



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ENFERMEDADES INFECCIOSAS

**“IDENTIFICACIÓN DE CAMBIOS GENÉTICOS DEL CIRCOVIRUS PORCINO
TIPO II (PCV2), EN MUESTRAS DE CAMPO, MEDIANTE LA
SECUENCIACIÓN DEL MARCO DE LECTURA ABIERTO 2 (OFR2)”.**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

FELIPE BEDOYA LÓPEZ

TUTOR PRINCIPAL:

JOSÉ IVAN SÁNCHEZ BETANCOURT

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA - UNAM

COMITE TUTOR:

SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN - UNAM

MARIA ELENA TRUJILLO ORTEGA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA - UNAM

MEXICO D.F. OCTUBRE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Agradecimientos

A todas la personas e instituciones que de una u otra manera hicieron posible la realización y culminación de este proyecto, dando sin interés alguno su tiempo, paciencia y esfuerzo, para ver realizado un sueño que parecía imposible en su comienzo. A todos gracias.

A CONACYT por su apoyo incondicional para la realización de este proyecto.

Resumen

El Circovirus porcino tipo 2 (PCV2) es un especial y complejo virus. Que alcanza tan solo los 17 nm con simetría de tipo icosaédrica, sin envoltura y con genoma ADN circular de una sola cadena. El PCV2 tiene una distribución ubicua, se han detectado anticuerpos contra al virus o al propio agente en cerdos de todos los países del mundo donde se ha buscado. Hasta la fecha, el cerdo doméstico y el jabalí han sido identificados como únicos hospedadores naturales. La infección por PCV2 se ha asociado a diversos procesos patológicos que afectan al cerdo, el más importante, denominado síndrome multisistémico del desmedro post-destete (SMDP). En estudios recientes se ha demostrado la existencia de 3 genotipos de PCV2 (a, b y c). Hasta la fecha no ha sido descrito ninguno de estos genotipos ni sus subgenotipos en el territorio nacional, este hecho al parecer no genera problema alguno, si no fuera por la controversia que se genera, entre las posibles diferencias de patogenicidad de los genotipos de PCV2, lo que condujo a la realización de este trabajo donde pudimos comprobar la presencia de dos genotipos (PCV2a y PCV2b) así mismo la presencia y diferencias entre los subgenotipos reportados, con mayor predominio de los subgenotipos de PCV2b (1A/1B, 1A) con un 87.5% y 12.5% para PCV2a con el subgenotipo(2C). Estos resultados establecen un punto de partida para investigaciones futuras encaminadas al control y manejo de la enfermedad.

Palabras claves: circovirus porcino tipo 2, genotipos, PCV2, subgenotipo, SMDP.

Abstract

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is a special and complex virus. Reaching only 17 nm with icosahedral symmetry type, non-enveloped DNA and circular genome single chain. PCV2 is a ubiquitous distribution, we detected antibodies to the virus or to the staff in pigs of all countries in the world where you searched. To date, the domestic pig and wild boar have been identified as only natural hosts. PCV2 infection has been associated with various pathological processes that affect pigs, the most important, multisystem syndrome called postweaning (PMWS). Recent studies have demonstrated the existence of three genotypes of PCV2 (a, b and c). To date there has been described any of these genotypes and their subgenotypes in the country, this fact apparently did not generate any problem, if not for the controversy generated, possible differences in pathogenicity of the genotypes of PCV2, which led to the completion of this work where we saw the presence of two genotypes (PCV2a and PCV2b) likewise the presence and differences between subgenotypes reported, with greater prevalence of subgenotypes of PCV2b (1A/1B, 1A) with a 87.5% and 12.5% for PCV2a with subgenotype (2C). These results establish a starting point for future research aimed at the control and management of the disease.

Keywords: Porcine circovirus type 2 genotypes, PCV2, subgenotype, SMDP.

Índice

Título	I
Agradecimientos	II
Resumen	III
Abstract	IV
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 Infección de PCV2	4
2.2 Transmisión	5
2.2.1 Transmisión Horizontal	5
2.2.2 Transmisión Vertical	5
2.3 Factores relacionados con el desarrollo de la enfermedad	6
2.3.1 La cerda	6
2.3.2 El momento de infección	7
2.3.3 La carga viral	7
2.3.4 El virus	7
2.3.5 Infecciones concomitantes y el “agente X”	9
2.3.6 Instalaciones y manejo	10
2.3.7 Sexo y genética	10
2.4 Patogénesis, distribución celular de PCV2 y células blanco	11
2.4.1 Evasión de la respuesta inmune	14
2.5 Principales Signos clínicos	15
2.5.1 Lesiones macroscópicas	15
2.5.2 Lesiones microscópicas	16
2.6 Diagnóstico de laboratorio de PCV2	16
2.7 Tratamiento	17
3. Justificación	19
4. Objetivos generales	20

4.1 Objetivos Específicos	20
5. Hipótesis	21
6. Materiales y Métodos	22
6.1 Extracción de ADN	22
6.2 Procesamiento de las muestras para PCR	23
6.3 Reacción de secuencia	24
6.4 Análisis de las secuencias	24
7. Resultados	25
8. Discusión	33
9. Anexos	38
10. Bibliografía	40

Índice de tablas

Tabla 1. Identificación de las muestras, origen y segmento obtenido de cada una.	26
Tabla 2. Porcentaje de similitud y número de bases que cambian, con relación a la secuencia de referencia.	27
Tabla 3. Posición de mutación respecto a la muestra de referencia.	31
Tabla 4. Posición de codón y cambio en aminoácido respecto a la muestra de referencia.	32

Índice de figuras

Figura 1. Patogénesis del síndrome de emaciación multisistémico posdestete (SEMP) (Darwich <i>et al</i> , 2004).	13
Figura 2. Gel 1 Muestras del 1-18.	25
Figura 3. Gel 2 Muestras del 19-34, CP: Control positivo y CN: Control negativo.	25
Figura 4. Árbol filogenético, construido con 8 secuencias obtenidas de campo y genomas del genbank (identificadas con sus números de referencia). Construido con (MEGA6.0) usando el método Tamura-Nei.	30
Figura 5. Distancia entre subgenotipos de PCV2b, y la diferencia encontrada en el análisis respecto al subgenotipo PCV2 (1C).	35
Figura 6. Distancia entre subgenotipos de PCV2a y similitud con el subgenotipo de PCV2b (1C).	36

1. Introducción

El Circovirus porcino tipo 2 (PCV2) es un virus pequeño, de unos 17 nm de diámetro, de simetría icosaédrica, sin envoltura y con genoma ADN circular de una sola cadena con polaridad negativa de aproximadamente 1.8 KDa (Mankertz *et al.*, 2000) que pertenece al género Circovirus de la familia Circoviridae.

PCV2 es un virus de distribución ubicua, se han detectado anticuerpos frente al virus o el propio agente en cerdos de todos los países del mundo donde se ha buscado (Segalés *et al.*, 2005). Por ahora, el cerdo doméstico y el jabalí han sido identificados como sus únicos hospedadores naturales (Rodríguez-Arrijoja *et al.*, 2003a; Vicente *et al.*, 2004).

La infección por PCV2 se ha asociado a diversos procesos patológicos que afectan al cerdo, incluyendo la circovirus porcina (CP), fallo reproductivo, síndrome de dermatitis y nefropatía porcina (SDNP), neumonía proliferativa necrotizante (NPN) y complejo respiratorio porcino (CRP). Por este motivo se sugirió utilizar el término enfermedades asociadas a circovirus porcino, bajo las siglas inglesas PCVD o PCVAD (porcine circovirus diseases o porcine circovirus associated-diseases) (Segalés *et al.*, 2005; Opriessnig *et al.*, 2007) para referirse al conjunto de ellas, sin embargo, de entre todas las PCVAD, la CP es considerada como la única que causa un importante impacto económico en el sector porcino. Así, solamente dentro del territorio de la Unión Europea, se cuantificaron pérdidas anuales asociadas a esta enfermedad por valor de 600 millones de euros (Armstrong y Bishop, 2004).

La CP, también denominada síndrome multisistémico del desmedro post-destete (SMDP) o mediante las siglas en inglés PMWS (postweaning multisystemic wasting syndrome), es una enfermedad multifactorial en la que, además de PCV2, es necesaria la participación de otros factores infecciosos y/o no infecciosos para su expresión. De ahí que en la actualidad se considere al PCV2 como el “agente infeccioso esencial” de la enfermedad.

Se ha sugerido que dentro de PCV2 existen cepas potencialmente más patogénicas que otras. De esta forma se ha sugerido el término genotipo, distinguiendo el PCV2 genotipo 1, potencialmente más patogénico, del PCV2 genotipo 2 (Grau-Roma *et al.*, 2008).

En México se documenta la presencia de la enfermedad desde el año 1973, sin embargo son muy pocos los casos reportados.

La primera descripción de la enfermedad en México fue hecha por Trujano *et al.*, en 2002; y el primer aislamiento se realizó en el 2004. La mayoría de los estudios realizados sobre la infección por PCV2 se han focalizado especialmente en la reproducción experimental de la CP.

Con base a la situación existente en el país, se quiere identificar si las muestras positivas a circovirus porcino tipo 2 obtenidas en los 5 estados presentan diferencias identificables con secuenciación del marco de lectura abierto 2 (OFR2), para así identificar las variantes genotípicas de PCV2 presentes en el territorio nacional.

2. Antecedentes

Circovirus porcino (PCV) era conocido desde los años 70 como un virus no patógeno, contaminante de la línea celular de células de riñón de cerdo PK-15. Sin embargo, tras el primer diagnóstico de un caso de CP en 1991 en una granja de alta sanidad localizada en el oeste del Canadá (Harding, 1996), estudios de secuenciación evidenciaron que el PCV encontrado en los cultivos celulares era genéticamente diferente del encontrado en los casos de CP (Meehan *et al.*, 1998). Se propuso una nomenclatura para diferenciar al virus contaminante de la línea celular del asociado a CP, denominándolos circovirus porcino tipo 1 (PCV1) y PCV2, respectivamente.

Tras la primera descripción de la enfermedad se realizaron estudios retrospectivos a partir de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina que permitieron establecer la existencia de la CP en España desde 1986 (Rodríguez-Arrijoja *et al.*, 2003b). Estudios realizados en Bélgica mostraron que la infección por PCV2 se encontraba ya presente en la explotación porcina en 1969 (Sánchez *et al.*, 2001). Estos resultados demuestran que PCV2 ha circulado durante muchos años en la explotación porcina, y que el síndrome estaba ya presente como mínimo de manera esporádica muchos años antes de su primera descripción a mediados-finales de los 90. Hasta hoy se ha diagnosticado la enfermedad en países de todos los continentes y en casi todo tipo de granjas, independientemente del tamaño o del sistema de producción (Segalés *et al.*, 2005).

Los resultados diagnósticos de laboratorio en diferentes países, muestran a lo largo de los años, periodos en los que se observan incrementos considerables del número de casos de CP remitidos. Así, en un primer periodo, se detectó CP en Norte-América entre los años 1991 y 1997, aunque el número de casos descritos fue relativamente reducido. Posteriormente, entre los años 1995-2004, los laboratorios de diagnóstico de la Unión Europea y el continente asiático describieron también la enfermedad, pero de forma prácticamente epizootica y con un impacto económico muy significativo sobre la producción porcina.

Actualmente en Norte-América y América del Sur se ha experimentado una segunda y más importante oleada de casos comprendida desde el 2004 hasta la actualidad (Segalés *et al.*,

2007), comparables con la situación previa de Europa y Sur-este Asiático. Estos datos sugieren que la presentación de CP aparentemente podría alternar periodos de presentación esporádica con periodos de presentación epizootica.

2.1 Infección de PCV2

La dinámica de infección y seroconversión es muy similar tanto en granjas afectadas por CP como en granjas no afectadas. Los anticuerpos maternos están presentes en prácticamente todos los lechones tras la toma de calostro y van disminuyendo progresivamente durante la lactación y la transición (Rodríguez-Arrijoja *et al.*, 2002). La viremia por PCV2 suele aparecer entre la fase final de transición y el inicio de la fase de engorde, coincidiendo con el momento en el que los anticuerpos maternos alcanzan niveles mínimos (Sibila *et al.*, 2004). Consecuentemente, los animales crean anticuerpos y seroconvierten frente a PCV2. De forma paralela al incremento de anticuerpos frente al virus, genera una disminución progresiva de la viremia (Carasova *et al.*, 2007). Estos anticuerpos se mantendrán presentes, por lo menos, hasta las 28 semanas de vida (Rodríguez-Arrijoja *et al.*, 2002).

La dinámica de infección descrita anteriormente es la que se observa en la mayoría de explotaciones, hay que tener en cuenta que su comportamiento variará en función de las características epidemiológicas de cada explotación y que incluso dentro una misma granja hay variaciones individuales. Se ha mostrado que un bajo porcentaje de animales pueden presentar ya la infección por PCV2 a los pocos días de vida (Sibila *et al.*, 2004; Calsamiglia *et al.*, 2007). Un componente notable en la mayoría de las descripciones de brotes naturales de PMWS es la falta de respuesta de los cerdos a los tratamientos antibióticos, en particular contra bacterias respiratorias; este hecho, en combinación con la elevada proporción de pérdidas atribuibles a patógenos secundarios durante los brotes de PCV2 y común detección de otros agentes infecciosos, incluyendo oportunistas conocidos tales como *Pneumocystis carinii*, o *Chlamydia spp* (Cavallini *et al.*, 2006; Carrasco *et al.*, 2000; Clark, 1997; Kim *et al.*, 2011), Conduce a la noción de que PCV2 es una inmunodeficiencia adquirida (Darwich *et al.*, 2004; Segalés y Domingo, 2002; Segalés *et al.*, 2004; Krakowka *et*

al, 2002). Casi todos los cerdos comerciales se infectaron por PCV2 en algún momento de sus vidas, pero sólo una pequeña proporción de ellos desarrollan PMWS. Este hecho trae a pensar en los factores que determinan el destino de la presentación, subclínica o el desenlace fatal de esta en los cerdos. Por lo que se ha sugerido que el virus puede causar una infección persistente al menos en un cierto porcentaje de cerdos (Rodriguez-Arriola *et al.*, 2002).

2.2 Transmisión

2.2.1 Transmisión Horizontal

El hecho de que Prácticamente todos los animales se infectan en un momento u otro a lo largo de su vida (Lopez-Soria *et al.*, 2005) indica que la transmisión horizontal del PCV2 y CP es muy eficiente.

- PCV2 se ha detectado en todas las potenciales rutas de secreción: cavidad nasal, cavidad oral, secreciones oculares, calostro, orina y heces, tanto de cerdos afectados como no afectados por la enfermedad (Segalés *et al.*, 2005; Shibata *et al.*, 2006). En un estudio longitudinal en el cual se monitorizaban lechones desde la primera semana de vida hasta el momento de aparición de la enfermedad se observó una buena correlación entre los niveles de PCV2 detectados en sangre, en hisopos nasales y en hisopos rectales (Grau-Roma *et al.*, 2008), sugiriendo la importancia de ambas rutas como vías de excreción de PCV2. También se evidenció una mayor prevalencia de PCV2 en hisopos nasales que rectales, lo cual soporta la idea que la ruta oro-nasal sea probablemente la principal ruta de transmisión horizontal.
- La transmisión de CP se ha demostrado en varios estudios, en los cuales se observó el desarrollo de la enfermedad en cerdos sanos después de mezclarlos con cerdos con CP (Jaros *et al.*, 2006; Kristensen *et al.*, 2007). Demostrándose que la transmisión de enfermedad fue más frecuente entre animales del mismo corral, pero también se dio entre animales de corrales vecinos (Kristensen *et al.*, 2007).

2.2.2 Transmisión Vertical

Aunque no se conocen los mecanismos mediante los cuales ocurre, ni la frecuencia con la que se da, existen evidencias de que la transmisión vertical es posible. Se ha podido aislar PCV2 de lechones abortados (West *et al.*, 1999, Brunborg *et al.*, 2007), con lesiones especialmente características en el miocardio. Existen únicamente dos estudios en los cuales se haya investigado esta ruta de transmisión mediante la inoculación de cerdas gestantes con PCV2, consiguiendo transmitir la infección en uno de ellos (Park *et al.*, 2005) mientras que no en el otro (Cariolet *et al.*, 2001).

Además se ha demostrado que los machos infectados con PCV2 son capaces de excretar el virus vía semen y que éste puede ser infeccioso. Esto se observó tras la detección de viremia y de anticuerpos frente a PCV2 en lechones seronegativos después de inocularlos intraperitonealmente con semen positivo para PCV2 mediante PCR (prueba de bioensayo). También se inseminaron 6 cerdas seronegativas con este mismo semen y no se detectó viremia ni anticuerpos frente a PCV2 en ninguna de las cerdas durante toda la gestación, así como tampoco en ninguno de los fetos (Madson *et al.*, 2008).

2.3 Factores relacionados con el desarrollo de la enfermedad

En la actualidad está ampliamente reconocido que PCV2 es el agente infeccioso esencial para el desarrollo de la CP, asimismo se sabe que se trata de una enfermedad multifactorial (Segalés *et al.*, 2003a; Segalés *et al.*, 2005; Opriessnig *et al.*, 2007). Existen distintos factores asociados con la aparición de la CP. Entre los que se encuentran:

2.3.1 La cerda

Un estudio reciente realizado en 7 granjas afectadas de CP (Calsamiglia *et al.*, 2007) se describió una mayor mortalidad en lechones procedentes de cerdas virémicas a PCV2 y de cerdas con bajo título de anticuerpos frente al virus. Esta información, conjuntamente con el hecho de que la CP raramente se observe antes de las 4 semanas de vida, sugiere que los anticuerpos maternos, presentes en prácticamente todos los lechones que toman calostro, confieren protección frente al desarrollo de la enfermedad.

2.3.2 El momento de infección

Estudios de casos y controles que han comparado granjas afectadas y no afectadas por CP muestran que las granjas afectadas tienen un porcentaje superior de cerdos con anticuerpos frente a PCV2 alrededor de los 3 meses de edad, lo cual sugiere que las granjas con problemática de CP sufren infecciones más tempranas por PCV2 que las granjas sin CP (Rose *et al.*, 2003; Lopez-Soria *et al.*, 2005).

2.3.3 La carga viral

Estudios indican que los animales afectados de CP tienen cantidades superiores de PCV2 en diversos tejidos comparadas con los animales que no están sufriendo la enfermedad (Rosell *et al.*, 1999; Olvera *et al.*, 2004). No obstante, a pesar de ser una constante en órganos linfoides, la detección de virus en suero mediante PCR cuantitativa puede dar resultados más variables. Por tanto, utilizando esta tecnología, la detección de cantidades elevadas de PCV2 en suero indica una mayor probabilidad de que un animal esté sufriendo la enfermedad, pero no es suficiente para establecer con certeza el diagnóstico de CP a nivel individual. (López *et al.*, 2008)

2.3.4 El virus

Las familias de virus de plantas, Nanoviridae y Geminiviridae, se consideran los parientes más cercanos a la Circoviridae. En general, estas familias comparten una estructura tallo-bucle común, que contiene el origen (ori) de replicación dentro del genoma circular. Análisis de secuencias de circovirus y péptidos de nanovirus sugieren que las similitudes entre nanovirus y circovirus se encontraron en la región N-terminal de Rep. Sin embargo, la región C-terminal de PCV Rep, se asocia más con una proteína de unión de ARN, 2C, de un calicivirus vertebrado, un virus de ARN. El sitio propuesto de la recombinación se encuentra entre las posiciones 129 y 178 de PCV1 Rep. La presencia de la secuencia 2C calicivirus sugiere que PCV surgió después de un evento de recombinación entre un nanovirus planta y calicivirus vertebrado. (Wei C *et al.* 2013)

En cuanto a la evolución continua de PCV2, el análisis de 160 genomas completos de longitud PCV2 reveló una tasa de mutación de $1,2 \times 10^{-3}$ sustituciones / sitio / año (s / s / y). Resultados similares se encontraron en un reciente estudio que analiza las secuencias de PCV2 de Cuba ($3,1 \times 10^{-3}$ - 6.6×10^{-3} s / s / y). En general, estos datos ponen de manifiesto que el PCV2 posee la tasa de mutación más altas reportadas por cualquier virus de ADN, que cae en el rango de los cambios genéticos detectados para la mayoría de los virus de ARN. Wei C *et al.* 2013)

Tres ORFs son reconocidos en PCV2 con ORF1 situado en la cadena positiva, y ORF2 y ORF3 en sentido negativo. ORF1 codifica dos proteínas de replicación-asociados (Rep y Rep ') y ORF2 codifica la proteína de la cápside y contiene la secuencia de nucleótidos más variable del genoma la viral (Cap). ORF3, que está incrustado en ORF1, está implicado en la apoptosis inducida por PCV2. (Wei C *et al.* 2013; Ramos N *et al.*, 2012).

Existen indicios de distintos genotipos de PCV2 con diverso grado de patogenicidad *in vivo*, Asociado a el ORF2 que se considera la proteína más variable de todo el genoma. Si ello fuera cierto, podría explicar muchos de los interrogantes que al día de hoy se mantiene en relación a la epidemiología de la infección por este virus. La propagación de genotipos más patógenos permitiría explicar la eclosión mundial, continental, nacional y regional de las PCVD. (López *et al.*, 2008; Lopez-Soria *et al.*, 2005)

Con la existencia de diferentes genotipos de PCV2, también se ha afirmado que tienen un papel en la virulencia (Chae *et al.*, 2010; Grau-Roma *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2011; Lohse *et al.*, 2007) e incluso co-infección con diferentes genotipos, considerándose una circunstancia agravante en la virulencia y patogenia de la enfermedad (Harding *et al.*, 2010; Khaiseb *et al.*, 2011).

Por secuenciación del genoma de PCV2 mostró la existencia de diferentes genotipos. Hasta ahora, cinco se han descrito y sobre la base de una propuesta de un consorcio-PCVD de la Unión Europea, se nombran con las letras que comienzan con a, por lo tanto a partir de ahora serán tipos a, b, c, d, e (Segales *et al.*, 2008). Tipos a y b parecen tener una

distribución en todo el mundo, mientras que el tipo c sólo se ha encontrado en Dinamarca (Dupont *et al.*, 2008). Otros subtipos descritos en Asia (d y e) (Wang *et al.*, 2009; Jantafong *et al.*, 2011) parecen pertenecer a los subtipos descritos anteriormente (a, b, c) (Cortey *et al.*, 2011a).

La controversia en relación a la posible diferencia de patogenicidad de los genotipos de PCV2 viene aportada por estudios de biología molecular y filogenéticos. Los distintos genotipos de PCV2 presentan una homología nucleotídica superior a 94%, lo que indica una similitud muy grande entre los distintos aislamientos a nivel mundial (Segalés *et al.*, 2005).

También se sugiere la existencia de un tercer genotipo de PCV2 (genotipo 3) que se detectó en muestras de cerdo correspondientes a los años 1980, 1987 y 1990. La existencia de este tercer genotipo podría indicar que se produciría un “gradiente genotípico” desde los años 80 hasta la actualidad, que seguiría el orden de genotipos 3, 2 y 1, siendo este último el aparentemente relacionado con los brotes epizooticos de enfermedad que se dieron en Dinamarca. Actualmente se desconoce si ello es extrapolable al resto de Europa y si este “gradiente genotípico” también se ha dado o no en otras regiones del mundo.

Por tanto lo único que se puede concluir de todo esto es que probablemente, cualquier genotipo de PCV2, en las condiciones adecuadas, es capaz de producir potencialmente la enfermedad. (López *et al.*, 2008; Segalés *et al.*, 2005).

2.3.5 Infecciones concomitantes y el “agente X”

Múltiples estudios epidemiológicos describen mayor frecuencia de otras infecciones o enfermedades en granjas con CP como pueden ser el síndrome respiratorio y reproductivo porcino (SRRP), infección por parvovirus porcino (PPV), Torque teno sus virus (TTSuVs), infección por *Mycoplasma hyorhinis*, enfermedad de Aujeszky, enfermedad de Glässer, meningitis streptocócica, salmonelosis, colibacilosis post-destete y neumonías bacterianas (Segalés *et al.*, 2005; Liu *et al.* 2013). La incógnita de si la mayor cantidad de infecciones presentes en una granja facilita la expresión de la CP o es inversa y es la CP quien facilita la manifestación de las infecciones. La respuesta a esta incógnita no es fácil,

el hecho de que se haya conseguido reproducir la CP mediante co-infecciones experimentales utilizando PCV2 junto a PPV (Allan *et al.*, 1999), el virus del SRRP (Rovira *et al.*, 2002) o *Mycoplasma hyopneumoniae* (Opriessnig *et al.*, 2004), sugiere que al menos algunos de estos agentes infecciosos puedan potencialmente desencadenar la CP en cerdos infectados con PCV2. Es bastante factible que algunas otras sean simplemente concomitantes, sin relación de sinergia o potenciación, y otras sean consecuencia de un estado de inmunosupresión.

Las dificultades en la reproducción de la CP mediante la utilización solamente de PCV2 y la ubicuidad del virus en las granjas a nivel mundial causaron la aparición de una corriente de pensamiento mediante la cual se atribuía la CP a un agente infeccioso desconocido, denominado “agente X”. Los estudios de distribución espacio-temporal de la enfermedad proponen que la diseminación de la CP dentro de Dinamarca e Inglaterra fue compatible con la introducción de un nuevo patógeno (Vigre *et al.*, 2005; Woodbine *et al.*, 2007). Estudios similares realizados en otros países como Suecia indican lo contrario (Walgreen *et al.*, 2004). Por lo que se conoce hasta la fecha de PCV2, no es descartable, por ahora, todos los intentos de aislar sistemáticamente de los casos de CP cualquier otro agente patógeno además del PCV2 han fracasado (Lohse *et al.*, 2008). Además, del éxito de las primeras vacunas frente a PCV2 en la prevención de CP, aunque no se descartan la existencia de un posible “agente X”, como mínimo esto refuerza el papel esencial indiscutible de PCV2 en la causalidad de la enfermedad.

2.3.6 Instalaciones y manejo

Uno de los factores que inicialmente se relacionó con el desarrollo de la CP fue el manejo. Ya que durante los primeros casos de CP detectados se observó que las granjas más afectadas padecían claras deficiencias de manejo e instalaciones. Madec, *et al.*, 2000; crearon un listado con 20 medidas de manejo aplicables en paridera, transición y engorde mediante las cuales se consiguió disminuir el impacto de la enfermedad, aunque en la mayoría de casos nunca se alcanzaban los valores productivos previos a la aparición del problema clínico, a partir de estas observaciones, se realizaron estudios epidemiológicos de

casos y controles en diferentes países con la intención de determinar específicamente cuáles son los factores que diferencian a las granjas que presentan CP de las que no.

2.3.7 Sexo y genética

Las características intrínsecas del propio cerdo juegan también un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Se observa una mayor proporción en machos castrados que en hembras (Corrége, 2001). Esta diferencia se atribuyó principalmente a posibles infecciones secundarias consecuentes a la castración o incluso a factores hormonales y genéticos.

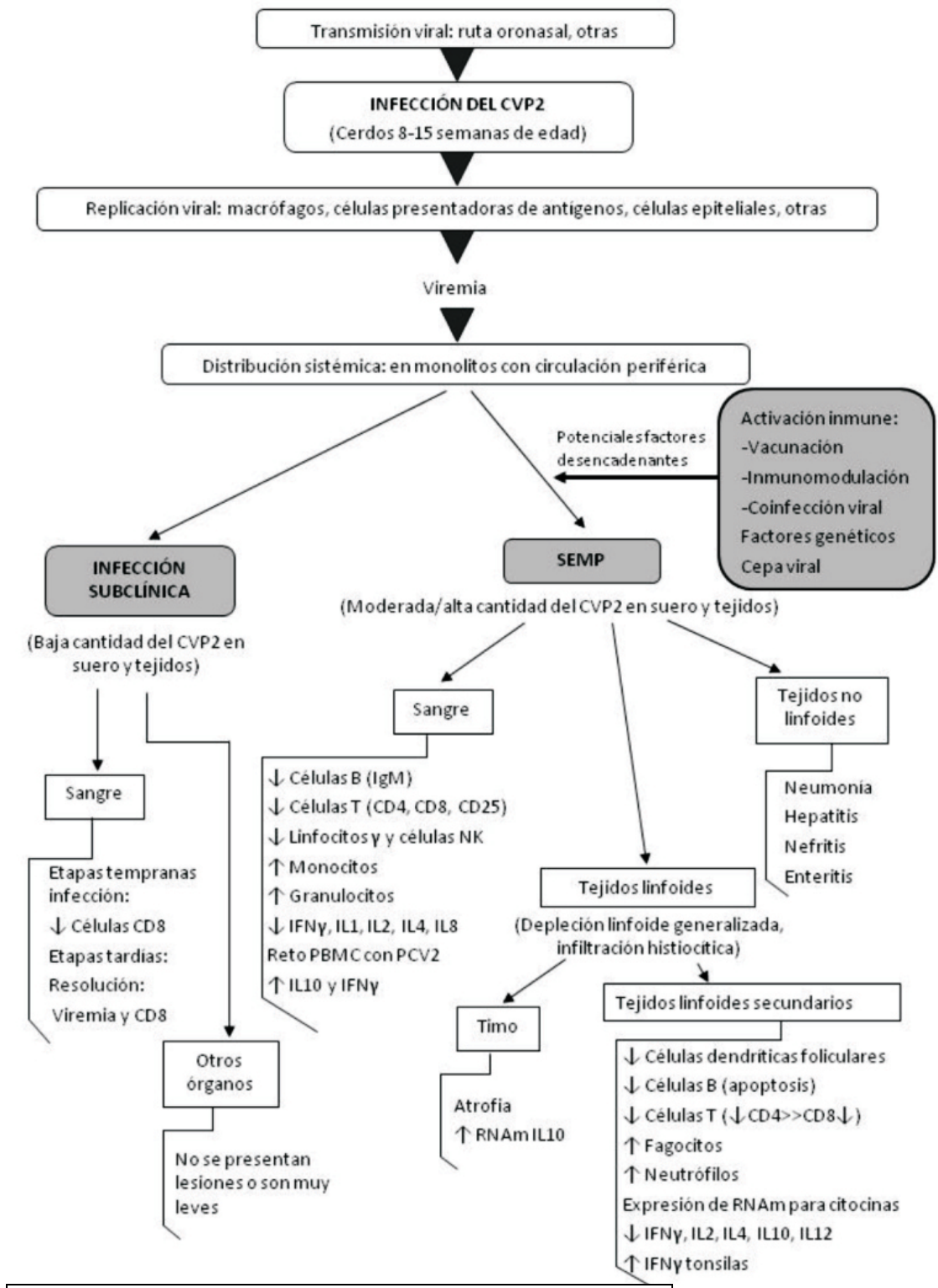
Experiencias en el sector parecen indicar que la utilización de determinadas líneas genéticas de machos, generan un incremento de la problemática de CP. Un trabajo realizado en España describió que los lechones procedentes de verracos Large White x Duroc presentaban mayor mortalidad que los de Large White x Pietrain y estos que los procedentes de Pietrain puro (Lopez-Soria *et al.*, 2004). Sin embargo, un estudio realizado en Francia en 4 explotaciones en el que se reemplazó el verraco finalizador habitual por uno Pietrain, no observó diferencias en la expresión de CP (Rose *et al.*, 2005). Por otra parte, en una infección experimental con PCV2 se observaron lesiones asociadas a CP más intensas en cerdos con genética Landrace que en cerdos Duroc y Large White, aunque no se consiguió reproducir la enfermedad en este estudio (Opriessnig *et al.*, 2006). Aun no es posible determinar si los efectos observados se deben a la raza o más probablemente, a determinadas líneas genéticas o incluso a individuos concretos que presenten genes que les otorguen una mayor susceptibilidad o resistencia a la enfermedad. En la actualidad, estudios de genética molecular han localizado dos regiones del genoma que podrían contener genes responsables de una mayor susceptibilidad a la CP (Karlskov-Mortensen *et al.*, 2008).

2.4. Patogénesis, distribución celular de PCV2 y células blanco

El genoma o los antígenos del PCV2 se han detectado en una amplia variedad de células. Las proteínas virales se encuentran principalmente en el citoplasma de los histiocitos, células gigantes multinucleadas y otras células del sistema mononuclear fagocitario como

los macrófagos alveolares, células de Kupffer y células dendríticas foliculares de los tejidos linfoides. Esporádicamente se detecta el virus en el citoplasma de las células epiteliales del riñón y de las vías respiratorias, células del endotelio vascular, linfocitos, células acinares y ductales del páncreas y en los núcleos de monocitos macrófagos, células del musculo liso, hepatocitos y enterocitos (Darwich *et al.*, 2004). No está claro como el PCV2 entra a las células y en cuales realiza su ciclo completo de replicación in vivo. Se asume que el PCV2 llega al citoplasma de células fagocíticas como resultado de la fagocitosis de otras células infectadas o por endocitosis antes de la presentación del antígeno. También se postula que hay un receptor específico del PCV2 en la superficie de los macrófagos que permite que el virus penetre en el citoplasma. Tal receptor no se ha identificado, pero parece razonable pensar que el PCV puede llegar al citoplasma de las células usando ambas vías (Darwich *et al.*, 2004). EL Cuadro 1. Muestra un resumen de la patogénesis de la enfermedad.

Como el PCV2 no codifica su propia polimerasa su replicación depende de la polimerasas celulares presentes en el núcleo durante la mitosis celular. Por eso se asume que cuando los fetos se infectan con PCV2 la distribución del virus se relaciona con tejidos o células con alta actividad mitótica, como los miocardiocitos fetales. Inversamente, el antígeno viral no se encontraría en células con baja actividad mitótica. PCV2 se encuentra generalmente en el citoplasma de las células del sistema mononuclear fagocitario y de otras células presentadoras de antígeno (Darwich *et al.*, 2004). El gran número de virus encontrados en los macrófagos de cerdos enfermos seria resultado de la acumulación de partículas virales liberadas durante una infección prolongada, probablemente iniciada algunas semanas antes del inicio de los signos clínicos. En condiciones experimentales el periodo de incubación del virus puede durar de 2 a 4 semanas y durante este tiempo se va acumulando el virus hasta que llega a un punto en que se inicia la enfermedad clínica.



Cuadro 1. Patogénesis del síndrome de emaciación multisistémico posdestete (SEMP) (Darwich *et al*, 2004)

2.4.1 Evasión de la respuesta inmune

Los eventos que tienen lugar en la interacción temprana entre el patógeno y el huésped se consideran cruciales para determinar el destino de la infección. En el caso de PCV2, el resultado de dicha interacción es particularmente importante, ya que las células diana en que el virus se puede encontrar pertenecen al sistema inmune o están estrechamente asociada a los tejidos linfoides, tales como las células del estroma (Steiner *et al.*, 2008).

PCV2 se encuentra comúnmente asociado con las células del linaje monocítico, macrófagos y las células dendríticas (DC), pero parece que estos tipos de células no son dianas eficaces para la replicación de PCV2 (Chang *et al.*, 2006a; Gilpin *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2007.; Steiner *et al.*, 2008;.. Vincent *et al.*, 2003, 2005). Sin embargo, puede persistir durante días sin daño en DC ni provocar signos de apoptosis o modulación de las moléculas de superficie celular derivada de los monocitos (MoDC) lo que sugiere que el virus podría utilizar DC como un mecanismo para la difusión y la transmisión (Vincent *et al.*, 2003). La baja actividad de replicación de PCV2 en macrófagos y DC ha llevado a la suposición de que la presencia de PCV2 en el citoplasma de aquellos tipos de células probablemente refleja las actividades fagocíticas o endocítica que se pueden considerar Absorción "normal" de antígeno en lugar de una infección activa (Kekarainen *et al.*, 2010; Steiner *et al.*, 2008; Vincent *et al.*, 2003). La presencia de PCV2 en los macrófagos parece inducir una respuesta alterada en estas células.

In vitro, PCV2 afecta la capacidad microbicida de los macrófagos para la destrucción de *Candida albicans* probablemente al afectar la producción de O₂ y H₂O₂ (Chang *et al.*, 2006). Estas observaciones refuerzan la noción de que macrófagos pueden actuar más como los caballos de Troya, donde el virus sobrevive y se extiende probablemente a células endoteliales, células endoteliales aórticas, células epiteliales del intestino y fibrocitos, como se evidencio *in vitro*. Curiosamente, las variaciones en la actividad endocítica, la unión del virus, y la absorción no se refieren a la eficacia de la replicación en una célula y la replicación particular no se correlacionó con la proliferación celular. (Finsterbusch and Mankertz., 2009)

Se ha observado que la presencia de PCV2 en DC no afecta sustancialmente la funcionalidad de estas pero genera inmunomodulación en plasmocíticas DC (pDC) (Vincent *et al.*, 2005). Vincent *et al.*, (2007) demostraron que esta inhibición de la funcionalidad pDC afectada negativamente las respuestas inducidas por la estimulación con ligandos de TLR7 y TLR9. Este evento se considera importante en el contexto de reconocimiento, peligro que afecta la señal de activación inicial para la maduración de DC mieloides y la posterior presentación de un antígeno eficiente (Takeda *et al.*, 2003).

2.5. Principales Signos clínicos

Los signos clínicos asociados a CP (PMWS) observados con mayor frecuencia son: emaciación, depresión, anorexia, agrandamiento de los linfonodos subcutáneos, disnea, palidez de la piel y diarrea. (Harding and Clark, 1997; Krakowka *et al.*, 2004; Rosell *et al.*, 1999).

2.5.1 Lesiones macroscópicas

Los hallazgos anatomopatológicos observados en los casos de CP muestran afectación de los linfonodos, pulmón, riñones, hígado, bazo, estómago e intestinos (Segalés, 2002; Ellis, 2003).

Los órganos afectados con mayor frecuencia son los nódulos linfáticos y pulmones (Segalés *et al.*, 2003a; Krakowka *et al.*, 2004). Se observa agrandamiento de leve a moderado de los linfonodos superficiales y/o viscerales; al corte presentan edema con una coloración blanca grisácea homogénea y en ocasiones se pueden observar focos blanquecinos (Cano *et al.*, 2004; Ellis, 2003). Hay ausencia de colapso pulmonar con un marcado patrón lobulillar y/o zonas de consolidación en lóbulos medio craneal, al corte se observa exudado catarral o purulento en los bronquios (Cano *et al.*, 2004; Ellis, 2003; Segalés y Domingo, 2002). Los riñones pueden estar agrandados con una coloración pálida y focos blanquecinos múltiples distribuidos en parénquima y corteza (Cano *et al.*, 2004; Ellis, 2003; Segalés *et al.*, 2006). El hígado disminuye de tamaño y muestra coloración pálida o amarillenta del parénquima

(Krakowka *et al.*, 2004; Segalés *et al.*, 2006). El bazo aumenta de tamaño en las etapas tempranas de la enfermedad para luego disminuir (Krakowka *et al.*, 2004; Segalés *et al.*, 2006). Los intestinos presentan paredes delgadas con abundante líquido. En ocasiones se presentan úlceras de la región no glandular del estómago (Illanes *et al.*, 2000; Segalés y Domingo, 2002).

2.5.2 Lesiones microscópicas

Las principales lesiones histológicas del CP se observan en los órganos linfoides y consisten en atrofia linfoide, inflamación granulomatosa y necrosis, en donde 30 a 35% de los casos presentan cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos como racimos de uvas en los macrófagos (Cano *et al.*, 2004; Ellis, 2003; Segalés *et al.*, 2006; Sarradell *et al.*; 2004). En los pulmones hay neumonía intersticial linfocitocítica con hiperplasia de moderada a severa de neumocitos tipo II, los alvéolos contienen un material eosinofílico con detritus celulares y macrófagos. Los lóbulos consolidados muestran bronco-neumonía supurativa de moderada a severa caracterizada por necrosis del epitelio e hiperplasia del tejido linfoide (Segalés *et al.*, 2006; Sarradell *et al.*, 2004). Ocurre hepatitis periportal linfocitocítica característica, en los casos severos se observa lipidosis hepática, desorganización de los sinusoides y necrosis difusa de hepatocitos con fibrosis perilobulillar (Krakowka *et al.*, 2004). En los riñones las lesiones características del CP se traducen en nefritis intersticial linfoplasmohistiocítica multifocal (Cano *et al.*, 2004; Ellis, 2003; Segalés *et al.*, 2006).

2.6. Diagnóstico de laboratorio de PCV2

Actualmente se dispone de técnicas inmunohistoquímicas, hibridación *in situ*, inmunofluorescencia directa, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), aislamiento viral y microscopía electrónica. Los anticuerpos se pueden detectar con las técnicas de inmunoperoxidasa en monocapa, inmunofluorescencia indirecta y ELISA (Rosell *et al.*, 2000, Sandvik *et al.*, 2001, Hamel *et al.*, 2000). Para evaluar la presencia del agente o sus anticuerpos.

2.7. Tratamiento

La respuesta a los antibióticos no es buena y en algunos casos puede resultar hasta negativa, sobre todo cuando el CP aparece conjuntamente con el SDNP, ya que al existir lesiones renales la eliminación de las sustancias inyectadas puede verse alterada. Deben evitarse los tratamientos inyectables generalizados ya que originan estrés y lo único que se consigue es aumentar las bajas por falla cardíaca. Se consigue una mejor respuesta al administrar los medicamentos en el agua de bebida (Ellis *et al*, 2004). El éxito del tratamiento y control de las enfermedades asociadas a PCV2 se ha centrado principalmente en asegurar prácticas que reduzcan al mínimo el estrés, en la eliminación de coinfecciones o reducir al mínimo su efecto y en la eliminación de posibles factores desencadenantes que produzcan estimulación del sistema inmune. Madec *et al.* (1999, 2000) propusieron un plan de 20 puntos para reducir al mínimo el impacto de las PCVAD en las granjas afectadas severamente.

La aparición en el mercado de las primeras vacunas comerciales frente a PCV2 han revolucionado los aspectos de control y prevención de la enfermedad. Todas las vacunas registradas hasta el momento a nivel mundial han mostrado resultados verdaderamente exitosos en cuanto a disminución de mortalidad y de casos de retraso en el crecimiento debidos a la CP (Joisel *et al.*, 2007; Kixmüller *et al.*, 2008; Francisco and Thacker, 2007; Connor and Elsener, 2007). Existen cuatro vacunas comerciales registradas, una inactivada para administración en cerdas (Circovac®, de Merial) y otras tres para su uso en lechones, dos de las cuales son vacunas de subunidades del virus (Porcilis PCV®, de Intervet, y Ingelvac CircoFLEX®, de Boehringer Ingelheim) y una tercera que se basa en un virus quimera de PCV2-PCV1 inactivada (Suvaxyn Circo®, de Fort Dodge).

La marcada eficacia vacunal, no debe hacer olvidar la naturaleza multifactorial de la CP, y definitivamente la implementación de las medidas descritas por Madec, siempre será una buena recomendación, ya que con ellas se busca mejorar la higiene, reducir el estrés de los animales y disminuir la presión de infección, principalmente de PCV2, pero también de cualquier otro agente patógeno. Su carácter inespecífico hace que sean medidas

potencialmente útiles para cualquier enfermedad infecciosa, y no solamente para la CP. Cualquier medida en aras de controlar infecciones concomitantes también revertirá positivamente en cuanto al impacto de la CP.

3. Justificación

A través de la historia, la enfermedad generada por el PCV2 se ha convertido en un problema serio para todos los productores de cerdos del país, su característica silenciosa produce incontables pérdidas económicas que afecta de manera directa a todos.

Segales en el año 2008 planteó la existencia de 5 genotipos de PCV2 (a,b,c,d,e). Los subtipos (d, e) al ser evaluados nuevamente por Cortey et al., en el año 2011, no mostraron diferencias significativas para ser considerados como subtipos y se clasificaron dentro a los subtipos (a, b). Hasta la fecha no ha sido descrito ninguno de estos genotipos ni sus subgenotipos en el territorio nacional, esto al parecer no genera problema alguno si no fuera por la controversia que existe sobre la diferencia de patogenicidad entre los genotipos de PCV2, lo que soporta la importancia de este estudio para determinar que genotipos están presentes en el país y establecer un punto de partida para investigaciones futuras encaminadas al control de la enfermedad basado en estos resultados.

4. Objetivo general

Identificar la existencia de los diferentes genotipos de circovirus porcino tipo 2 (PCV2) presentes en las muestras positivas a PCV2 en 5 estados de la República Mexicana.

4.1 Objetivos específicos

- Evaluar la presencia de los diferentes genotipos de PCV2, en cerdos positivos así como la distribución de estos en los diferentes estados de la República Mexicana.
- Identificar cambios en el marco de lectura abierto 2 (ORF2) que indiquen la presencia de los diferentes genotipos en muestras provenientes de los estados de Sonora, Jalisco, Estado de México, Hidalgo y Veracruz.
- Construir un árbol filogenético con las secuencias obtenidas, para así relacionar los diferentes genotipos obtenidos.

5. Hipótesis

Los diferentes genotipos de PCV2 están presentes en México debido a la alta prevalencia de la enfermedad en las granjas del país, generando altas pérdidas económicas y limitantes en el desarrollo de la industria.

6. Materiales y Métodos

Para la realización del proyecto se utilizaron las muestras provenientes de 5 estados de la República Mexicana; Sonora, Jalisco, Estado de México, Hidalgo, y Veracruz., se obtuvieron 34 muestras de tejido (bazo, pulmón, nódulos linfáticos) a las cuales se les realizó la extracción del ADN por medio un kit comercial(Kit Pure Link Invitrogen)[®], para luego ser sometidas a un PCR con primers específicos del marco de lectura abierto 2(ORF2) de las cuales, 22 de las muestras amplificaron, estas fueron sometidas al proceso de secuenciación para así realizar la caracterización y determinar por lectura del ORF2 las variantes genéticas de PCV2 en la población porcina Mexicana.

Todos los análisis se realizaron en el laboratorio de diagnóstico del Departamento de Medicina y Zootecnia de cerdos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (DMVZC) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), a excepción de la purificación, reacción de secuenciación y posterior secuenciación que fue realizada en el Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la UNAM.

6.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó con (Kit Pure Link Invitrogen)[®]

Se pulverizó la muestra de tejido con ayuda de nitrógeno líquido, mezclándolo con 200µL de PBS, se adicionaron 25µL de proteinasa K y 200 µL de buffer de lisis(L22), agitandolo en vortex por 40 seg; se incubó a 56 °C durante 20 min, se mezcló con pipeta por 5 segundos y se adiciono 250µL de etanol al 100%, para ser agitado en vortex durante 20 seg e incubado 5 min a °T ambiente, se mezcló con pipeta por 5 seg y se transfirió a una columna, para ser centrifugado a 9000 rpm en un lapso de 1 min. Se desechó lo colectado, se añadió a la columna 500µL de buffer de lavado (W5) y se centrifugó a 9000 rpm por 1 min, cambiando la columna a un tubo para colectar, se adicionaron 500µL de buffer de lavado (W5), para ser centrifugado a 9000 rpm durante 1 min, se colocó la columna en otro tubo y centrifugo a 13000rpm por 1min, se colocó la columna en tubo eppendorf y adicionó 40µL de agua libre de RNAsas, incubándolo por 1 min a °T ambiente, se centrifugo a 13000 rpm por 1 min , se usó inmediatamente o guardo a - 80 °C.

6.2 Procesamiento de las muestras para PCR

La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando el ADN extraído y un kit comercial (Biotecmol)[®] siguiendo las indicaciones del fabricante;

- Amortiguador 10 X
- MgCl₂ 20 X
- Deoxinucleotidos 10 X
- Primers 10 X
- Amplicasa 5
- H₂O libre de RNAs

Los primers utilizados para la reacción de PCR fueron:

Forward: CTGATTACCAGCAATCAGACC iniciando en la posición 804 terminando en la posición 825.

Reverse: ACCGYTACCGYTGGAGAAG iniciando en la posición 1616 terminando en la posición 1635 con dos bases degeneradas en la posición 5 y 11 identificadas con Y que permite la adhesión de C/T.

Esperando obtener un segmento de 831pb.

La reacción se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones en un termociclador BIO-RAD, iniciando con un ciclo de 95 °C por 5 minutos para una desnaturalización, luego 35 ciclos:

- 94 °C durante 35 segundos
- 60 °C durante 35 segundos
- 72 °C durante 35 segundos

Y un ciclo de 72 °C durante 10 minutos, y se mantiene a 4° indefinidamente.

Los productos amplificados de PCR se evaluaron a partir de geles de agarosa al 2% + TAE 1X, empleando como marcador de peso molecular el DNA Pbr322, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador UV Kodak.

6.3 Reacción de secuencia

La reacción de secuenciación se realizó en el IFC de la UNAM en la unidad de biología molecular (UBM) bajo el método de SANGER, utilizando un secuenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems, Foster City USA), para la lectura de la secuencia y la obtención del electroferograma.

6.4 Análisis de las secuencias

Las secuencias de nucleótidos de cada muestra se registraron de forma electrónica y en electroferogramas. El primer paso del análisis de la secuencia de nucleótidos fue identificar la calidad de la secuencia y eliminar las secuencias no confiables. Para ello fue requerido editar los errores que aparecieron en la lectura original, a partir de la identificación de los nucleótidos no definidos en los electroferogramas, utilizando el programa bioedit sequence alignment editor 7.1, conservando las regiones de secuencia de calidad.

Las lecturas obtenidas de las cadenas luego de su análisis y edición, fueron empalmadas para construir la secuencia completa del ORF2 empleando el programa MEGA 6.0 for Windows (molecular evolutionary genetics analysis). La fiabilidad del árbol Neighbor-Joining (NJ) se calculó utilizando 1000 repeticiones de bootstrap. Las secuencias de nucleótidos se compararon por pares con distancias inferiores a 0.005 (lo que significa que son secuencias casi idénticas o idénticas, y se limita a un máximo de 3 diferencias nt y una diferencia de un aminoácido) se representan como una secuencia y en el análisis filogenético. Las secuencias fueron alineadas con genotipo de referencias PCV2a, 2b y 2c.

Una vez obtenidas las secuencias de los virus se realizó la alineación para identificar los cambios en la estructura del ORF2 y llevar a cabo la construcción del árbol filogenético.

7. Resultados

De las 34 muestras procesadas con los primers diseñados para identificar el ORF2, se obtuvieron 22 productos de PCR, como se muestra en las figuras 2 y 3.

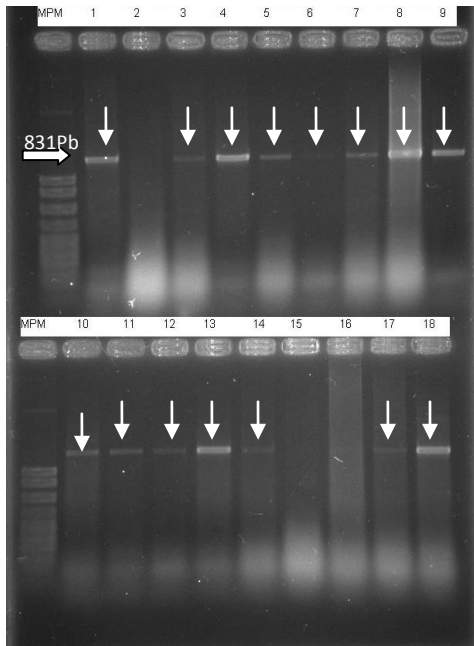


Figura 2. Gel 1 Muestras del 1-18

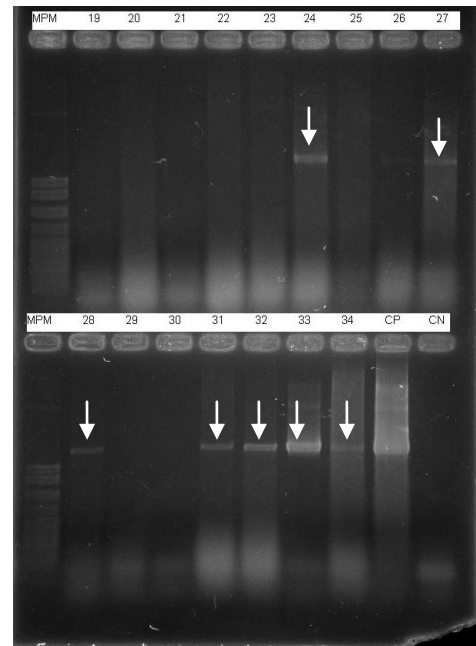


Figura 3. Gel 2 Muestras del 19-34, CP: Control positivo y CN: Control negativo

Del total de las 22 muestras que amplificaron, 18 de estas fueron enviadas a secuenciar, las cuales cumplían con los requisitos indicados por el protocolo de la unidad de biología molecular del departamento de fisiología celular de la UNAM, de todas la muestras enviadas a secuenciar se obtuvieron 8 secuencias completas del segmento de 831pb, las demás no contaron con cantidad suficiente de ADN para realizar la reacción de secuenciación, dando como resultado segmentos de menos de 200pb. En la tabla1 se muestra la relación de las muestras enviadas a secuenciar y sus resultados.

Tabla1. Identificación de las muestras, origen y segmento obtenido de cada una.

Identificación	Origen	Segmento obtenido
1	Sonora1-13	831pb
4	Sonora. Obregón-13	831pb
7	Veracruz. Perote2	160pb
8	Veracruz. Perote-14	831pb
9	Edo. Mex. Coatlan-13	831pb
10	Veracruz. Perote3	198pb
11	Veracruz. Perote4	201pb
12	Veracruz. Perote5	186pb
13	Veracruz. Perote1-14	831pb
18	Sonora.2-13	831pb
24	Edo. Mex. Coatlan2	464pb
27	Sonora3-13	168pb
28	Veracruz. Perote6	165pb
31	Jalisco2	174pb
32	Jalisco1	65pb
33	Jalisco	831pb
34	Hidalgo. Tulancingo	156pb
CP	Hidalgo. Tlaxcoapan-14	831pb

Los resultados del estudio se basan en el 64.38% del ORF2 obtenido de las muestras procesadas, debido a que el codón de inicio del ORF2, por la alineación realizada respecto a la muestra referencia del genbank (AF027217.1) inicia en la posición 1021 y nuestras secuencias terminan en la posición 1473, solo se obtienen 452pb de 702pb del ORF2.

A continuación se muestran los porcentajes de similitud respecto a la muestra de referencia y el número de bases que cambian. Ver tabla2.

Tabla 2. Porcentaje de similitud y número de bases que cambian, con relación a la secuencia de referencia, de las 8 muestras seleccionadas para la construcción del árbol filogenético, utilizando MEGA 6.0.

Muestras	# Bases que cambian	% de Similitud
Ref. AF027217.1 Can-09		
Jalisco-08	25	94
Edo Mex.Coatlan-13	30	93
Sonora. Obregon-13	38	91
Veracruz.Perote-14	29	93
Veracruz.Perote1-14	30	93
Sonora 1-13	30	93
Sonora 2-13	36	91
Hidalgo.Tlaxcoapan-14	31	92
AY146991.1 2B - Tai-02	18	95
AY256459.1 2C - Hun-03	21	95
AY424402.1 2D - Aus-03	20	95
AF109399.1 2E - Can-00	23	94
AF112862.1 2E - T2-05	10	97
AY181948.1 Chi-09	3	99
AB072301.1 2A - Jap-09	4	99
AY094619.1 2E - Usa-03	10	97
HQ395028.1 1A/1B - Chi-12	28	93
AY596823.1 1A/1B - Chi-04	29	93
HQ395027.1 1A1B - Chi-12	28	93
AY682993.1 1A/1B - Chi-04	32	92
AY713470.1 1C - Ale-05	31	92
AY484416.1 1A - Hol-04	28	93
AY424405.1 1A - Aus-03	28	93
AY691169.1 1B - Chi-04	28	93
AY682994.1 1C - Chi-04	36	91
EF524539.1 1C - Chi-09	35	92
HM038030.1 1C - Chi-10	36	91
AY484410.1 1C - Hol-04	36	91
EU148503.1 Din TC-08	46	89
EU148504.1 Din TC-08	46	89
EU148505.1 Din TC-08	47	89

Luego de obtener las 8 secuencias completas, editar y realizar su análisis, se construyó un árbol filogenético usando referencias del genbank y otros autores (ver anexo1) donde se evidencia la relación entre ellas y la presencia de los diferentes genotipos ya registrados para PCV2, este se divide en tres genotipos (PCV2a, PCV2b, PCV2c) PCV2a, a su vez en 5 cluster (2A -2E) y PCV2b en 3 cluster (1A – 1C) Wei C et al. 2013; Olvera *et al.* 2007). Recientemente se ha reportado que PCV2b es el genotipo predominante en la mayoría de países del mundo (Wei C *et al.* 2013; Tribble and Rowland. 2012; Olvera *et al.* 2007).

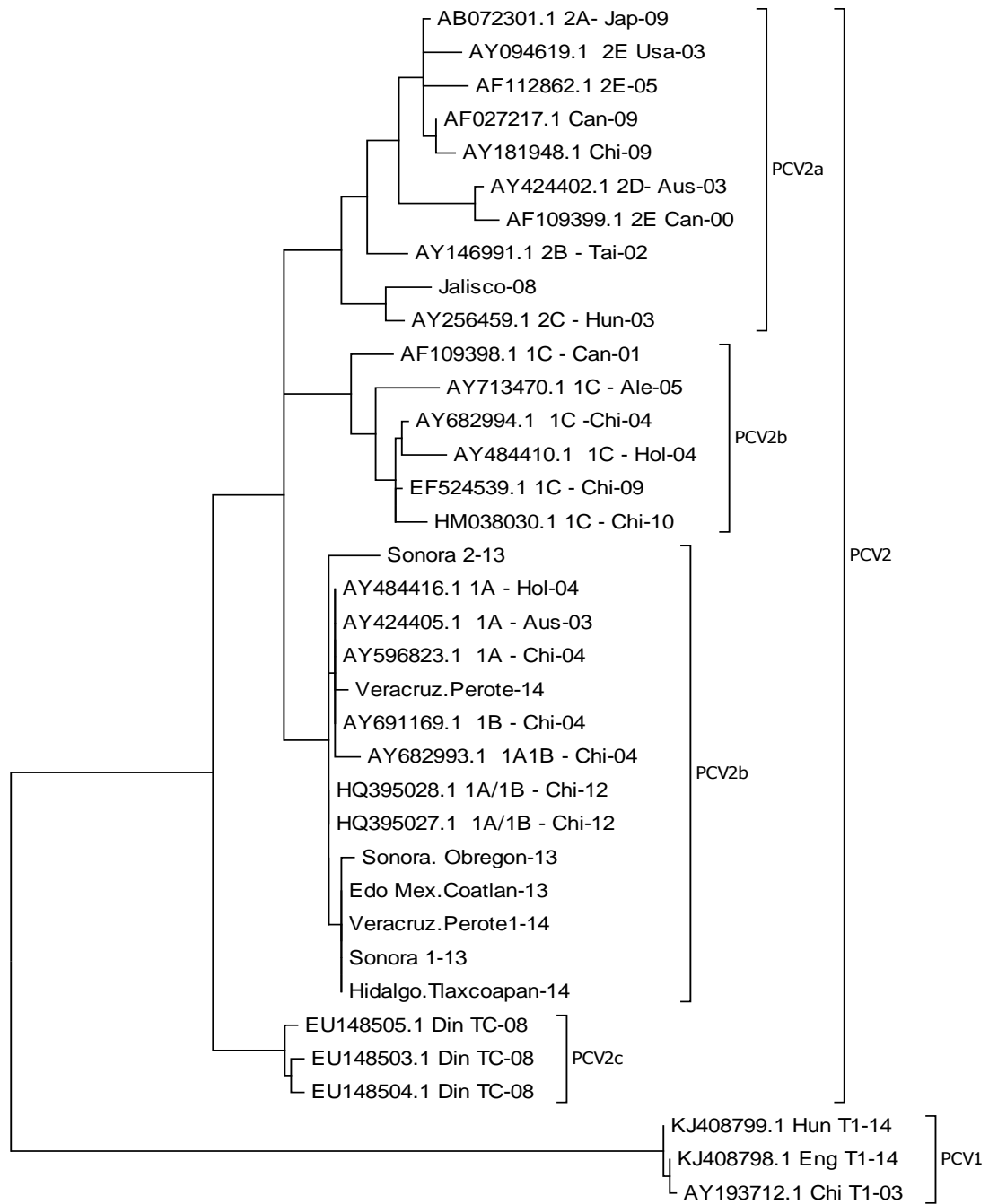
Tomando en cuenta los subgenotipos reportados y evaluando con los resultados obtenidos, se evidencio la presencia de varios subgenotipos presentes en el territorio nacional, el análisis de las secuencias muestra similitud en varios genotipos, predominando el subgenotipo PCV2b (1A/1B) con un 85.7%(6/7) y 14.3%(1/7) para PCV2b (1A), el 12.5% (1/8) perteneciente a PCV2a se clasifica como subgenotipo PCV2a (2C), además señala la diferencia que existe con PCV2 y PCV1 considerado como no patogénico. Ver figura 4.

En total se identificaron 120 cambios en las bases respecto a la secuencia de referencia con 89 mutaciones que producen cambio de aminoácido, 23 mutaciones que no generan cambio, 6 inserciones y 2 deleciones. Los cambios más importantes que se observan entre las muestras y la referencia se encuentran en las posiciones: 1033, 1040, 1045, 1111, 1167, 1175, 1178, 1179, 1188, 1198, 1205, 1207,1216, 1243, 1246, 1249, 1261, 1264, 1270, 1291,1296, 1297, 1300, 1327, 1339, 1378, 1385, 1402, 1405, 1417. Se encontró una alta similitud entre la muestra de campo Jalisco-08 respecto a la referencia, corroborando el resultado del árbol filogenético donde se clasifica como PCV2a, en las demás muestras de campo se evidencian los cambios que al parecer generan la variación en el genotipo y soporta la clasificación dada por el árbol filogenético de PCV2b, como se evidencia en la tabla 3.

La tabla 4 muestra el número de codón y el cambio que produce en los aminoácidos respecto a la muestra de referencia, así como inserciones, deleciones y ubicación de codones de paro. Las principales mutaciones que generan el cambio de clasificación dentro de los diferentes subgenotipos existentes. Las posiciones que más generan similitud con las

referencias de PCV2a respecto a la referencia son: 7, 9, 31, 52, 53, 60, 63, 66, 76, 77, 81, 94, 107, 120, 122, 128; estas ostentan el mismo aminoácido para Jalisco-08 pero cambia para los genotipo PCV2b; en la posición 7 y 76 se identifica un codón de paro para PCV2b presente en las muestras de campo, y en la posición 107 un codón de paro para PCV2a presente en la muestra Jalisco-08. El análisis muestra similitud entre las muestras de campo con las muestras de referencia para cada subgenotipo, especialmente para PCV2b (1A/1B), (1A) y para PCV2a con el subgenotipo (2C).

El resultado del árbol filogenético clasifica a las muestras de referencia de PCV2b 1C como un genotipo diferentes y más cercano a PCV2a, al revisar la alineación de estas muestras respecto a la referencia y las demás referencias, se observan 27 cambios, de los cuales 13 son iguales a PCV2b en las posiciones: 9, 52, 53, 62, 63, 76, 77, 81, 84, 93, 94, 103, 128; 7 para PCV2a: 7, 31, 66, 74, 82, 107, 122 y 7 cambios que solo se observan para el subgenotipo 1C en las posiciones: 60, 47, 67, 72, 73, 133, 144; algo en particular es que solo las muestras de PV2b 1C poseen los dos codones de paro encontrados en el análisis para cada genotipo y tiene en sus secuencias la inserción que hay en la posición 7 solo presente en las muestras de PCV2a.



$\frac{H}{0.005}$
Figura 4. Árbol filogenético, construido con 8 secuencias obtenidas de campo y genomas del genebank (identificadas con sus números de referencia). Construido con (MEGA6.0) usando el método Tamura-Nei.

Tabla3. Posición de mutación respecto a la muestra de referencia.

Posición	1033	1036	1038	1040	1041	1044	1045	1077	1093	1098	1104	1111	1112	1118	1120	1122	1124	1134	1135	1138	1141	1142	1143	1144	1145	1148	1151	1152	1154	1159	1163	1164	1167	1174	1175	1176	1177	1178	1179	1182	1185	1188		
AF027217.1 Can-09	T	C	T	T	A	G	T	T	G	C	T	G	T	T	G	A	A	C	G	C	A	G	T	-	G	G	-	-	C	G	-	-	C	C	T	A	G	A	G	T	T	C		
Jalisco-08	A	A	T	.	.	.	G	.	.	.	-	.	.	-	-	.	.	-	-	.	G	C
Edo Mex.Coatlan-13	A	.	.	A	T	-	.	.	-	-	.	.	-	T	.	C	.	.	T	A	.	.	.	T		
Sonora. Obregon-13	A	.	.	A	T	T	.	T	A	T	T	.	A	T	T	.	C	.	.	T	A	.	.	T		
Veracruz.Perote-14	A	.	.	A	T	T	T	-	.	.	-	-	.	.	-	T	.	C	.	.	C	A	.	.	T			
Veracruz.Perote1-14	A	.	.	A	T	-	.	.	-	-	.	.	-	T	.	C	.	.	T	A	.	.	T			
Sonora 1-13	A	.	.	A	T	-	.	.	-	-	.	.	-	T	.	C	.	.	T	A	.	.	T			
Sonora 2-13	A	.	.	A	T	-	.	.	-	-	.	.	-	T	.	C	.	.	T	A	.	.	T			
Hidalgo.Tlaxcoapan-14	A	.	.	A	T	-	.	.	-	-	.	.	-	T	.	C	.	.	T	A	.	.	T			
Otros			C			C	G	G	A	T	C		G	G	A	T	G	G	A	T	G	T	G						A						C	C				C	C			

Posición	1193	1194	1198	1201	1204	1205	1207	1208	1214	1216	1218	1219	1234	1237	1240	1241	1242	1243	1246	1249	1252	1258	1261	1264	1267	1270	1272	1273	1276	1284	1291	1296	1297	1300	1311	1321	1324	1327	1339	1340	1345	1346	
AF027217.1 Can-09	G	-	A	C	A	G	C	C	T	A	T	T	A	A	G	G	A	G	A	A	A	G	T	G	G	A	G	G	G	A	T	G	G	T	A	T	A	T	T	A	T	G	
Jalisco-08	.	-	.	.	.	T	A	G	A	.	C	.	.	.	C	.	T	G	.	.	.	G
Edo Mex.Coatlan-13	.	-	C	.	.	T	T	.	.	G	A	T	G	.	.	G	A	.	G	.	.	.	C	T	T	G	.	.	.	G	G	
Sonora. Obregon-13	.	A	C	.	.	T	T	.	.	G	A	T	G	.	.	G	A	.	G	.	.	.	C	T	T	G	.	.	.	G	G	
Veracruz.Perote-14	.	-	C	.	.	T	T	.	.	G	A	T	G	.	.	G	A	.	G	.	.	.	A	.	C	T	T	G	.	.	.	G	G	.	.	.
Veracruz.Perote1-14	.	-	C	.	.	T	T	.	.	G	A	T	G	.	.	G	A	.	G	.	.	.	C	T	T	G	.	.	.	G	G	
Sonora 1-13	.	-	C	.	.	T	T	.	.	G	A	T	G	.	.	G	A	.	G	.	.	.	C	T	T	G	.	.	.	G	G	
Sonora 2-13	.	-	C	.	G	T	T	.	C	G	A	T	G	.	.	G	A	.	G	.	.	.	C	T	T	G	.	.	.	G	G	
Hidalgo.Tlaxcoapan-14	.	-	C	.	.	T	T	.	.	G	A	T	G	.	.	G	A	.	G	.	.	.	C	T	T	G	.	.	.	G	G	
Otros	T			T				T			C	G	G	T	C	C	T			T	G	T			A		T	T		G					C	G	G		A	T	A	T	

Posición	1347	1350	1354	1355	1356	1357	1358	1359	1366	1371	1372	1377	1378	1380	1385	1390	1393	1402	1405	1408	1411	1417	1423	1425	1426	1428	1429	1430	1437	1438	1441	1444	1447	1450	1457	1459	1461	1462	1470	1473		
AF027217.1 Can-09	T	C	T	G	T	T	A	C	A	C	T	T	A	C	G	G	C	A	A	C	G	G	G	A	G	G	C	C	C	A	C	A	C	T	C	G	A	G	A	G		
Jalisco-08	.	A	.	.	G	A	.	A	C	T	A	A	T	T	.	.
Edo Mex.Coatlan-13	C	.	C	.	.	.	G	T	.	.	C
Sonora. Obregon-13	C	.	C	.	.	.	G	T	.	.	C
Veracruz.Perote-14	C	.	.	.	C
Veracruz.Perote1-14	C	.	C	.	.	.	G	T	.	.	C
Sonora 1-13	C	.	C	.	.	.	G	T	.	.	C
Sonora 2-13	C	.	.	G	.	.	.	C	T	.	C	T	.	.	T	G	C		
Hidalgo.Tlaxcoapan-14	C	.	C	.	.	.	G	T	.	.	C
Otros	G		A	A			G		G	T	C	C	T	T		T	A			T	A		T	T	A	C	A	A		C	T		T									

Tabla 4. Posición de codón y cambio en aminoácido respecto a la muestra de referencia.

# Codon	5	6	7	9	25	31	33	34	35	38	39	40	41	42	43	44	45	47	48	52	53	55	58	60	62	63	65	66	67	72	73	74	75	76	77	78	80
AF027217.1 Can-09	F	H	L	F	G	V	V	V	Y	F	E	R	S	-	R	-	A	V	-	L	E	C	-	K	S	P	V	I	W	N	S	G	V	K	N	R	G
Jalisco-08	I	N	F	.	.	G	.	-	.	-	.	.	-	A	.	.	-	.	I	I
Edo Mex.Coatlan-13	I	.	*	-	.	F	-	.	-	.	.	-	P	V	.	-	Q	I	S	.	V	I	*	D	.	.	
Sonora. Obregon-13	I	.	*	-	.	F	C	L	D	V	.	D	P	V	.	R	Q	I	S	.	V	I	*	D	.	.	
Veracruz.Perote-14	I	.	Y	-	.	F	-	.	-	.	.	-	P	A	.	-	Q	I	S	.	V	I	*	D	.	.	
Veracruz.Perote1-14	I	.	*	-	.	F	-	.	-	.	.	-	P	V	.	-	Q	I	S	.	V	I	*	D	.	.	
Sonora 1-13	I	.	*	-	.	F	-	.	-	.	.	-	P	V	.	-	Q	I	S	.	V	I	*	D	.	.	
Sonora 2-13	I	.	*	-	.	F	-	.	-	.	.	-	P	V	.	-	Q	V	S	A	V	I	*	D	.	.	
Hidalgo.Tlaxcoapan-14	I	.	*	-	.	F	-	.	-	.	.	-	P	V	.	-	Q	I	S	.	V	I	*	D	.	.	
Otros				V	S	G	G	I	C	L	K	C/G	V				M			L	W		E		F			G	D	C	S/P			Y	G	W/R	

# Codon	81	82	83	84	86	93	94	101	102	103	107	109	112	113	116	118	120	122	124	125	128	129	131	133	135	136	137	139	140	141	142	143	144	146	147	148	
AF027217.1 Can-09	C	E	V	T	V	D	C	Y	I	W	*	C	C	Y	I	*	N	S	A	H	I	T	G	G	A	G	P	F	N	L	N	L	S	S	V	V	
Jalisco-08	G	K	.	P	.	Y	G	.	.	G	.	.	W	K	R	W	.	.	.	L	I	L
Edo Mex.Coatlan-13	G	K	.	A	.	Y	G	.	.	G	E	H	T	.	.	V	S	.	R	
Sonora. Obregon-13	G	K	.	A	.	Y	G	.	.	G	E	H	T	.	.	V	S	.	R	
Veracruz.Perote-14	G	K	.	A	M	Y	G	.	.	G	E	T	.	.	V	.	.	R	
Veracruz.Perote1-14	G	K	.	A	.	Y	G	.	.	G	E	H	T	.	.	V	S	.	R	
Sonora 1-13	G	K	.	A	.	Y	G	.	.	G	E	H	T	.	.	V	S	.	R	
Sonora 2-13	G	K	.	A	.	Y	G	.	.	G	E	T	.	.	V	.	.	R	Y	.	P	F	.	L		
Hidalgo.Tlaxcoapan-14	G	K	.	A	.	Y	G	.	.	G	E	H	T	.	-	V	S	.	R	
Otros			L/I				D	V		L/K	W/I	S/G	C	V	Q	D/Y		S	Y/N			S		S	R/C	K		H	F		F						

Mismo Aminoácido	.
Ausencia Aminoácido	-
Codón de Paro	*

8. Discusión

PCV2 es de distribución ubicua, estable al medio ambiente y resistente a desinfectantes, es el responsable de las PCVAD y de altas pérdidas económicas en la producción de cerdos, la presencia de diferentes genotipos se ha mostrado a nivel mundial, PCV2 se divide en tres genotipos (PCV2a, PCV2b, PCV2c), PCV2a a su vez en 5 cluster (2A -2E) y PCV2b en 3 cluster (1A – 1C) (Wei C *et al.* 2013; Olvera *et al.* 2007).

Los porcentajes de similitud entre los diferentes genotipos al ser comparados con la secuencia de referencia, concuerdan con lo reportado por diferentes autores (Olvera *et al.* 2007; Huang *et al.* 2011; Triple and Rowland. 2012; Hesse, *et al.* 2008), donde los genotipos a y b tienen un porcentaje de similitud 95 a 97% (97.1% en las muestras secuenciadas) el genotipo C un 92% (92 % en nuestro análisis) y un 70% con respecto al genotipo PCV1 (71% encontrado en nuestro análisis). Recientemente se ha reportado que PCV2b es el genotipo predominante en la mayoría de países del mundo Wei C *et al.* 2013; Triple and Rowland. 2012; Olvera *et al.* 2007, En la República Mexicana estos datos no son ajenos a lo que sucede en el resto de mundo, con un 87.5%(7/8) clasificadas como PCV2b y un 12.5%(1/8) como PCV2a, no se registró ningún genotipo de PCV2c dentro de las muestra analizadas.

Tomando en cuenta las secuencias de los subgenotipos reportados y comparando con los resultados obtenidos, se evidenció la presencia de varios subgenotipos presentes en el territorio nacional, donde predomina el subgenotipo PCV2b (1A/1B) con un 85.7% (6/7) del (87.5%) y 14.3% para PCV2b (1A), el 12.5% (1/7) perteneciente a PCV2a lo clasifica como subgenotipo PCV2a (2C)(1/8), además señala la diferencia que existe entre PCV2 y PCV1 considerado como no patogénico.

En total se identificaron 120 cambios en las bases respecto a la secuencia de referencia con 89 mutaciones que producen cambio de aminoácido, 23 mutaciones que no generan cambio en aminoácidos, 6 inserciones, 2 deleciones. Aunque las variaciones se distribuyen a través de toda la secuencia del ORF2, la alineación reveló áreas de mayor heterogeneidad entre

las muestras y los genotipos, donde las muestras Edo Mex.Coatlan-13, Sonora. Obregon13, Veracruz.Perote-14, Veracruz.Perote1-14, Sonora1-13, Sonora2-13, Hidalgo.Tlaxcoapan-14, respecto al genotipo PCV2b 1A/1B en las posiciones 5-31, 52-77, 81-103, 107-133 son semejantes a lo que reporta Savic *et al.*2012. Para el subgenotipo PCV2 1C se muestra como un genotipo diferente y más cercano a PCV2a, al revisar la alineación se observan 27 cambios, de los cuales 13 son iguales a PCV2b en las posiciones: 9, 52, 53, 62, 63, 76, 77, 81, 84, 93, 94, 103, 128; 7 para PCV2a: 7, 31, 66, 74, 82, 107, 122 y 7 cambios que solo se observan para el subgenotipo 1C en las posiciones: 60, 47, 67, 72, 73, 133, 144, algo en particular es que solo las muestras de PV2b 1C poseen los dos codones de paro 76, 107; encontrados en el análisis para cada genotipo y tiene en sus secuencias la inserción que hay en la posición 7 solo presente en las muestras de PCV2a, lo que sugiere, da la clasificación como genotipo diferente, pero si revisamos detalladamente tiene una alta similitud con el genotipo PCV2b, pero debido a que posee la inserción en la posición 7, solo presente en las muestras PCV2a, se genera su cercanía a PCV2a, se podría sugerir también que estos cambios encontrado en la alineación de todas estas muestras sea producto de una recombinación entre los genotipos PCV2a y PCV2b, como se ha propuesto por muchos autores, pero en nuestro caso no podría corroborarse, ya que el segmento analizado es muy pequeño(64.38% del ORF2) y se requiere tener los dos principales ORF para poder determinar si se produjo o no esta recombinación tal como lo señalan algunos autores Tribble and Rowland. 2012; Hesse, *et al.* 2008; Olvera *et al.* 2007; Savic *et al.*2012. Para PCV2a las posiciones que más generan similitud respecto a la referencia son: 31, 53, 60, 63, 66, 77, 120, 122, 128, 129; estas ostentan el mismo aminoácido para la muestra Jalisco-08, lo que clasifica esta muestra como PCV2a y soporta la distribución dada en el árbol filogenético.

Además se encontró muy poca diferencia entre las secuencias de nucleótidos al ser compradas por pares, entre las muestras secuenciadas con respecto a las muestras de referencia para PCV2b 1A-1B, no se descubrió en ninguna de las muestras cambios relevantes que las diferenciaron entre los diferentes subgenotipos, excepto en la muestra Sonora 2-13, presentando una diferencia de 0.02 respecto a las demás en la construcción del

árbol filogenético, donde las secuencias de nucleótidos con distancias inferiores a 0.005 en las comparaciones por pares son casi idénticas o idénticas, y se limita a un máximo de 3 diferencias de nucleótidos y una diferencia de un aminoácido, como se muestra en la figura 5. Caso contrario sucede para el genotipo PCV2a y el subgenotipo PCV2b 1C donde se muestra una diferencia marcada entre cada uno de los subgenotipos alineados, donde se observan distancias de 0.01, 0.02, 0.03, entre los diferentes subgrupos, figura 6. (Tamura *et al.* 2013; Wei C *et al.* 2013; Olvera *et al.* 2007; Savic *et al.* 2012; Ramos *et al.* 2012; Triple and Rowland. 2012).

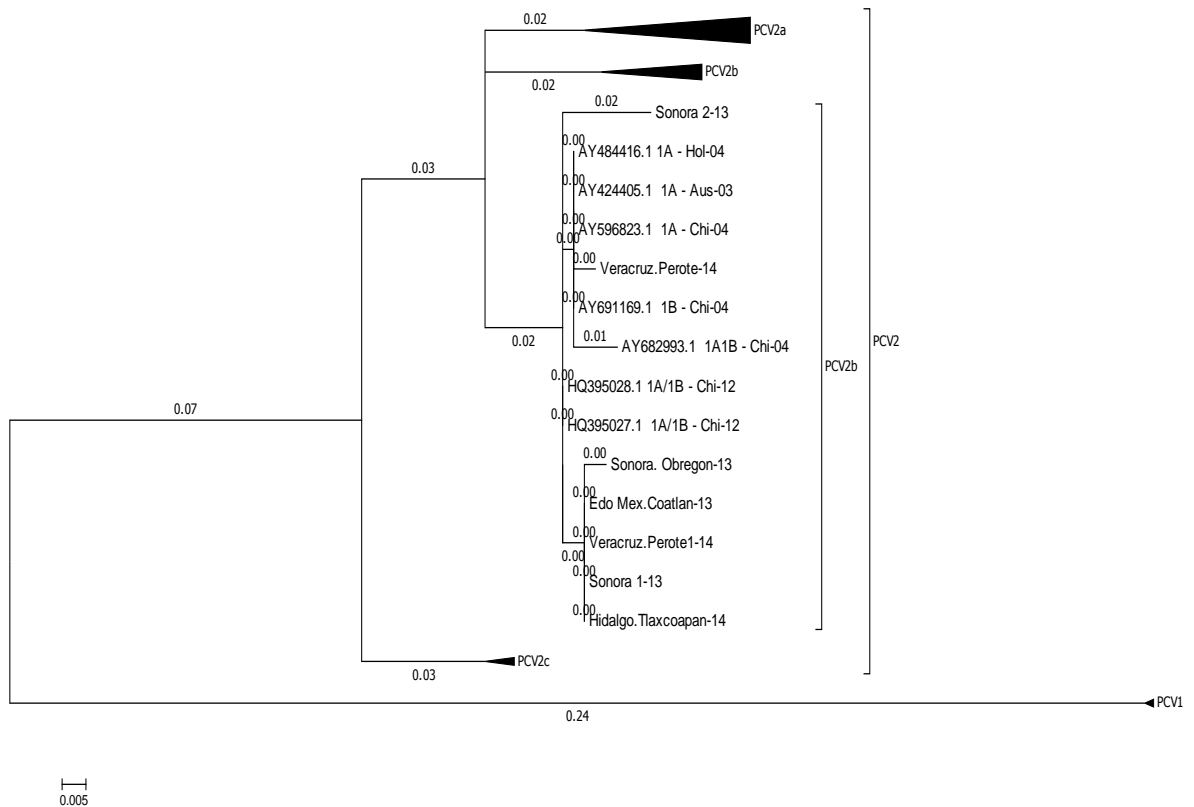


Figura 5. Distancia entre subgenotipos de PCV2b, y la diferencia encontrada en el análisis respecto al subgenotipo PCV2 (1C).

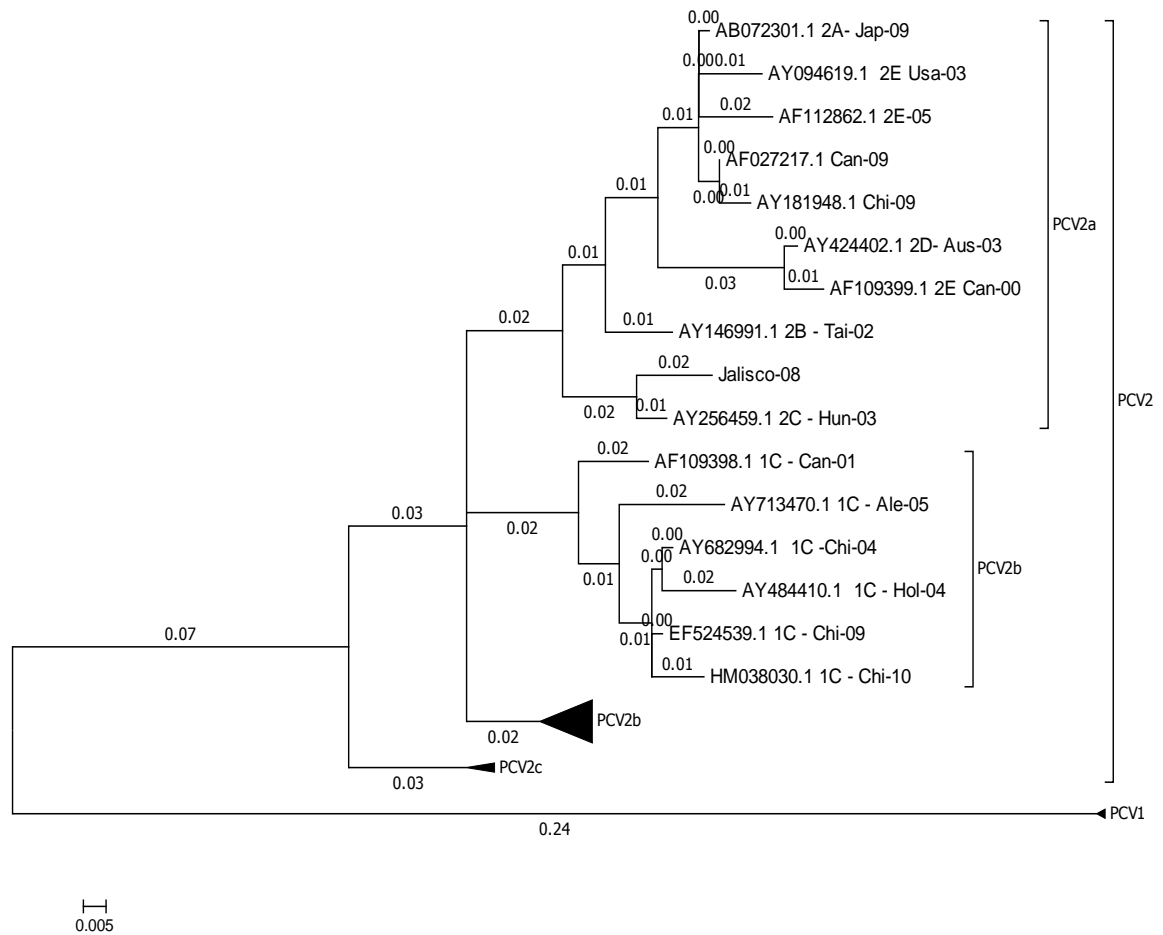


Figura 6. Distancia entre subgenotipos de PCV2a y similitud con el subgenotipo de PCV2b (1C).

En nuestro estudio se evaluó la presencia de los diferentes genotipos de PCV2, además la distribución de estos en los diferentes estados: Sonora, Jalisco, Estado de México, Hidalgo y Veracruz. Identificando cambios en el marco de lectura abierto 2 (ORF2) que indiquen los calificaron dentro de los diferentes genotipos, y generando un árbol, filogenético donde se relaciona la similitud entre cada genotipo y sus genotipos, encontrando un gran predominio del PCV2b y sus genotipos 1A-1B con presencia en 4 de los 5 estados evaluados, y un estado para PCV2a.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran semejanza con dos autores, en especial en las áreas de mayor heterogeneidad como reporta Savic *et al.* 2012 y en las áreas de mayor variabilidad como Wei C *et al.* 2013. Todo esto soporta la importancia de los resultados obtenidos y abre paso para realización de nuevas investigación, con el fin de esclarecer las incógnitas que existen sobre el comportamiento del virus; así como un estatus sanitario respecto a la enfermedad más actual; obtención del genoma viral completo, para así determinar la presencia con exactitud de los diferentes subgenotipos y la posible presencia de virus recombinados entre PCV1, PCV2a y PCV2b; además de contrastar la presencia de los genotipos y sus subtipos con la manifestación clínica en las piaras de la república Mexicana y poder recopilar información que apoye o rechace la gran disyuntiva que hay sobre las patogenicidad de los diferentes genotipos, además de su concomitancia con otras patologías como ya ha sido reportado.

Con los resultados obtenidos y la discusión realizada acerca de estos podemos concluir que los genotipos de PCV2a y PCV2b están presentes en México debido a la alta prevalencia de la enfermedad en las granjas del país, generando altas pérdidas económicas y limitantes en el desarrollo de la industria, aceptando nuestra hipótesis dejando muchas incógnitas sobre el comportamiento y manejo de la enfermedad en la República Mexicana.

Aún falta recabar en el territorio nacional mucha información acerca del comportamiento, presentación y manifestaciones clínicas de PCV2. Este estudio solo nos aproxima con los genotipos reportados, pero aún queda por revisar muchos factores, tanto del agente como de las condiciones manejo, ambientales y demás, para así, poder tener un panorama más claro en cuanto a genotipos presentes, manifestaciones clínicas en los diferentes estados, estado sanitario frente a la enfermedad, perdidas económicas y demás factores que se pueden pasar por alto, pero que afectan de manera directa la economía de los grandes y pequeños productores de cerdos en todo el territorio nacional.

9. Anexos

Anexo 1. Referencias de genbank y otras tomadas de (Olvera *et al.* 2007; Wei C *et al.* 2013)

Numero de acceso	País	Año
AF112862.1	Canadá	2000
AY181948.1	China	2009
AB072301.1	Japón	2009
AF027217.1	Canadá	2009
AF109398.1	Canadá	2001
AY146991.1	Taiwán	2002
AY424402.1	Austria	2003
AY256459.1	Hungría	2003
AF109399.1	Canadá	2000
AY094619.1	USA	2003
EU148503.1	Dinamarca	2008
EU148504.1	Dinamarca	2008
EU148505.1	Dinamarca	2008
HQ395028.1	China	2012
AY596823.1	China	2004
HQ395027.1	China	2012
AY682993.1	China	2004
AY682994.1	China	2004
EF524539.1	China	2009
HM038030.1	China	2010
AY484410.1	Holanda	2004
AY193712.1	China	2003
KJ408799.1	Hungría	2014
KJ408798.1	Inglaterra	2014

AY713470.1	Alemania	2005
AY691169.1	China	2004
AY424405.1	Austria	2003

10. Bibliografía

- Allan, G.M., Kennedy, S., McNeilly, F., Foster, J.C., Ellis, J.A., Krakowka, S.J., Meehan, B.M., Adair, B.M., 1999, Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J Comp Pathol* pp. 121, 1-11.
- Armstrong, D., Bishop, S., 2004, Does genetics or litter effect influence mortality in PMWS. In: *Proceedings of the international pig veterinary society congress*, p. 809.
- Brunborg, I.M., Jonassen, C.M., Moldal, T., Bratberg, B., Lium, B., Koenen, F., Schonheit, J., 2007, 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. *J Vet Diagn Invest* 19, 368-375.
- Calsamiglia, M., Fraile, L., Espinal, A., Cuxart, A., Seminati, C., Martin, M., Mateu, E., Domingo, M., Segales, J., 2007, Sow porcine circovirus type 2 (PCV2) status effect on litter mortality in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Res Vet Sci* 82, 299-304.
- Cano J.P., C. Rodríguez, E. Sogbe, J. Segalés, V. Utrera y C. Díaz. 2004. Coinfección de Circovirus Porcino Tipo 2 con el Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino en Venezuela. *Rev. Fac. Cs. Vets. UCV*. 45 (1): 19-29.
- Carasova, P., Celer, V., Takacova, K., Trundova, M., Molinkova, D., Lobova, D., Smola, J., 2007, The levels of PCV2 specific antibodies and viremia in pigs. *Res Vet Sci* 83, 274-278.
- Cariolet, R., Blanchard, J.F., L., D., Mahé, D., Jolly, J.P., de Boisseson, C., Truong, C., Ecobichon, P., Madec, F., Jestin, A., 2001, Experimental infection of pregnant SPF

sows with PCV2 through tracheal and muscular routes. In: Proceedings of the ssDNA Viruses Plants, Birds, Pigs and Primates (ESVV) Meeting, p.129.

Carrasco, L., Segalés, J., Bautista, M.J., Gómez-Villamandos, J.C., Rosell, C., Ruiz-Villamor, E., Sierra, M.A., 2000. Intestinal chlamydial infection concurrent with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Vet. Rec.* 146 (1), 21–23.

Cavallini Sanches, E.M., Borba, M.R., Spanamberg, A., Pescador, C., Corbellini, L.G., Ravazzolo, A.P., Driemeier, D., Ferreira, L., 2006. Co-infection of *Pneumocystis carinii* f.sp suis and porcine circovirus-2 (PCV2) in pig lungs obtained from slaughterhouses in southern and midwestern regions of Brazil. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53 (Suppl 1), S92–S94.

Chae, J.S., Choi, K.S., 2010. Genetic diversity of porcine circovirus type 2 from pigs in Republic of Korea. *Res. Vet. Sci.* 88 (2), 333–338.

Chang, H.W., Jeng, C.R., Lin, T.L., Liu, J.J., Chiou, M.T., Tsai, C.Y., Chia, M.Y., Jan, T.R., Pang, V.F., 2006. Immunopathological effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) on swine alveolar macrophages by in vitro inoculation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 110 (3–4), 207–219.

Clark, E.G., 1997. Post-weaning multisystemic wasting syndrome. In: *Proc. Am. Assoc. Swine Pract.*, Quebec City, Canada, pp. 499–501.

Connor, J., Elsener, J., 2007, Field efficacy of Suvaxyn[®] PCV2 One Dose in pigs. In: Proceedings of the 38th American Association of Swine Veterinarians Annual meeting, pp. 151-152.

- Corrégé, I., 2001, La Maladie de l'Amaigrissement du Porcelet (MAP). Journées de la Recherche Porcine 33, 283-290.
- Cortey, M., L. Grau_Roma, and J. Segales, 2011a: Letter to the Editor: Further comments on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and nomenclature. *Vet. Microbiol.* 149, 522–523.
- Darwich, L., J. Segalés y E. Mateu. 2004. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by PCV2: an immune riddle Brief review. *Arch Virol.* 149:857-874.
- Dupont, K., E. O. Nielsen, P. Baekbo, and L. E. Larsen, 2008: Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Vet. Microbiol.* 128, 56–64.
- Ellis J. 2003. Porcine circovirus: An old virus in new guise cause an emerging disease through a novel pathogenesis. *Large Animal Veterinary Rounds.* 3: 1- 6.
- Finsterbusch, T., Mankertz, A., 2009, Porcine circoviruses—Small but powerful. *Virus Research* 143, 177–183
- Francisco, C., Thacker, 2007, Field performance of a conditionally licensed vaccine: US experience. In: *Proceedings of the 38th American Association of Swine Veterinarians Annual meeting*, p. 157.
- Gilpin, D.F., McCullough, K., Meehan, B.M., McNeilly, F., McNair, I., Stevenson, L.S., Foster, J.C., Ellis, J.A., Krakowka, S., Adair, B.M., Allan, G.M., 2003. In vitro studies on the infection and replication of porcine circovirus type 2 in cells of the porcine immune system. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 94 (3–4), 149–161.

- Grau-Roma, L., Crisci, E., Sibila, M., Lopez-Soria, S., Nofrarias, M., Cortey, M., Fraile, L., Olvera, A., Segales, J., 2008, A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. *Vet Microbiol* 128, 23-35. (Erratum in: *Vet. Microbiol.* 2010, 141 (1–2) 194–195).
- Guo, L., Lu, Y., Wei, Y., Huang, L., Wu, H., Liu, C., 2011. Porcine circovirus genotype 2a (PCV2a) and genotype 2b (PCV2b) recombinant mutants showed significantly enhanced viral replication and altered antigenicity in vitro. *Virology* 419 (2), 57–63.
- Hamel A. L., L.L. Lin y C. Sachvie. 2000. PCR Detection and characterization of type 2 porcine Circovirus. *Can J. Vet. Res.* 64: 44-52.
- Harding, J., 1996, Post-weaning multisystemic wasting-syndrome (PMWS): preliminary epidemiology and clinical presentation. In: *Proceedings of the Western Canadian Association of Swine Practitioners*, p. 21.
- Harding, J.C., Clark, E.G., 1997. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J. Swine Health Prod.* 5, 201–203.
- Harding, J.C., Ellis, J.A., McIntosh, K.A., Krakowka, S., 2010. Dual heterologous porcine circovirus genogroup 2a/2b infection induces severe disease in germ-free pigs. *Vet. Microbiol.* 145 (3–4), 209–219.
- Hesse, R., Kerrigan, M., Rowland, R.R., 2008. Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field. *Virus Research.* 132, 201-207.
- Huang, L.P., Lu, H.Y., Wei, W. Y., Guo, J. L., Liu, M.C., 2011. Identification of one critical amino acid that determines a conformational neutralizing epitope in the capsid protein of porcine circovirus type 2. *BMC Microbiology.* 11,188.

- Illanes O., A. López, L. Miller, J. Mclearn, C. Yason, D. Wadowska y J. Martínez. 2000. Lesions associated with Postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs from Prince Edward Island, Canada. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12: 146-150.
- Jantafong, T., A. Boonsoongnern, P. Poolperm, K. Urairong, C. Lekcharoensuk, and P. Lekcharoensuk, 2011: Genetic characterization of porcine circovirus type 2 in piglets from PMWS-affected and -negative farms in Thailand. *Virology* 438, 88.
- Jaros, P., McIntyre, L.H., Morris, R.S., Johnstone, A.C., Garkavenko, O., Neumann, E., 2006, Experimental evidence that an agent other than PCV2 is a necessary cause of PMWS. In: Proceedings of 19th International Pig Veterinary Society Congress, p.168.
- Joisel, F., Brune, A., Schade, A., Longo, S., Charreyre, C., 2007. Vaccination of sows and gilts against PCV2 diseases with CIRCOVAC[®] (Merial): Field experience in Europe. In: Proceedings of the 38th American Association of Swine Veterinarians Annual meeting, pp. 311-314.
- Karlskov-Mortensen, P., Kristensen, C.S., Grau-Roma, L., Bille-Hansen, V., McNeilly, F., C.B., J., Bækbo, P., Segales, J., Fredholm, M., 2008, Closing in on a locus with effect on PMWS susceptibility. In: Proceedings of 2nd European conference of pigs genomics.
- Kekarainen, T., McCullough, K., Fort, M., Fossum, C., Segalés, J., Allan, G.M., 2010. Immune responses and vaccine-induced immunity against porcine circovirus type 2. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 136 (3–4), 185–193.
- Khaiseb, S., Sydler, T., Zimmermann, D., Pospischil, A., Sidler, X., Brugnera, E., 2011. Coreplication of the major genotype group members of porcine circovirus type 2 as

a prerequisite to coevolution may explain the variable disease manifestations. *J. Virol.* 85 (21), 11111–11120.

Kim, K.S., Jung, J.Y., Kim, J.H., Kang, S.C., Hwang, E.K., Park, B.K., Kim, D.Y., Kim, J.H., 2011. Epidemiological characteristics of pulmonary pneumocystosis and concurrent infections in pigs in Jeju Island, Korea. *J. Vet. Sci.* 12 (1), 15–19.

Kixmoller, M., Ritzmann, M., Eddicks, M., Saalmuller, A., Elbers, K., Fachinger, V., 2008, Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine.*

Krakovka, S., Ellis, J.A., McNeilly, F., Gilpin, D., Meehan, B., McCullough, K., Allan, G., 2002. Immunologic features of porcine circovirus type 2 infection. *Viral Immunol.* 15 (4), 567–582.

Krakovka, S., F. Ellis, B. McNeilly, M. Meehan, S. Oglesbee, M. Alldinger y G. Allan. 2004. Features of Cell Degeneration and Death in Hepatic Failure and Systemic Lymphoid Depletion Characteristic of PCV2 associated Postweaning Multisystemic Wasting Disease. *Vet Pathol* 47: 471-481.

Kristensen, C.S., Bille-Hansen, V., Vestergaard, K., Jorsal, S.E., Baekbo, P., Enoe, C., Larsen, E.L., 2007, Airborne transmission of PMWS between pig units located at close range. In: *Proceedings of 5th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases*, p.73.

Liu, J., Guo, L., Zhang, L., Wei, Y., Huang, L., Wu, H., Liu, C., 2013, Three new emerging subgroups of torque teno sus viruses (TTSuVs) and co-infection of TTSuVs with porcine circovirus type 2 in China. *Virology Journal*, 10:189.

- Lohse, L., Botner, A., Hansen, A.S., Frederiksen, T., Dupont, K., Christensen, C.S., Baekbo, P., Nielsen, J., 2008, Examination for a viral co-factor in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Microbiol* 129, 97-107.
- Lopez, Soria., Grau-Roma, L., Segalés, J., 2008, “Epidemiología de la circovirus porcina” , *Suis*, nº 49, pp 14-23).
- Lopez-Soria, S., Segales, J., Nofrarias, M., Calsamiglia, M., Ramirez, H., Minguez, A., Serrano, I.M., Marin, O., Callen, A., 2004, Genetic influence on the expression of PCV disease. *Vet Rec* 155, 504.
- Lopez-Soria, S., Segales, J., Rose, N., Vinas, M.J., Blanchard, P., Madec, F., Jestin, A., Casal, J., Domingo, M., 2005, An exploratory study on risk factors for postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain. *Prev Vet Med* 69, 97-107.
- Madec F, E. Eveno, P. Morvan, L. Hamon, H. Morvan, E. Albina, C. Truong, E. Hutet, R. Cariolet, C. Arnauld y A. Jestin. 1999. La maladie de l'amaigrissement du porcelet (MAP) en France 1 – Aspects descriptifs, impact en élevage. *Journées Rech. Porcine en France*. 31:347-354.
- Madec F, E. Eveno, P. Morvan, L. Hamon, P. Blanchard, R. Cariolet, N. Amenna, H. Morvan, C. Truong, D. Mahé, E. Albina y A. Jestin. 2000. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. *Livestock Prod Sci*. 63:223-233.
- Madson D., Opriessnig, T., Kuster, C., Pal, N., Ramamoorthy, S., Meng, X.J., Halbur, P., 2008, Shedding of porcine circovirus type 2 by boars and the role of PCV-2 in semen transmission. In: *Proceedings of the 39th American Association of Swine Veterinarians Annual meeting*, pp.129,130.

- Mankertz, A., Domingo, M., Folch, J.M., LeCann, P., Jestin, A., Segales, J., Chmielewicz, B., Plana-Duran, J., Soike, D., 2000, Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Res* 66, 65-77.
- Meehan, B.M., McNeilly, F., Todd, D., Kennedy, S., Jewhurst, V.A., Ellis, J.A., Hassard, L.E., Clark, E.G., Haines, D.M., Allan, G.M., 1998, Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J Gen Virol* 79 (Pt 9), 2171-2179.
- Olvera, A., Sibila, M., Calsamiglia, M., Segales, J., Domingo, M., 2004, Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *J Virol Methods* 117, 75-80.
- Olvera, A., Cortey, M., Segales, J., 2007, Molecular evolución of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology* 357,175-185.
- Opriessnig, T., McKeown, N.E., Zhou, E.M., Meng, X.J., Halbur, P.G., 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. *J Gen Virol* 87, 2923-2932.
- Opriessnig, T., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2007, Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest* 19, 591-615.
- Opriessnig, T., Thacker, E.L., Yu, S., Fenaux, M., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2004, Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs

by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Vet Pathol* 41, 624-640.

Park, J.S., Kim, J., Ha, Y., Jung, K., Choi, C., Lim, J.K., Kim, S.H., Chae, C., 2005, Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. *J Comp Pathol* 132, 139-144.

Pérez-Martín, E., Rovira, A., Calsamiglia, M., Mankertz, A., Rodríguez, F., Segalés, J., 2007. A new method to identify cell types that support porcine circovirus type 2 replication in formalin-fixed, paraffin-embedded swine tissues. *J. Virol. Methods* 146 (1–2), 86–95.

Ramos N., Mirazo S., Castro G., Arbiza J., 2012. Detection and molecular characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) from piglets with exudative epidermitis in Uruguay. *Veterinary Science* 1-2.

Rodriguez-Arrioja, G.M., Segales, J., Calsamiglia, M., Resendes, A.R., Balasch, M., Plana-Duran, J., Casal, J., Domingo, M., 2002, Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Am J Vet Res* 63, 354-357.

Rodriguez-Arrioja, G.M., Segales, J., Domingo, M., Plana-Duran, J., 2003a, Lack of PCV-2 infection in non-porcine species in Spain. *Vet Rec* 153, 371-372.

Rodriguez-Arrioja, G.M., Segales, J., Rosell, C., Rovira, A., Pujols, J., Plana-Duran, J., Domingo, M., 2003b, Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 50, 99-101.

- Rose, N., Abhervé-Guéguen, A., Le Diguerher, G., Eveno, E., Jolly, J.P., Blanchard, P., Oger, A., Jestin, A., Madec, F., 2005, Effect of the Pietrain breed used as terminal boar on Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in the offspring in four PMWS-affected farms. *Livest Prod Sci* 95, 177-186.
- Rose, N., Larour, G., Le Diguerher, G., Eveno, E., Jolly, J.P., Blanchard, P., Oger, A., Le Dimna, M., Jestin, A., Madec, F., 2003, Risk factors for porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in 149 French farrow-to-finish herds. *Prev Vet Med* 61, 209-225.
- Rosell C., J. Segalés, A. Rovira y M Domingo. 2000. Porcine circovirus in Spain. *Vet. Rec.* 146, 591-592.
- Rosell, C., Segalés, J., Plana-Duran, J., Balasch, M., Rodríguez-Arrijoja, G.M., Kennedy, S., Allan, G.M., McNeilly, F., Latimer, K.S., Domingo, M., 1999. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J. Comp. Pathol.* 120 (1), 59–78.
- Rovira, A., Balasch, M., Segales, J., Garcia, L., Plana-Duran, J., Rosell, C., Ellerbrok, H., Mankertz, A., Domingo, M., 2002, Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J Virol* 76, 3232-3239.
- Sánchez, R., Nauwynck, H., Pensaert, M., 2001, Serological survey of porcine circovirus type 2 antibodies in domestic and feral pigs populations in Belgium. In: *Proceedings of the ssDNA Viruses Plants, Birds, Pigs and Primates (ESVV) Meeting*, p.122.
- Sandvik T., S. Grierson, D.P. King, Y. Spencer, M. Banks y T. Drew. 2001. Detection and genetic typing of porcine circovirus DNA isolated from archived paraffin embedded

pig tissues. Proceedings of ssDNA Viruses of Plants, Birds, Pigs and Primates, pp. 111.

Sarradell J., A.M. Pérez, E. Comba, N. Pereira, L. Anthony, M. Andrada y J. Segalés. 2004. Hallazgos patológicos en cerdos afectados con el síndrome del desmedro multisistémico postdestete de la República de Argentina. Revista Argentina de Microbiología. 36: 118-124.

Savic, B., Milicevic, V., Jakic-Dimic, D., Bojkovski, J., Prodanovic, R., Kureljusic, B., Potkonjak, A., Savic, B. 2012. Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) in Serbia. Arch Virol 157:21–28

Segalés J. y M. Domingo. 2002. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. Vet. Quart. 24:109-124.

Segales, J., A. Olvera, L. Grau-Roma, C. Charreyre, H. Nauwynck, L. Larsen, K. Dupont, K. McCullough, J. Ellis, S. Krakowka, A. Mankertz, M. Fredholm, C. Fossum, S. Timmusk, N. Stockhofe-Zurwieden, V. Beattie, D. Armstrong, B. Grassland, P. Baekbo, and G. Allan, 2008: PCV-2 genotype definition and nomenclature. Vet. Rec. 162, 867–868.

Segalés, J., Allan, G.M., Domingo, M., 2005, Porcine circovirus diseases. Animal Health Research Reviews 6, 119-142.

Segalés, J., Domingo, M., Chianini, F., Majó, N., Domínguez, J., Darwich, L., Mateu, E., 2004. Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. Vet. Microbiol. 98 (2), 151–158.

Segalés, J., G. Allan y M. Domingo. 2006. Porcine Circovirus diseases. In B.Straw, J. Zimmerman, S. D`Allaire and D. Taylor (Eds). Diseases of swine. 9th edition. Blackwell publishing. Ohio USA.

- Segalés, J., Larsen, L., Wallgren, P., Rose, N., Grau-Roma, L., Sibila, M., Fraile, L., Casal, J., Baekbo, P., 2007, What do we know on epidemiology, control and prevention of porcine circovirus diseases? 5th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases p.35.
- Segalés, J., M. Calsamiglia, y M. Domingo. 2003a How We diagnose Postweaning multisystemic Wasting Syndrome. Proc Emerg Reemerg Swine Diseases. 22: 149-151.
- Shibata, I., Okuda, Y., Kitajima, K., Asai, T., 2006, Shedding of porcine circovirus into colostrum of sows. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 53, 278-280.
- Sibila, M., Calsamiglia, M., Segales, J., Blanchard, P., Badiella, L., Le Dimna, M., Jestin, A., Domingo, M., 2004, Use of a polymerase chain reaction assay and an ELISA to monitor porcine circovirus type 2 infection in pigs from farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. Am J Vet Res 65, 88-92.
- Steiner, E., Balmelli, C., Herrmann, B., Summerfield, A., McCullough, K., 2008. Porcine circovirus type 2 displays pluripotency in cell targeting. Virology 378 (2), 311–322.
- Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S., 2003. Toll-like receptors. Annu. Rev. Immunol. 21, 335–376.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.

- Trible, R.B, Rowland, R.R., 2012, Genetic variation of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its relevance to vaccination, pathogenesis and diagnosis. *Virus Resarch* 164, 68-77.
- Trujano C.M, Piña R., “Síndrome Dermatítico y Nefrótico Porcino en México.” *Memorias AMVEC*, 2002.
- Vicente, J., Segalés, J., Höfle, U., Balasch, M., Plana-Durán, J., Domingo, M., Gortázar, C., 2004, Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Vet Res* 35, 243-253.
- Vigre, H., Baekbo, P., Jorsal, S.E., Bille-Hansen, V., Hassing, A.G., Enoe, C., Botner, A., 2005, Spatial and temporal patterns of pig herds diagnosed with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) during the first two years of its occurrence in Denmark. *Vet Microbiol* 110, 17-26.
- Vincent, I.E., Balmelli, C., Meehan, B., Allan, G., Summerfield, A., McCullough, K.C., 2007. Silencing of natural interferon producing cell activation by porcine circovirus type 2 DNA. *Immunology* 120 (1), 47–56.
- Vincent, I.E., Carrasco, C.P., Guzylack-Piriou, L., Herrmann, B., McNeilly, F., Allan, G.M., Summerfield, A., McCullough, K.C., 2005. Subset-dependent modulation of dendritic cell activity by circovirus type 2. *Immunology* 115 (3), 388–398.
- Vincent, I.E., Carrasco, C.P., Herrmann, B., Meehan, B.M., Allan, G.M., Summerfield, A., McCullough, K.C., 2003. Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus. *J. Virol.* 77 (24), 13288–13300.

- Wang, F., X. Guo, X. Ge, Z. Wang, Y. Chen, Z. Cha, and H. Yang, 2009: Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2. *Virus Res.* 145, 151–156.
- West, K.H., Bystrom, J.M., Wojnarowicz, C., Shantz, N., Jacobson, M., Allan, G.M., Haines, D.M., Clark, E.G., Krakowka, S., McNeilly, F., Konoby, C., Martin, K., Ellis, J.A., 1999, Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J Vet Diagn Invest* 11, 530-532.
- Wei C., Zhang M., Chen Y., Xie J., Huang Z., Zhu W., Xu T., Cao Z., Zhou P., Su S., Zhang G., 2013, Genetic evolution and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 infections in southern China from 2011 to 2012. *Infection, Genetics and Evolution* 17 (2013) 87–92
- Woodbine, K.A., Medley, G.F., Slevin, J., Kilbride, A.L., Novell, E.J., Turner, M.J., Keeling, M.J., Green, L.E., 2007, Spatiotemporal patterns and risks of herd breakdowns in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Rec* 160, 751-762.