



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**ESTANDARIZACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE UNA TÉCNICA DE  
PCR ANIDADO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN  
GENÉTICA VP1 PARCIAL DEL COPIPARVOVIRUS UNGULADO 4  
(PPV6) A PARTIR DE SANGRE DE CERDAS PRIMERIZAS**

Tesis profesional

Que para obtener el título de:  
Médica veterinaria y zootecnista

Presenta:

Elizabeth Herrera Estrada

Asesor: Dr. Alejandro Vargas Ruiz

Co-asesor: M. en C. Ernesto Marín Flamand

Cuautitlán Izcalli, Estado de México 2022



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

Gerardo, por ser la base de motivación para concluir la licenciatura.

Eva, mi madre por brindarme su amor, su apoyo incondicional y ser mi sostén ante toda situación presentada en este camino llamado vida.

Ismael, por sus consejos y el apoyo brindado en todo momento.

Aloys y Alessio, que me inspiran a dar lo mejor de mí.

Luis Antonio, por acompañarme a lo largo de este proyecto.

Alejandro Vargas, por permitirme trabajar con el y extenderme su constante apoyo ante las adversidades académicas como personales que se presentaron a lo largo de este proyecto, que hasta el día de hoy no ha dejado de alentarme, y no menos importante su ardua dedicación y perseverancia para concluir este trabajo.

Ernesto Marín, por la paciencia de guiarme y explicarme lo necesario para la realización del experimental de este trabajo y por hacer ameno cada instante que pase en el laboratorio.

Agradecimiento al Técnico Académico MC Francisco Rodolfo González Díaz por el apoyo técnico en el desarrollo experimental de este trabajo.

# INDICE

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Índice de tablas y figuras</b> .....	2
<b>Tabla de abreviaturas</b> .....	3
<b>Introducción</b> .....	4
<b>I. Antecedentes</b> .....	4
<b>II. Causas de afectación de la reproducción en la cerda</b> .....	4
<b>III. Generalidades de la familia <i>Parvoviridae</i></b> .....	7
<b>a. Genoma</b> .....	7
<b>b. Replicación</b> .....	8
<b>c. Taxonomía</b> .....	13
<b>i. Especies que infectan al cerdo</b> .....	13
<b>IV. <i>Ungulate protoparvovirus 1</i></b> .....	14
<b>a. Genoma</b> .....	14
<b>b. Taxonomía</b> .....	15
<b>c. Patogénesis</b> .....	15
<b>d. Diagnostico</b> .....	17
<b>V. <i>Ungulate copiparvovirus 4</i></b> .....	19
<b>a. Genoma</b> .....	19
<b>b. Taxonomía</b> .....	20
<b>VI. Coinfección con <i>Circovirus porcino tipo 2 (PCV2)</i></b> .....	20
<b>Justificación</b> .....	23
<b>Objetivos</b> .....	24
<b>I. Generales</b> .....	24
<b>II. Particulares</b> .....	24
<b>Material y Métodos</b> .....	25
<b>I. Selección de muestras</b> .....	25
<b>II. Diseño de Iniciadores</b> .....	25
<b>III. PCR anidada</b> .....	25
<b>IV. Implementación</b> .....	27
<b>V. Visualización de productos amplificados</b> .....	27
<b>VI. Secuenciación</b> .....	28
<b>VII. Análisis de resultados</b> .....	29
<b>Resultados</b> .....	30
<b>Discusión</b> .....	38
<b>Conclusiones</b> .....	42
<b>Referencias</b> .....	43

## RESUMEN

El genoma del *Ungulate copiparvovirus 4* (Parvovirus Porcino 6 o PPV6) codifica para 2 proteínas no estructurales (NS), NS1 y NS2, operan en la replicación del virus y para 2 proteínas estructurales (VP1 y VP2). Con respecto a la Enfermedad asociada a Circovirus porcino tipo 2 (PCVAD) , el Circovirus porcino tipo 2 (PCV2) es el agente causal de la presentación clínica del síndrome multisistémico de emaciación post destete (PMWS), sin embargo, en coinfección con el *Ungulate protoparvovirus 1* (PPV1), la gravedad de la enfermedad aumenta. Asimismo, los Parvovirus emergentes han sido relacionados con la PCVAD. Con el fin de establecer la presencia del PPV6 en México y al no contar con un control positivo se utilizaron dos casos de PMWS que cubren los criterios diagnósticos internacionales, una vez captado un caso positivo se estandarizo la prueba de PCR anidado, con las siguientes condiciones 1.75 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 pmol de cada iniciador, 25 ng de templado, 12.5 µl de master mix y agua grado molecular cbp 25 µl. Adicionalmente, el mínimo de detección de ADN en la mezcla fue de 12.5 ng, la especificidad de la prueba se obtuvo con la secuenciación de 2 casos positivos, el árbol filogenético demostró que los productos amplificados son específicos de la VP1 del PPV6. La PCR se probó con ADN proveniente de sangre fresca de cerdas primerizas de 3 granjas del estado de México, mostrando una frecuencia del 80%. Los resultados demostraron la presencia del PPV6 en México, el cual circula en la sangre de cerdas primerizas, dejando la puerta abierta para estudiar si este agente viral tiene alguna participación en falla reproductiva en cerdas, como ha sido demostrado para el PPV1 el cual produce viremia como un factor importante para el

desarrollo de la falla reproductiva, por lo que estudios del genoma viral del PPV6 puede ser importante para conocer sus factores de virulencia, receptores o célula blanco.

## INDICE DE FIGURAS

• Figura 1. Transporte nuclear de proteínas de la cápside y partículas virales.....	12
en el ciclo de vida de Parvovirus.	
• Figura 2. Taxonomía de la familia <i>Parvoviridae</i> .....	13
• Figura 3. Género y especie de la subfamilia <i>Parvovirinae</i> que afectan al cerdo.....	13
• Figura 4. Alineación de iniciadores.....	32
• Figura 5. Gradiente de Temperatura.....	33
• Figura 6. Gradiente de MgCl <sub>2</sub> .....	33
• Figura 7. Gradiente de Iniciadores.....	34
• Figura 8. Gradiente de Templado.....	34
• Figura 9. Amplificación obtenida por PCR anidado para VP1 de PPV6.....	35
• Figura 10. Amplificación obtenida por PCR anidado para VP1 de PPV6.....	35
• Figura 11. Amplificación del gen constitutivo HPRT1. ....	36
• Figura 12. Secuencias con alta homología obtenidas en Blast.....	36
• Figura 13. Árbol filogenético del <i>Ungulate copiparvovirus 4</i> (PPV6).....	37

## INDICE DE TABLAS

• Tabla 1. Iniciadores utilizados para la amplificación de la región génica VP1.....	26
del PPV6	
• Tabla 2. Gradientes para la amplificación de la VP1 del PPV6.....	27

## **TABLA DE ABREVIATURAS**

**PMWS:** Síndrome multisistémico de emaciación post destete

**ARN:** ácido ribonucleico

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**PPC:** Peste porcina clásica

**ADNss:** ADN monocatenario

**ARNm:** ARN mensajero

**FR-PCV2:** Falla reproductiva asociada a Circovirus porcino tipo 2

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**ICTV:** Comité Internacional de Taxonomía de Virus

**PCV2:** Circovirus porcino tipo 2

**PPV:** Parvovirus porcino

**PPV1:** Parvovirus porcino 1

**PPV4:** Parvovirus porcino 4

**PPV6:** Parvovirus porcino 6

**PRRS:** Síndrome respiratorio y reproductivo porcino

**PCVAD:** Enfermedad asociada a Circovirus porcino tipo 2

**SMEDI:** Stillbirth, Mummification, Embryonic Death and Infertility

# INTRODUCCION

## I. Antecedentes

La infección con PPV1 causa pérdidas reproductivas en cerdos caracterizados por mortinatos, momificación, muerte embrionaria e infertilidad (SMEDI). La cerda afectada generalmente no muestra signos clínicos, y la transmisión del virus a los fetos está asociada a viremia en la cerda. PPV1 es probablemente la causa más importante de falla reproductiva en cerdos en todo el mundo, pero tomó varios años vincular PPV1 a trastornos reproductivos endémicos y demostrar que se distribuyó globalmente. (Zimmerman *et al.*,2019)

## II. Causas de afectación de la reproducción en la cerda

La enfermedad reproductiva en el tercio final de la gestación de las cerdas se suele manifestar como abortos o partos prematuros. De hecho, dentro de lo que sería este fallo reproductivo tardío se describen dos grandes categorías. Una, la que incluye aquellos agentes infecciosos que causan una infección primaria del tracto reproductivo (se considera que serían los responsables del 30-40% de abortos, momificados y nacidos muertos); y la segunda está formada por un grupo heterogéneo de posibles causas, que incluye toxinas, factores nutricionales y ambientales, y enfermedad sistémica de la propia cerda (sea ésta de carácter infeccioso o no), que supondría la responsabilidad para el resto de problemas reproductivos de la cerda en el tercio posterior de la gestación(Segalés).

### *Afectaciones nutricionales*

El aborto y la infertilidad asociados con la exposición a toxinas pueden afectar a múltiples animales en rebaños reproductores y, hasta cierto punto, imitar abortos infecciosos y contagiosos. Las dos causas más comunes asociadas con problemas reproductivos en los cerdos son el monóxido de carbono y la zearalenona. La zearalenona es una micotoxina estrogénica producida por *Fusarium roseum* y, en menor medida, por *Fusarium monilliforme*, que tiene una influencia bien conocida en la función reproductiva. La infección por zearalenona ocurre más comúnmente en el maíz, pero otros alimentos también pueden estar infectados. La zearalenona administrada durante el embarazo puede interferir con el desarrollo fetal temprano, resultando en un tamaño reducido de la camada o pseudogestación, pero no aborto (Zimmerman, *et.al*, 2019).

Resulta evidente que la nutrición juega un papel clave en la reproducción de todas las especies animales superiores.

Un déficit nutricional puede afectar los parámetros reproductivos de las reproductoras de diferentes formas: a) retraso de la pubertad, b) retraso de la salida a celo después del destete (incremento del Índice Destete-Celo), c) descenso de la tasa de ovulación y d) reducción o aumento de la tasa de supervivencia embrionaria por un déficit nutricional previo o posterior a la ovulación, respectivamente.

En los diagnósticos debe ser consciente tomando en cuenta la gran cantidad de factores y su interrelación que podrían ser causantes del problema, incluido el

tipo de instalación, el entorno del edificio, la estacionalidad, la nutrición, el saneamiento / higiene y las ocurrencias o intervenciones relacionadas con la enfermedad (Carrión y Medel, 2001).

### ***Agentes infecciosos***

Cualquier proceso febril ocasionado por virus o bacterias puede ser causa de muerte embrionaria o fetal y aborto en una cerda , reflejándose en una menor tasa de fertilidad o bien en una camada pequeña ( Martínez,1998).

Entre las bacterias que ocasionan falla reproductiva en la cerda se reportan: *E. coli*, *C. pyogenes*, *S. aureus*, *E. rhusiopathiae*, *Pseudomonas spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Actinomyces suis*, *Salmonella spp.*, *Brucella suis* y *Leptospira spp.* ( Martínez,1998).

Con relación a los agentes virales que afectan a la cerda gestante, es importante dejar claro, que cualquier infección viral tiene el potencial para interrumpir la gestación parcial o totalmente, sin embargo, existen algunos virus que tienen mucha afinidad por el tracto reproductor, especialmente el tejido fetal, independientemente de afectar a otros sistemas ( Martínez,1998).

Las cuatro enfermedades implicadas en la falla reproductiva son: falla reproductiva asociada a Circovirus porcino tipo 2 (PCV-2), parvovirus porcino (*Ungulate Parvovirus 1*), fiebre porcina clásica (*Pestivirus C*), síndrome reproductivo y respiratorio porcino (*Betaarterivirus suid 2*) y la Enfermedad de Aujeszky (*Suid herpesvirus 1*) (Jiang *et al.*,2010).

### III. Generalidades de la familia *Parvoviridae*

#### a. Genoma

Los virus empaquetan una copia única de una molécula de ADNss lineal de 4–6 kb, que contiene una región codificante larga entre corchetes con terminales dinámicos cortos (120–600 nts) en forma de horquilla que median la replicación del ADN. Los hilos empaquetados pueden ser negativos o de ambos sentidos ( Cotmore *et.al.*,2019).

El genoma codifica cuatro proteínas transcritas de dos promotores. El "empalme alternativo" extiende la capacidad de codificación del genoma pequeño. Dos proteínas no estructurales (NS), NS1 y NS2, operan en la replicación del virus, particularmente para la replicación del ADN. Dos proteínas estructurales (VP1 y VP2) se transcriben y traducen del genoma del parvovirus.( Zimmerman *et.al*,2019)

La cápside del parvovirus está compuesta por un total de 60 moléculas de proteína, aproximadamente el 90% es VP2 y aproximadamente el 10% es la proteína VP1 superpuesta pero más grande. VP1 y VP2 se forman mediante un empalme alternativo del mismo ARN mensajero (ARNm), y la secuencia completa de VP2 está codificada dentro del gen VP1. El genoma contiene dos marcos de lectura abiertos principales: un marco de lectura abierto en la 3' mitad del genoma que codifica las proteínas no estructurales que se requieren para la transcripción y replicación del ADN, y otro marco de lectura abierto hacia el 5' mitad que codifica las proteínas estructurales (designadas de forma diversa como CAP, VP o S) de la

cápside. Ambos marcos de lectura están presentes en la misma cadena de ADN de los miembros de *Parvovirinae* (Maclachlan *et al.*,2016).

La cápside tiene estructura icosaédrica  $T = 1$  ensambladas a partir de 60 copias de entre 2 y 4 formas de una sola proteína estructural (proteína viral (VP): VP1, VP2 y VP3), que encapsulan el genoma lineal de ssADN. El N-terminal de VP1 contiene motivos de aminoácidos básicos que probablemente funcionen como motivos de localización nuclear durante la entrada de células y el ensamblaje de la cápsida (Fields *et al.*,2013).

### **b. Replicación**

Los parvovirus tienen cápsides pequeñas (-25 nm de diámetro) y estructuralmente estables que se unen a los receptores de las células del hospedero, pequeños genomas de ADN de cadena sencilla con pocos genes que controlan sus interacciones con sus huéspedes, y se replican solo en las células en división o en presencia de un virus auxiliar. Las cápsides se transmiten entre los huéspedes por vías que incluyen la diseminación fecal-oral, urinaria y respiratoria, y son estables en el medio ambiente y se transmiten fácilmente por fómites contaminados (Fields *et al.*,2013).

La unión del receptor en la membrana plasmática inicia la infección por virus de células susceptibles, y los viriones son llevados a la célula por endocitosis. La replicación del parvovirus está íntimamente asociada con la replicación celular, porque la replicación del virus se produce solo en las células que pasan a través de la fase mitótica. Una vez dentro de las células, los viriones atraviesan las vías

endosomales dentro del citoplasma, incluidos los endosomas tempranos y tardíos y, en algunos casos, los endosomas de reciclaje (Maclachlan *et al.*,2016).

Sin embargo, la proteína viral VP1 contiene una actividad enzimática fosfolipasa A2 en su región única N-terminal que puede estar involucrada en la modificación de la membrana endosomal y facilitar la liberación de la cápside. Esta región única de VP1 está enterrada dentro de la partícula recién hecha, por lo que la exposición dentro del endosoma requiere una transformación estructural de la cápside para liberar esa actividad. Las partículas que ingresan al citoplasma son traficadas al poro nuclear, y más o menos la partícula intacta parece entrar en el núcleo, donde ocurre la replicación. La replicación del ADN viral y el ensamblaje de la cápside tienen lugar en el núcleo y requieren funciones de célula huésped de la fase S del ciclo de división celular. Un requisito para la replicación del virus es que debe utilizar la maquinaria de replicación del ADN del hospedero para la replicación de su ADN viral, ya que el virus no codifica ni empaqueta una ADN polimerasa. En cambio, las ADN polimerasas celulares replican el ADN viral para formar un intermediario de ADN bicatenario, que luego se usa como plantilla para la transcripción de ARNm virales (Maclachlan *et al.*,2016).

El empalme alternativo da lugar a varias especies de ARNm que se traducen en cuatro proteínas principales y proteínas adicionales pequeñas y menos bien caracterizadas. El ARNm más abundante que está codificado en la mitad derecha del genoma 5', dirige la síntesis de las proteínas estructurales. La proteína no estructural (NS1) que está codificada en la porción izquierda 3' del genoma cumple varias funciones: (1) se une al extremo 5' del ADN viral durante la replicación; (2)

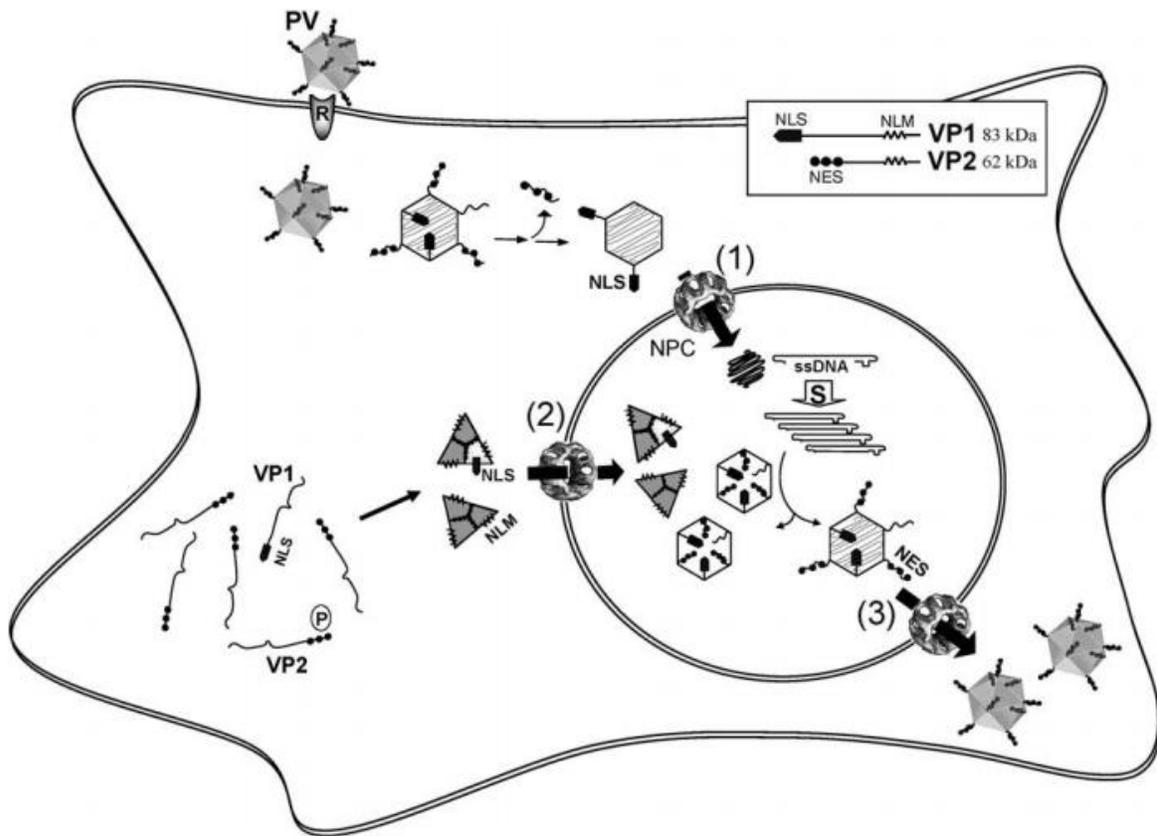
sirve como helicasa durante la replicación y el empaquetamiento de ADN; (3) sirve como una nickase específica del sitio; y (4) media la detención de la célula en la fase G1 del ciclo celular. El mecanismo de replicación del genoma se describe como una replicación en espiral; es complejo y algunos detalles aún no se entienden completamente (Maclachlan *et al.*,2016).

La horquilla terminal 3 'en el genoma de ADN de sentido negativo sirve como un auto cebador para el inicio de la síntesis del intermedio replicativo de ADN de doble hebra. La detección de una forma dimérica del intermediario replicativo, es decir, un concatador cabeza a cabeza de dos formas bicatenarias unidas covalentemente, ha llevado a un modelo en el que la cadena de ADN en crecimiento se replica sobre sí misma para producir una forma tetramérica, a partir de la cual dos hebras positivas completas y dos hebras negativas completas se generan por una serie complicada de reapertura de formas circulares cerradas, reinicio de la replicación de horquillas formadas de manera transitoria y escisión de endonucleasas de una sola hebra (Maclachlan *et al.*,2016).

Por lo general, la replicación de estos mismos virus está restringida en animales mayores con órganos diferenciados; sin embargo, las células que se dividen continuamente, como los precursores hematopoyéticos, los linfocitos y las células progenitoras de la mucosa intestinal pueden infectarse en animales de todas las edades. Infección selectiva por parvovirus y destrucción de estos tipos de células que se dividen rápidamente conducen a una lesión tisular análoga a la inducida por la radiación, de ahí que la designación de algunas infecciones por parvovirus sea "radiomimética"(Maclachlan *et al.*,2016).

Un determinante importante de la patogénesis de los parvovirus es su requerimiento de ciclar las células para la replicación del virus. Las infecciones por parvovirus del feto (cerdo o gato) o del recién nacido (perro o gato) en las etapas críticas de la organogénesis cuando existe una división celular considerable pueden provocar una infección generalizada y la destrucción de los tejidos que causan la muerte fetal o defectos de desarrollo (Maclachlan *et al.*,2016).

Todos los parvovirus parecen requerir endocitosis mediada por receptores para la infección celular. La infección por parvovirus se inhibe fácilmente mediante el tratamiento de células con agentes lisosomotrópicos que incluyen NH<sub>4</sub>Cl y bafilomicina A1, lo que indica que el pH endosómico bajo es requerido para la infección de la cápside o para el tráfico endosómico. Se cree que las cápsides se liberan al citoplasma desde una vesícula en una ubicación perinuclear, y es probable que se requieran más eventos de procesamiento y tráfico en el citoplasma antes del transporte al núcleo. También es probable que los mecanismos de transporte activo sean requeridos para que las partículas o el genoma viral alcancen poro nuclear. El citoplasma contiene una malla reticular similar a moléculas, que restringen la difusión de complejos macromoleculares. El transporte de la cápside y / o el ADN viral al núcleo es un paso importante en la infección que ocurre principalmente a través del complejo de poros nucleares (NPC). Una razón para la lenta entrada nuclear de las cápsides es que la estructura de la cápside debe modificarse para permitir la focalización nuclear exponiendo secuencias de localización nuclear (NLS) (Figura 1) (Kerr *et al.*,2005).



**Figura 1. Transporte nuclear de proteínas de la cápside y partículas virales en el ciclo de vida de Parvovirus.** (1) Entrada del virión entrante: escisión de NES y exposición del NLS de VP-1 a lo largo del transporte del virión entrante a través del citoplasma para entregar el genoma a través de la APN. (2) Translocación a través de la membrana nuclear: las proteínas estructurales sintetizadas VP1 y VP2 son fosforiladas en el citoplasma y translocado como trímeros en el núcleo por la actividad NLM. El ADN viral se amplifica en la fase S del ciclo celular, y la encapsidación presumiblemente ocurre en cápsides vacías premontadas. (3) Salida nuclear activa de los viriones recién formados. El virión maduro puede salir activamente del núcleo antes de la lisis celular por el NES mapeado en el extremo N del VP2 expuesto en la superficie de la cápside. Superior derecha: secuencias de transporte nuclear identificadas en las proteínas VP de MVM: NLS: secuencia de transporte nuclear convencional en configuración lineal identificado en VP1; NLM: motivo de localización nuclear trenzado en VP1 y VP2; NES: secuencia de exportación nuclear fosforilada (P) en VP2. NPC: complejo de poros nucleares (Tomado de Kerr, J., Cotmore, S., & Bloom, M. E. Kerr, *Parvoviruses.*).

### c. Taxonomía

<b>Subfamilia <i>Parvovirinae</i></b>	
<b>Genero</b>	<b># Especies</b>
<i>Amdoparvovirus</i>	2
<i>Aveparvovirus</i>	1
<i>Bocaparvovirus</i>	12
<i>Copiparvovirus</i>	2
<i>Dependoparvovirus</i>	7
<i>Erythroparvovirus</i>	6
<i>Protoparvovirus</i>	5
<i>Tetraparvovirus</i>	6
<b>Subfamilia <i>Densovirinae</i></b>	
<b>Genero</b>	<b># Especies</b>
<i>Ambidensovirus</i>	6
<i>Brevidensovirus</i>	2
<i>Hepadensovirus</i>	1
<i>Iteradensovirus</i>	5
<i>Penstyldensovirus</i>	1

La taxonomía clasifica la familia *Parvoviridae* en dos subfamilias, los *Parvovirinae* y *Densovirinae*.

Los miembros de la subfamilia *Parvovirinae* infectan a los vertebrados; Esta subfamilia incluye ocho géneros.

Los miembros de la subfamilia *Densovirinae* infectan a los invertebrados; Esta subfamilia incluye cinco géneros (Figura 2).

**Figura 2.** Taxonomía de la familia *Parvoviridae*.

### IV. Especies que infectan al cerdo

La subfamilia *Parvovirinae*, comprende 8 géneros de los cuales se puede observar que determinados géneros contienen especies que afectan al cerdo (Figura 3).

<b>Familia <i>Parvoviridae</i></b>	
<b>Subfamilia <i>Parvovirinae</i></b>	
<b>Genero</b>	<b># Especies</b>
<i>Bocaparvovirus</i>	<u><i>Unqulate bocaparvovirus 2</i></u>
	<u>Porcine bocavirus 1</u>
	<u>Porcine bocavirus 2</u>
	<u>Porcine bocavirus A6</u>
	<u><i>Unqulate bocaparvovirus 3</i></u>
	<u>Porcine bocavirus SX</u>
	<u><i>Unqulate bocaparvovirus 4</i></u>
	<u>Porcine bocavirus H18</u>
	<u><i>Unqulate bocaparvovirus 5</i></u>
	<u>Porcine bocavirus 3</u>
	<u>Porcine bocavirus 4-1</u>
	<u>Porcine bocavirus 4-1</u>
	-2
<i>Copiparvovirus</i>	<u><i>Unqulate copiparvovirus 2</i></u>
	<u>Porcine parvovirus 4</u>
<i>Protoparvovirus</i>	<u><i>Unqulate protoparvovirus 1</i></u>
	<u><i>Porcine parvovirus</i></u>
	<u>Porcine parvovirus Kresse</u>
	<u>Porcine parvovirus NADL-2</u>
<i>Tetraparvovirus</i>	<u><i>Unqulate tetraparvovirus 2</i></u>
	<u>Porcine hokovirus</u>
	<u><i>Unqulate tetraparvovirus 3</i></u>
	<u>Porcine Cnvirus</u>

**Figura 3.** Género y especie de la subfamilia *Parvovirinae* que afectan al cerdo.

## V. *Ungulate parvovirus 1*

El parvovirus porcino (PPV1) se aisló por primera vez en Alemania en 1965 como un contaminante del cultivo celular primario porcino que se utilizó para la propagación del virus de la fiebre porcina clásica.(Oh *et al.*, 2017)

El parvovirus porcino 1 ahora designado como *Ungulate parvovirus 1* es una causa de falla reproductiva en cerdos en todo el mundo. Cuando el virus se introduce en un rebaño reproductivo totalmente susceptible, puede tener efectos devastadores (Maclachlan *et al.*,2016).

La infección con PPV1 causa pérdidas reproductivas en cerdos caracterizados por mortinatos, momificación, muerte embrionaria e infertilidad (SMEDI) La cerda afectada generalmente no muestra signos clínicos, y la transmisión del virus solo a los fetos ocurre si ella es seronegativa (Zimmerman *et al.*,2019).

Las infecciones combinadas de PPV y Circovirus porcino tipo 2 pueden causar la presentación clínica del Síndrome Multisistémico de Emaciación post destete, que parece ser el resultado de la estimulación inmune resultante de la infección por PPV1 ( Fields *et al.*,2013).

### a. Genoma

El PPV1 tiene dos marcos de lectura abiertos (ORF) que comprenden la proteína no estructural (NS1), la proteína viral 1 (VP1) y la proteína estructural principal (VP2). La proteína VP2 es el objetivo principal de los anticuerpos neutralizantes contra el VPP.(Oh *et al.*,2017) La VP1 contiene un dominio de fosfolipasa A2 (PLA2) que juega un papel crucial en la liberación viral de los

endosomas al citoplasma, actuando a través de la digestión enzimática de los fosfolípidos de membrana que desestabilizan las membranas endosómicas (Cotmore *et al.*, 2014).

#### **b. Taxonomía**

El ICTV clasifica a la especie *Ungulate protoparvovirus 1* (PPV1 como acrónimo de Parvovirus porcino 1) dentro de la Subfamilia *Parvovirinae*, genero *Protoparvovirus* (Cotmore *et al.*,2019).

#### **c. Patogénesis**

La patogénesis de PPV1 refleja la capacidad del virus para infectar al feto. Sin embargo, no está claro cómo PPV1 cruza realmente la barrera transplacentaria porcina. Al igual que en otros virus, PPV1 podría llegar al feto de tres maneras: en fluidos corporales, como sangre o linfa; por replicación progresiva a través de capas de células placentarias continuas; o en células, como macrófagos o linfocitos.

Después de la replicación primaria en los tejidos linfoides, PPV1 se distribuye sistémicamente a través de la viremia libre de células. Sin embargo, la placenta epiteliocorial porcina está compuesta de seis capas de tejido que separan por completo la circulación sanguínea materna de la fetal, y las células placentarias están tan estrechamente conectadas que no permiten el paso de incluso moléculas pequeñas, por ejemplo, anticuerpos. Las células placentarias no son susceptibles a la infección por PPV1, y no se ha demostrado PPV1 en los tejidos placentarios, por lo que no es probable que el virus pueda cruzar la barrera a través de la replicación progresiva. Por lo tanto, es más probable que el virus llegue al feto a través de las células inmunes infectadas por el virus. Los estudios han reportado la presencia del

virus en los tejidos linfoides de cerdos y linfocitos fetales en el sistema circulatorio de cerdas gestantes (Zimmerman *et al.*,2019).

Una vez en el feto, PPV1 encuentra un entorno propicio para la replicación del virus debido al alto índice mitótico de la mayoría de los tejidos del feto en desarrollo. El virus se puede detectar en muchos tejidos y órganos, lo que sugiere que no hay tropismo tisular específico. PPV1 ingresa a las células a través de una serie de interacciones que culminan en la liberación de material genético viral en un compartimento celular en el que puede producirse la replicación. Los mecanismos de entrada de PPV no están claros, pero incluyen endocitosis mediada por clatrina o macropinocitosis, seguida de transporte a través de la vía endosómica. El tráfico endosómico y la acidificación son esenciales para que el PPV ingrese en el núcleo, lo que resulta en modificaciones reversibles de la cápside que permiten que el virus escape del endosoma. En este proceso, la fosfolipasa A2 (PLA2) debe ser exteriorizada desde la cápside (Zimmerman *et al.*,2019).

El motivo de esta actividad es esencial para romper las membranas vesiculares, lo que resulta en la formación de poros. Después de que el virus llega al núcleo, el PPV se replica utilizando el mecanismo de replicación propio de las células. El virus se replica en las células en fase de replicación (S) utilizando la ADN polimerasa celular para la replicación del ADN. Esto explica el requisito de células con un índice de replicación más alto. La replicación de PPV1 disminuyó el potencial de membrana mitocondrial. El daño oxidativo posterior también conduce a la liberación de proteínas tóxicas celulares como el citocromo c desde la

mitocondria al citosol, lo que posteriormente desencadena la apoptosis y provoca la muerte celular y el daño tisular en enfermedades virales (Zimmerman *et al.*,2019).

La infección por PVP por sí sola no causa síntomas clínicos en cerdas adultas no preñadas o lechones. El resultado de la infección en el feto varía con la progresión de la gestación en las cerdas. Los estudios experimentales y epidemiológicos indican que la infección por PPV durante la primera mitad del embarazo puede provocar insuficiencia reproductiva. Los fetos inmunocompetentes infectados después del día 70 de gestación desarrollan una respuesta de anticuerpos y generalmente sobreviven a la infección. La transmisión vertical al feto tarda de 12 a 18 días después de la infección inicial de las madres por la ruta natural (oral) y algo menos de tiempo por inyección intramuscular. En consecuencia, la infección de las cerdas después de 56 días de gestación generalmente no causa daño al feto. el virus puede replicarse en linfocitos activados, no puede replicarse en monocitos sanguíneos, y los resultados relacionados con la capacidad de replicación en los macrófagos son inconsistentes (Mészáros *et al.*,2017).

#### **d. Diagnóstico**

La base genética de la patogenicidad no se ha resuelto, pero la proteína estructural VP1 / VP2 parece jugar un papel importante. Presumiblemente, la patogenicidad o virulencia está determinada (al menos en parte) por el tropismo tisular. Se considera al PPV1 cuando se observan afectaciones reproductivas, por ejemplo, un aumento en el porcentaje de cerdas vacías, baja en el porcentaje de lechones por cerda al año, mayor número de fetos momificados y camadas más pequeñas, especialmente en hembras de primerizas. Una combinación de cerdos

normales y fetos momificados que murieron en diferentes etapas de desarrollo en la misma camada es una fuerte indicación de infección por PPV1. La infección por PPV1 normalmente no causa abortos y no causa signos clínicos en adultos. Las presentaciones de laboratorio para la confirmación de la infección por PPV1 deben incluir fetos momificados y restos fetales (Zimmerman *et al.*,2019).

La detección de antígeno viral en tejidos fetales por inmunofluorescencia (IF) es un procedimiento confiable para el diagnóstico de PPV1. Para el diagnóstico de rutina, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la técnica más útil para la detección de PPV1 en tejidos fetales, semen y otras muestras. Se han descrito numerosos protocolos de PCR (y basados en PCR, como qPCR y RPA), incluidos los PCR multiplex principalmente para la detección concurrente de PPV1 y PCV2. Se considera que estos métodos poseen una mayor sensibilidad y especificidad diagnóstica que la hemaglutinación y son más adecuados para la detección de PPV1 en tejidos autolizados. La serología puede ser útil para el diagnóstico de PPV1 cuando los tejidos fetales no están disponibles; sin embargo, la prevalencia normalmente alta de PPV1 en poblaciones y el lapso de tiempo entre la infección y la observación de pérdidas reproductivas a menudo presentan desafíos para la interpretación de los resultados (Zimmerman *et al.*,2019).

Según los experimentos de PCR, el PPV puede propagarse en las células del corazón, pulmón, riñón, bazo, endometrio e intestino delgado. Sin embargo, la PCR no puede distinguir entre los virus que se producen en los órganos y los virus que son transportados allí por el sistema vascular. Esto puede explicar los resultados

controvertidos de la detección de VPP en los ganglios linfoides (Mészáros *et al.*, 2017).

## **VI. *Ungulate copiparvovirus 4 (PPV6)***

El *Ungulate copiparvovirus 4* (PPV6) se identificó por primera vez en China a finales de 2014 en fetos de cerdo abortados y posteriormente también se informó en los EE. UU. (Schirtzinger *et al.*, 2015; Cui *et al.*, 2017).

Se encontró que la prevalencia de PPV6 en China es similar en cerdos en edad de finalización de granjas con y sin evidencia de insuficiencia reproductiva porcina (Schirtzinger *et al.*, 2015). PPV6 comparte solo un 20,5–42,6% de similitud de nucleótidos con otros miembros de la subfamilia *Parvovirinae* y está más estrechamente relacionado con PPV4. La distribución de PPV6 en la población mundial de cerdos y los posibles signos clínicos asociados con la infección por PPV6 aún no se han determinado. El ADN de PPV6 se identificó en muestras de suero recogidas de cerdos polacos domésticos y se caracterizó adicionalmente por secuenciación genómica (Cui *et al.*, 2017).

### **a. Genoma**

La organización genómica de PPV6 es similar a la de otros parvovirus. El genoma PPV6 de longitud casi completa consta de ADN de cadena negativa de aproximadamente 6100 nucleótidos (nts). Hay dos ORF supuestos separados por ocho nts y flanqueados por 5' y 3' UTR (333–364 nts y 219, respectivamente).

ORF1 codifica una supuesta proteína no estructural (NS1) de 662 aminoácidos que funciona como la replicasa viral. ORF2 codifica la supuesta proteína de la cápside (VP1) que se predice que tendrá 1189 aminoácidos de longitud. La comparación de las longitudes predichas de las proteínas de la cápside de los parvovirus porcinos muestra que la proteína de la cápside de PPV6 es más grande que los otros parvovirus asociados a los cerdos (Schirtzinger *et al.*, 2015).

#### **b. Taxonomía**

El ICTV clasifica a la *Ungulate copiparvovirus 4* (PPV6 como acrónimo de PPV6) dentro de la Subfamilia *Parvovirinae*, genero *Copiparvovirus* (ICTV).

### **VII. Co-infección con Circovirus porcino tipo 2 (PCV2)**

El síndrome multisistémico de emaciación post destete (PMWS) se identificó por primera vez en el oeste de Canadá en la década de 1990 y es otro cuadro clínico asociado a PCV2, el cual afecta a lechones post destetados, sin embargo, aunque la participación de PCV2 como agente causal ha sido aceptado, el factor desencadenante de la enfermedad aún no ha sido bien determinado, por lo que la coinfección con otros agentes virales, ha sido propuesta como un factor importante, adicionalmente, se ha reconocido la interacción del PCV2 en otras enfermedades de importancia en cerdos como parvovirus porcina (PPV1), enfermedad de Aujeszky y el síndrome respiratorio y reproductivo porcino (Sarradell *et al.*, 2004).

El Circovirus porcino tipo 2 (PCV2) es la causa de la aparición del síndrome multisistémico de emaciación post destete (PMWS) pero en coinfección con PPV1, la gravedad de la enfermedad aumenta. Asimismo, los PPV emergentes se han relacionado con la enfermedad asociada a Circovirus porcino . En un estudio retrospectivo, se encontró una asociación significativa con enfermedad asociada a Circovirus porcino, para la infección concurrente de PPV1 y PPV2 en los EE. UU. Se encontró que la frecuencia y la carga viral de PPV4 se duplicaron en muestras de casos de PMWS comparado con muestras de animales sanos, lo que sugiere una conexión con enfermedad asociada a Circovirus porcino (García *et al.*, 2020).

Se ha propuesto que el PPV pudiera facilitar la infección por PCV2, indirectamente, reduciendo la inmunoprotección y / o estimulando la replicación del virus mediante la activación de la célula huésped, o directamente, promoviendo la replicación del ADN del virus que infecta las mismas células huésped. De hecho, tanto PCV2 como PPV mostraron replicación en linfocitos (Mészáros *et al.*, 2017). Es posible que la disfunción inmune inducida por PPV facilite la replicación de PCV2 (Choi y Chae, 2000).

La participación indirecta de PPV parece más probable dado que la inmunoestimulación no viral de animales infectados con PCV2 también promueve PMWS, la sobreinfección con PPV parece más efectiva para inducir la enfermedad que la coinfección y PPV se ha asociado con efectos inmunosupresores transitorios. La característica más consistente de PMWS es un agotamiento generalizado de linfocitos. Las infecciones secundarias con organismos oportunistas son comunes.

Hay evidencia de que la destrucción de los linfocitos tímicos tiene un papel central en la patogénesis del PMWS (Darwich *et al.*, 2004).

La infección concurrente con VPP aumentó la gravedad de las lesiones, lo que sugiere que los cofactores son importantes en la patogénesis del PMWS (Kennedy *et al.*, 2000).

Por otro lado, la participación de las distintas especies de Parvovirus porcinos en los casos de FR-PCV2 aún no ha sido aclarada, más aún, la presencia de estas especies de Parvovirus porcinos en México no ha sido determinada, en particular del PPV6 y su posible asociación con el Circovirus porcino tipo 2.

## JUSTIFICACION

El Circovirus porcino tipo 2 (PCV2) es un agente viral altamente distribuido en México, el cual esta asociado con diversos cuadros clínicos, como el Síndrome multisistémico de emaciación post destete (PMWS) y la falla reproductiva asociada a Circovirus porcino tipo 2 (FR-PCV2), ambos cuadros clínicos han sido descritos en los principales estados de la república mexicana productores de carne de cerdo, sin embargo, a pesar de que se reconoce al PCV2 como agente causal de estos cuadros, los factores desencadenantes de la enfermedad, aún no son claros; la coinfección con otros agentes ha tomado fuerza como un factor a considerar para desencadenar la enfermedad o agravarla. En este sentido, el *Ungulate parvovirus 1* (PPV1) es un agente causal de falla reproductiva, caracterizado por producir reabsorción fetal, sin embargo, diversos reportes a nivel mundial han reportado una alta tasa de coinfección con el PCV2, en particular en la presentación clínica de PMWS, adicionalmente, con el avance en la secuenciación, se han descrito 7 especies de parvovirus (PPV2-7) que infectan al cerdo, siendo el PPV6 el que muestra una mayor coinfección en casos de PMWS, sin embargo, la participación del PPV1 en casos de falla reproductiva ha sido documentada, así como su posible asociación con PCV2, no obstante, se desconoce la presencia del PPV6 en nuestro país, y aún más su posible participación en casos de PMWS o en casos de falla reproductiva asociada o no a PCV2.

# OBJETIVOS

## I. Objetivo General

Estandarizar e implementar la técnica de PCR anidado para la amplificación de la región genética VP1 parcial del Parvovirus porcino 6 (PPV6) a partir de sangre de cerdas primerizas.

## II. Objetivos Particulares

- Diseñar iniciadores específicos para la amplificación de la VP1 parcial del *Ungulate copiparvovirus 4* (PPV6)
- Determinar la temperatura optima de hibridación de los iniciadores para la amplificación del VP1 parcial del *Ungulate copiparvovirus 4* (PPV6) en la PCR anidada
- Determinar la concentración optima de MgCl<sub>2</sub> para la amplificación del VP1 parcial del *Ungulate copiparvovirus 4* (PPV6) en la PCR anidada.
- Determinar la concentración optima de templado y la concentración mínima de detección para el protocolo de PCR anidada.

## MATERIAL Y METODOS

### I. Selección de muestras

Con el fin de determinar la presencia del PPV6 en sangre se seleccionaron 30 casos del archivo de muestras del Laboratorio A: Patología Molecular Veterinaria en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, las cuales corresponden a ADN de sangre completa de cerda primeriza provenientes de 3 granjas del Estado de México.

### II. Diseño de Iniciadores

Se utilizaron 10 secuencias del *Ungulate copiparvovirus 4* (PPV6) de distintos países obtenidas en el GenBank; Reino Unido (KX384822), USA (KR709268), China (KF999685), Reino unido (KX384817), USA (KR709266), USA (KR709267), China (KF999681), Reino Unido (KX384813), China (KF999682), se buscó una zona conservada de la ORF2 (VP1), los iniciadores fueron diseñados con el programa Primer3 (Untergrasser et al., 2012) y fueron analizados, editados y alineados con Bioedit (bioEdit v7.2.5, Ibis Bioscience, Carlsbad, CA).

Los iniciadores fueron sintetizados de manera comercial (OLIGO T4, Guanajuato, México).

### III. PCR anidada

El ADN se utilizó como templado para la PCR anidada. Los iniciadores utilizados en el presente trabajo se muestran en la tabla 1. Para la optimización de las condiciones de amplificación y al carecer de control positivo y dada la alta tasa de co-infección entre el PCV2 y el PPV6 documentada en literatura, se utilizaron

dos casos del archivo de muestras del Laboratorio A: Patología Molecular Veterinaria correspondiente a linfonodos proveniente de un cerdos afectados por PMWS los cuales presentaron síngnologia compatible con la presentación clínica (adelgazamiento progresivo, linfadenopatía generalizada), lesiones histopatológicas características (depleción linfoide e infiltrado de macrófagos y formación de sincitios) y un patrón de hibridación *in situ* positivo a Circovirus porcino tipo 2. Con un caso se realizaron gradientes de temperatura, curva de concentración de cloruro de magnesio, curva de concentración de iniciadores y templado, los cuales se pueden observar en la tabla 2. La amplificación se realizó en reacciones de 25µl en microtubos para PCR de 0.2 ml. En el termociclador (Mastrer clycler gradient, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) con las siguientes condiciones: activación inicial de 94°C por 5 minutos y 40 ciclos con una desnaturalización a 94°C por 20 seg, seguidos de una alineación (determinada por el gradiente de temperatura) por 20 seg y una elongación a 72°C por 20 seg; concluyendo con un ciclo de elongación final de 72°C por 10 minutos.

PPV6		
Iniciador	Secuencia	Producto esperado
Forward	5'-ATTCCCAACAGACAGACAGAA - 3'	550 pb
Reverse	5'-TTAGGTTCGGAAGGCATCAT - 3'	
Foward Anidado	5'-TTCTTCCGAGTCCAGATTA - 3'	248 pb
Reverse Anidado	5'-ATGAAGTGATCACAGAGTTTT - 3'	

**Tabla 1.** Iniciadores utilizados para la amplificación de la región génica VP1 del PPV6

Temperatura	MgCl <sub>2</sub>	Primer	Templado
54°C	1.5mM	100pM	100 ng
56°C	1.75mM	75pM	75 ng
58°C	2mM	50pM	50 ng
60°C	2.25mM	25pM	25 ng
			12.5 ng

**Tabla 2.** Gradientes para la amplificación de la VP1 del PPV6.

#### IV. Implementación

Con las condiciones de amplificación óptimas obtenidas en la estandarización se probaron las 30 muestras seleccionadas. Adicionalmente, para validar los casos negativos se corrió un PCR para amplificar el gen constitutivo a la Hipoxantín-guanín fosforibosil transferasa 1 (HPRT1) utilizando los iniciadores forward 5'-TTGCTGACCTGCTGGATTAC-3' y reverse 5'-CTGACCAAGGAAAGCAAAGT-3'. Se realizaron 35 ciclos a temperaturas de 94°, 50° y 72° correspondientes a desnaturalización, alineación y extensión respectivamente.

#### V. Visualización de productos amplificados

La visualización de los productos amplificados se realizó por electroforesis en gel agarosa al 1.5% con solución amortiguadora Tris 1M, ácido bórico anhidro 1M, Na<sub>2</sub> EDTA 2H<sub>2</sub>O 20M (TBE, Promega Corp. Madison, WI, USA) teñido con 2.5 µl de bromuro de etidio (Promega Corp. Madison, WI, USA). El llenado de los pozos se realizó con 8µl de muestra anidada, 4µl del amortiguador de corrida (Glicerol 50% v/v, Na<sub>2</sub> EDTA 2H<sub>2</sub>O 100mM, duodecil sulfato de sodio 1% w/v, azul de bromofenol 0.1% w/v), y 4µl de marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder, PromegaCorp, Madison WI, USA). La electroforesis se realizó a 90 volts

durante 120 minutos y los productos se visualizaron en un transiluminador de luz UV (Apollo, Instrumentation, Claremont CA, USA).

## **VI. Secuenciación**

Las bandas obtenidas del control positivo se purificaron utilizando un kit comercial (EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit, Bioline) siguiendo las instrucciones del fabricante, se describe a continuación:

Se extrajeron los fragmentos de ADN del gel con un bisturí limpio y afilado. Se pesaron y se transfirieron a microtubos de 1.5 ml. Paso seguido, se agregaron 700 µl de Binding Buffer II por cada 100 mg de peso de gel e incubó a 500 C-600 C durante 10 minutos agitando ocasionalmente hasta que la agarosa se disolvió por completo, esperando que tenga una coloración amarillenta.

A continuación, se agregó la mezcla anterior a la columna EZ-10, se dejó reposar durante 2 minutos, y se centrifugó a 10.000 rpm durante 2 minutos y desechando el flujo que quedó en el tubo. Posteriormente, se agregó 750 µl de solución de lavado y centrifugó a 10,000 rpm durante un minuto. De igual manera se desechó la solución en el tubo. Nuevamente se repitió el paso 4, y centrifugó a 10,000 rpm durante un minuto adicional para eliminar cualquier tampón de lavado residual.

Por último, se colocó la columna en un microtubo limpio de 1,5 ml y se le agregó 30-50 µl de tampón de elución al centro de la columna, incubando a temperatura ambiente durante 2 minutos y después centrifugando a 10.000 rpm durante 2 minutos para eluir el ADN. El ADN purificado se almaceno a -20°C hasta el momento de su secuenciación.

Los productos recuperados fueron secuenciados en el Instituto de Fisiología Celular (UNAM), utilizando un kit comercial (Big Dye terminator V3.1, Applied Biosystems, USA). En un secuenciador (3500 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA).

## **VII. Análisis de resultados**

Las secuencias obtenidas se buscaron con el software BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), se editaron y alinearon con el programa Bioedit (bioEdit v7.2.5, Ibis Bioscience, Carlsbad, CA), para comprobar la especificidad de la secuencia, se construyó un árbol filogenético utilizando secuencias de las diversas especies de PPVs de diversos países, usando el algoritmo Maximun parsimony y con el método de validación de bootstrap, valores mayores a 70 fueron considerados significativos.

## RESULTADOS

### I. Estandarización

Los 4 iniciadores diseñados se alinearon en zonas conservadas del ORF2 (VP1) independientemente del país de origen de la secuencia (Fig. 4, a, b, c, d). Por otro lado, los casos probados de PMWS mostraron una banda del tamaño esperado (248 pb). El gradiente de temperatura mostro bandas positivas en todas las temperaturas probadas, sin embargo, la banda con mayor definición se obtuvo a los 60° (Fig.7), el gradiente de MgCl<sub>2</sub> mostro bandas positivas en 2 de las 4 concentraciones probadas, las cuales corresponden a 1.75 mM y 2.25mM, no obstante, la banda mejor definida se observó en 1.75 mM (Fig.8), el gradiente de primers exhibió bandas positivas en 2 de las 4 concentraciones probadas (75 pM y 50 pM), siendo la concentración optima de primers a 50 pM (Fig.9) , finalmente, el gradiente de templado expone bandas positivas en todas las concentraciones, aunque la banda con mayor definición se obtuvo en 50 ng, obteniendo un mínimo de detección de 12.5 ng (Fig.10).

### II. Implementación

Con las condiciones óptimas de amplificación se obtuvo un 80% (24/30) en el total de las muestras seleccionadas (Fig. 11, 12), así mismo, para evitar falsos negativos, las muestras negativas mostraron banda positiva para el gen constitutivo HPRT1 (Fig. 13).

### **III. Especificidad**

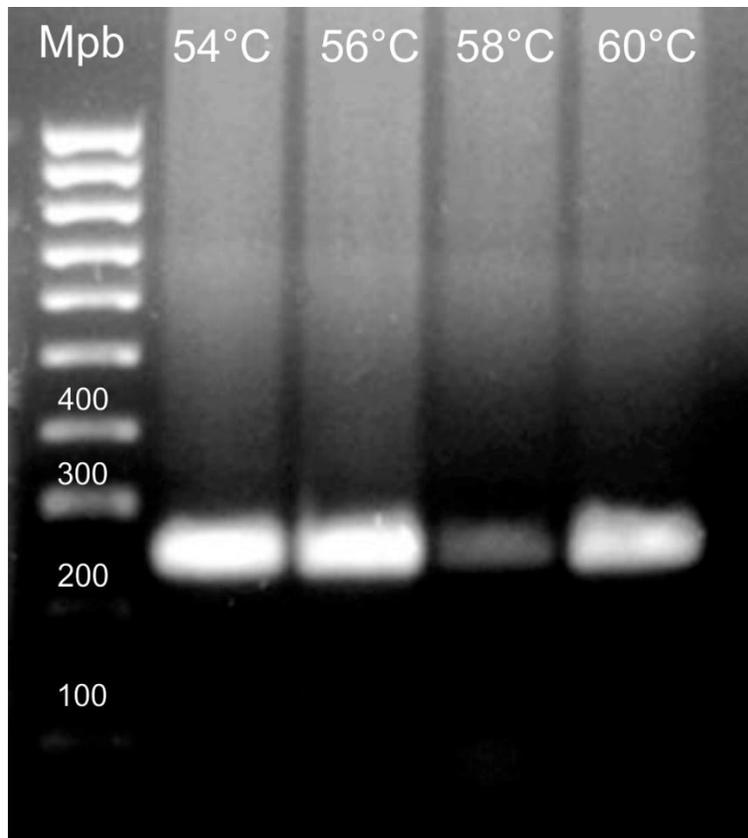
La secuencia obtenida mostró una identidad del 100% con secuencias del Genbank (KX384822, KR709268, KF999685, KX384817, KR709266, KR709267, KF999681, KX384813, KF999682) (Fig. 14).

Las secuencias obtenidas en el presente trabajo fueron depositadas en el Genbank y se asignaron los números de acceso MH717889 y MH717890.

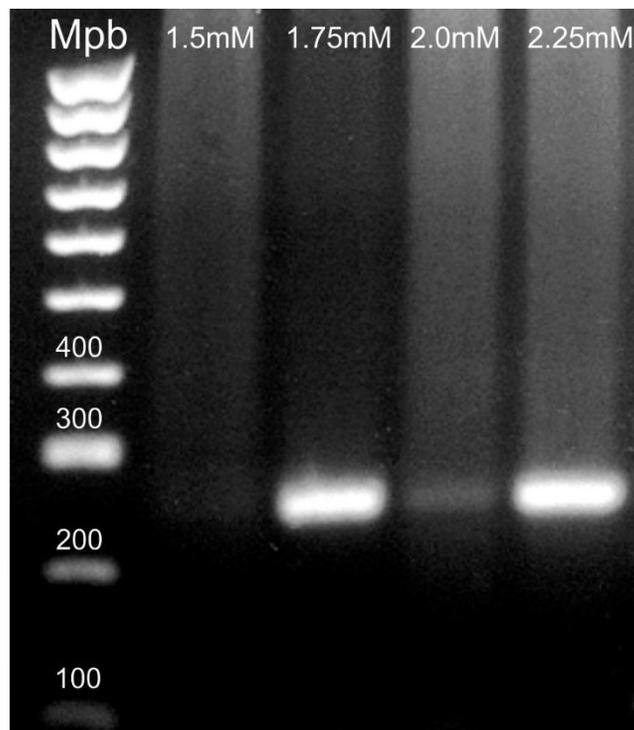
El árbol filogenético mostró 6 ramas bien definidas, correspondientes a cada especie de PPVs, adicionalmente, las secuencias mexicanas se encontraron en la misma clada que las secuencias obtenidas en el genbank correspondientes al PPV6, demostrando que los productos amplificados son específicos de la VP1 del PPV6. (Fig. 15).



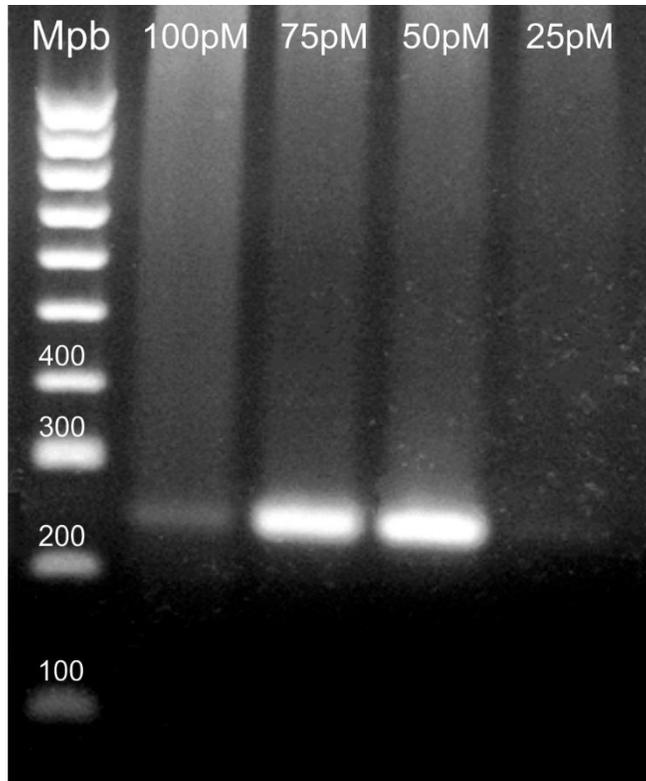
**Figura 4. Alineación de iniciadores.** Se muestran zonas conservadas en la alineación del iniciador forward (a), reverse (b), forward anidado (c) y reverse anidado (d). Bioedit. Puntos indican misma base nucleotídica, letra indica cambio en relación a la primera secuencia.



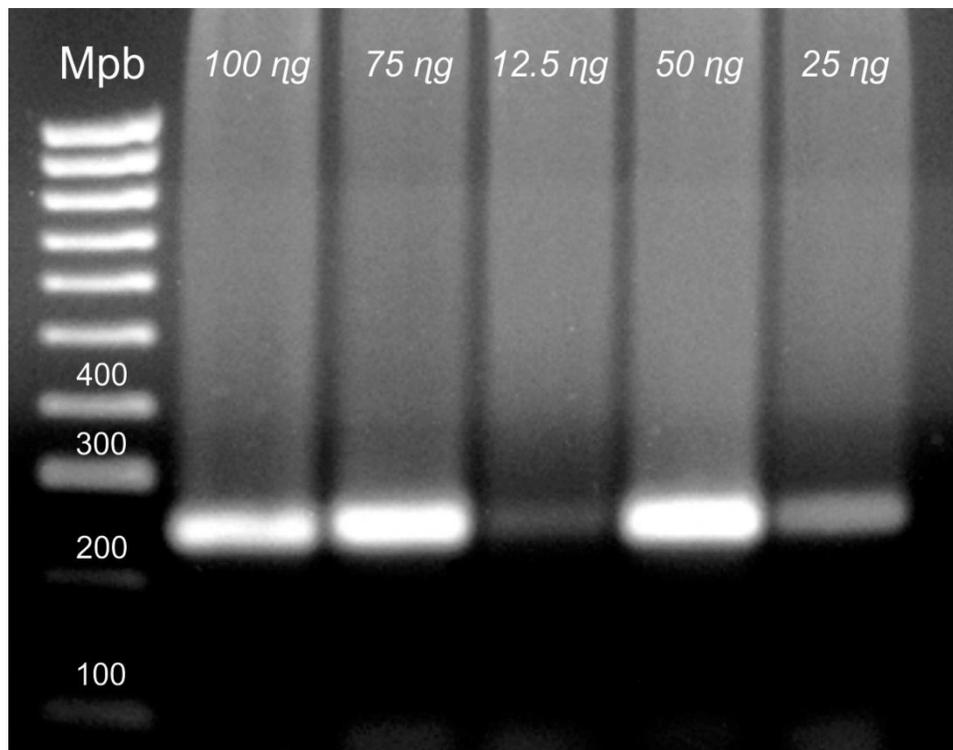
**Figura 5. Gradiente de Temperatura.** Marcador de pares de bases (Mpb) 1000 pb (L1), se muestran productos del tamaño esperado (248 pb) en todas las temperaturas (L2-L5), gel de agarosa al 1.5%.



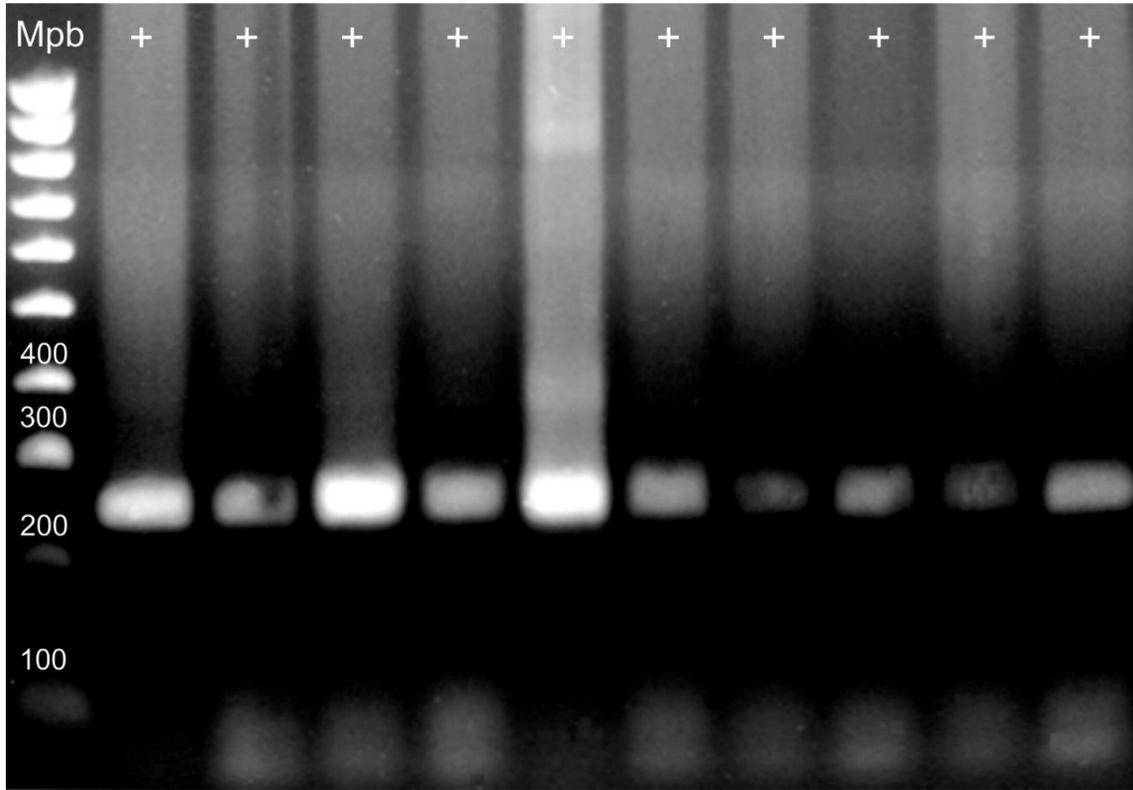
**Figura 6. Gradiente de  $MgCl_2$ .** Marcador de pares de bases (Mpb) 1000 pb (L1), se muestran productos del tamaño esperado (248 pb) en L3 y L5, gel de agarosa al 1.5%.



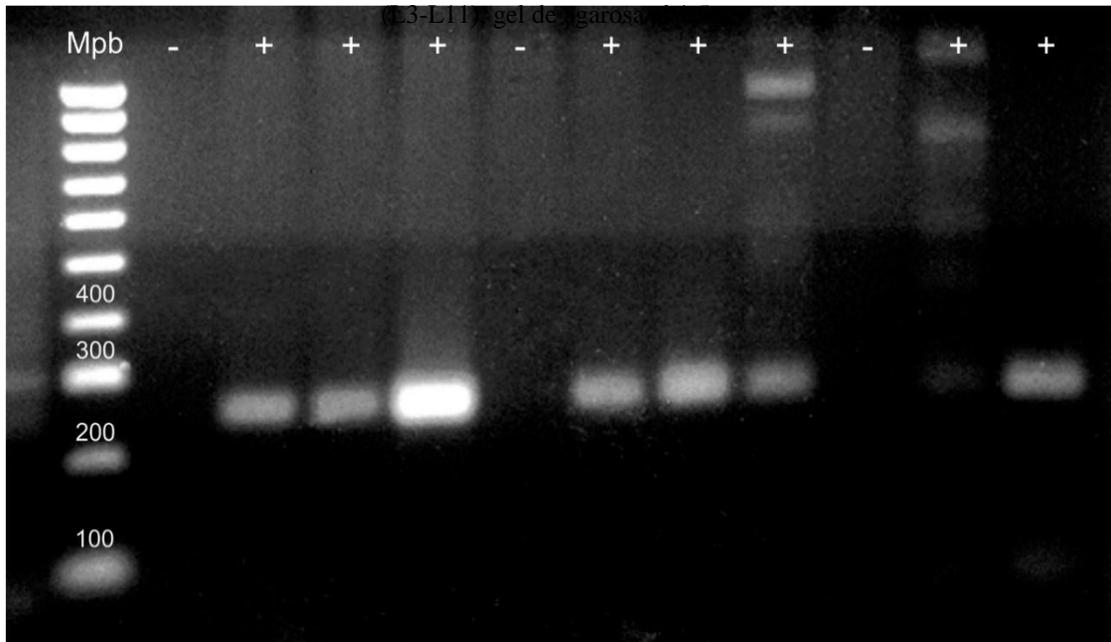
**Figura 7. Gradiente de Iniciadores.** Marcador de pares de bases (Mpb) 1000 pb (L1), se muestran productos del tamaño esperado (248 pb) en todas las concentraciones, gel de agarosa al 1.5%.



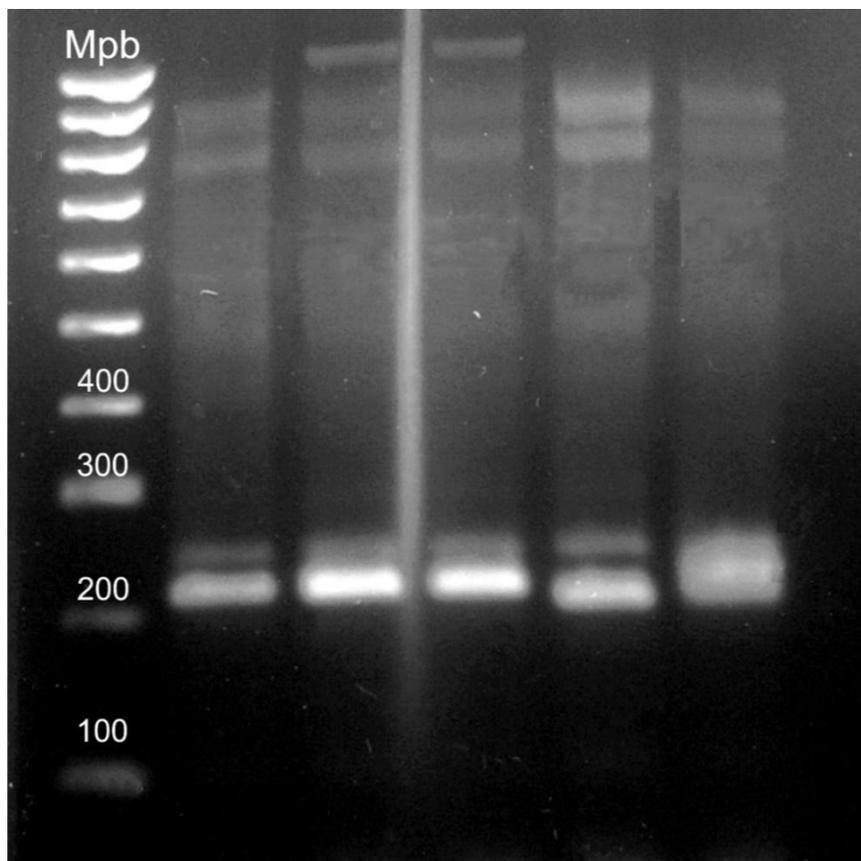
**Figura 8. Gradiente de Templado.** Marcador de pares de bases (Mpb) 1000 pb (L1), se muestran productos del tamaño esperado (248 pb) en todas las concentraciones, gel de agarosa al 1.5%.



**Figura 9. Amplificación obtenida por PCR anidado para VP1 de PPV6.** Marcador de pares de bases (Mpb) 1000 pb (L1), control positivo (L2), productos del tamaño esperado (248 pb) en todas las líneas (L3-L11) gel de agarosa.



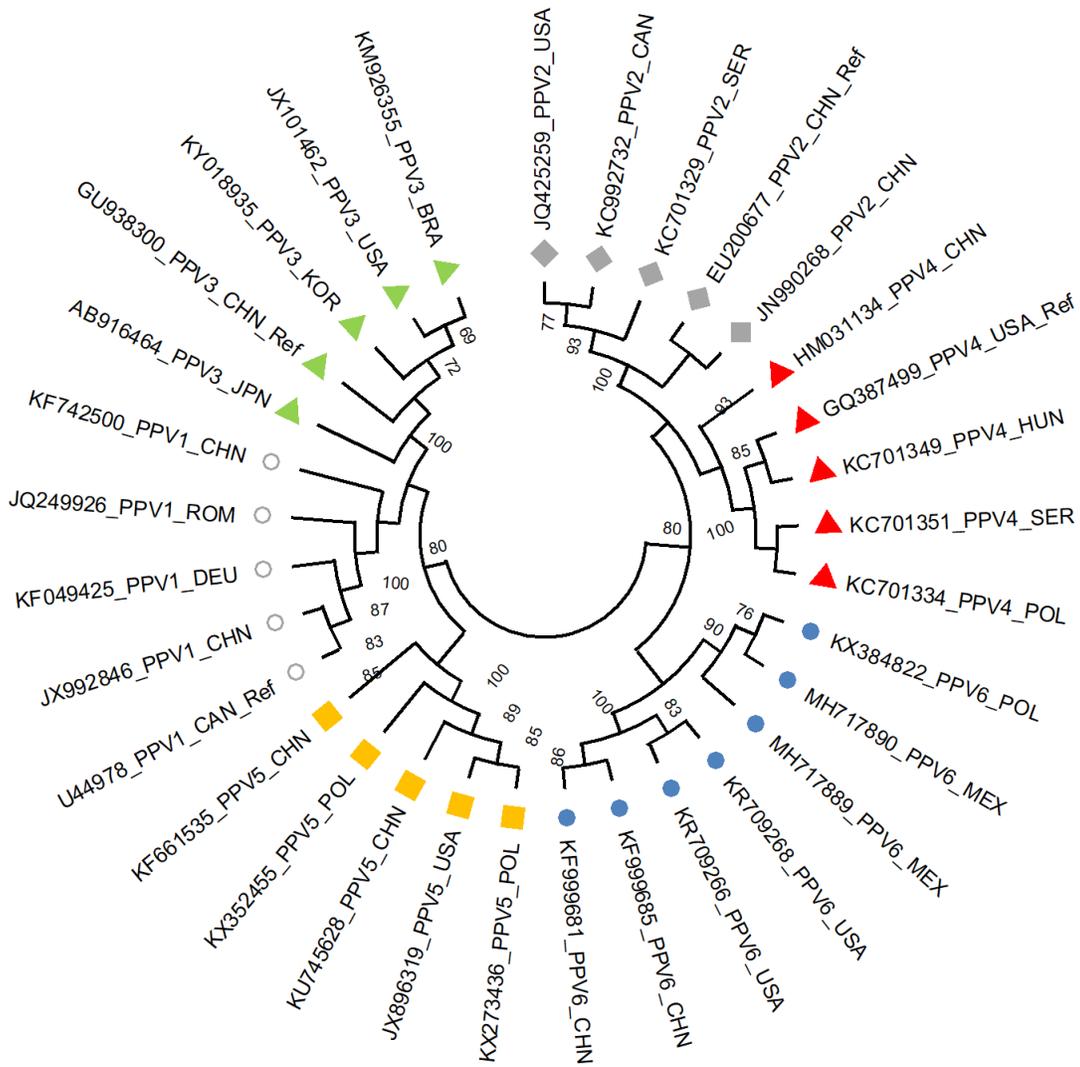
**Figura 10. Amplificación obtenida por PCR anidado para VP1 de PPV6.** Marcador de pares de bases (Mpb) 1000 pb (L1), se muestran productos del tamaño esperado (248) y casos negativos, gel agarosa al 1.5%.



**Figura 11. Amplificación del gen constitutivo HPRT1.** Marcador de pares de bases (Mpb) 1000 pb (L1), se muestran productos del tamaño esperado (224 bp) de muestras negativas al PCR anidado para el PPV6, gel agarosa al 1.5%.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<a href="#">Porcine parvovirus 6 strain U18-1 nonstructural protein and capsid protein genes .complete cds</a>	327	327	100%	7e-86	99.44%	<a href="#">KX384822.1</a>
<a href="#">Porcine parvovirus 6 strain U18-9 nonstructural protein and capsid protein genes .complete cds</a>	327	327	100%	7e-86	99.44%	<a href="#">KX384817.1</a>
<a href="#">Porcine parvovirus 6 strain U18-8 nonstructural protein and capsid protein genes .complete cds</a>	327	327	100%	7e-86	99.44%	<a href="#">KX384816.1</a>
<a href="#">Porcine parvovirus 6 strain U18-7 nonstructural protein and capsid protein genes .complete cds</a>	327	327	100%	7e-86	99.44%	<a href="#">KX384815.1</a>
<a href="#">Porcine parvovirus 6 strain U18-5 nonstructural protein and capsid protein genes .complete cds</a>	322	322	100%	3e-84	98.89%	<a href="#">KX384818.1</a>
<a href="#">Porcine parvovirus 6 strain U18-4 nonstructural protein and capsid protein genes .complete cds</a>	322	322	100%	3e-84	98.89%	<a href="#">KX384814.1</a>
<a href="#">Porcine parvovirus 6 isolate PPV6_VIRES_YN01_C1 nonstructural protein gene .complete cds .and capsid protein gene .partial cds</a>	305	305	100%	3e-79	97.22%	<a href="#">MK378401.1</a>
<a href="#">Porcine parvovirus 6 isolate PPV6_VIRES_NX01_C1 nonstructural protein and capsid protein genes .complete cds</a>	305	305	100%	3e-79	97.22%	<a href="#">MK378389.1</a>
<a href="#">Porcine parvovirus 6 isolate PPV6_VIRES_ZJ01_C1 nonstructural protein and capsid protein genes .complete cds</a>	294	294	100%	7e-76	96.11%	<a href="#">MK378405.1</a>
<a href="#">Porcine parvovirus 6 isolate PPV6_VIRES_TJ01_C1 nonstructural protein gene .complete cds .and capsid protein gene .partial cds</a>	294	294	100%	7e-76	96.11%	<a href="#">MK378400.1</a>
<a href="#">Porcine parvovirus 6 isolate PPV6_VIRES_SX02_C1 nonstructural protein and capsid protein genes .complete cds</a>	294	294	100%	7e-76	96.11%	<a href="#">MK378399.1</a>
<a href="#">Porcine parvovirus 6 isolate PPV6_VIRES_SX01_C2 capsid protein gene .partial cds</a>	294	294	100%	7e-76	96.11%	<a href="#">MK378398.1</a>
<a href="#">Porcine parvovirus 6 isolate PPV6_VIRES_SH01_C1 nonstructural protein and capsid protein genes .complete cds</a>	294	294	100%	7e-76	96.11%	<a href="#">MK378396.1</a>
<a href="#">Porcine parvovirus 6 isolate PPV6_VIRES_SD01_C1 nonstructural protein gene .complete cds .and capsid protein gene .partial cds</a>	294	294	100%	7e-76	96.11%	<a href="#">MK378393.1</a>

**Figura 12. Secuencias con alta homología obtenidas en Blast.** Se muestran 14 secuencias con un porcentaje de identidad del 99.44%-96.11% con las secuencias obtenidas del PPV6



**Figura 13. Árbol filogenético del *Ungulate copiparvovirus 4* (PPV6).** Se muestran números de acceso de secuencias de nucleótidos de distintas especies de PPVs. Se definen 6 cladas correspondientes a cada especie de PPVs. Las secuencias mexicanas (●MH717889 y MH717890) pertenecen dos casos positivos del PPV6 descritos en este trabajo.

## DISCUSIÓN

La identificación de virus emergentes es de gran utilidad, ocupando un lugar importante en el panorama de salud, por lo que se refiere a la investigación, se considera llevar a cabo su debido diagnóstico, ya que de esta manera se puede corroborar su presencia en el país, viendo así la oportunidad de llevar un control y prevención de enfermedades emergentes. Una espléndida forma de identificar estos agentes es utilizar la sangre como primera opción para llevar a cabo su respectivo diagnóstico, una vez que el agente ingresa al animal provoca una viremia, por consiguiente es distribuido sistémicamente. (Streck y Truyen, 2019) No obstante el hecho de que las diferentes especies de Parvovirus porcinos muestran variabilidad entre ellos, cabe recalcar que tienen tropismos tisulares similares, ya que el parvovirus tiene su enfoque en células de alta actividad mitótica, esta variabilidad en los aminoácidos de PPV6 VP1 afecta su patogenicidad y tropismo, los cuales aún no han sido determinados (Schirtzinger *et al.*, 2015).

Las frecuencias globales del PPV6 reportadas en Polonia, Estados Unidos y China, tienen un rango del 3%-15.6% siendo más frecuente en cerdos de finalización (Ni *et al.*, 2014; Schirtzinger *et al.*, 2015; Cui *et al.*, 2017), estos datos contrastan con el presente estudio, dado que se obtuvo una frecuencia del 80% de casos positivos al PPV6, indicando una mayor prevalencia en nuestro país, adicionalmente, el grupo de muestras se obtuvo de cerdas primerizas, las cuales son de mayor edad a los cerdos de finalización, pudiendo sugerir que a mayor edad la infección por PPV6 es mayor.

En la actualidad, el diagnóstico de la infección por las distintas especies de PPVs que infectan al cerdo, se basa en la detección de ADN viral mediante técnicas de biología molecular, tales como PCR punto final (Chen *et al.*, 2009), PCR anidado (García *et al.*,

2020), PCR tiempo real (Chen *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2010; Oh *et al.*, 2017; Schirtzinger *et al.*, 2015; Cui *et al.*, 2017; Cibulski *et al.*, 2017; Miłek *et al.*, 2018; Miłek *et al.*, 2020), Hibridación *in situ* (Novosel *et al.*, 2018), inhibición de la hemoaglutinación (Arambula, 1992), siendo el PCR la herramienta más utilizada.

Por otra parte el PCR anidado es una técnica que se utiliza cuando la cantidad de ADN viral presente en las muestras es baja, adicionalmente aumenta la sensibilidad de la prueba, detectando cantidades mínimas de ADN viral; dado el caso en algunos trabajos que han llevado a cabo protocolos de PCR tradicional para la detección de las diversas especies de Parvovirus, no describen la cantidad de templado utilizada para lograr una amplificación positiva o al menos para tomar en cuenta la evaluación de la Ct, por lo que el PCR anidado del presente trabajo demostró tener una alta sensibilidad al tener 12.5 ng de templado mínimo de detección, por lo que el PCR anidado es una herramienta útil con alta sensibilidad.

Dentro de las variantes de la PCR, el PCR en tiempo real ha sido la más utilizada ya que ha demostrado tener una sensibilidad alta y un menor margen de error en comparación a la PCR convencional (Chen *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2010), cada técnica tiene su importancia, sin embargo, esto da paso a que se implemente la PCR anidada de manera rutinaria como método de detección de las diversas especies de parvovirus, sobre todo cuando hay limitantes que perjudican la cantidad de ADN viral contenida en determinada muestra.

Por otra parte, el éxito de la amplificación en un PCR depende mucho del blanco, en este sentido diversos trabajos han basado la detección de las distintas especies de PPVs utilizando como blanco el ORF1 (NS1) (Song *et al.*, 2010; Miłek *et al.*, 2018) tanto para

protocolos de PCR punto final como para PCR tiempo real, dado que esta región del genoma viral es muy conservada en los PPVs, por otra parte el ORF2 el cual codifica para las proteínas de la cápside (VP1) ha sido utilizado como blanco para la detección de especies de PPVs, siendo las proteínas estructurales las responsables de las propiedades inmunogénicas de PPV(De Souza *et al.*,2019), dicho de otra manera la N-terminal de VP1 mejora la unión con el ADN del huésped para así estabilizar el ADN del genoma viral (Xie *et al.*,2019) ,siendo el VP1 una zona con mayor variabilidad podría permitir distinguir las distintas especies de PPVs (Schirtzinger *et a.*,2015), adicionalmente podría dar mayor información del origen evolutivo de las secuencias dado que el gen de la cápside presumiblemente está bajo la selección de purificación. En este sentido los iniciadores diseñados en este trabajo demostraron ser eficientes en la amplificación de un fragmento del ORF2.

Como se ha descrito anteriormente, la PCR es una herramienta útil para la detección de ADN viral. En la actualidad existen diversos protocolos y kits comerciales para la extracción de ADN , asimismo es importante mencionar que la cantidad de ADN presente en la muestra depende mucho de la célula blanco ya que la replicación primaria es llevada a cabo en tejido linfoide para así distribuirse a través de la sangre a tejidos adyacentes (Cotmore *et al.*,2014; Streck y Truyen,2019). El uso de la PCR en cualquiera de sus variantes tiene la ventaja de que la muestra empleada puede ser a partir de sangre (Miłek *et al.*,2018; Cui *et al.*,2020; Opriessnig *et al.*,2020) , suero (Schirtzinger *et a.*,2015; Cui *et al.*,2017; Cibulski *et al.*,2017; Miłek *et al.*,2020), tejido (Ni *et al.*,2014; Oh *et al.*,2017; Novosel *et al.*,2018; Dal Santo *et al.*,2020) e incluso materia fecal (Miłek *et al.*,2018), no obstante cabe considerar que esta enfermedad provoca grandes pérdidas para la industria

porcina ya que provoca abortos con la presencia de fetos momificados, camadas reducidas y lechones débiles aumentando la tasa de mortalidad, siendo posible así la extracción de tejido fresco para su respectivo análisis, siendo que este mantiene integro su ADN, siendo la defunción una desventaja, por lo contrario, es posible conceptuar como ventaja el hecho de emplear sangre y suero para la detección de parvovirus porcino puesto que la integridad del ADN se conserva, obteniéndolo de animales *in vivo*.

En este sentido, los casos negativos del presente trabajo lograron amplificar al HPRT1 utilizado como gen constitutivo, demostrando así la integridad del ADN. Por otra parte, diversos trabajos han utilizado el suero como muestra para la detección de diversas especies de Parvovirus, sin embargo no se ha descrito la patogenia completa del PPV6, por lo que el tiempo que permanece en sangre es desconocido, y dado que la distribución en tejidos y la célula blanco es muy similar al PPV1, la viremia es característica del PPV1, la cual le da su capacidad para generar transmisión transplacentaria, por lo que la sangre, puede ser una muestra idónea para captar casos positivos al PPV6.

Finalmente, la PCR anidada demostró amplificar secuencias específicas de Parvovirus porcino 6 (PPV6) del ORF2. Los resultados de la PCR anidada revelaron que PPV6 está presente en México y se encuentra circulando en cerdas primerizas del estado de México, sin embargo, se desconoce la participación del PPV6 en falla reproductiva, dado que *Ungulate protoparvovirus 1* (PPV1) es un agente causal de falla reproductiva y su presencia en sangre de cerda primeriza es un factor importante para el desarrollo de la falla reproductiva, por lo que conocer más sobre las características genómicas del PPV6 puede ayudar a conocer su patogenia y otros factores asociados a enfermedad, por lo que se podría realizar un análisis filogenético para obtener un fragmento más grande de la región génica

de la VP1 para poder conocer más sobre la evolución y saber a qué género pertenece este agente viral ya que la ICTV aún no lo ha clasificado, inclusive el amplificar otras regiones del genoma como lo que es el ORF1 (NS1), el cual forma parte de las proteínas no estructurales.

## CONCLUSIONES

- ✓ El *Ungulate copiparvovirus 4* (PPV6) se encuentra presente en nuestro país.
- ✓ El *Ungulate copiparvovirus 4* (PPV6) se encontró en sangre completa, y es un tejido útil como muestra para protocolos de PCR.
- ✓ Las frecuencias del *Ungulate copiparvovirus 4* (PPV6) obtenidas son considerablemente altas con relación a los reportes de otros países como Polonia, Estados Unidos y China.
- ✓ El *Ungulate copiparvovirus 4* (PPV6) pudo detectarse en casos bien documentados de PMWS.
- ✓ La PCR anidada estandarizada demostró ser una herramienta sensible y específica para la amplificación de la VP1 del *Ungulate copiparvovirus 4* (PPV6).

## REFERENCIAS

1. Martínez, R. (1998). Principales factores que afectan la reproducción en el cerdo. *Ciencia Veterinaria*, 8, 187-222.
2. Jiang, Y., Shang, H., Xu, H., Zhu, L., Chen, W., Zhao, L., & Fang, L. (2010). Simultaneous detection of porcine circovirus type 2, classical swine fever virus, porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs by multiplex polymerase chain reaction. *The Veterinary Journal*, 183(2), 172-175.
3. Cotmore, S. F., Agbandje-McKenna, M., Canuti, M., Chiorini, J. A., Eis-Hubinger, A. M., Hughes, J., ... & Pintel, D. J. (2019). ICTV virus taxonomy profile: Parvoviridae. *The Journal of general virology*, 100(3), 367.
4. Cotmore, S. F., Agbandje-McKenna, M., Chiorini, J. A., Mukha, D. V., Pintel, D. J., Qiu, J., ... & Davison, A. J. (2014). The family parvoviridae. *Archives of virology*, 159(5), 1239-1247.
5. Mészáros, I., Olasz, F., Cságola, A., Tijssen, P., & Zádori, Z. (2017). Biology of porcine parvovirus (Ungulate parvovirus 1). *Viruses*, 9(12), 393.
6. Oh, W. T., Kim, R. Y., Nguyen, V. G., Chung, H. C., & Park, B. K. (2017). Perspectives on the evolution of porcine parvovirus. *Viruses*, 9(8), 196.
7. Choi, C., & Chae, C. (2000). Distribution of porcine parvovirus in porcine circovirus 2-infected pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome as shown by in-situ hybridization. *Journal of Comparative Pathology*, 123(4), 302-305.

8. Darwich, L., Segales, J., & Mateu, E. (2004). Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by porcine circovirus 2: an immune riddle. *Archives of virology*, *149*(5), 857-874.
9. Kennedy, S., Moffett, D., McNeilly, F., Meehan, B., Ellis, J., Krakowka, S., & Allan, G. M. (2000). Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. *Journal of comparative pathology*, *122*(1), 9-24.
10. Schirtzinger, E. E., Suddith, A. W., Hause, B. M., & Hesse, R. A. (2015). First identification of porcine parvovirus 6 in North America by viral metagenomic sequencing of serum from pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology journal*, *12*(1), 170.
11. Cui, J., Fan, J., Gerber, P. F., Biernacka, K., Stadejek, T., Xiao, C. T., & Opriessnig, T. (2017). First identification of porcine parvovirus 6 in Poland. *Virus genes*, *53*(1), 100-104.
12. Sarradell, J., Pérez, A. M., Comba, E., Pereira, N., Anthony, L., Andrada, M., & Segalés, J. (2004). Hallazgos patológicos en cerdos afectados con el síndrome del desmedro multisistémico postdestete de la República Argentina. *Revista argentina de microbiología*, *36*(3), 118-124.
13. Segalés, J. Relevancia de circovirus porcino tipo 2 en alteraciones reproductivas de la cerda.
14. Zimmerman, J. J., Karriker, L. A., Ramirez, A., Schwartz, K. J., Stevenson, G. W., & Zhang, J. (Eds.). (2019). *Diseases of swine*. John Wiley & Sons.

15. N. James Maclachlan, B. V. S. M. S., & Dubovi, E. J. (2016). *Fenner's Veterinary Virology* (5<sup>a</sup> ed.). San Diego, United States: Elsevier Science.
16. Fields, B. N., Knipe, D. M., & Howley, P. M. (2013). *Fields Virology* (6<sup>a</sup> ed.). Philadelphia, USA: Wolters Kluwer Health
17. Arambula Rosales, M. G. (1992). Frecuencia de anticuerpos específicos de parvovirus porcino en cerdos sacrificados en el rastro municipal de Guadalajara Jalisco. Universidad de Guadalajara. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
18. Carrión, D., & Medel, P. (2001). Interacción nutrición reproducción en ganado porcino. *XVII Curso de Especialización FEDNA*. 42p.
19. Kerr, J., Cotmore, S., & Bloom, M. E. (2005). *Parvoviruses*. CRC Press.
20. Cotmore SF, Agbandje-Mckenna M, Canuti M, et al. ICTV virus taxonomy profile: *Parvoviridae*. *J Gen Virol*. 2019;100:367-8.
21. Garcia-Camacho, L. A., Vargas-Ruiz, A., Marin-Flamand, E., Ramírez-Álvarez, H., & Brown, C. (2020). A retrospective study of DNA prevalence of porcine parvoviruses in Mexico and its relationship with porcine circovirus associated disease. *Microbiology and Immunology*.
22. Cibulski, S. P., Teixeira, T. F., Varela, A. P. M., Scheffer, C. M., Santos, H. F., Lima, F. E., & Roehle, P. M. (2017). Ungulate copiparvovirus 2 in healthy and postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs. *Tropical animal health and production*, 49(5), 945-949.
23. Novosel, D., Cadar, D., Tuboly, T., Jungic, A., Stadejek, T., Ait-Ali, T., & Cságola, A. (2018). Investigating porcine parvoviruses genogroup 2 infection using in situ polymerase chain reaction. *BMC veterinary research*, 14(1), 163.

- 24.** Miłek, D., Woźniak, A., & Stadejek, T. (2018). The detection and genetic diversity of novel porcine parvovirus 7 (PPV7) on Polish pig farms. *Research in veterinary science*, *120*, 28-32.
- 25.** Dal Santo, A. C., Cezario, K. C., Bennemann, P. E., Machado, S. A., & Martins, M. (2020). Full-genome sequences of porcine circovirus 3 (PCV3) and high prevalence in mummified fetuses from commercial farms in Brazil. *Microbial Pathogenesis*, *141*, 104027.
- 26.** Ni, J., Qiao, C., Han, X., Han, T., Kang, W., Zi, Z., ... & Cai, X. (2014). Identification and genomic characterization of a novel porcine parvovirus (PPV6) in China. *Virology journal*, *11*(1), 203.
- 27.** Chen, H. Y., Li, X. K., Cui, B. A., Wei, Z. Y., Li, X. S., Wang, Y. B., ... & Wang, Z. Y. (2009). A TaqMan-based real-time polymerase chain reaction for the detection of porcine parvovirus. *Journal of virological methods*, *156*(1-2), 84-88.
- 28.** Song, C., Zhu, C., Zhang, C., & Cui, S. (2010). Detection of porcine parvovirus using a taqman-based real-time pcr with primers and probe designed for the NS1 gene. *Virology journal*, *7*(1), 353.
- 29.** Miłek, D., Woźniak, A., Podgórska, K., & Stadejek, T. (2020). Do porcine parvoviruses 1 through 7 (PPV1-PPV7) have an impact on porcine circovirus type 2 (PCV2) viremia in pigs?. *Veterinary Microbiology*, *242*, 108613.
- 30.** Cui, J., Biernacka, K., Fan, J., Gerber, P. F., Stadejek, T., & Opriessnig, T. (2017). Circulation of porcine parvovirus types 1 through 6 in serum samples obtained from six commercial polish pig farms. *Transboundary and emerging diseases*, *64*(6), 1945-1952.

31. Streck, A. F., & Truyen, U. (2019). Porcine Parvovirus. *Current issues in molecular biology*, 37, 33.
32. De Souza, A. R., Yamin, M., Gava, D., Zanella, J. R. C., Gatti, M. S. V., Bonafe, C. F. S., & de Lima Neto, D. F. (2019). Porcine parvovirus VP1/VP2 on a time series epitope mapping: exploring the effects of high hydrostatic pressure on the immune recognition of antigens. *Virology journal*, 16(1), 75.
33. Opriessnig, T., Karuppanan, A. K., Halbur, P. G., Calvert, J. G., Nitzel, G. P., Matzinger, S. R., & Meng, X. J. (2020). Porcine circovirus type 2a or 2b based experimental vaccines provide protection against PCV2d/porcine parvovirus 2 co-challenge. *Vaccine*, 38(8), 1975-1981.
34. Xie, H. L., Wang, Z., Cui, S. J., Zhang, C. F., & Cui, Y. D. (2010). The epitope of the VP1 protein of porcine parvovirus. *Virology journal*, 7(1), 161.
35. Streck, A. F., & Truyen, U. (2019). Porcine Parvovirus. *Current issues in molecular biology*, 37, 33.
36. “International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV): <https://ictv.global/taxonomy/>”