. FR-PCV2: Miocarditis no supurativa perivascular.	20
☞ Figura 8. FR-PCV2: Señal de hibridación.	20
☞ Figura 9. PCR anidado de casos sospechosos de TTSuV1.	26
☞ Figura 10. Gradientes de temperatura. .	26
☞ Figura 11. Software BioEdit. Iniciadores descritos por McKweon et al, 2004.	27
☞ Figura 12. Software BioEdit. Iniciadores diseñados utilizando bases degeneradas.	27
☞ Figura 13. Muestras sospechosas de TTSuV1.	28
☞ Figura 14. Estandarización de la PCR anidada.	28
☞ Figura 15. Recuperación de bandas.	29
☞ Figura 16. Software BioEdit. Se observan 5 secuencias del TTSuV1.	29
☞ Figura 17. Casos de PMWS.	30
☞ Figura 18. Casos de PDNS.	30
☞ Figura 19. Casos de FR-PCV2.	31
☞ Figura 20. Casos de fetos abortados negativos a FR-PCV2.	31

INTRODUCCIÓN

El Torque teno virus fue descubierto en muestras de pacientes humanos con hepatitis post transfusional de etiología desconocida en 1997 (Gallei *et al.*, 2010). En humanos los Torque teno virus han sido implicados en hepatitis, falla renal, neoplasias así como en el incremento de la severidad del asma, condiciones reumatoides y gastritis asociada a *Helicobacter pylori* (Savic *et al.*, 2010). El Torque teno sus virus fue identificado como una contraparte homóloga del TTV humano en los cerdos domésticos en Japón en 2002. Actualmente, con base al comité internacional de taxonomía viral, todos los virus TTV de humanos y de animales, incluyendo al TTSuV, son oficialmente asignados dentro de la nueva familia establecida *Anelloviridae* que incluye nueve géneros. El TTSuV pertenece al nuevo género *lotatorquevirus* con dos especies Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) y Torque teno sus virus 2 (TTSuV2) (Ting-Xiao *et al.*, 2012). Ambos virus TTSuV1 y TTSuV2 son caracterizados por una cadena sencilla circular de sentido negativo de genoma ADN de 2.9 kb con 4 marcos de lectura abiertos, ORF1, ORF2, ORF 1/1 y ORF 2/2 (antes ORF3) y una región alta en GC dentro de la región sin traducir (UTR). Por analogía con la anemia infecciosa aviar y el Circovirus porcino, se establece que el ORF1 codifica la proteína de cápside y la proteína de replicación (Huang *et al.*, 2010; Cortey *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011). El ARNm derivado del OFR1 es el más grande con una longitud variable de 1914-1950 nucleótidos (638-650 aminoácidos) en el TTSuV1 y de 1875-1884 nucleótidos de longitud (625-628 aminoácidos) en el TTSuV2, mientras que ARNm del ORF2 es el más pequeño con 69 aminoácidos para TTSuV2 y 73-74 aminoácidos para TTSuV1. Se postula que el ORF2/2 se genera después del empalme compartiendo a partir de la mitad 5' con el ORF2, y la otra mitad 3' comienza alrededor de la posición 2000 abarcando entre 400 nucleótidos (TTSuV2) y 500 nucleótidos (TTSuV1). El ORF2/2 codifica una proteína de función desconocida de 221-232 aminoácidos (TTSuV1) y 200-203 aminoácidos (TTSuV2). La UTR es de longitud variable, ocupando entre el 20 y el 29% de la totalidad del genoma. Adicionalmente ambos agentes poseen una gran proporción de posiciones variables, en el TTSuV1 (46.3%) contra el 23.9% del TTSuV2

(Cortey *et al.*, 2011). Por otra parte se han identificado 4 secuencias genómicas de larga duración de cepas de TTV porcino representando distintos genotipos (TTSuV1a y TTSuV1b) o subtipos (TTSuV2b y TTSuV2c) (Huang *et al.*, 2010). No obstante, se han descrito diferencias entre el TTSuV1 y el TTSuV2, principalmente en el tamaño. El TTSuV2 posee 2.7 a 2.8 kb (2735-2803 nucleótidos) y el tamaño del TTSuV1 es de 2.8 a 2.9 kb (2863-2913 nucleótidos). Esta diferencia se debe principalmente a varios grupos de inserción-supresión situadas alrededor de las posiciones 700-900, 1400-1500 y 1650-1750. Debido al bajo número de secuencias del genoma del TTSuV disponibles en las bases de datos y su limitado origen geográfico, la diversidad y la filogenia de este virus no han sido plenamente estudiadas (Cortey *et al.*, 2011).

El TTSuV1 es ubicuo en cerdos domésticos y salvajes, ha sido detectado en la población de cerdos en Europa (Hungría, Italia, Francia y España), Asia (China, Corea, Japón y Tailandia) y América (Canadá y EUA). Un estudio retrospectivo reveló la evidencia de infecciones por TTSuV en inicios de 1985 en granjas de cerdos en España (Segales *et al.*, 2009). La co-infección del TTSuV especie 1 (TTSuV1) con el especie 2 (TTSuV2) tiene una alta prevalencia en cerdos domésticos y ha sido documentado en todo el mundo. Recientemente, se ha demostrado la existencia de infecciones múltiples de TTSuV con distintos subtipos de la misma especie. En un estudio, se encontró una prevalencia del 31.5% para TTSuV1, 16.8% para TTSuV2 y una co-infección entre ambos del 32%. Sólo un 20% del total de las muestras fueron negativas a TTSuV (Huang *et al.*, 2010). Estudios realizados demostraron que la infección por TTSuV ocurre de manera variable. La transmisión entre cerdos se lleva a cabo principalmente por transmisión horizontal a través de la vía oro-fecal ya que el TTSuV se ha detectado en heces, aunque la transmisión por otras secreciones puede ser importante. En un estudio, se demostró la infección intrauterina y la presencia del virus en el calostro lo cual representa una relevante ruta pre y post-parto de infección vertical. Además se postula que la transmisión congénita puede ser posible ya que se ha detectado el TTSuV en semen. Estas múltiples rutas de

transmisión promueven una elevada tasa de prevalencia de ambas especies en el mundo y apoyan la creencia de que los TTSuV son altamente contagiosos.

Sin embargo, aún no se ha establecido si la infección por TTSuV causa una enfermedad específica como agente primario, y sigue siendo debatible debido a que el agente es ubicuo en cerdos saludables y domésticos en todo el mundo (Huang *et al.*, 2011). Sin embargo, se menciona que el TTSuV1 puede contribuir al desarrollo de enfermedades severas en co-infección con otros virus. Por otro lado, el TTSuV2 podría estar asociado al aborto involuntario en cerdas (Gallei *et al.*, 2010). Por otra parte, la infección experimental con el TTSuV1, en lechones gnotobióticos desarrolló neumonía intersticial, atrofia transitoria del timo, glomerulopatía e infiltrado linfocitario en el hígado (Krakowka *et al.*, 2008, Savic *et al.*, 2010). Se menciona que el potencial patogénico del Torque teno virus humano radica en que el ORF2 codifica una proteína que puede disminuir la expresión de IL-6 e IL-8 así como de la expresión de COX₂ a través de la interacción con IKK β y IKK α . Lo anterior sugiere que el papel de esta proteína radica en la regulación de la respuesta inmune innata y adaptativa del huésped y por ende, contribuye en la asociación y desarrollo de síndromes relacionados con otros agentes virales, pudiendo ser similar al Torque teno sus virus (Savic *et al.*, 2010). Se menciona que la probabilidad de causar o exacerbar enfermedades o síndromes específicos depende de la prevalencia relativa de las especies y/o de la carga viral del TTSuV en el huésped, tal y como se describe para el Circovirus porcino 2 (PCV2) (Gallei *et al.*, 2010).

A nivel mundial, el principal agente con el que se ha descrito una fuerte asociación es el PCV2, en sus diferentes presentaciones de enfermedad asociada a PCV2 (PCVAD, por sus siglas en inglés). De hecho, se ha propuesto que el TTSuV1 puede ser el factor adicional (factor X, Segales J, 2009) para el desarrollo de PCVAD, la cual presenta un alto impacto económico en la industria porcina al afectar los parámetros productivos y reproductivos. Las presentaciones de PCVAD descritas son; Síndrome Multisistémico de Emaciación Post-destete (PMWS), Síndrome de Dermatitis y Nefritis Porcino (PDNS), Falla Reproductiva asociada a PCV2 (FR-PCV2) y Enteritis Granulomatosa (EG) (Opriessnig *et al.*, 2010). El

PMWS es el cuadro más estudiado ya que fue el primero en que se estableció una asociación con el PCV2. Esta enfermedad afecta a cerdos de 7 a 16 semanas de edad que cursan con anorexia, baja progresiva de peso, letargia, diarrea, palidez e ictericia. El PDNS fue descrito en 1993 pero fue hasta el 2000 que se atribuyó la participación del PCV2. Esta condición es fatal en cerdos menores a 3 días pero afecta principalmente a cerdos de 5 semanas. El cuadro clínico cursa con fiebre, letargia, lesiones elevadas en la piel de color morado progresando a rojo purpura con costras principalmente en las patas traseras. En la actualidad, la falla reproductiva asociada a PCV2 (FR-PCV2) en cerdas es una presentación reconocida de PCVAD. Con base a estudios retrospectivos realizados en Canadá, no se encontraron casos de falla reproductiva asociados a la presencia de PCV2 anteriores al año 1999 (Bogdan *et al.*, 2001). La participación del PCV2 en casos de falla reproductiva ha sido corroborada en diversos estudios de casos naturales e infecciones experimentales (Ladekjare-Mikkelsen *et al.*, 2001; Sánchez, *et al.* 2001; Sánchez *et al.*, 2003; Pensaert *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2004; Madson *et al.*, 2009). En cerdas infectadas, el PCV2 es capaz de cruzar la placenta durante la viremia (Nielsen *et al.*, 2004; Madson *et al.*, 2009) y la transmisión de feto a feto es un fenómeno frecuente (Madson *et al.*, 2009). También se ha detectado la presencia de PCV2 en lechones nacidos vivos a partir de madres infectadas (Nielsen *et al.*, 2004; Allan *et al.*, 2000). En casos naturales de falla reproductiva se ha descrito que existe una alta relación entre la alta carga viral de PCV2 y la muerte fetal y/o presencia de lechones no viables sin participación de parvovirus porcino (vPPV) y virus de la encéfalomiocarditis/EMCV (Brunborg *et al.*, 2007). Microscópicamente, las lesiones fetales y neonatales características son miocarditis y encefalitis no supurativa en presencia de una consistente detección de PCV2 en los tejidos (Nielsen *et al.*, 2004; Mikami *et al.*, 2005). La EG es el cuadro endémico de la infección por PCV2 ya que la excreción de los agentes por vía fecal permite la diseminación y mantenimiento del agente viral circulando en la población porcina. Este síndrome afecta cerdos destetados de 40 a 70 días de edad que cursan con diarrea intermitente que va de café a amarillenta, pérdida de peso y retraso en el crecimiento, presentando un engrosamiento de la mucosa

intestinal, por tal motivo, es muy difícil establecer un diagnóstico diferencial macroscópico con *Lawsonia intracelularis*, siendo aún más complicado ya que existe una co-infección entre este agente bacteriano y el PCV2 hasta un 47% (García-Camacho *et al.*, 2006). Histológicamente las lesiones que se observan asociadas a la presencia de PCV2 en tejidos son depleción linfocítica en placas de Peyer aunado a una inflamación granulomatosa caracterizada por infiltrado de células gigantes multinucleadas. Las lesiones sólo se aprecian a nivel intestinal, no se observa afección sistémica (García-Camacho *et al.*, 2006).

Con respecto a la relación del TTSuV1 con la PCVAD, se ha asociado principalmente con casos naturales y experimentales de PMWS. La inoculación del TTSuV1 previa a la inoculación de PCV2 en cerdos gnotobióticos facilita el desarrollo de la enfermedad (Ellis *et al.*, 2008; Sibila *et al.*, 2009). En PMWS, la frecuencia de co-infección va desde el 33% hasta el 90% (McKweon *et al.*, 2004). En un informe, el 83% de los casos de PMWS presenta infección por TTSuV y, en estos casos, el 60% corresponde al TTSuV1, hasta el 70% al TTSuV2 y una proporción de co-infección por ambas especies del 55% (Kekarainen *et al.*, 2006). Por otro lado se ha podido reproducir el PDNS experimentalmente inoculando previamente al TTSuV1 (Krakowka *et al.*, 2008b). Con respecto a la relación del TTSuV1 con la FR-PCV2 no existen informes. Sin embargo, en un estudio realizado con cerdos gnotobióticos sanos se reportó transmisión transplacentaria de TTSuV1 y en 85.2% de esta población, se detectó al TTSuV1 en el suero y tejidos de lechones (Krakowka *et al.*, 2009). En otros estudios, también se sugiere una transmisión transplacentaria mediante la detección del TTSuV1 en sangre de cordón umbilical (Martínez *et al.*, 2009; Kekarainen *et al.*, 2006). En relación a la EG no hay datos ni estadísticas que mencionen si existe una relación entre estos dos agentes; el PCV2 como posible agente primario y el papel que pueda jugar el TTSuV1 en este síndrome.

Debido a que tanto el PCV2 como el TTSuV son ubicuos en la población porcina, aún no se descubre cual o que desencadena la enfermedad ya que no todos los cerdos se afectan. Por tal motivo, la forma más correcta de poder emitir un diagnóstico positivo de PCVAD consiste en cumplir con tres criterios: signos

clínicos compatibles, lesiones histopatológicas características de PCV2 y la presencia del PCV2 asociada a las lesiones microscópicas detectada por hibridación *in situ* o inmunohistoquímica. Estos tres criterios separados no son diagnóstico de PCVAD (Chae *et al.*, 2005). De este modo, la hibridación *in situ* tomó un papel importante para el diagnóstico correcto de esta enfermedad no solamente por la especificidad sino por la sensibilidad de la prueba, además de ser aceptada a nivel internacional (Kim y Chae *et al.*, 2005). Sin embargo la capacidad de diagnóstico del TTSuV es limitada. En la actualidad no existe un sistema de cultivo celular o ensayo serológico disponible. Por tal motivo, el diagnóstico del TTSuV se realiza por PCR tradicional, PCR anidado o ensayos de Rollingcircle (Gallei *et al.*, 2010). Estudios han demostrado una prevalencia del 31.5% para TTSuV1 y 16.8% para TTSuV2 y una co-infección entre ambos del 32% y un 20% de negativos del total de muestras (Huang *et al.*, 2011). Carga viral de $10^{4.37}$ para TTSuV1 y $10^{4.14}$ para TTSuV2 (por ml de suero). Homología entre especies del 48% de los nucleótidos y un 32% en la secuencia de aminoácidos de las proteínas virales (Gallei *et al.*, 2010).

En México, la PCVAD tiene un impacto económico importante y han sido confirmadas por HIS las presentaciones de PMWS, PDNS, enteritis granulomatosa y FR-PCV2 (García-Camacho *et al.*, 2006). Los informes de casos compatibles con presencia de lechones con muerte neonatal alrededor de los 3 días de nacidos (lechones no viables) en camadas selectas de granjas de cerdos sin la participación del virus del Síndrome respiratorio y reproductivo porcino (vPRRS) y el Parvovirus porcino (vPPV). En dichas camadas, hubo presencia de lesiones características (miocarditis, hepatitis y encefalitis no supurativas) y detección de PCV2 por aislamiento viral, PCR e HIS (García-Reyna *et al.*, 2004). La presencia de PCV2 en casos de FR ha sido confirmada a lo largo república Mexicana particularmente en los estados del centro del país (Guanajuato, Michoacán y Jalisco) en donde se localizan las mayores áreas de producción porcina (Quintero *et al.*, 2010). Así mismo, se ha determinado que en nuestro país existe un alto porcentaje (39%) de casos compatibles con falla reproductiva asociada a PCV2 (FR-PCV2) y una alta proporción (47%) de transmisión transplacentaria mediante

detección de PCV2 por hibridación in situ (HIS) y presencia de miocarditis no supurativa en tejidos cardiacos fetales y neonatales procedentes de casos naturales de falla reproductiva (Enriquez R.K., 2009; Enriquez *et al.*, 2010). No hay reportes de co-infección en FR-PCV2 con el TTSuV1. Aunque los reportes en países europeos y de Norteamérica sugieren que ambos agentes etiológicos se encuentran muy relacionados pudiendo favorecer o incrementar la severidad de los casos de PCVAD, no existe información disponible acerca de la presencia de TTSuV1 o de su asociación con el desarrollo de PCVAD en México.

OBJETIVOS

GENERAL

- Ⓢ Evaluar la presencia de TTSuV1 en la población porcina nacional.
- Ⓢ Determinar la relación del TTSuV1 en casos de PCVAD.

PARTICULARES

- Ⓢ Estandarizar una técnica de PCR anidado utilizando casos sospechosos de la presencia de TTSuV1.
- Ⓢ Secuenciar los productos amplificados de TTSuV1.
- Ⓢ Evaluar la presencia de TTSuV1 mediante la implementación de la técnica de PCR anidado en casos comprobados de PCVAD procedentes de diferentes estados de la República Mexicana durante el periodo de 2001-2009.
- Ⓢ Establecer la relación del TTSuV1 con el desarrollo de la PCVAD.

HIPÓTESIS

- Ⓢ Si la ubicuidad del TTSuV1 es similar a la del PCV2, entonces el virus estará presente en tejidos procedentes de casos de PCVAD.
- Ⓢ Si el TTSuV1 está presente en alta proporción en casos de PCVAD, entonces está relacionado con la presentación de PCVAD.

MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL

Con el fin de establecer la presencia y relación del TTSuV1 en casos de PCVAD durante el periodo de 2001-2009, 100 tejidos incluidos en parafina (68 con lesiones características y positivos a PCV2 por hibridación *in situ* y 32 tejidos no afectados, negativos a PCV2) fueron evaluados para la presencia de TTSuV1 mediante PCR anidado utilizando iniciadores descritos en la literatura e iniciadores con bases degeneradas. Posteriormente, los productos amplificados del tamaño esperado fueron purificados y se realizó la secuenciación de un producto seleccionado para corroborar la presencia de TTSuV1. Los casos de PCVAD fueron representativos de una forma clínica particular con base a los criterios diagnósticos de PCVAD (19 casos de PMWS, 4 de PDNS y 45 de FR-PCV2). Los tejidos no afectados (PCVAD-no afectados) procedían de animales clínicamente sanos y/o sin lesiones histopatológicas características de PCVAD. Se realizaron tablas de contingencia de 2X2, considerando el estatus de PCVAD y de TTSuV1 para evaluar la relación por prueba de χ^2 .

SELECCIÓN DE CASOS

Los casos positivos a PCVAD (PCVAD-afectados) fueron seleccionados con base a los criterios diagnósticos de: 1. signología clínica, 2. lesiones histopatológicas características conforme a las presentaciones clínicas y, 3. HIS positiva a PCV2 ya que dichos criterios por sí solos no establecen el diagnóstico de PCVAD. Los casos de PMWS presentaron depleción linfocítica severa e inflamación granulomatosa en tejido linfocítico (Fig. 1), patrón difuso de hibridación (Fig. 2), y/o presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos múltiples en racimos (Fig. 6). Los casos de PDNS exhibieron depleción linfocítica multifocal (Fig. 3), con presencia de células gigantes multinucleadas (Fig. 4), patrón de hibridación multifocal (Fig. 5) así como vasculitis necrotizante dérmica y glomerulitis. Los casos de FR-PCV2 exhibieron miocarditis no supurativa en tejido fetal (Fig. 7) y patrón aleatorio de hibridación (Fig. 8).

EXTRACCIÓN DE ADN DE TEJIDOS PARAFINIZADOS.

De los tejidos incluidos en parafina seleccionados, se realizaron cortes de 20 μm los cuales se depositaron en tubos eppendorf estériles. Con los cortes, se realizó la extracción de ADN utilizando un juego de reactivos comercial (QIAamp DNA FFPE Tissue kit, Qiagen, Germany). Brevemente el corte de parafina se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml. y se le adicionó 1 ml de Xileno y se agitó vigorosamente con un vortex (Scientific industries) durante 10 seg. Posteriormente, se centrifugó a 15,000 x g por 2 min a temperatura ambiente y se removió cuidadosamente el sobrenadante con una micropipeta para adicionar 1 ml de etanol absoluto y mezclar en el vortex y centrifugar a 15,000 x g por 2 min a temperatura ambiente. Una vez centrifugado, se retiró el sobrenadante con una micropipeta sin mezclar el fondo con el tejido y se incubó por 10 min a 37°C. Acto seguido, se agregaron 180 μl del buffer ATL y 20 μl de proteinasa K y la mezcla se agitó con el vortex para incubar en el Thermomixer (Eppendorf Hamburg, Germany) por 1 hr a 56°C seguido de una incubación por 1 hr a 90°C. Al finalizar la incubación, se adicionaron 200 μl del buffer AL, se agitó en el vortex y se adicionaron 200 μl de etanol absoluto y la mezcla se agitó en el vortex. Posteriormente, el lisado completo ($\pm 600 \mu\text{l}$) se transfirió cuidadosamente a una columna MinElute con un tubo colector y sin tocar el borde y se centrifugó a 15,000 x g por 1 min. El tubo colector se eliminó para colocar uno nuevo y adicionar sin tocar los bordes y en el centro de la columna, 500 μl del buffer AW1. La columna se centrifugó a 15,000 x g por 1 min y nuevamente se eliminó el tubo colector y se colocó uno nuevo para adicionar sin mojar los bordes y al centro de la columna, 500 μl del buffer AW2 y centrifugar a 15,000 x g por 1 min. Tras eliminar el tubo colector y colocar uno nuevo, se centrifugó a 15,000 x g por 3 min para secar la membrana y eliminar el tubo colector, y colocar uno nuevo. Posteriormente, se adicionaron 100 μl del buffer ATE al centro de la membrana, se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 15,000 x g por 1 min para eliminar la columna MinElute. El ADN contenido en el tubo colector, se almacenó a -20°C hasta su uso. La concentración de ADN se cuantificó por espectrofotometría (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Germany).

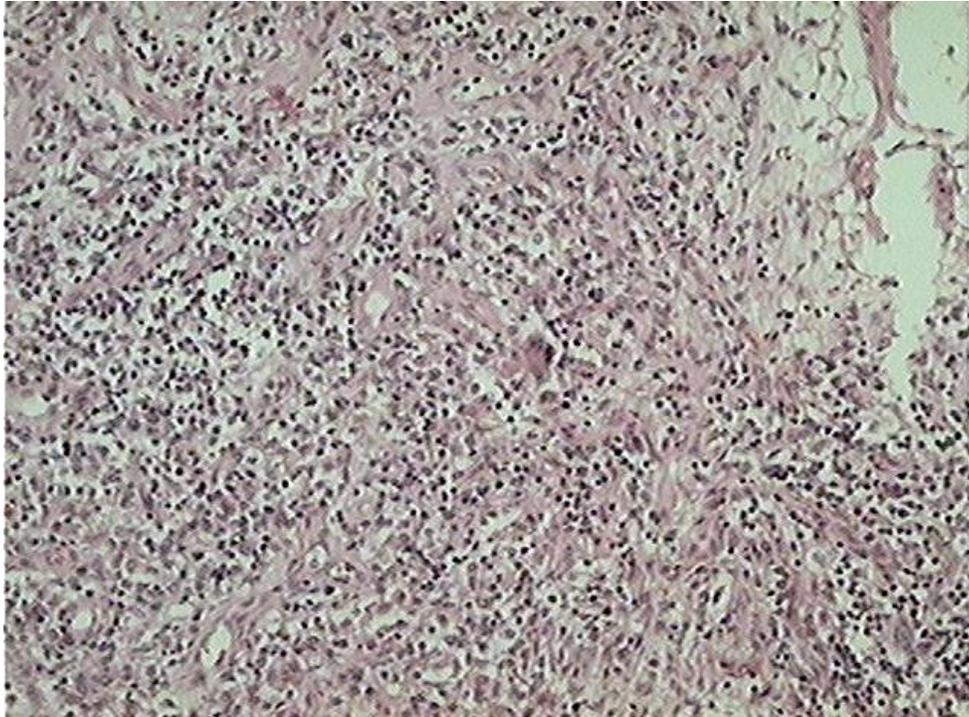


Figura 1. PMWS: Depleción linfoide severa y linfadenitis granulomatosa difusa severa. Nótese la marcada disminución de la población linfoide. Linfonodo, 100 x. H-E
Cortesía: Dra. Lucía A. García Camacho

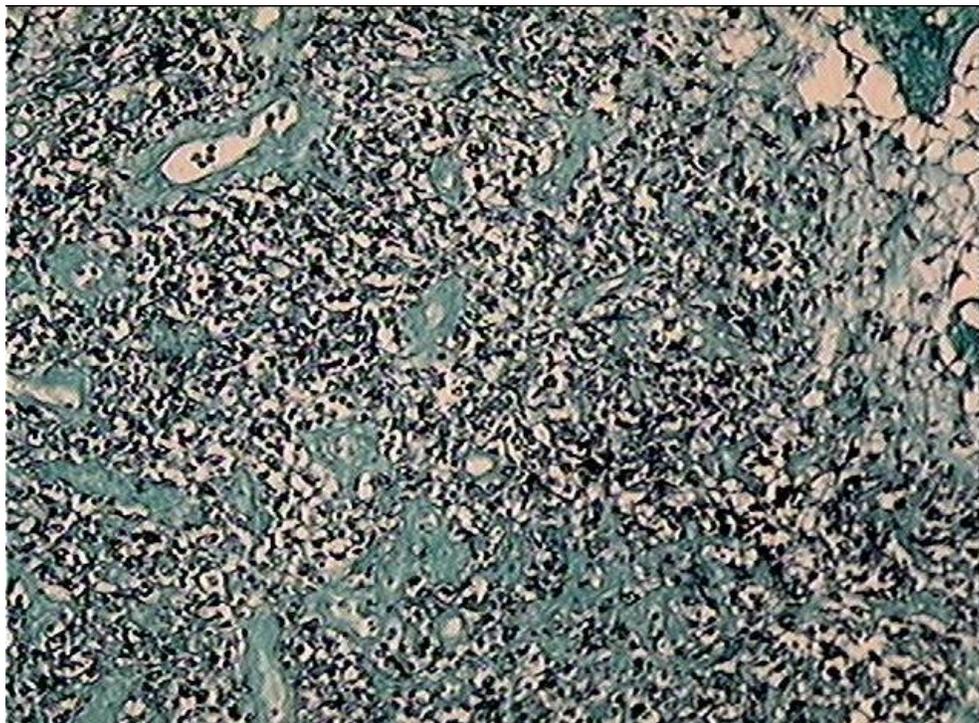


Figura 2. PMWS: Patrón de hibridación difuso positiva a PCV2. Linfonodo, 100x. Verde rápido.
Cortesía: Dra. Lucía A. García Camacho

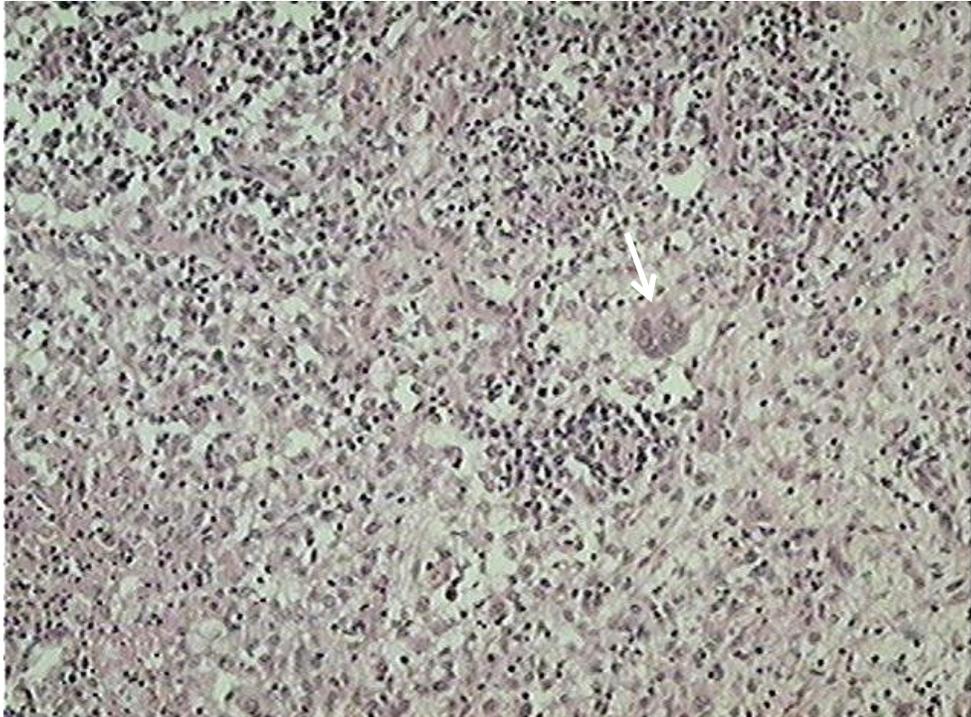


Figura 3. PDNS: Depleción linfoide multifocal y linfadenitis granulomatosa. Se aprecia una célula gigante multinucleada (Inserto). Linfonodo, H-E.
Cortesía: Dra. Lucía A. García Camacho

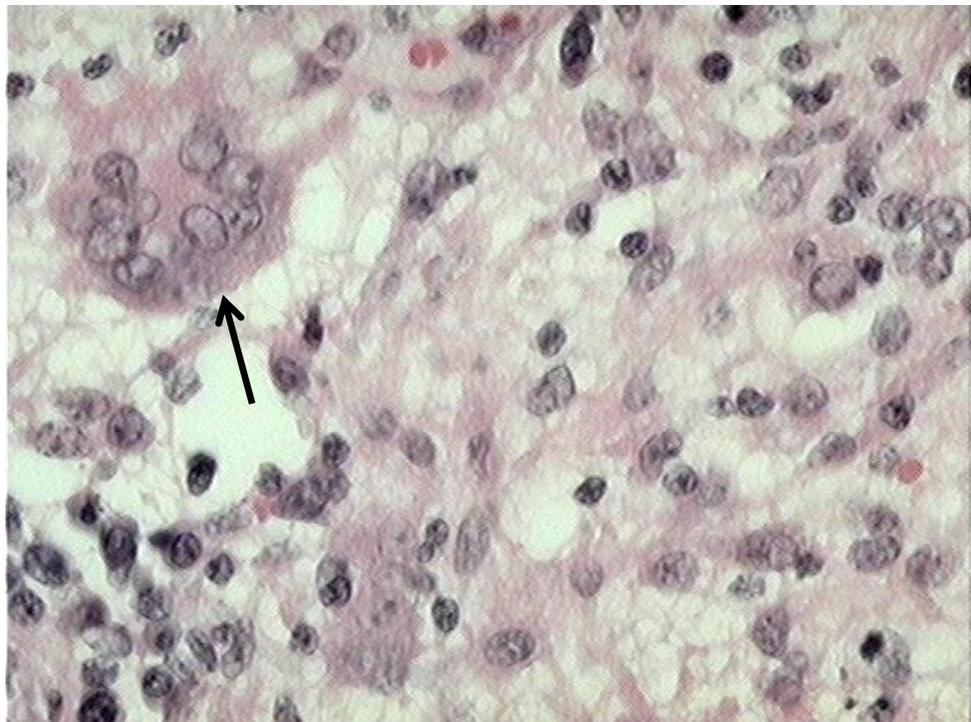


Figura 4. PDNS: Acercamiento del inserto de la figura 3, Sincitios celulares (flechas) entremezcladas con células epitelioides. Linfonodo, 400x H-E.
Cortesía: Dra. Lucía A. García Camacho

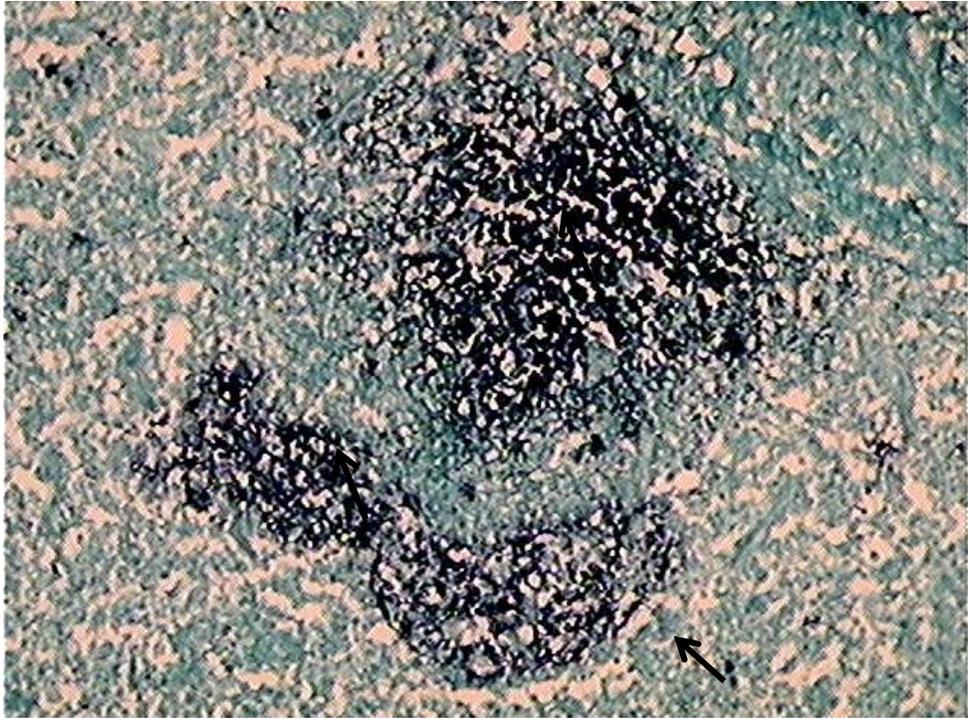


Figura 5. PDNS: Patrón de hibridación multifocal positiva a PCV2. Linfonodo, 100x. Verde rápido.
Cortesía: Dra. Lucía A. García Camacho

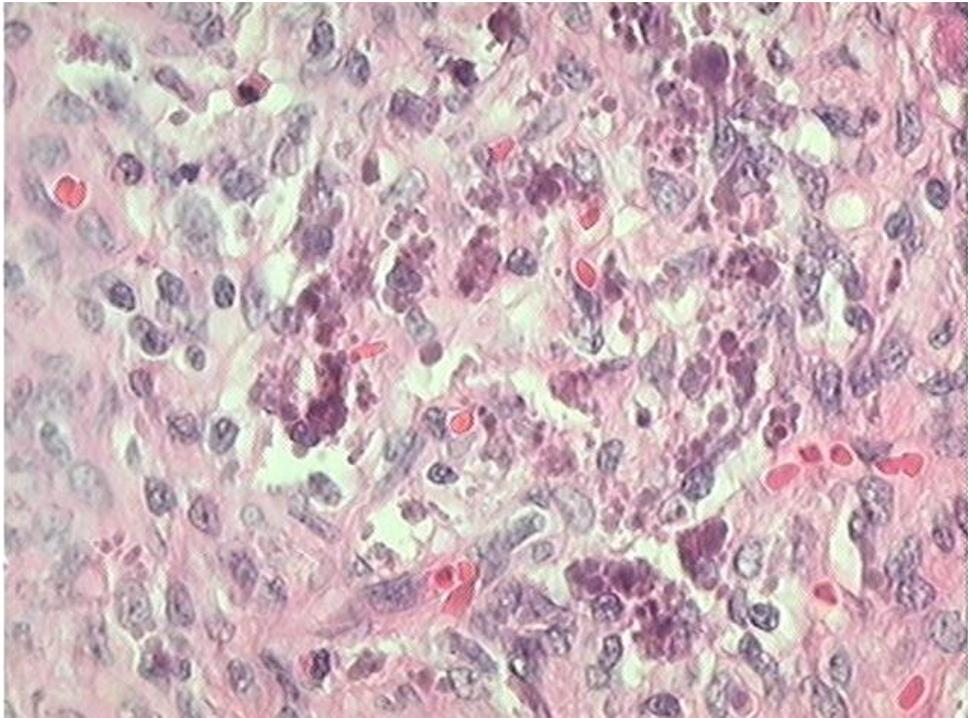


Figura 6. Cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos basofílicos en racimo en macrófagos (flechas). Linfonodo, 400x. H.E.
Cortesía: Dra. Lucía A. García Camacho

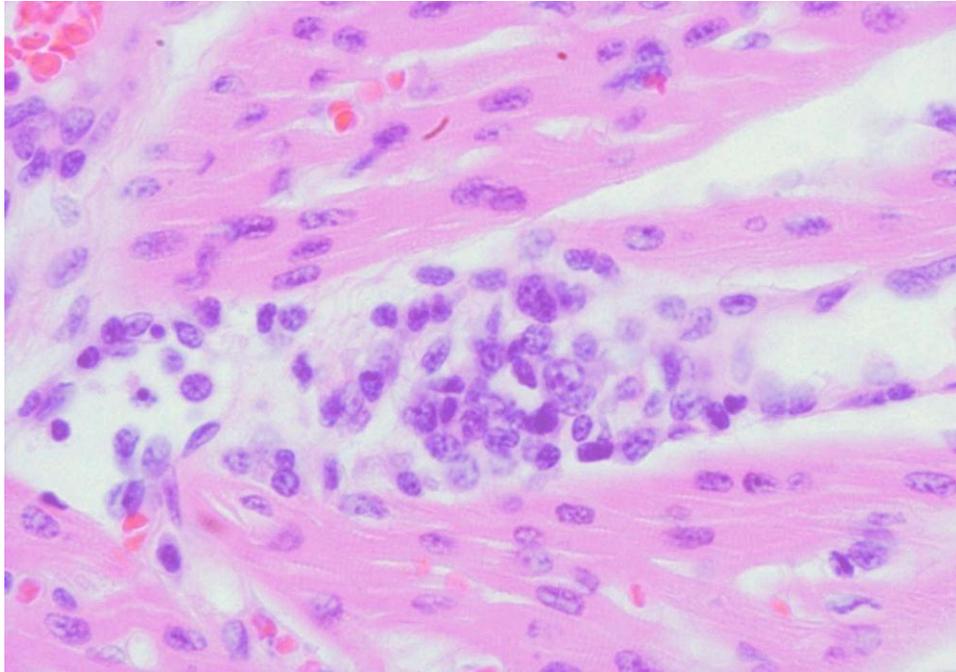


Figura 7. FR-PCV2: Miocarditis no supurativa perivascular. Miocardio, 400x. H-E.
Cortesía: Dra. Lucía A. García Camacho

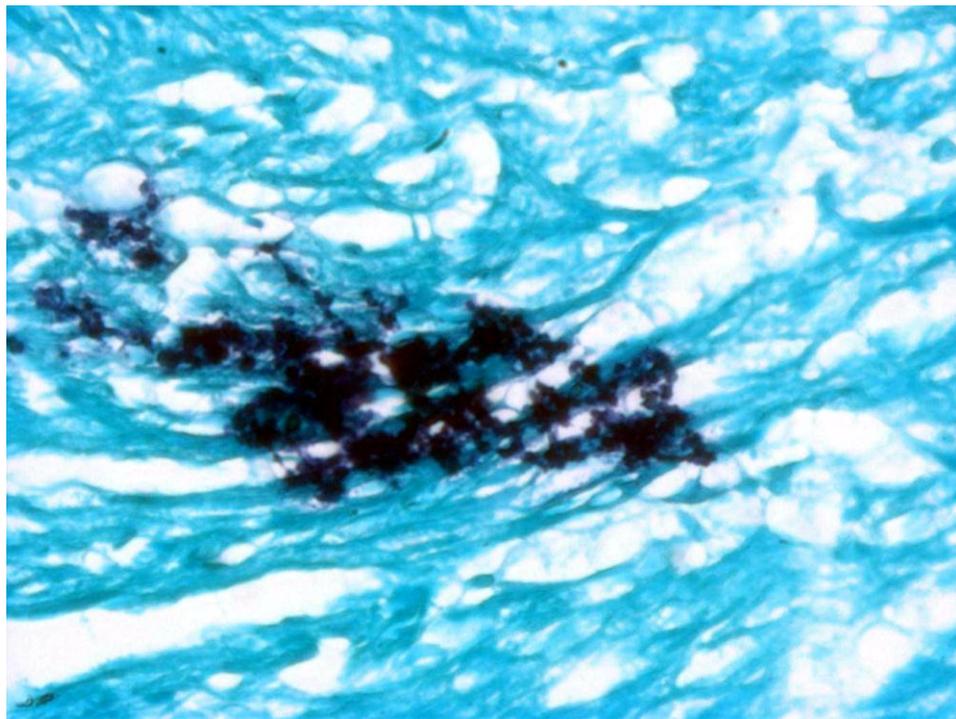


Figura 8. FR-PCV2: Señal de hibridación positiva a PCV2 en miocardiocitos. Corazón, 400x. Verde rápido.
Cortesía: Dra. Lucía A. García Camacho

DISEÑO DE INICIADORES

Para el diseño de iniciadores se utilizó el software BioEdit. Se compararon 10 secuencias del TTSuV1 de distintos países: 1 de China (HQ204188), 2 de Brasil (NC014092, AY823990), 1 de Japón (NC014480), 2 de Alemania (GU188046, GU188045), 3 de EUA (GU456386, GU456383, GU456384) y 1 de Canadá (GQ120664) en el GenBank para evaluar las regiones más conservadas y seleccionar las secuencias adecuadas para el diseño de iniciadores. Con base a la variación genómica observada se decidió utilizar solo 5 secuencias ya que las elegidas presentaban menor variabilidad, así como menor dificultad por parte del software para alinearlos, y se le dio preferencia a las secuencias de los países del continente (Brasil, Canadá, 2 de EUA y Alemania), los iniciadores se diseñaron en el esquema de bases degeneradas los cuales se enviaron a sintetizar (IDT Integrated DNA Technologies).

PCR ANIDADO

El ADN genómico se utilizó como templado en la PCR anidada para determinar la presencia del TTSuV1. Se utilizaron iniciadores que amplifican productos de 412pb y 218 pb, respectivamente (Tabla 1) y condiciones de amplificación descritas (McKweon *et al.*, 2004) y mediante el uso de dichos iniciadores, se realizaron gradientes de temperatura y curvas de concentración de cloruro magnesio para estandarizar las condiciones de amplificación. Así mismo, con los iniciadores diseñados los cuales amplifican productos de 481pb y 255pb, respectivamente (Tabla 1), se estandarizó la PCR anidada en reacciones de 50 µl. Brevemente, en un tubo Eppendorf de 0.2 ml se mezclaron los iniciadores específicos 1 µM con 1U de Taq DNA polimerasa, Buffer Standard de PCR, MgCl₂ 2.5 mM, dATP 0.2 mM, dCTP 0.2 mM, dGTP 0.2 mM, dTTP 0.2 mM, y 20 ng de templado. La mezcla se homogenizó y se colocó en el termociclador MasterCycler Gradient (Eppendorf Hamburg, Germany). Se realizaron 40 ciclos a temperaturas de 94°, 56° y 72° correspondientes a desnaturalización, alineación y extensión respectivamente.

Tabla 1. Iniciadores utilizados para TTSuV1	
Iniciadores descritos por McKweon <i>et al.</i> , 2004	
Forward	Nucleótido 1 – 24 5'-TACACTTCCGGGTTTCAGGAGGCT-3'
Reverse	Nucleótido 296 – 319 5'-GAGTGCAGTTCCGAATGGCTGAGT-3'
Forward nested	5'-CAATTTGGCTCGCTTCGCTCGC-3'
Reverse nested	5'-CGTTCCCACTAAAGTGAATATAAGTGAGTGCAGT-3'
Iniciadores diseñados en BioEdit	
Forward	Nucleótido 509 – 528 5'-AACTGGCAGGACCCACCTATG-3'
Reverse	Nucleótido 903 – 931 5'-AGTGTBACHTCHCCACTYC-3'
Forward nested	5'-AAAGAGACGCTATGGCTGGA-3'
Reverse nested	5'-TGYTTTTTCWGTGTCCCAYTGC-3'

VISUALIZACIÓN DE PRODUCTOS

La visualización de los productos amplificados se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con solución amortiguadora Tris 1M, ácido bórico anhidro 1M, Na₂ EDTA 2H₂O 20M (TBE, Promega Corp. Madison, WI, USA) teñido con 4 µl de bromuro de etidio (Promega Corp. Madison, WI, USA). En el llenado se los pozos se utilizaron 4µl de cada mezcla con 4µl del amortiguador de corrida (Glycerol 50% v/v, Na₂ EDTA 2H₂O 100mM, duodecil sulfato de sodio 1% w/v, azul de bromofenol 0.1% w/v) y un marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder, PromegaCorp, Madison WI, USA). El gel se corrió a 80 volts durante 60 minutos y los productos se visualizaron en un transiluminador de luz UV (Apollo, Instrumentation, Claremont CA, USA).

RECUPERACIÓN DE PRODUCTOS AMPLIFICADOS

Con los productos amplificados en el gel de agarosa al 1.5%teñido con bromuro de etidio en condiciones de esterilidad se realizó la recuperación de las bandas

utilizando un juego de reactivos comercial (MinElute Gel Extraction kit, Qiagen, Germany). Brevemente, se seccionó el gel con una navaja de bisturí estéril alrededor de la banda y esta se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml para pesarla. Posteriormente, se agregaron 300 µl de buffer QG y la mezcla se incubó en un Thermomixer (Eppendorf Hamburg, Germany) a 250 rpm a 50°C a durante 10 min. Una vez disuelto el gel, se adicionaron 100 µl de isopropanol y se mezcló por inversión para transferir la mezcla a una columna MinElute y centrifugar a 20,000 x g por 1 min. El filtrado se eliminó y se colocó el mismo tubo colector para adicionar 500 µl de buffer QG a la columna y centrifugar nuevamente a 20,000 x g por 1 min. Posterior a la eliminación del filtrado, se colocó el mismo tubo colector a la columna para adicionar 750 µl de buffer PE y centrifugar a 20,000 x g por 1 min, eliminar lo filtrado y colocar el mismo tubo colector a la columna y centrifugar nuevamente a 20,000 x g por 1 min para secar la membrana. Por último, se colocó la columna MinElute en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml y se agregaron 10 µl de buffer EB directamente en la membrana, se incubó por 1 min y se centrifugó a 20,000 x g por 1 min. Acto seguido, se elimina la columna MinElute, y el filtrado se almacenó a -20°C hasta su uso.

SECUENCIACIÓN

La amplificación de ADN se realizó por medio de estuches que contienen enzimas de alta fidelidad, procesividad y especificidad requeridas en secuenciación y clonación molecular. Se emplearon iniciadores específicos para amplificar regiones genéticas del TTSuV1. Los productos de amplificación fueron purificados y secuenciados para ambas cadenas empleando estuches de secuenciación BygDye V3.1, y utilizando el secuenciador 3100 (Applied Biosystems).

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se realizaron cuadros de contingencia de 2x2 así como una Ji cuadrada para evaluar la relación TTSuV1-PCV2.

RESULTADOS

Los ensayos de PCR realizados con los iniciadores y condiciones de amplificación de TTSuV1 descritas por McKweon (2004) los cuales no amplificaron productos del tamaño esperado (218 pb) pero se observaron amplificaciones inespecíficas (Fig. 9). Por tal motivo, se realizaron amplificaciones adicionales utilizando ADN procedente de otros casos sospechosos a la presencia de TTSuV1 (casos de PMWS, PDNS y FR-PCV2) en las cuales se establecieron gradientes de temperatura (Fig. 10) y curvas de concentración de cloruro magnesio con los iniciadores referidos. En ambos procedimientos, persistió la amplificación de productos inespecíficos, impidiendo la discriminación de productos con el tamaño esperado a pesar de tener bandas sospechosas (218 pb) utilizando temperaturas de alineación de 52° C y 53.8° C (Fig. 10). Posteriormente, se evaluaron los iniciadores descritos por McKweon *et al.*, 2004 mediante el software BioEdit (Ibis Biosciences, California, EUA) con el fin de compararlos con las secuencias del TTSuV1 disponibles en el GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI). En la comparación realizada con secuencias procedentes de 5 países (Alemania, 2 de EUA, Canadá y Brasil). Se pudo apreciar que los sitios de unión al genoma viral del iniciador reverse anidado era muy variable (Fig. 11). Por esta razón, se diseñaron nuevos iniciadores utilizando el esquema de bases degeneradas (Fig. 12). Con los iniciadores degenerados diseñados, se procedió a determinar las condiciones óptimas para la amplificación de productos de 255 pb, iniciándose con una amplificación estándar a 56° C (Fig. 13) que utilizó el ADN de la muestras sospechosas utilizadas con los iniciadores de McKweon. En dicha amplificación, se obtuvieron productos del tamaño esperado aún en presencia de amplificaciones inespecíficas (Fig. 14) mismas que se resolvieron mediante la realización de una curva de concentración de cloruro de magnesio. Posteriormente, con las condiciones establecidas se realizaron amplificaciones con otras muestras sospechosas (Fig. 15). Al obtener bandas positivas estas se recuperaron y purificaron para su posterior secuenciación en 2 casos, utilizando el iniciador forward y reverse del anidado y se obtuvo que la secuencia corresponde al genoma del TTSuV1 al alinear la secuencia en el software BioEdit (Fig. 16),

observándose una zona conservada y una casi perfecta similitud con las secuencias comparadas principalmente con la de Alemania.

Una vez que se determinaron las condiciones óptimas de amplificación y la especificidad de la misma, se implementó la PCR anidada en los casos seleccionados de PCVAD. Se obtuvieron 35 casos positivos a TTSuV1, de los cuales se recuperarán las bandas del gel de agarosa al 1.5% (Fig. 15).

Con respecto a la evaluación retrospectiva de la presencia de TTSuV1 en casos de PCVAD diagnosticados en nuestro laboratorio, las muestras de tejido del 2001 procedentes de casos de PMWS y del 2004 de FR-PCV2 fueron consistentemente negativas a TTSuV1. Los casos TTSuV1⁺ fueron detectados a partir del 2003 en casos de PMWS y de PDNS. Los estados de la República Mexicana en los que se detectó la presencia de TTSuV1 fueron Chiapas, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Puebla, Queretaro, Sonora, Veracruz y Yucatán. Los productos amplificados de TTSuV1 de los casos representativos de PMWS, de PDNS y de FR-PCV2 se muestran en las figuras 17, 18, 19 y 20, respectivamente.

De los cien casos seleccionados, 68 correspondieron a casos de PCVAD y 32 procedieron de tejidos no afectados por PCV2. Del total de muestras, 35% fueron positivos a TTSuV1. Del total de casos de PCVAD 36.8% (25/68) fueron TTSuV1⁺ así como 33.3% (10/32) de los tejidos no afectados (Tabla 2). Con respecto a las presentaciones seleccionadas de PCVAD, del total de los casos agrupados de PMWS/PDNS (Tabla 3), 13/35 (37.1%) fueron TTSuV1⁺. De los 23 casos de tejidos afectados por PCV2, 10 (43.5%) exhibieron productos de 255 pb mientras que en 25% (3/12) de los tejidos no afectados por PCV2 no se amplificaron productos. Cabe señalar que 3 de los 4 casos de PDNS (75%) y 7 de 19 casos de PMWS (36.8%) en este grupo, fueron positivos a TTSuV1. La frecuencia de los casos de falla reproductiva en cerdas se muestra en la Tabla 4, en la que se aprecia que el 33.85% (22/65) del total de casos y 33.3% (15/45) de los casos de FR-PCV2, fueron TTSuV1⁺. Así mismo, 7 de los 20 casos de falla reproductiva que no fue asociada a PCV2 (35%) fueron TTSuV1⁺. El análisis de los resultados

mediante la prueba de Ji^2 de cada tabla demostró que no existe relación entre la presentación de PCVAD y la presencia del TTSuV1.

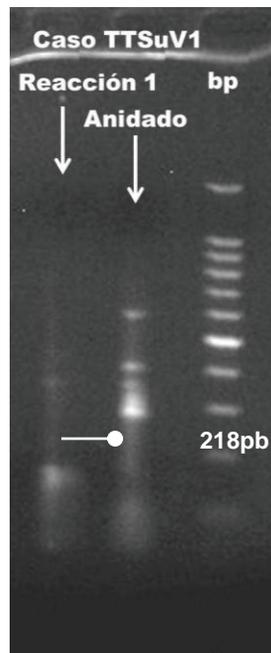


Figura 9. PCR anidado de casos sospechosos de TTSuV1 (Gel de agarosa al 1.5%, 1.5 mM $MgCl_2$). Reacción 1 y anidada con un caso sospechoso de TTSuV1 utilizando los iniciadores y condiciones descritas por Mckweon *et al.*, 2004. Observándose bandeos inespecíficos y ninguno correspondiente al tamaño esperado (inserto).

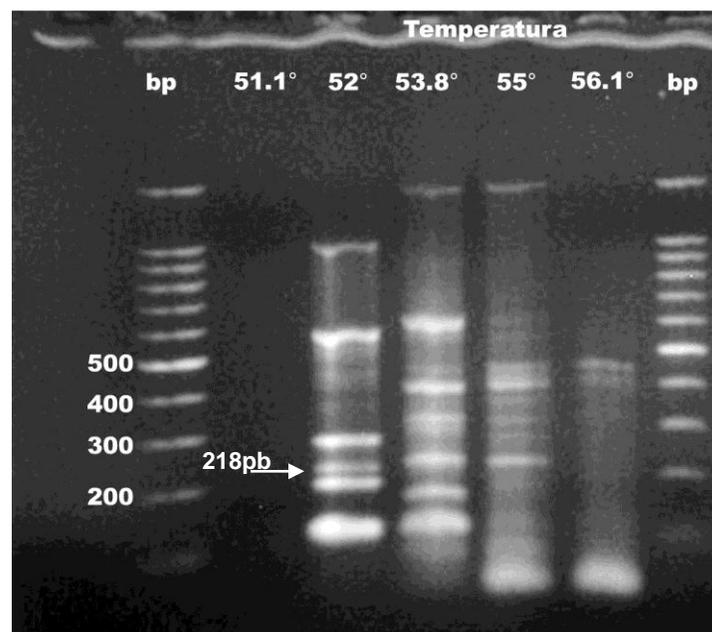


Figura 10. Gradientes de temperatura (Gel de agarosa al 1.5%, 1.5 mM de $MgCl_2$). Reacción anidado de un caso sospechoso a TTSuV1 en condiciones de amplificación descritas por Mckweon *et al.*, 2004. Observándose bandeos inespecíficos en todas las temperaturas. Nótese en el carril 2 una banda del tamaño esperado (flecha).

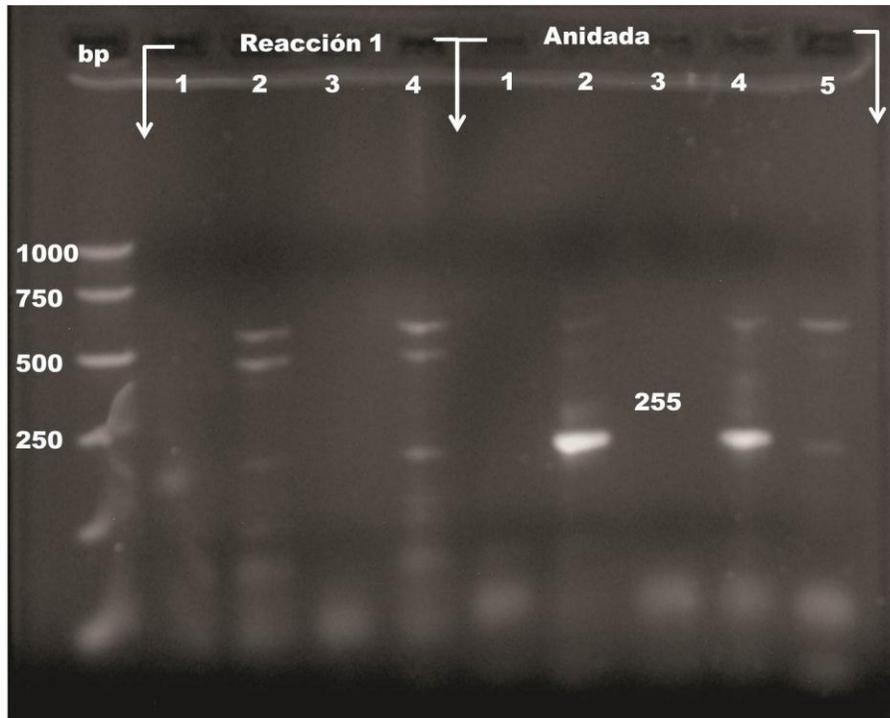


Figura 13. Muestras sospechosas de TTSuV1 (Gel de agarosa al 1.5%, reacciones a 56° y 1.5 mM de MgCl₂). Reacción 1 y anidada que muestra una banda intensa en el tamaño esperado (255 pb) con un escaso y tenue bandeado utilizando los iniciadores diseñados en BioEdit utilizando bases degeneradas.

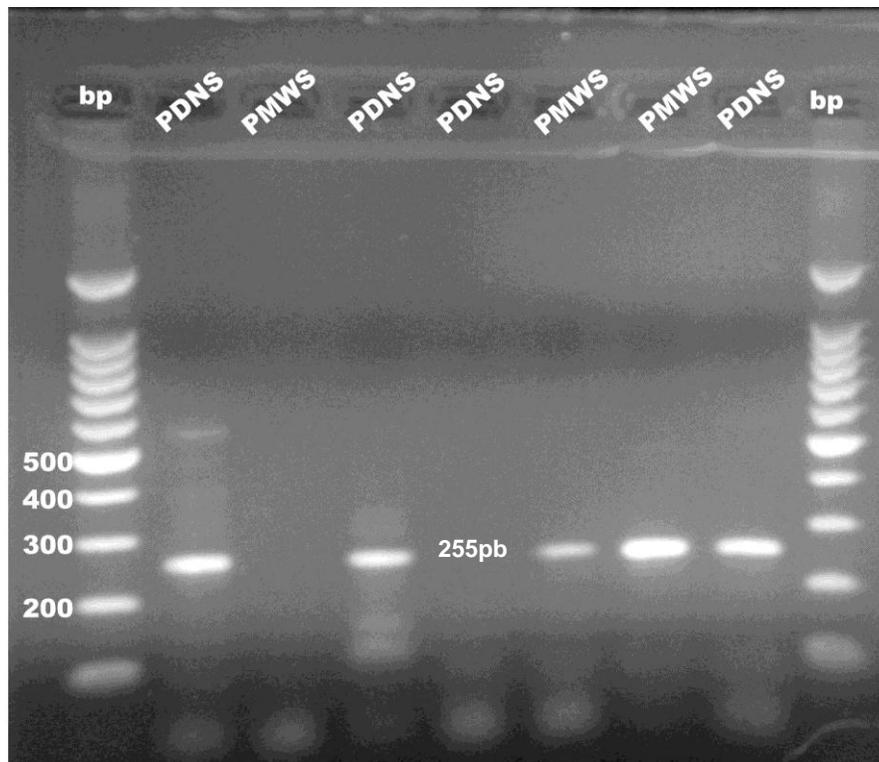


Figura 14. Estandarización de la PCR anidada (Gel de agarosa al 1.5%, T 56°C y 2.25 mM de MgCl₂). Reacción anidada de casos sospechoso a TTSuV1 utilizando casos de PCVAD. Observándose una sola banda en casos positivos y ausencia en los negativos

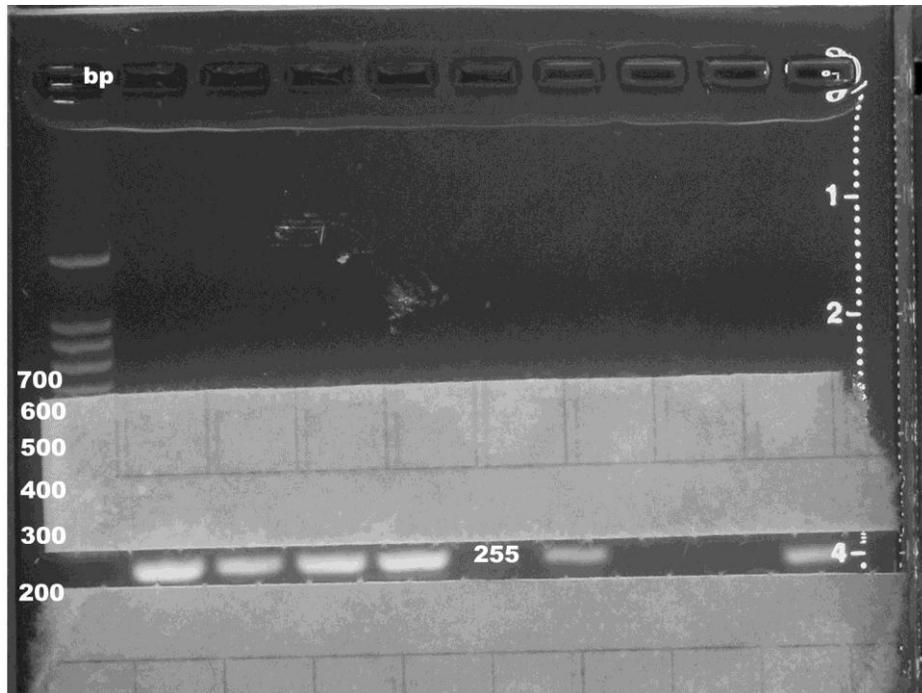


Figura 15. Recuperación de bandas (Gel de agarosa al 1.5%) se observan bandas claras de 255 pb, Gel realizado en condiciones de esterilidad para recuperar las bandas para su posterior secuenciación.

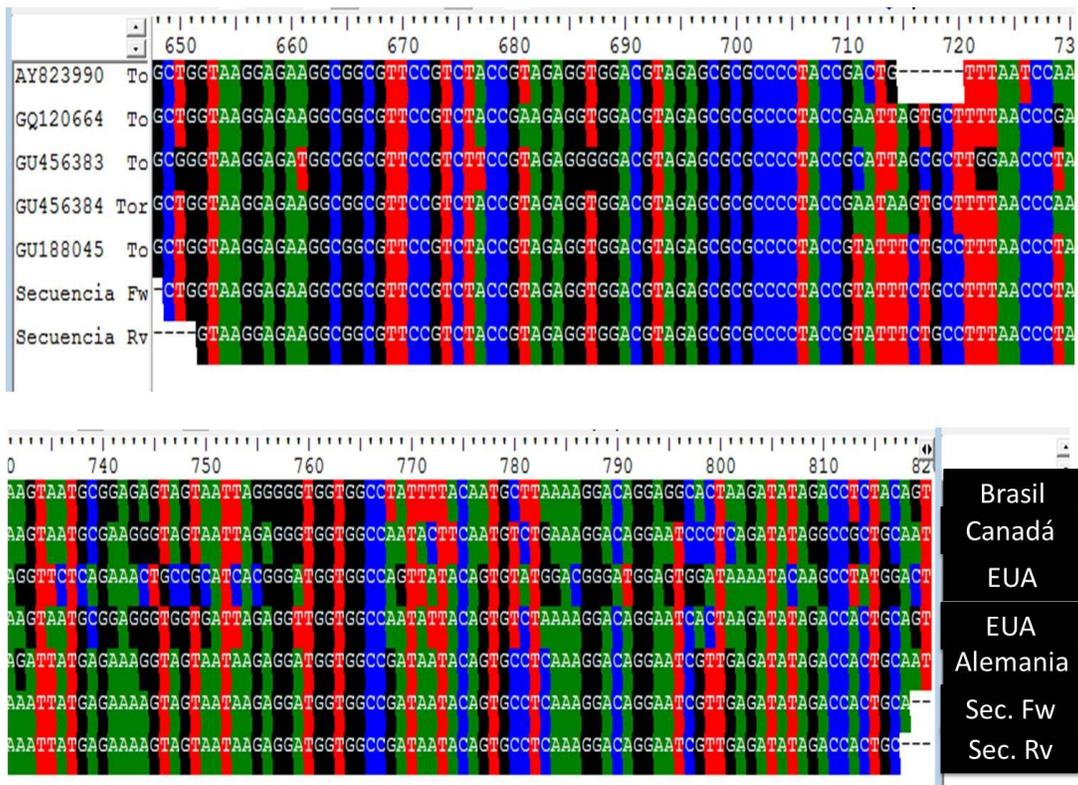


Figura 16. Software BioEdit. Se observan 5 secuencias del TTSuV1 de distintos países y sus respectivos números de acceso, se encuentran alineados entre el nucleótido 649 al 820 mostrando la hibridación con las secuencias obtenidas a partir de las 2 bandas recuperadas utilizando el iniciador forward y reverse del anidado respectivamente. Contemplando que la secuencia obtenida corresponde al TTSuV1.

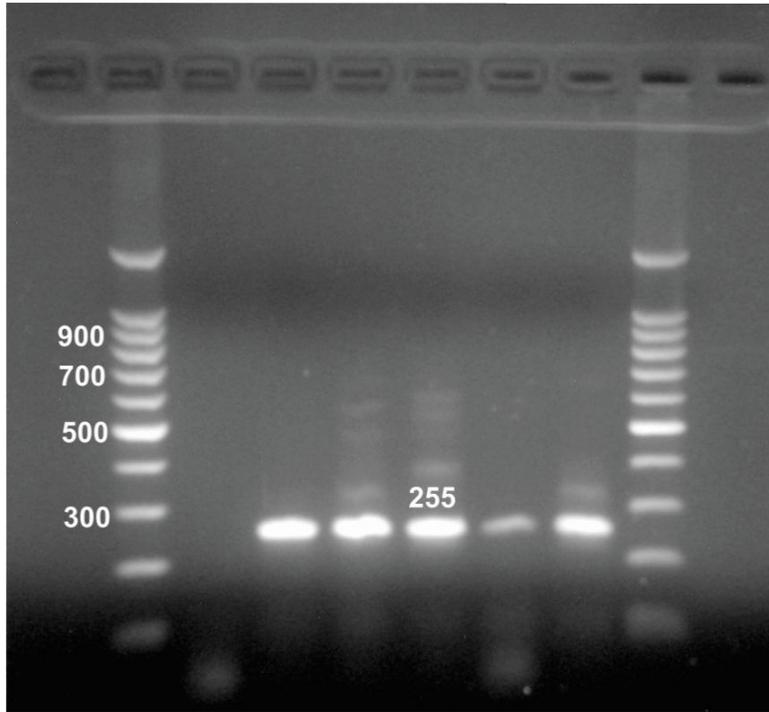


Figura 17. Casos de PMWS (Gel de agarosa al 1.5%, 2.25 mM de MgCl₂) se observan bandas claras de 255 pb, del tamaño esperado para los iniciadores diseñados para TTSuV1.

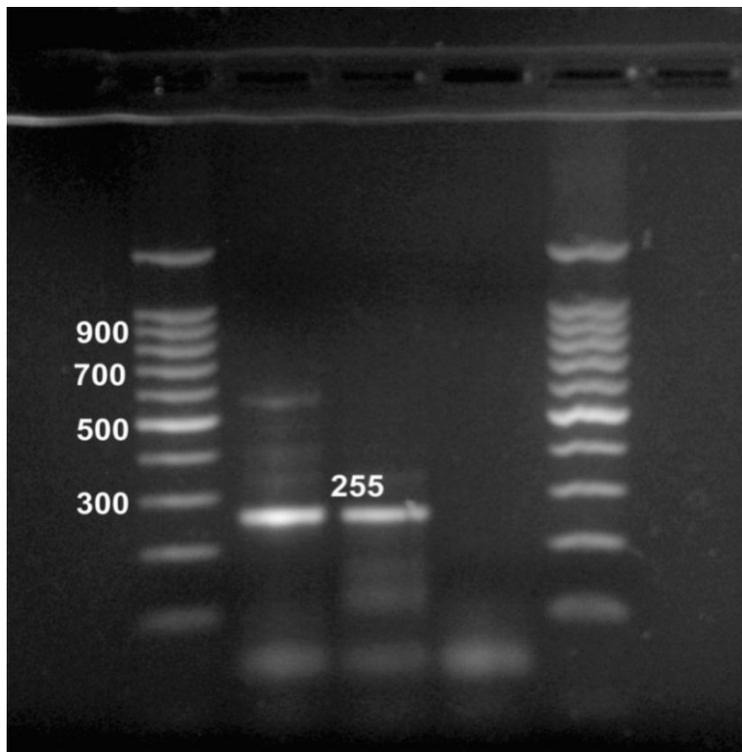


Figura 18. Casos de PDNS (Gel de agarosa al 1.5%) se observan bandas claras de 255 pb, del tamaño esperado para los iniciadores diseñados para TTSuV1.

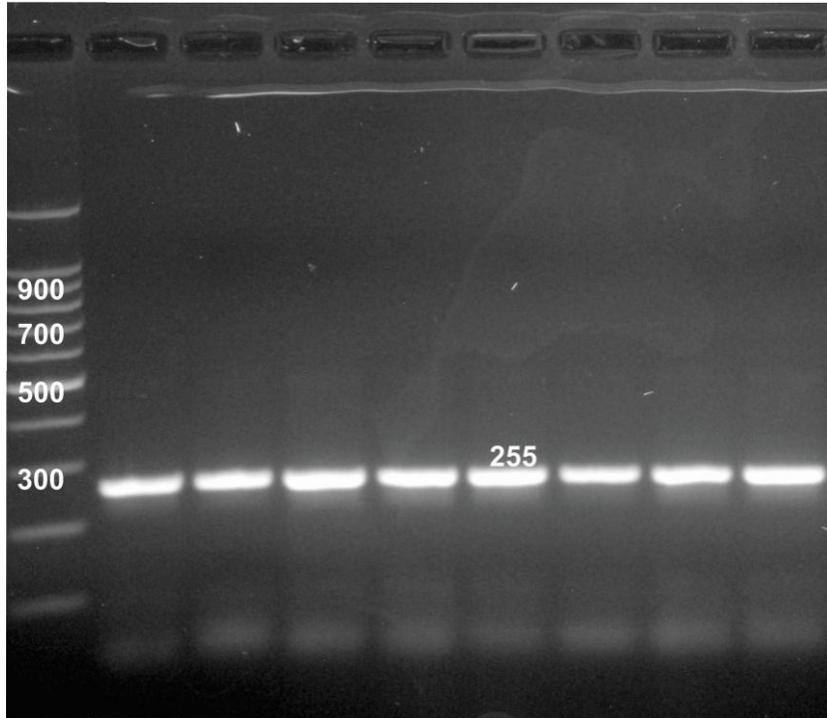


Figura 19. Casos de FR-PCV2 (Gel de agarosa al 1.5%) se observan bandas claras de 255 pb, del tamaño esperado para los iniciadores diseñados para TTsuV1.

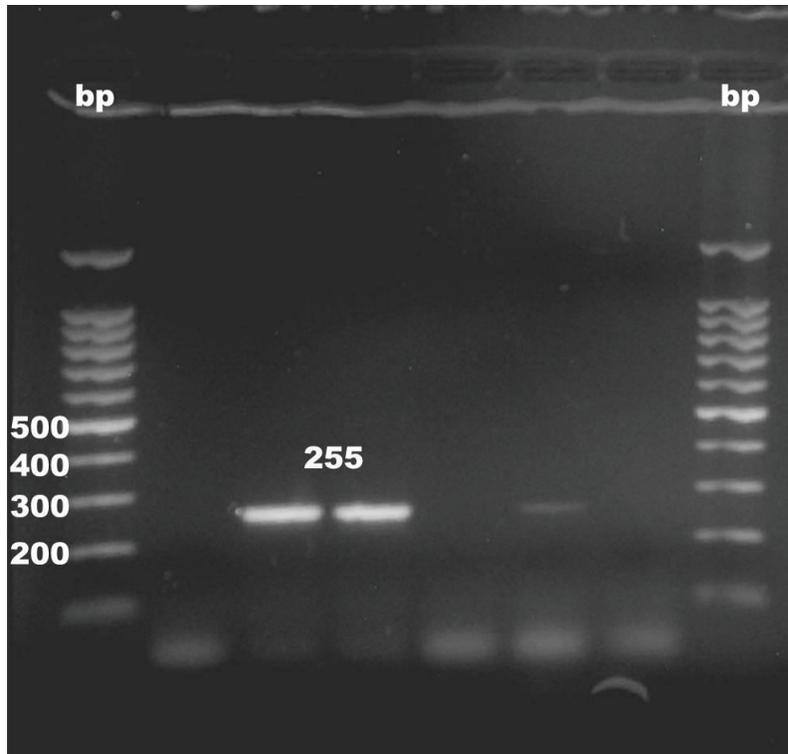


Figura 20. Casos de fetos abortados negativos a FR-PCV2 (Gel de agarosa al 1.5%) se observan bandas claras de 255 pb, del tamaño esperado para los iniciadores diseñados para TTsuV1.

Tabla 2. Resultados de las PCR anidados específicos para TTSuV1 en el total de los casos evaluados.			
	TTSuV1 (+)	TTSuV1 (-)	Total
PCVAD-Afectados	25	43	68
PCVAD-no afectados	10	22	32
Total	35	65	100

Ho: No hay relación
 Ha: Hay relación
 GL = 1, índice de confianza del 99%
Ji calculada = 0.1066 < 2.71 valor crítico.

Tabla 3. Resultados de las PCR anidados específicos para TTSuV1 en casos de PMWS/PDNS frente a tejidos no afectados			
	TTSuV1 (+)	TTSuV1 (-)	Total
PMWS/PDNS-Afectados	10	13	23
PMWS/PDNS-no afectados	3	9	12
Total	13	22	35

Ho: No hay relación
 Ha: Hay relación
 GL = 1, índice de confianza del 99%
Ji calculada = 1.148 < 2.71 valor crítico.

Tabla 4. Resultados de las PCR anidados específicos para TTSuV1 de corazón fetal procedentes de casos de falla reproductiva en cerdas.			
	TTSuV1 (+)	TTSuV1 (-)	Total
FR-PCV2+	15	30	45
FR-PCV2-no afectado	7	15	20
Total	22	41	65

Ho: No hay relación
 Ha: Hay relación
 GL = 1, índice de confianza del 99%
Ji calculada = 0.1747 < 2.71 valor crítico.

DISCUSIÓN

El TTSuV1 es ubicuo en cerdos domésticos y salvajes, ha sido detectado en la población de cerdos de diversos países alrededor del mundo tales como Hungría, Italia, Francia, España, China, Corea, Japón, Tailandia, Canadá, Brasil y EUA (Gallei *et al.*, 2010). Hasta el momento, no se ha establecido como agente primario la infección por TTSuV1 produce una enfermedad específica. Sin embargo, la infección experimental con el TTSuV en lechones gnotobióticos desarrolló neumonía intersticial, atrofia transitoria del timo, glomerulopatía e infiltrado linfocitario en el hígado (Krakowka *et al.*, 2008a). Por otro lado, existen informes que establecen que la co-infección del TTSuV1 con otros virus puede contribuir al desarrollo de enfermedades severas (Huang *et al.*, 2011). En este sentido, la principal asociación descrita es con la enfermedad asociada a PCV2 (PCVAD) en la cual se ha descrito alta frecuencia de co-infección del TTSuV1 con el PCV2 en casos naturales y experimentales de PMWS (Kekarainen *et al.*, 2006; Ellis *et al.*, 2008). Por otro lado, todas las lesiones características de PDNS fueron reproducidas en cerdos negativos a PCV2 inoculados con el TTSuV1 en combinación con el vPRRS (Krakowka *et al.*, 2008b). De este modo, no está clara la relación del TTSuV1 con el desarrollo de la PCVAD. Hasta el momento no existen informes ni estudios que evalúen la participación del TTSuV1 con el desarrollo de la FR-PCV2 y de la enteritis granulomatosa.

El estudio de la PCVAD es prioritario a nivel mundial puesto que tiene un alto impacto económico en la industria porcina al afectar considerablemente los parámetros productivos y reproductivos (Segales J, 2009). Como se mencionó anteriormente, en México la presencia de casos de FR-PCV2 es importante dado que la frecuencia de la FR-PCV2 y de la transmisión transplacentaria del PCV2 es alta con respecto a los informes de otros países (Enriquez *et al.*, 2009; Enriquez *et al.*, 2010) y se ha observado a lo largo república Mexicana particularmente en los estados del centro del país (Guanajuato, Michoacán y Jalisco) en donde se localizan las mayores áreas de producción porcina (Quintero *et al.*, 2010). Debido a que en nuestro país no hay informes sobre la presencia del TTSuV1 ni reportes

sobre la relación de éste con la PCVAD, se procedió a la estandarización de la PCR anidada para la amplificación de secuencias de TTVSuV1. En ausencia de un control positivo de TTVSuV1, la primera estrategia fue utilizar controles positivos de PCV2 (casos representativos de PMWS y de PDNS), tomando en consideración la ubicuidad en la población porcina del TTVSuV1 (McKweon *et al.*, 2004); y la alta frecuencia de co-infección entre ambos agentes (Kekarainen *et al.*, 2006; Krakowka *et al.*, 2008a). La segunda estrategia fue el uso de iniciadores descritos (McKweon *et al.*, 2004) ya que con estos mismos se realizó el primer informe de amplificación de TTVSuV1 con base a homologías con TTV bovino. De hecho, otros informes que evaluaron la frecuencia de TTVSuV1 en casos de PMWS, utilizaron iniciadores descritos por McKweon (Brassard *et al.*, 2008; Kekarainen *et al.*, 2006; Segales *et al.*, 2009). Sin embargo, en el presente estudio, el uso de dichos iniciadores resultó en la amplificación de productos inespecíficos que no pudieron eliminarse mediante la modificación de las condiciones de amplificación (gradiente de temperatura y curvas de concentración de magnesio) a pesar de obtener un producto compatible con la presencia de TTVSuV1 (Fig. 10, línea 2). Los esfuerzos infructuosos, condujeron al análisis de las secuencias de los iniciadores para explorar dichas inconsistencias con base a la comparación con 5 secuencias obtenidas del GenBank (Brasil, Canadá, 2 de EUA y Alemania). Las diferencias en las secuencias de alineación del iniciador reverso sugirieron una baja hibridación del iniciador descrito y una alta variabilidad genómica del TTVSuV1 a nivel mundial. El uso de iniciadores inéditos con base al esquema de bases degeneradas demostró ser exitoso debido a que en su diseño se consideró dicha variabilidad y la falta de disponibilidad de secuencias de TTVSuV1 derivadas de los subtipos que puedan estar circulando en la población porcina nacional. Además, las amplificaciones posteriores que se realizaron con el uso de los iniciadores diseñados y el ADN procedente de todos los casos sospechosos utilizados con los iniciadores de McKweon (2004), corroboró que el caso utilizado en la Fig. 9 fue consistentemente negativo y que la banda sospechosa observada en la Fig. 10 (línea 2) fue positiva con los iniciadores diseñados. Así mismo las secuencia amplificadas corresponden a TTVSuV1. De

este modo, las estrategias implementadas demostraron ser eficaces para demostrar la presencia del TTSuV1 en nuestro país.

Los casos seleccionados para la determinación de la relación del TTSuV1 con la PCVAD fueron representativos de cada tipo de PCVAD, no sólo por la solidez en el diagnóstico, puesto que se cubrieron exhaustivamente los criterios (Chae *et al.*, 2005), sino en el año de su presentación. En este sentido, los tejidos de casos de PMWS, de PDNS y de RF-PCV2 de los años 2001, 2003 y 2004, respectivamente, correlacionan con las primeras descripciones en México de PMWS (Trujano 2001), de PDNS (García-Reyna *et al.*, 2003) y de RF-PCV2 (García-Reyna 2004). En este último, también corresponde a las primeras descripciones de RF-PCV2 a nivel mundial (Nielsen *et al.*, 2004). Por tal motivo, se utilizaron como casos índices para el inicio del presente estudio retrospectivo. La ausencia de amplificación de secuencias de TTSuV1 en los casos índices de PMWS y de RF-PCV2 es sugestivo de que en dicho periodo, la presencia del TTSuV1 no fue indispensable para el desarrollo de estas presentaciones. Sin embargo, la emergencia precisa del TTSuV1 en las granjas de nuestro país requiere de un estudio retrospectivo exhaustivo que incluya tanto cerdos afectados como no afectados por PCVAD. Por otro lado, los resultados de la PCR anidada revelan que el TTSuV1 está ampliamente distribuido en la República Mexicana tal y como se describe para el PCV2 (Quintero *et al.*, 2010).

Los estudios realizados hasta el momento no han concluido acerca de la participación del TTSuV1 como agente primario. No obstante, la inoculación de TTSuV1 de campo en gnotobióticos demostró su capacidad de infectar y producir lesiones compatibles con PMWS (neumonía intersticial, atrofia de timo, glomerulopatía membranosa, y ligeros infiltrados linfocíticos-histiocíticos en el hígado) pero no reprodujo manifestaciones clínicas (Krakowka *et al.*, 2008a). Adicionalmente, la inoculación del TTSuV1 previa a la del PCV2 facilitó el desarrollo de PMWS en cerdos gnotobioticos dado que la infección única de TTSuV1 o PCV2 no desarrollaron manifestaciones clínicas de la enfermedad (Ellis *et al.*, 2008). Dichos resultados derivan de estudios realizados en Norteamérica (Estados Unidos y Canadá), países con los cuales México está relacionado

comercialmente y de donde proceden la mayoría de los cerdos de pie de cría. Por tal motivo, se consideró la evaluación de la presencia y/o participación del TTSuV1 en la población porcina nacional.

En el total de la población evaluada en el presente estudio, sólo el 35% fue positivo a TTSuV1 con resultados similares con respecto al estatus de PCVAD y la presentación de PCVAD. En un informe realizado en España, de 121 muestras de suero procedentes de 34 granjas porcinas, el 83% (100/121) fueron positivas a TTSuV por PCR anidada. Esta población se clasificó en cerdos afectados por PMWS (32/121) y animales no afectados por PMWS (89/121). En el primer grupo, 66% (21/32) fueron positivos a TTSuV1 mientras que en el segundo grupo el 78% (69/89) fue positivo a TTSuV y 57% (51/89) al TTSuV1 (Kekarainen *et al.*, 2006). Lo anterior contrasta con los resultados obtenidos, los cuales fueron considerablemente menores, aun considerando únicamente valores de casos de PMWS (36.8%/afectados y 25%/no afectados). Otros informes, también han reportado bajas frecuencias de co-infección entre el PCV2 y el TTSuV1 del 20% (Gallei *et al.*, 2010) al 30% (Taira *et al.*, 2009). Aunque en el presente estudio se observó que 3/4 (75%) casos de PDNS fueron positivos a TTSuV1, el bajo número de casos evaluados impide establecer su relación con PDNS. Es posible que en nuestro país no se observe la misma frecuencia de co-infección que otros países dada la alta variabilidad descrita para el TTSuV1.

Independientemente de las frecuencias observadas, los datos arrojados por esta investigación al igual que los informes en otros países demostraron que no existe una relación estadísticamente significativa entre la presencia del TTSuV1 y la manifestación de PMWS (Kekarainen *et al.*, 2006; Taira *et al.*, 2009) y de PDNS (Gallei *et al.*, 2009).

Los pocos estudios realizados de la participación del TTSuV1 en falla reproductiva han sido con cerdos gnotobióticos sanos inoculados con TTSuV1 los cuales reportaron transmisión transplacentaria de TTSuV1 mediante la detección del TTSuV1 en sangre de cordón umbilical detectado mediante PCR anidado de la región sin traducir (Krakowka *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2009; Kekarainen *et al.*, 2006). También se ha detectado presencia de TTSuV1 en suero y tejidos de

lechones en 85.2 % de los casos (Krakowka *et al.*, 2009). Otro estudio revela una prevalencia del 17% en fetos abortados (Martínez *et al.*, 2010). Así mismo otro estudio realizado en España donde se evaluaron 11 lotes de 7 granjas multi-sitios de las cuales seleccionaron 4 cerdas de distintos partos y 5 lechones sanos por cerda, detectando al TTSuV1 mediante PCR obteniendo una prevalencia en las cerdas del 75% (33/44) y en los lechones del 43% (92/215) para el TTSuV1 (Sibila *et al.*, 2009).

Con respecto a FR-PCV2, no existe algún reporte relacionado a la frecuencia de co-infección entre TTSuV1 y su relación con FR-PCV2 por lo que esta investigación es pionera en mostrar datos sobre la relación de dichos agentes. De manera similar que en los casos agrupados de PMWS-PDNS, la co-infección en casos de FR-PCV2 fue baja (33.85%) al igual de los casos de falla reproductiva no relacionados con PCV2 (35%), y no se encontró relación estadísticamente significativa sobre la presencia del TTSuV1 y la observación de FR-PCV2.

La evidencia experimental y de campo sobre la participación del TTSuV1 en PCVAD recabada hasta el momento es contradictoria. En PCVAD, la infección experimental con PCV2 señala que se requieren factores adicionales para reproducir la enfermedad debido a que la inoculación de PCV2 en ocasiones no reproduce la PCVAD (Krakowka *et al.*, 2008b) o desarrolla formas leves o moderadas de la enfermedad (Grierson *et al.*, 2005). Entre estos destaca la inmunoestimulación; ya sea por vacunación o por co-infección (Grierson *et al.*, 2005). Nuevamente, los resultados de estudios de inmunoestimulación son contradictorios y no concluyentes. La estimulación sistémica o local con un inmunógeno irrelevante ha desarrollado desde formas graves de la enfermedad hasta efectos irrelevantes al no encontrarse diferencias entre cerdos inmunoestimulados y no inmunoestimulados (Segalés y Domingo 2002). De hecho, ciertos adyuvantes no han ejercido efecto sobre la carga y replicación viral ni en la presentación clínica de la enfermedad (Resendes *et al.*, 2004). Del mismo modo, la vacunación contra vPPV, *Leptospira* sp. y *Erysipela rhusiopathiae*, aunque disminuyó la viremia por vPPV, no previno del PMWS ni redujo la severidad de la enfermedad. Tampoco se observó una mayor incidencia clínica

asociada con el uso de la vacunación (Opriessnig *et al.*, 2004). Por tal motivo, se ha postulado que el TTSuV1 fuera el posible agente X que en conjunto con el PCV2 generara el desarrollo de PCVAD (Segales *et al.*, 2009). Dado que los criterios de inclusión del diseño experimental fueron exhaustivos para la determinación de PCVAD, los resultados obtenidos sugieren una baja posibilidad de que el TTSuV1 sea el factor X y la presencia de otros factores de campo no evaluados en el presente estudio. Por otro lado, en nuestro laboratorio no se cuenta con casos con signología clínica y lesiones características de PMWS o PDNS negativos a PCV2 lo que limita la evaluación de la participación de TTSuV1 en infección única. Sin embargo, si se evaluaron casos de falla reproductiva en cerdas (incremento en el número de abortos, y/o mortinatos y fetos momificados junto con lesiones fibroticas y/o necroticas en miocardio así como la detección del PCV2 en las lesiones) no atribuibles a la presencia de PCV2 (23/68) de los cuales 7 fueron positivos a TTSuV1 lo que sugiere una posible participación. Sin embargo, la de estos casos fueron a negativos a TTSuV1 por lo que dicho hallazgo no fue estadísticamente significativo.

Debido a que los avances en la clasificación y genotipificación del TTSuV originó que se estableciera una diferenciación clara entre los anteriormente denominados genotipos, los estudios en la actualidad revelan que posiblemente la relación entre la PCVAD sea con el TTSuV2.

En un estudio realizado en España que utilizó cerdos afectados y no afectados por PMWS se detectó por PCR en tiempo real una menor frecuencia del TTSuV1 que del TTSuV2 tanto en cerdos sanos como afectados clínicamente, y que la presencia de TTSuV1 no mostrando diferencia estadística entre los sanos y los afectados por PMWS a lo largo del estudio mientras que la presencia del TTSuV2 sólo reveló una diferencia estadística significativa en un muestreo realizado. Por tal motivo, se concluye que no existe una relación fuerte entre estos agentes (Nieto *et al.*, 2011). Del mismo modo, una baja carga viral de TTSuV2 no mostró interferencia con un protocolo de vacunación con PCV2 puesto que no hubo desarrollo de cuadro clínico de PMWS (Nieto *et al.*, 2012). Por otro lado, también se ha observado una relación estadística significativa entre la presencia del

TTSuV2 y la presentación de PMWS (Gallei 2010). Al parecer, los informes sugieren que la PCVAD tiene una mayor asociación con el TTSuV2 por lo que sería de utilidad documentar la presencia del TTSuV2 en el territorio nacional y su relación con la PCVAD.

Debido al bajo número de secuencias del genoma del TTSuV porcino disponibles en las base de datos y su limitado origen geográfico, la filogenia y diversidad de este virus no ha sido plenamente estudiado (Cortey *et al.*, 2011). Por tal motivo, las secuencias obtenidas en este trabajo son muy importantes porque pueden ser utilizadas como referencia en el desarrollo de un árbol filogenético de los subtipos que circulan en el territorio nacional que contribuya al estudio del TTSuV1. Por otro lado sería importante tratar de detectar la presencia del TTSuV2 para evaluar la relación del TTSuV2 en la PCVAD así como la co-infección entre ambas especies ya que ha sido ampliamente reportado en otros países y su posible participación en el desarrollo de la PCVAD.

CONCLUSIONES

- ④ El PCR anidado es una herramienta útil y sensible para la detección de agentes virales de reciente descripción.
- ④ El diseño de iniciadores en el formato de bases degeneradas son de gran utilidad para la detección de agentes virales de los que se desconoce su variabilidad genómica y/o su presencia en la población evaluada.
- ④ El TTSuV1 está presente en la mayoría de los estados productores de cerdo del país.
- ④ La presencia del TTSuV1 no mostró una relación estadística significativa con la presentación de PCVAD.

BIBLIOGRAFIA

1. Allan G, Ellis JA. Porcine circoviruses: a review. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation* 2000; 12: 3-14.
2. Bogdan J, West K, Clark E, Konoby C, Haines D, Allan G. Association of porcine circovirus 2 with reproductive failure in pigs: a retrospective study, 1995-1998. *Canadian Veterinary Journal* 2001; 42(7):548-550.
3. Brassard J., Gagné M. J., Lamoureux L., Inglis G. D., Leblanc D., Houde A. Molecular detection of bovine and porcine Torque teno virus in plasma and feces. *Veterinary Microbiology* 2008; 126: 271-276.
4. Brunborg IM, Jonassen CM, Moldal T, Bratberg B, Lium B, Koenen F, et al. Association of myocarditis with high viral load of porcine circovirus type 2 in several tissues in cases of fetal death and high mortality in piglets. A case study. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation* 2007; 19(4):368-375.
5. Chae C. A review of porcine Circovirus 2-associated síndromes and diseases. *Journal Veterinary* 2005; 169:326-336.
6. Cortey M, Macera L, Segales J, Kekarainen. Genetic variability and phylogeny of Torque Teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) based on complete genomes. *Veterinary microbiology* 2011, 148:125-131.
7. Ellis JA., Allan G., Krakowka S. Effect of coinfection with genogroup 1 porcine torque teno virus on porcine circovirus type 2-associated postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic pigs. *American Journal of Veterinary Research* 2008; 69 (12): 1608-1614.
8. Enriquez R. K. "Evaluación de la participación del circovirus porcino tipo 2 (PCV-2) en la falla reproductiva". Tutora: Dra. Lucía Angélica García Camacho. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlan Izcalli 2009.
9. Enríquez K. Relationship of histopathology and PCV2 detection in fetal and neonatal myocardium from cases of reproductive failure in sows. ¹ Proceedings of the 21st. IPVS Congress, Vancouver, Canadá-July 18-21, 2010. P.467.

10. Gallei A, Pesch S, Keller C, Ohlinger VF. Porcine Torque teno virus: Determination of viral genomic loads by genogroup-specific multiplex rt-PCR, detection of frequent multiple infections with genogroups 1 or 2, and establishment of viral full-length sequences. *Veterinary microbiology* 2010; 143: 202-212.
11. García-Camacho LA, Enríquez-Ramírez K, Araiza-Nava D, Rangel-Rodríguez IC, Quintero-Ramírez V, García-Reyna PB. Porcine circovirus 2-associated syndromes in Mexican farms as detected by in situ hybridization. *Veterinary Pathology* 2006; 43(5):15.
12. García-Camacho L. A., Enríquez K., Quintero V., Perez-Razo M.A., Romero Y. Reproductive failure associated to PCV2 and its distribution in the Mexican Republic. 21st. International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress. 2010a.
13. García-Camacho L. A., Enríquez K., Quintero V., Rangel-Rodríguez I.C., Perez-Razo M.A., Romero Y. Relationship of histopathology and PCV2 detection in fetal and neonatal myocardium from cases of reproductive failure in sows. 21st. International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress. 2010b.
14. García-Reyna, et al. 2003. "Reporte de un caso de síndrome de nefropatía y dermatitis porcina asociado al circovirus porcino tipo 2 en una granja del estado de México" García-Reyna, P.B., Segalés, J., García, C.L., Quintero, R.V. XXXVIII Congreso Nacional AMVEC. Guadalajara, Jal. 17-20 de Julio de 2003.
15. García-Reyna, P.B., Segalés, J., García, C.L., Quintero, R.V. "Reporte de un caso de síndrome de nefropatía y dermatitis porcina asociado al circovirus porcino tipo 2 en una granja del estado de México" *Memorias XIX Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias*. Buenos Aires, Argentina 2004.
16. García-Reyna PB; Quintero-Ramírez V; Rangel-Rodríguez IC; Romero-Sánchez Y; García-Camacho LA. Circovirus neonatal detectada por hibridación in situ y microscopía electrónica en México (Neonatal

- circovirus detected by in situ Hybridization and electron microscopy in México). Memorias XX Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, 14° Congreso Chileno de Medicina Veterinaria. Santiago, Chile 2006.
17. Grierson SS, King DP, Tucker AW, Donadeu M, Mellencamp MA, Haverson K. Ontogeny of systemic cellular immunity in the neonatal pig: correlation with the development of post-weaning multisystemic wasting syndrome; 2005.
 18. Huang YW, Dryman BA, Harrall KK, Vaughn EM, Roof MB, Meng XJ. Development of SYBR green-based real time PCR and duplex nested PCR assay for quantitation and differential detection of species or type specific porcine Torque Teno viruses. *Journal of virological methods* 2010; 170:140-148.
 19. Huang YW, Dryman BA, Harrall KK, Beach NM, Kenney SP, Oprlessnig T, Vaughn EM, Roof MB, Meng XJ. Expression of the putative ORF1 capsid protein of Torque tenosus virus 2 (TTSuV2) and development of western blot and ELISA serodiagnostic assay: Correlation between TTSuV2 viral load and IgG antibody level in pigs. *Virus research* 2011, 158: 79-88.
 20. Krakowka S, Hartunian C, Hamberg A, et al. Evaluation of induction of porcine dermatitis and nephropathy syndrome in gnotobiotic pigs with negative results for porcine circovirus type 2. *American Journal Veterinary Research* 2008a; 69:1615–1622.
 21. Krakowka S., Ellis JA. Evaluation of the effects of porcine genogroup 1 torque teno virus in gnotobiotic swine. *American Journal Veterinary Research* 2008b; 69 (12):1623-1629.
 22. Krakowka S, Pozzuto T, Mueller B, Mechan B, Ringler S, McIntosh K, Ellis J, Mankertz A. In utero transmission of porcine torque teno virus. *Veterinary Microbiology* 2009; 173: 375-379.
 23. Kekarainen T., Sibila M., Segalés J Prevalence of swine Torque teno virus in post-weaning multisystemic wasting síndrome (PMWS)-affected and no-PMWS-affected pigs in Spain. *Journal of General Virology* 2006; 87:833-837.

24. Kim J, Jung K, Chae C. Prevalence of porcine circovirus type 2 in aborted fetuses and stillborn piglets. *Veterinary Record* 2004; 155(16):489-492.
25. Ladekjaer-Mikkelsen A-S, Nielsen J, Storgard T, Botner A, Allan G, McNelly F. Transplacental infections with PCV-2 associated with reproductive failure in a gilt. *Veterinary Record* 2001; 148: 759-760.
26. Madson DM, Patterson AR, Ramamoorthy S, Pal N, Opriessnig T. Effect of natural of vaccine-induced porcine circovirus type 2 immunity on fetla infection after artificial insemination with PCV2 spiked semen *Theriogenology* 2009; 72: 747-754.
27. Martínez-Guinó L., Kekarainen T., Segalés J. Evidence of Torque teno virus (TTV) vertical transmission in swine. *Theriogenology* 2009; 71: 1390-1395.
28. McKweon NE, Fenaux M, Halbur PG, Meng XJ. Molecular characterization of porcine TT virus, an orphan virus, in pigs from six different countries. *Veterinary Microbiology* 2004; 104: 113-117.
29. Mikami O, Nakajima H, Kawashima K, Yoshii M, Nakajima Y. Nonsuppurative myocarditis caused by porcine circovirus type 2 in a weak-born piglet. *Journal of Veterinary Medical Science* 2005; 67(7):735-738.
30. Nielsen J, Ladekjaer-Hansen A-S, Bille-Hansen V, Lohse L, Bøtner A. PCV2-associated disease following intrauterine infection. Proc 18th IPVS Congress. Hamburg, Germany. 2004. Vol I, 14.
31. Nieto D., Aramouni M., Grau-Roma L., Segalés J., Kekarainen T. Dynamics of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) DNA loads in serum of healthy and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected pigs. *Veterinary Microbiology* 2011; 152: 284-290.
32. Nieto D., Aramouni M., Sibila M., Fraile L., Kekarainen T., Segales J. Lack of effect of piglet vaccination against Porcine Circovirus type 2 (PCV2) on serum viral loads of Torque teno sus virus 2 (TTSuV2). *Veterinary Microbiology*. 2012; 157: 8-12.
33. Oppriessnig T, Prickett JR, Madson DM, Shen HG. Porcine circovirus type 2 (PCV2)-infection and re-inoculation with homologous or heterologous

- strains: virological, serological, pathological and clinical effects in growing pigs: *Sciences* 2010; 41(31).
34. Pensaert M.B., Sánchez Jr., R.E., Ladekjær-Mikkelsen A-S., Allan G.M., Nauwynck H.J. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. 2004. *Veterinary Microbiology* 2004; (98) 175-183.
 35. Quintero-Ramirez V., Romero Y., Enriquez K., García-Camacho L. Reproductive failure associated to PCV2 and its distribution in the Mexican Republic. Proceedings of the 21st. IPVS Congress, Vancouver, Canada. July 18-21, 2010. P.470.
 36. Resendes A, Segalès J, Balash M, Calsamiglia M, Sibila M, Ellerbrok H. Lack of an effect of a commercial vaccine adjuvant on the development of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in porcine circovirus type 2 (PCV2) experimentally infected conventional pigs. *Veterinary Research* 2004; 35(1):83-90.
 37. Sanchez Jr. RE, Nauwynck HJ, McNeilly F, Allan GM, Pensaert MJ. Porcine circovirus 2 infection in swine fetuses inoculated at different stages of gestation. *Veterinary Microbiology* 2001; 83: 169-176.
 38. Sanchez Jr RO, Meerts P, Nauwynck HJ, Pensaert MB. Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life. *Veterinary Microbiology* 2003; 95: 15-25.
 39. Savic B, Milicevic V, Bojkovski J, Kureljusic B, Ivetic V, Pavlovic I. Detection rates of the swine Torque teno virus (TTVs), porcine circovirus type 2 (PCV2) and hepatitis E virus (HEV) in the livers of pigs with hepatitis. *Veterinary research communications* 2010; 34: 641-648.
 40. Segalés J. and Domingo M. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Veterinary Quarterly* 2002; 24(3): 109-124.
 41. Segales, J., Martinez-Guino, L., Cortey, M., Navarro, N., Huerta, E., Sibila, M., Pujols, J., Kekarainen, T. Retrospective study on swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 infection from 1985 to 2005 in Spain. *Veterinary Microbiology* 2009; 134 (3-4), 199-207.

42. Sibila M, Martínez-Guinó L, Huerta E, Llorens A, Mora M, Grau-Roma L, Kekarainen T, Segales J. Swine Torque teno virus (TTV) infection and excretion dynamics in convectional pig farms. *Veterinary Microbiology* 2009; 139: 213-218.
43. Taira O., Hirohito O., Nagao A., Tuchiya K., Nunoya T., Ueda S. Prevalence of swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 in Japanese swine with suspected post-weaning multisystemic wasting syndrome and porcine respiratory disease complex. *Veterinary Microbiology* 2009; 139: 347-350.
44. Ting XC, Giménez LL, Wei HY, Jin MX, Opriessnig T. The prevalence of Torque Tenos us virus (TTSuv) is common and increased with age of growing pigs in the united states. *Journal of Virological Methods* 2012; 183:40-44.
45. Trujano M., Iglesias G., Segalés J., Palacios J.M. PCV-2 from emaciated pigs in Mexico. *Veterinary Records* 2001; 148 (25): 792.