UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

ESTANDARIZACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE UNA TÉCNICA DE PCR ANIDADO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN GENÉTICA VP1 PARCIAL DEL TETRAPARVOVIRUS 2 DE LOS UNGULADOS (PPV3) EN CORAZONES FETALES DE CERDOS PROCEDENTES DE RASTRO

Tesis para obtener el Título de Médico Veterinario Zootecnista

Sustentante: Isidro Chávez Raziel Omar

Asesor: Dr. Alejandro Vargas Ruiz

Coasesor: M. en C. Ernesto Marín Flamand

CUAUTITLLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2023

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

VNIVERSIDAD NACIONAL AVFNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

UNAM
CUAUTITLÁN
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

ESTANDARIZACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE UNA TÉCNICA DE PCR ANIDADO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN GENÉTICA VP1 PARCIAL DEL TETRAPARVOVIRUS 2 DE LOS ANGULADOS (PPV3) EN CORAZONES FETALES DE CERDOS PROCEDENTES DE RASTRO

Que presenta el pasante: **Raziel Omar Isidro Chávez.**
Con número de cuenta: **311188381** para obtener el título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 17 de marzo de 2023.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Enrique Salaz Téllez	
VOCAL	Dra. Cynthia González Ruíz	
SECRETARIO	Dr. Alejandro Vargas Ruíz	
1er. SUPLENTE	M.V.Z. Alma Noemi Montes de Oca Chávez	
2do. SUPLENTE	M. en C. Diana Michele Araiza Hernández	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

MCVB/ntm*

DEDICATORIA.

A mi tutor: Alejandro Vargas Ruiz. Sin usted y sus virtudes, su paciencia y constancia este trabajo no lo hubiese logrado tan fácil. Usted formó parte importante de esta historia con sus aportes profesionales que lo caracterizan. Muchas gracias por sus múltiples palabras de aliento.

A mis padres: Por apoyarme en mis estudios y brindarme la orientación en cada parte de mi vida, porque ellos fueron los que dedicaron su tiempo para lograr que yo entendiera que el estudio, la perseverancia y la aspiración a ser alguien mejor, son virtudes muy importantes para todo ser humano.

Hoy en día seré una persona que tendrá un título profesional que se me abrirá muchas puertas y me permitirá trazarme planes a corto, mediano y largo plazo

AGRADECIMIENTOS.

A mis padres por todas las facilidades que me brindaron para el término de mi carrera

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme un lugar en la máxima casa de estudios y poder realizar una carrera universitaria

A mis semejantes por brindarme su amistad y compañerismo.

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

El presente trabajo fue apoyado por la Cátedra de Investigación CI 2210: “Patología Morfológica y Molecular Veterinaria: El presente trabajo fue apoyado por la Cátedra de Investigación CI 2210: “Patología Morfológica y Molecular Veterinaria.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio “A” de Patología Molecular Veterinaria de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

RESUMEN.

Los miembros de la familia *Parvoviridae* son virus pequeños y no envueltos con genomas lineales de ADN monocatenario de 4 – 6 KB. En Asia el Parvovirus porcino 3 (PPV3) se encontró por primera vez en Hong Kong en piaras de jabalís. Por otro lado, la posible asociación de las distintas especies de PPVs con en el Circovirus porcino tipo 2 aún no ha sido aclarada, en particular la participación del PPV3 y su posible relación con la falla reproductiva en cerdas. Para de detectar al PPV3 se realizó el diseño de iniciadores para estandarizar una técnica de PCR anidado, para esto, se utilizaron 9 secuencias del PPV3 disponibles en el Gan Bank y se tomó como blanco el ORF2. Como control positivo se utilizaron 2 linfonodos con diagnóstico positivo al Síndrome Multisistémico de emaciación post destete (PMWS), con el ADN de estas muestras se realizaron curvas de temperatura, iniciadores y cloruro de magnesio, posteriormente se determinó la sensibilidad (mediante una curva de templado) y la especificidad (mediante la secuenciación de 2 amplificaciones del PCR anidado) de la prueba. Finalmente, la prueba se implementó en 30 muestras de corazones fetales provenientes de cerdas enviadas al rastro municipal de Cuautitlán Izcalli. Las condiciones de amplificación fueron: temperatura de alineación de 58°, 75 pmol de concentración de iniciadores y 2.0 mM de concentración de Cloruro de magnesio. Así mismo, la cantidad mínima de amplificación fue de 50 ng y los productos esperados son de 235 pb los cuales su secuencia mostró una homología de 100-99.51% con secuencias reportadas como PPV3. Con las condiciones de amplificación estandarizadas del total de muestras (30) se obtuvo un 33% de casos positivos (10/30). El PPV3 ha sido reportado en países de importancia comercial como China, Alemania, Canadá, USA, Alemania, Reino Unido y Camerún con una prevalencia que oscila entre 12-47%. Este estudio obtuvo una frecuencia del 30% similar a lo reportado. Con la detección del virus en este estudio se confirma la presencia en México del *Tetraparvovirus de los Ungulados 2* en corazones de fetos provenientes de cerdas aparentemente sanas. Así mismo este estudio deja la puerta abierta para que posteriormente se profundice en la investigación de la infección, tropismo y/o sinergia con otros agentes virales de alto impacto en la producción porcina.

ÍNDICE.

DEDICATORIA…… 2
AGRADECIMIENTOS…… 2
RESUMEN…… 3
ÍNDICE…… 4
ÍNDICE DE FIGURAS…… 5
ÍNDICE DE TABLAS…… 5
ABREVIATURAS…… 6

1. INTRODUCCIÓN…… 7
   - 1.1 PRODUCCIÓN DEL CERDO NACIONAL …… 7
   - 1.2 ENFERMEDADES REPRODUCTIVAS…… 8
   - 1.3 ENFERMEDADES TRANSPLACENTARIAS…… 12
   - 1.4 FAMILIA PARVOVIRIDAE…… 17
   - 1.5 COMPONENTES PROTEICOS DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA PARVOVIRIDAE…….. 19
   - 1.6 ESPECIES DE PARVOVIRUS PORCINO…..…… 24
   - 1.7 PPV3…… 25
   - 1.8 PPV´S- PCV2…… 25
   - 1.9 PPV3-PCV2…… 26
2. JUSTIFICACIÓN …… 27
3. OBJETIVOS …… 28
4. MATERIAL Y MÉTODOS …… 29
   - 4.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS …… 29
   - 4.2 EXTRACCIÓN DE ADN …… 29
   - 4.3 DISEÑO DE INICIADORES…… 30
   - 4.4 CONTROL POSITIVO …… 31
   - 4.5 CONTROL NEGATIVO…… 31
   - 4.6 ESTANDARIZACIÓN DE LA PRUEBA …… 31
     - 4.6.1 GRADIENTE DE TEMPERATURA …… 32
     - 4.6.2 GRADIENTE DE INICIADORES …… 32
     - 4.6.3 GRADIENTE DE MAGNESIO …… 32
     - 4.6.4 SENSIBILIDAD…… 33
   - 4.7 ESPECIFICIDAD…… 33
   - 4.8 IMPLEMENTACIÓN …… 34
   - 4.9 ANÁLISIS DE RESULTADOS…… 34
5. RESULTADOS …… 34
   - 5.1 ESTANDARIZACIÓN …… 34
   - 5.2 ESPECIFICIDAD…… 38
   - 5.3 IMPLEMENTACIÓN …… 40
6. DISCUSIÓN …… 41
7. CONCLUSIÓN…… 44
8. BIBLIOGRAFIA…… 45

ÍNDICE DE FIGURAS.

- Figura 1: Representación esquemática de un parvovirus.
- Figura 2: Representación del gen VP1.
- Figura 3: ADN genómico del Parvovirus canino y su transcripción.
- Figura 4: Comparación de las características superficiales de especies de la familia *Parvoviridae*.
- Figura 5: Visualización de la estructura de PPV por cristalografía.
- Figura 6: Alineación de iniciadores con las secuencias de PPV3.
- Figura 7: Concentración de iniciadores.
- Figura 8: Temperatura óptima de reacción.
- Figura 9: Concentración de templado.
- Figura 10: Concentración de Magnesio.
- Figura 11: Homología del producto secuenciado.
- Figura 12: Árbol filogenético del *Tetraparvovirus de los ungulados 2* (PPV3).
- Figura 13: Casos positivos al PPV3.
- Figura 14: Amplificación del Gen HPRT1

ÍNDICE DE TABLAS.

- Tabla 1: Principales enfermedades porcícolas de Norteamérica.
- Tabla 2: Modificado del Comité Internacional de Taxonomía Viral: principales enfermedades de la subfamilia *Parvovirinae.*

ABREVIATURAS

OIE	Organización mundial de sanidad animal .
PPV	Parvovirus porcino.
MVM	Virus diminuto de los ratones.
FPV	Virus del panleucopenia felina.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
FW	Iniciador sentido.
RV	Iniciador antisentido.
FN	Iniciador sentido anidado.
RN	Iniciador antisentido anidado.
SNC	Sistema nervioso central.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ARN	Ácido ribonucleico.
PCV	Circovirus porcino.
PMWS	Síndrome multisistémico de emaciación post-destete.
VP	Proteínas estructurales.
NS	Proteínas no estructurales.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 Producción de cerdo nacional

México se posiciona en noveno lugar mundial en producción de carne de cerdo y octavo en consumo de esta (según la OIE). Es la segunda carne más consumida por los mexicanos seguida de la de pollo (1).

La producción de carne porcina nacional está calculada (según SADER Y SIAP, hasta octubre del 2019) en 1,303,770 toneladas y el consumo per cápita oscila en 19.7 kg . La industria porcina estima una producción en México de 3,338 millones de dólares en 2018. La zootecnia porcina depende principalmente de ciencias como: la nutrición, la reproducción, genética y bienestar animal (2,3).

La zootecnia porcina puede ser afectada por agentes etiológicos como bacterias, hongos y virus, entre las principales se encuentran:

Sistémicas	**Digestivas**	**Respiratorias**	**Nerviosas**	**Reproductivas**	**Dérmicas**
● Síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) ● Fiebre porcina clásica ● Peste porcina africana	● Colibacilosis ● Enteritis necrótica ● Coccidiosis ● Salmonelosis ● Enteropatía proliferativa porcina ● Gastroenteritis transmisible del cerdo ● Circovirosis ● Enterovirus	● Neumonía enzotica ● Pleuroneumoní a contagiosa del cerdo ● Rinitis atrófica ● Influenza porcina ● Streptococosis ● Pasteurrellosis	● Enfermedad de Glasser ● Enfermedad de Aujeszky o Pseudorrabia ● Encefalitis japonesa tipo B ● Enfermedad de ojo azul ● Meningitis estreptocócica	● Brucelosis ● Leptospirosis ● Parvovirosis porcina	● Erisipelosis ● Sarnas del cerdo ● Epidermitis exudativa

Tabla 1: Principales enfermedades porcícolas de Norteamérica. (4,5)

1.2 Enfermedades reproductivas (impacto económico).

Cualquier proceso febril ocasionado por virus o bacterias puede ser causa de muerte embrionaria o fetal y provocando aborto en una cerda gestante, reflejándose en una menor tasa de fertilidad o bien en una camada pequeña. Entre las bacterias que ocasionan una disminución en la gestación de la cerda se reportan: *E. coli*, *T. pyogenes*, *S. aureus*, *E. rhusiopathiae*, *Pseudomonas* spp., *Listeria monocitogenes*, *Actinomyces suis*, *Salmonella* spp., *Brucella suis* y *Leptospira* spp., siendo esta última la de mayor importancia ocasionando abortos de fetos del mismo tamaño, generalmente cerca del término de la gestación y repeticiones a intervalos irregulares; también es frecuente el nacimiento de momias y el de lechones débiles. También la brucelosis puede causar abortos y repeticiones principalmente al inicio de la gestación, pero su incidencia es muy baja (5,6).

Una gran lista de virus debe incluirse en la categoría de falla reproductiva. El virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (vPRRS), *Alphaherpesvirus porcino* 1 (HVP-1), *Protoparvovirus de los ungulados* 1 (PPV1), virus de la fiebre porcina clásica (CSFV) y el virus de la encefalomiocarditis (EMCV) se han asociado con la muerte fetal debido al daño al feto y/o a la placenta. Por otra parte, en los últimos años, el circovirus porcino tipo 2 (PCV2), considerado el agente causal del síndrome multisistémico de emaciación post-destete (PMWS), también se ha ligado a la falla reproductiva, con un efecto directo sobre el feto. (4,5,6)

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. Entre estos se pueden citar: *Protoparvovirus de los ungulados 1*, *Alphaherpesvirus porcino 1*, virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio del cerdo, así como, *Orthorubulavirus porcino* (5,6).

Los gastos de producción que genera la industria porcina como consecuencia de las enfermedades es la suma de: los costos de las visitas del veterinario, medicinas, vacunas, etc. Se calcula que el 40% de los cerdos en crecimiento y el

30% de las cerdas son vacunados con regularidad y que el 60% aproximadamente de los cerdos en crecimiento y el 30% de las cerdas reciben tratamiento antibiótico. El costo de las medicinas incorporadas al alimento equivale a un 5% adicional del costo; la inclusión mantenida de antibióticos en el alimento hasta el momento del sacrificio equivale en costo al valor de uno a dos kg de la carne en canal. Aunado a esto el costo de las pérdidas de eficacia antes de salir de la explotación por descenso de la productividad de las cerdas, menor tasa de crecimiento y descenso del índice de conversión del alimento. (7)

Algunas de las enfermedades de impacto reproductivo mayormente reportadas en Norteamérica son:

- ***Leptospirosis:*** es una enfermedad contagiosa que afecta al cerdo y es causado por una espiroqueta del orden *Spirochaetales*, de la familia *Leptospiraceae*, la especie es *Leptospira* posee varios géneros que afectan a una gran cantidad de especies animales. Los cerdos son afectados por *Leptospira borgpetersenii* serovariedad *tarassovi y Leptospira interrogans* serovariedades *Bratislava y Pomona.* La leptospirosis puede transmitirse directamente entre los huéspedes o bien, indirectamente en el medioambiente, puede ocasionar alteraciones digestivas, abortos, mortinatos y lechones nacidos débiles. Esta enfermedad puede asociarse con un escaso control de roedores y deficiencias de higiene, así como en las medidas de bioseguridad en producciones poco tecnificadas o de traspatio (5,7,8).

- ***Estreptococosis:*** Es una cocácea grampositiva, perteneciente al orden *Lactobacillales*, la familia *Streptococcaceae*, género *Streptococcus*, la especie es *Streptococcus suis* teniendo 35 serotipos siendo el *Streptococcus suis* tipo 2 el mayor reportado en cuadros clínicos de meningitis tanto en cerdos como en humanos. En el cerdo se transmite por contacto directo, principalmente vía oro-nasal; sin embargo, se llega a transmitir por canal vaginal. Afecta principalmente a cerdos de una y dos semanas de edad focalizándose en cavidad nasal y tonsilas. Es una enfermedad bacteriana, que determina infecciones articulares, nistagmos, reducción notable de la eficacia

reproductiva, neumonía, disminución encefálica, abscesos, septicemia, convulsiones nerviosas y muerte. (5,9,10)

- ***Erisipelosis:*** Es una batería Gram +, perteneciente al orden *Erysipelotrichales*, familia *Erysipelotrichaceae*, género *Erysipelothrix* de la cual se pueden identificar cerca de 29 serotipos y subtipos, la especie de interés es *Erysipelothrix rhusiopathiae*. La vía de ingreso más común es la oral; sin embargo, también por la piel herida, o la picadura de insectos hematófagos. Los signos incluyen muerte súbita, generalmente por septicemia con marcas elevadas sobre la piel de color púrpura y con forma de diamante, alteraciones crónicas articulares y cardiacas, constipación y pérdida de productividad. (5,11)

- ***Peste porcina africana:*** La etiología es el único miembro actual de la familia *Asfarviridae*, Género *asfivirus*, Especie *African swine fever virus*. Es transmitida mediante secreciones contaminadas de animales infectados, o de forma indirecta por alimento infectado o parásitos (principalmente garrapatas). Tiene la capacidad de infectar células endoteliales, hepatocitos, células del epitelio tubular renal y neutrófilos. Ocasiona lesiones hemorrágicas en linfonodos, bazo, riñones y algunas veces en corazón. Los linfonodos se encuentran hemorrágicos, edematosos y friables. Ocasionalmente se encuentran hallazgos como hidropericardio con petequias en el pericardio y endocardio, hemorragias en la mucosa de la vejiga urinaria, laringe y pleura. Congestión del hígado, pulmones, líquido libre en cavidad torácica. Origina temperatura elevada, inapetencia, postración, cianosis en piel, pérdida de crecimiento, aborto, enfermedad general intensa y muerte súbita. Su mortalidad es cercana al 100% (12,13)
- ***Fiebre porcina clásica:*** el virus pertenece a la familia *Flaviviridae,* género *Pestivirus,* teniendo 11 especies afectando a diferentes especies siendo la de interés la especie *Pestivirus c. (*Virus de la fiebre porcina clásica) hay un solo serotipo. El contagio es directo por cerdos infectados a cerdos susceptibles a la enfermedad, el virus puede excretarse por saliva, secreciones nasales,

orina y heces. Además del contagio indirecto por medio de fómites como vehículos, corrales, alimento o ropa contaminada. En la forma aguda de la enfermedad, en todos los grupos de edad, hay fiebre, pérdida de apetito, apatía, debilidad, conjuntivitis, estreñimiento seguido de diarrea, y ataxia. Varios días después del inicio de los signos clínicos, las orejas, el abdomen y la cara interna de las extremidades pueden presentar una coloración púrpura. Los animales con la enfermedad aguda mueren en un plazo de una a dos semanas. Casos graves de la enfermedad son muy similares a los de la peste porcina africana. Con cepas de baja virulencia, la única expresión puede ser una disminución de la tasa de reproducción y el nacimiento de lechones con defectos neurológicos, tales como el temblor congénito. (1,5,13)

- ***Encefalomiocarditis porcina:*** pertenece al orden *Picornavirales*, a la familia *Picornaviridae*, género *cardiovirus*, teniendo tres especies, la etiología de esta enfermedad es la especie *cardiovirus A* “virus de la encephalomyocarditis”, es un virus pequeño, no envuelto con una cápside icosaédrica. La transmisión puede ser directa afectando gran número de especies, se considera a roedores como reservorio natural, y siendo una zoonosis potencial. Resiste condiciones ambientales desfavorables pudiendo infectar después de días por comida y agua contaminada. En cerdos ocasiona; anorexia, decaimiento, parálisis, disnea y fiebres altas. Pocos días después de la infección se puede aislar al virus del cerebro, bazo, intestino, páncreas, hígado, riñones, corazón, pulmones y linfonodos. Los hallazgos en cerdos de experimentación fueron; lesiones miocárdicas, hidropericardio, edema pulmonar, ascitis, hidrotórax, dilatación cardíaca con áreas de necrosis. Los problemas reproductivos incluyen abortos, muerte fetal o momificación. La mortalidad puede estar cercana al 100% y disminuye con edades avanzadas. (13,14)

- ***Citomegalovirus porcino:*** pertenece al orden Herpesvirales, la familia *Herpesviridae,* subfamilia *betaherpesvirinae,* genero *roseolovirus,* con seis especies, siendo la etiología *Betaherpesvirus porcino 2. E*s endémico de la

población porcina, la vía de transmisión más común es por contacto directo por estertores nasales infectados, la mayoría de los casos se presenta en forma subclínica; sin embargo, llega a ocasionar: rinitis y neumonía, inapetencia, muertes fetales, momias, nacidos muertos, nacidos débiles y muerte de lechones. (15)

- ***Enfermedad de ojo azul:*** pertenece al orden *Mononegavirales*, la familia *Paramyxoviridae,* la subfamilia *Rubulavirinae* género O*rthorubulavirus,* teniendo ocho especies afectando a mamíferos, la etiología es *Orthorubulavirus porcino;* sin embargo, también se le conoce como *LPMV* La-Piedad-Michoacán-México virus. Los signos son más evidentes en cerdos jóvenes ocasionando fiebre, pelo hirsuto y una postura de espalda arqueada acompañada de diarreas. Posteriormente los signos nerviosos pueden hacerse visibles con ataxia, debilidad, rigidez principalmente en miembros pélvicos, temblores musculares, posturas anormales, excitabilidad al contacto, movimientos involuntarios, pupilas dilatadas, nistagmos, conjuntivitis, lagrimación excesiva, ocasionalmente los ojos cerrados por exudado que pegan las pestañas llegando a ser unilateral o bilateral aunado a una opacidad corneal. Los problemas reproductivos suelen ser el incremento de cerdas que retornan al estro, incremento del tiempo de intervalos de servicio, momias y nacidos débiles; sin embargo, los abortos no son comunes en esta enfermedad (16).

1.3 Las enfermedades transplacentarias

En el caso de los agentes oportunistas, son aquellos que se encuentran normalmente en la vagina mientras que los agentes patógenos penetran en la cerda con la ayuda de condiciones o factores predisponentes como la falta de limpieza en la sala de partos, una desinfección poco adecuada o un manejo excesivo de la cerda en estro en la cual se manipule muchas veces catéteres u objetos contaminados sobre la cerda, incluyendo el material genético o el macho. La mayoría de las infecciones urogenitales ascienden desde la vagina. El útero de la cerda es

relativamente resistente a la infección en el momento del estro debido al aumento de los niveles de IgG e IgA y al aumento de la actividad de las células fagocíticas bajo la influencia del estrógeno; sin embargo, el cuello uterino se abre a este nivel y puede permitir que una gran carga bacteriana tenga la capacidad de acceder al útero. La resistencia natural a la infección disminuye durante la fase lútea cuando el útero está bajo la influencia de progesterona y es allí cuando las bacterias colonizan a menudo. El tracto urinario es también relativamente resistente a la infección, pero el traumatismo durante el apareamiento, la inseminación artificial o el parto puede comenzar con la infección (17).

Cuando las cerdas sufren una infección durante la gestación, depende mucho del agente etiológico las lesiones que este pueda ocasionar, algunos tipos de bacterias pueden llegar a encontrarse focos de congestión, hemorragia, edema, metritis crónica, engrosamiento nodular inflamatorio de la pared uterina y salpingitis de tipo purulenta, nódulos blanco-amarillentos, exudados caseosos, nódulos linfoides hiperplásicos, lesiones miliares en el útero, endometritis catarral, infiltrados leucocitarios, células plasmáticas y linfoides. La mayoría de los virus que llegan a traspasar la barrera placentaria, buscan células de rápida división o actividad metabólica, llegando a las células de los fetos en formación. Una de las principales células con mayor actividad metabólica son las de músculo estriado cardiaco, provocando focos de necrosis. Así mismo puede afectar células del epitelio gástrico, células renales, células hepáticas, hallándose los mismos focos necróticos en los órganos fetales y ocasionando la muerte fetal. Dependiendo la etapa en la cual la gestación es interrumpida por la infección se pueden llegar a dar diferentes signologías como la reabsorción fetal, momificación fetal, abortos, nacidos muertos y nacidos débiles (4,17).

Algunas enfermedades transplacentarias son:

- ***Enfermedad de Aujeszky:*** Este virus es miembro de la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae,* género *varicellovirus,* especie A*lphaherpesvirus porcino 1*. También conocido como virus de la pseudorrabia. Por lo general, se propaga directamente entre los animales por

contacto estrecho; no obstante, el virus puede permanecer infeccioso en el aire por un período de siete horas si la humedad relativa es al menos de 55%, desplazarse hasta dos kilómetros en forma de aerosol y transmitirse mediante fómites y cadáveres. En condiciones favorables, el VEA puede sobrevivir durante varios días en las camas y en el agua contaminada. La transmisión venérea es posible y puede ser la forma principal de propagación entre los cerdos salvajes. Los lechones pueden infectarse por vía transplacentaria. Los signos clínicos en los lechones de menos de una semana de edad, los signos van desde fiebre, desgano anorexia y son seguidos rápidamente por temblores, pedaleos, convulsiones u otros signos relacionados con el SNC. En cerdos de mayor edad son; fiebre, anorexia, pérdida de peso, tos, estornudos, conjuntivitis y disnea Cuando aparece por vez primera en la piara provoca elevada mortalidad y pérdida de crecimiento, en cerdas reproductoras ocasiona abortos, cerdos momificados y meningitis en cerdos lactantes. Su tasa de mortalidad puede ser de hasta el 90% en cerdos con menos de 10 días de edad, de 70% en cerdos con edad entre 10 y 20 días, y del 10% en cerdos con edades entre los 20 y 50 días. La tasa de abortos llega a un valor cercano del 15% (5,7,8).

- ***Síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS):*** pertenece a la orden *Nidovirales,* subfamilia *Arteriviridae,* género *arterivirus,* especie *Betaarterivirus porcino 2 (*virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino), es un virus ARN de una cadena de sentido positivo con alrededor de 15 kb con nueve marcos de lectura abiertos. El virus entra por vía oronasal y genital; penetra a epitelios nasal y tonsilar, a macrófagos pulmonares y a endometrio uterino y es eliminado principalmente por saliva, orina, semen, secreciones mamarias, transplacentarias y excremento. Los cerdos afectados por PRRS manifiestan fiebre, escalofríos, disnea, enrojecimiento de la piel, pelaje áspero, edema en párpados, conjuntivitis, depresión, anorexia y diarrea, correspondientes a diferentes grados de neumonía, miocarditis, encefalitis, rinitis, vasculitis, linfadenopatías, en el área de reproducción

aumentan las tasas de aborto (a finales de la gestación), momias, mortinatos, nacidos débiles y repeticiones de celo; en sementales disminuye la calidad del semen; en lechones lactantes incrementa la tasa de mortalidad. Pueden ocurrir brotes hasta en 80% de cerdas gestantes, llegando a ocasionar pérdidas de hasta el 90% de la producción porcina. La lesión más común es una vasculitis en la placenta. (8,18)

- ***Brucelosis:*** es causada por *Brucella suis,* son bacilos, Gram negativos, inmóviles, no capsulados, no esporulados, de localización y multiplicación intracelular facultativa. El contagio es por vía venérea; sin embargo, puede entrar al hospedero por mucosa oral, nasal, conjuntival y por placenta. Ocasiona abortos del segundo y tercer mes de gestación, coexisten con otras camadas de lechones débiles, mortinatos y aumento de la mortalidad embrionaria en la granja En los machos, la infección puede tener lugar en testículos, próstata, epidídimo, vesículas seminales y/o glándulas bulbouretrales. (5,19)

- ***Influenza porcina:*** pertenece al orden *Articulavirales,* de la familia *orthomyxoviridae* género *Alphainfluenzavirus*, especie I*nfluenza A virus,* se han caracterizado varios subtipos, siendo los más comunes H1N1, H1N2, H3N2. La principal vía de contagio es el contacto directo por hacinamiento y llega a pasar vía transplacentaria. Los signos clínicos suelen aparecer a los tes días de contagio siendo los más comunes; picos febriles, letargia, anorexia, pérdida de peso y dificultad para respirar, se observa descargas nasales, tos. Los problemas reproductivos suelen ser el retorno al celo, reducción de camadas, abortos principalmente la cepa H3N2 por los picos febriles y disminución de la viabilidad de los neonatos. (1,5,13)

- ***Falla reproductiva asociada a circovirus porcino tipo 2 (FR-PCV2):*** proviene de la familia *Circoviridae* género *Circovirus,* la especie *Porcine Circovirus porcino 2.* El virus se transmite de forma directa, pueden ser excretadas las partículas virales en secreciones nasales, orina y heces,

además que puede pasar la barrera placentaria e infectar a los fetos. Tomando como especie el C*ircovirus porcino 2* ya que está asociada al síndrome multisistémico de emaciación post-destete que se caracteriza por la pérdida de peso, desgaste general y una severa inmunodepresión que ocasionan la muerte prematura de cerdos. El virus es asociado a diferentes enfermedades y síndromes como la baja productividad, el complejo respiratorio, tremor congénito, síndrome porcino de dermatitis y nefropatía, traqueítis necrotizante y epidermitis exudativa. En conjunto con otros agentes virales y bacterias. (20)

- ***Parvovirus porcino:*** proviene de la familia *Parvoviridae* subfamilia *Parvovirinae* genero *Protoparvovirus,* la especie es *Protoparvovirus de los Ungulados 1.* Actualmente existen ocho especies de parvovirus porcino reportadas por el ICTV. La infección por la vía oronasal y en ocasiones a través del semen, la replicación local del virus conduce a una viremia. El virus tiene predilección por las células en división activa de los tejidos fetales. La infección transplacentaria se produce en las cerdas gestantes de 10 a 14 días después de la exposición al virus. Las lesiones más importantes de los fetos tienen lugar antes de que se establezca su competencia inmunológica, aproximadamente a los 60 a 70 días de gestación. La infección de los embriones en las primeras semanas de vida provoca su muerte y reabsorción. Cuando la infección se produce en fases avanzadas de la gestación, pero antes del día siete los fetos mueren y sufren una momificación. Cuando el virus ataca por primera vez a cerdos no inmunizados, sus efectos son ligeros a menos que los animales vayan a iniciar pronto una gestación o su gestación sea reciente. En este caso el virus causará muerte embrionaria, muerte fetal, nacimiento de cerdos débiles y pequeños, además de cerdos que nacen muertos. Es el principal agente asociado con la infertilidad y con pérdidas en la reproducción de las cerdas. La enfermedad puede generar brotes periódicos, su influencia puede ser anulada fácilmente mediante la aplicación de un programa simple de vacunación. (21,22)

1.4 Familia Parvoviridae

El comité internacional de taxonomía viral señala la clasificación de la familia *Parvoviridae* se divide en dos subfamilias de acuerdo con el hospedero que llegan a afectar, la subfamilia *Parvovirinae* afectando a primates y la familia *Densovirinae* afectando insectos y artrópodos. De la subfamilia *Parvovirinae* hay ocho géneros: *Amdoparvovirus, Aveparpovirus, Bocaparvovirus, Copipárvovirus, Dependoparvovirus, Erythroparvovirus, Protoparovirus y finalmente Tetraparvovirus*. El género *Tetraparvovirus* a su vez contiene 6 especies: *Chiropteran tetraparvovirus 1, Primate tetraparvovirus 1, Ungulate tetraparvovirus 1, Ungulate tetraparvovirus 2, Ungulate tetraparvovirus 3, Ungulate tetraparvovirus 4. (13,22)*

Los miembros de la familia *Parvoviridae* son virus pequeños, resistentes y no envueltos con genomas lineales de ADN monocatenario de 4 – 6 KB. Los virus se dividen en dos subfamilias, los *Parvovirinae* y los *Densovirinae*, se distinguen principalmente por su capacidad respectiva de infectar a los vertebrados (incluidos los humanos) contra los invertebrados. Al ser genéticamente limitados, la mayoría de los parvovirus requieren dividir activamente las células hospederas y son específicas del huésped y/o del tejido. Algunas causan enfermedades, que van desde la subclínica a la letal. Algunos requieren coinfección con virus auxiliares de otras familias. (13,23,24)

Los viriones son partículas pequeñas, no envueltas, de 23 – 28nm de diámetro, sin lípidos esenciales conocidos, carbohidratos, proteínas accesorias o histonas. Son excepcionalmente robustas, a menudo permanecen infecciosas en el medio ambiente durante meses o años. Los estudios de reconstrucción de imágenes cristalográficas y cryoEM de rayos X revelan una estructura de partículas altamente característica con T = 1 simetría icosaédrica. (13,22). La cápside se ensambla a partir de 60 cadenas polipeptídicas estructuralmente equivalentes derivadas del extremo C-terminal de una sola secuencia de la proteína viral de la cápside (VP). Estos monómeros interdigitales se extienden para crear 60 unidades asimétricas por partícula, que coordinan a 12 ejes de 5, 23 y 32 veces. (21,22,24)

Así, en general, las estructuras de la cápside del parvovirus son significativamente más conservadas que sus identidades de secuencia de proteínas sugieren. En consecuencia, las estructuras de la cápside sirven como un indicador fuerte de la identidad filogenética del parvovirus. (24)

Género	***Especie***	***Especie afectada***	***Sinonimias***
Amdoparvovirus	*Carnivore amdoparvoviurs*	Visones	*Aleutian mink disease virus*
Artiparvovirus	*Chiropteran artiparvovirus*	Murciélagos	
Aveparvovirus	*Galliform aveparvovirus*	Galliformes	*Chicken parvovirus*
Bocaparvovirus	*Carnivore bocaparvovirus*	Caninos	*Canine minute virus*
	Rodent bocaparvovirus	Roedores	
	Ungulate bocaparvovirus	Bovinos	*Bovine parvovirus*
Copiparvovirus	*Ungulate* Copipárvovirus 4	Porcino	*Porcine parvovirus 6*
Erythroparvovirus	*Pinniped erythroparvovirus*	Pinipedos	
	Primate erythroparvovirus	Humanos	*Human parvovirus B19*
	Rodent Erythroparvovirus	Roedores	
Protoparvovirus	*Carnivore protoparvovirus*	Caninos y felinos	*Feline panleukopenia virus Canine parvovirus*
	Rodent protoparvovirus	Roedores	*Mouse parvovirus 1 Mice minute virus*
	Ungulate protoparvovirus	Porcinos	*Porcine parvovirus*
Tetraparvovirus	*Chiropteran tetraparvovirus 1*	Murcielagos	*Eidolon helvum (bat) parvovirus 1*
	Primate tetraparvovirus	Humanos	*human parvovirus 4*
	Ungulate tetraparvovirus 1	Bovinos	*bovine hokovirus 1*
	Ungulate tetraparvovirus 2	Porcino	*Porcine parvovirus 3 porcine hokovirus*
	Ungulate tetraparvovirus 3	Porcino	*Porcine parvovirus 2 parvovirus YX-2010/CHN*
	Ungulate tetraparvovirus 4	Ovino	*ovine hokovirus 1*

Tabla 2. Modificado del Comité Internacional de Taxonomía Viral: principales enfermedades de la subfamilia *Parvovirinae* (2)

1.5 Componentes proteicos de los miembros de la familia Parvoviridae

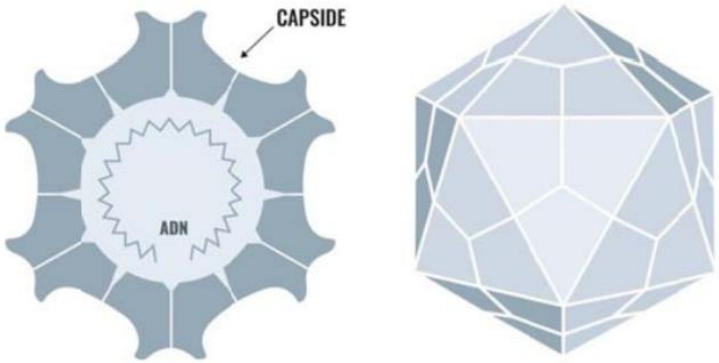


Figura 1. Representación esquemática de un parvovirus (24)

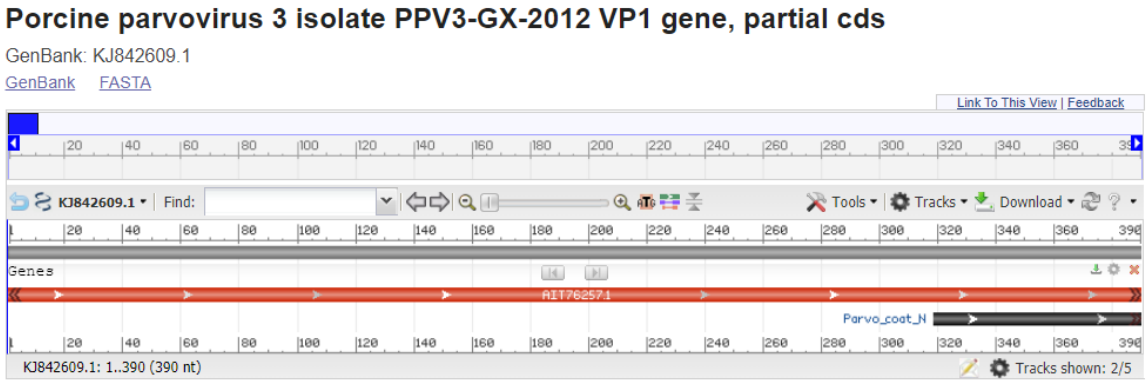
La cápside presenta protuberancias superficiales como un poro central en cada uno de los vértices del icosaedro (representado en la figura 1) y está compuesta por aproximadamente 90% de VP2 y solo 10% de VP1 (figura 2). En algunas especies virales se encuentra una tercera proteína estructural denominada VP3 (13,23,24).

A pesar de su pequeño tamaño, el genoma de los parvovirus puede generar varias proteínas con múltiples funciones que garantizan un ciclo vírico altamente efectivo. El gen que codifica para la cápside vírica es traducido en las proteínas VP1, VP2; VP2 sufre, a su vez, proteólisis tras la traducción, dando lugar a la variante VP3(13,22,24).

El VP1 contiene la secuencia completa de VP2 y un dominio N-terminal. Este extremo N-terminal de VP1 se encuentra enterrado en la cápside cuando el virus se encuentra dentro de la célula, siendo expuesto al exterior en el proceso de infección por mecanismos desconocidos. La VP2 es la proteína estructural más abundante, representando un 90% de la cápside vírica, siendo el mayor determinante del rango de hospedador y de la interacción entre virus y hospedadores. VP2 se escinde en VP3 por proteasas del hospedador (13,24).

La cápside contiene una actividad enzimática fosfolipasa A2, así como secuencias de bases que controlan el transporte nuclear de las proteínas de la cápside durante la infección y replicación. La actividad enzimática de la fosfolipasa A2 varía significativamente dependiendo del virus examinado, pero parece ser necesaria para la infección celular, modificando la membrana endosomal para permitir el ingreso del virus al citoplasma. (13,22,24)

A



B

```
>KJ842609.1 Porcine parvovirus 3 isolate PPV3-GX-2012 VP1 gene, partial cds
CAGTCTGCGCTTAACTTAGGTGATTTTCACCGGCCGCCTAACCCGGCCGTGTTGTTGGATTTACACAAAT
TTGCTAAGGATGCCGTAGTGCCTTCTGCGGAGGATATTAAAATTTTCTTTGAGGAGAGTGTATCCCCTTG
GTCTGAGGAAGACAAAAAAATTTTGAAACAGATTGAAGGGCAGTTCCAGGAAATATTCCATCCACCCACA
GATACGGAGGATGGAGCCGATAGCTACGGTGGCAACAGTGATCAAGGAACTGGTTCCCTTAGTGAACCAG
ACCTTGAACGCCCTCCCGAGCGCCCCGGAATCTTGGTCCCCGGGTACAATTATGTTGGTCCTGGTAATCC
TTTGGATAATGCTCCCGCTAAGGGACCAGTGGATGAAGCA
```

Figura 2. A) representación gráfica del gen que codifica la proteína VP1 del PPV3. B) Representación por nucleótidos del gen que codifica la proteína VP1 del PPV (25).

La VP2 (o VP3, dependiendo del virus), ya que contiene los determinantes antigénicos principales y juega un papel muy importante en la patogenicidad del virus. Esta es necesaria para ensamblar la cápside y empaquetar el genoma vírico en su interior. Esta proteína también le permite al virus ingresar a la célula a través de su interacción con el receptor celular de la transferrina (TfR). Por esta razón, unos pocos cambios en la secuencia de aminoácidos de la VP2 pueden variar el grado de afinidad con su receptor celular, lo que podría alterar la capacidad infectiva y el rango de hospedadores del virus. Se ha relacionado también VP2 con la interacción con ácido siálico (SA); así mismo, juega un papel importante en el proceso de infección celular ya que posee actividad fosfolipasa A2. Sus sitios antigénicos son el principal blanco de los anticuerpos del hospedador, los cuales

protegen contra la infección. Además, tiene capacidad de autoensamblaje, formando partículas inmunocompetentes similares al virus (23,26,27).

La proteína VP2 posee una estructura común en forma de barril β, compuesto por ocho láminas β antiparalelas, conectadas a través de α hélices que forman lazos. La superficie de la cápside vírica está formada principalmente por estos lazos, que determinan propiedades biológicas tales como el rango de hospedador, el tropismo celular, la unión al receptor celular, así como propiedades antigénicas. Las inserciones entre las cadenas βD y βE del barril β forman una cinta β antiparalela, la cual junto a inserciones similares en otros cuatro polipéptidos cercanos forman un cilindro en el eje de simetría 5 de la cápside vírico; en este cilindro hay una abertura a la superficie de la partícula vírica por la que VP2 es externalizada para su escisión en VP3 en las partículas maduras (13,26,27).

La proteína VP1 forma también parte de la cápside vírica. Presenta unas secuencias básicas que podrían estar controlando los procesos de transporte nuclear. VP1 es esencial para la infectividad del virus, por lo que se cree que el dominio N-terminal adicional de la misma posee una función específica. Por otro lado, existe evidencia de que dicho extremo se localiza internamente y que ayudaría a neutralizar el ADN vírico (26,27).

La proteína VP3 es el componente minoritario de la cápside y resulta de una escisión proteolítica postraduccional de 15 a 20 aminoácidos del extremo N-terminal de VP2, expuesto hacia el exterior de la cápside. Dicha escisión se realiza tras el ensamblaje de las partículas víricas que contienen el genoma vírico (partículas completas). En las partículas víricas carentes de genoma no se ha constatado la presencia de la proteína VP3 (13,26,27).

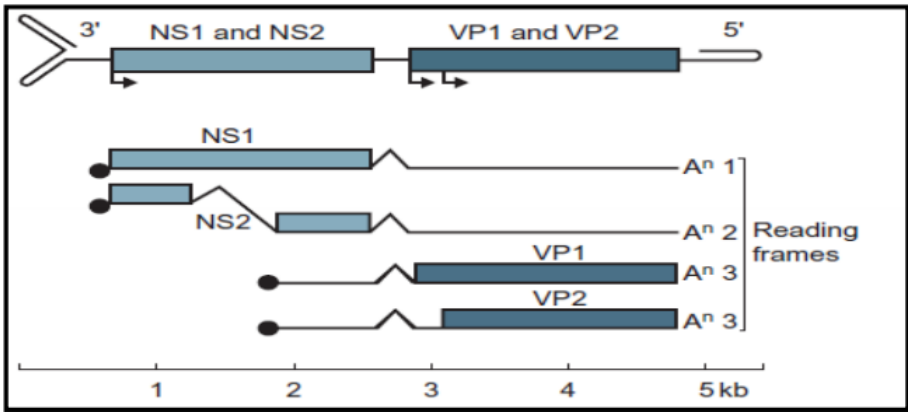


Figura 3. DNA genómico de parvovirus y su estrategia de transcripción (41).

La proteína NS1 es el producto de mayor tamaño del gen NS, posee una localización nuclear y está involucrada en el control de la replicación del ADN ya que reconoce, une y corta el ADN vírico durante la replicación (Figura 3). A su vez, posee actividad helicasa y ATPasa, regula la expresión génica, controla el empaquetamiento del ADN dentro de la cápside, interviene en el control de la apoptosis celular después de la infección vírico, y es la responsable del reconocimiento y unión a varias proteínas celulares (26,27).

Por último, la proteína NS2 se encuentra en el núcleo y en el citoplasma, y a pesar de ser aún poco conocida, se cree posee un papel de una manera dependiente del tipo celular y del hospedador, en el ensamblaje correcto de la cápside y en el tráfico de los componentes de la misma. Además, se presupone que interviene en el proceso de regulación de la expresión génica, pero no parece tener un papel mayor en el ciclo vírico (27,28).

Los parvovirus que afectan a los vertebrados, a pesar de las diferencias en las secuencias de muchos de ellos, comparten secuencias en una región de las proteínas no estructurales, lo que sugiere que todos los virus tienen un ancestro común y propiedades comunes (Figura 4). El genoma de todos ellos oscila entre 4500 y 5200 bases de longitud, la mayoría contienen 2 marcos de lectura abiertos (ORF); sin embargo, PPV4 tiene 3, así como secuencias terminales palindrómicas

implicadas en el control de la replicación del ADN. El marco de lectura abierto izquierdo codifica las proteínas no estructurales, y el derecho las estructurales. El genoma puede contener entre uno y 3 promotores funcionales para la transcripción del RNA (13,28,29).

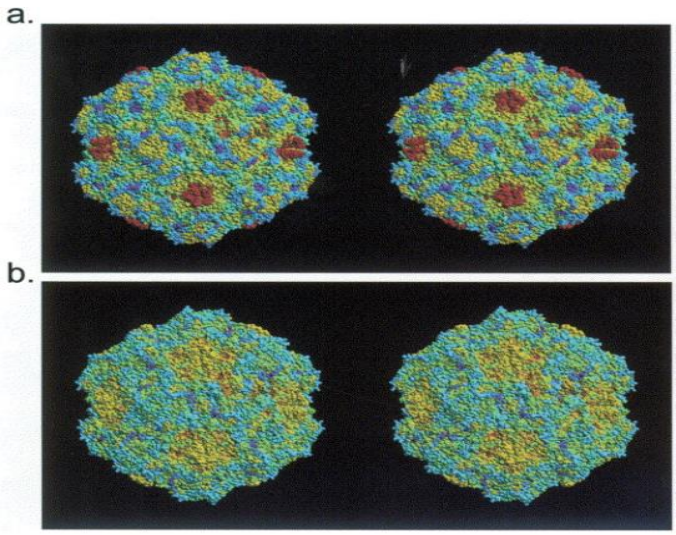


Figura 4. Comparación de las características superficiales de especies de la familia *Parvoviridae*. A; PPV con FPV B; PPV con MVM. Las áreas rojas representan zonas conservadas y las azules zonas de alta variación (13).

El ADN vírico, posee dos unidades transcripcionales. El transcrito de la primera unidad produce los RNA mensajeros de las proteínas no estructurales (NS1 y NS2) por un mecanismo que implica un corte y empalme alternativo en el mensajero de la NS2. Este mecanismo genera un cambio en el marco de lectura a partir del sitio de eliminación del intrón, por lo que las proteínas NS1 y NS2 son idénticas en su extremo N-terminal, pero difieren en el extremo C-terminal. El transcrito generado por la segunda unidad produce los RNA mensajeros de las proteínas estructurales (VP1 y VP2), también por procesamiento diferencial. La secuencia completa de VP2 está presente en VP1, que contiene un dominio N-terminal adicional de 143 aminoácidos (13,26).

Los componentes de la cápside viral y la morfología es muy similar en la subfamilia *Parvovirinae encontrando paralelismos en los dobleces estructurales proteicos (Figura 5)(13).*

Todos los parvovirus autónomos poseen secuencias palindrómicas en ambos extremos de su genoma. Estos palíndromos son diferentes en cada extremo y se pliegan sobre sí mismos para actuar como cebadores durante la replicación (13,22).

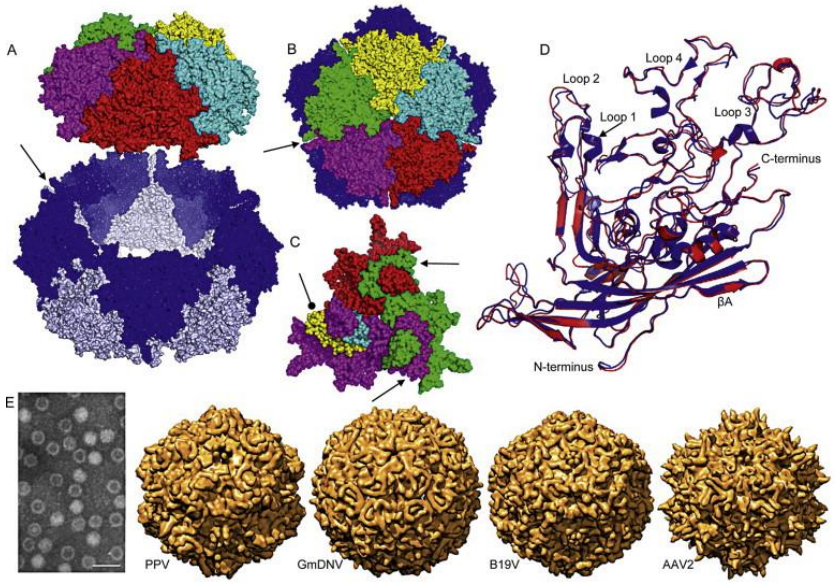


Figura 5. A) vista lateral de parvovirus porcino con 5 trímeros componentes de un segmento de la cápside B) visualización por arriba de los 5 trímeros C) composición del trímero de parvovirus porcino y sus diferentes dobleces proteicos estructurales. D) comparación entre los dobleces proteicos estructurales del parvovirus porcino y del ratón teniendo una similitud del 52 % . E) visualización por cristalografía de diferentes parvovirus significativamente similares (13)

1.6 ESPECIES DE PARVOVIRUS PORCINO

El PPV2 fue reportado en Norteamérica en 1998, (Estados Unidos de Norte América y Canadá), en cerdos de producción afectados por el Circovirus porcino tipo 2 ocasionando problemas económicos por alteraciones en los parámetros productivos causando el síndrome multisistémico de emaciación post-destete (PMWS), en los cuales la prevalencia del PPV2 es de 56.7%. (29)

En Europa posteriormente, aunque no se sabe con exactitud de donde proviene el virus investigaciones de Selección de variables de búsqueda estocástica bayesiana determinaron que puede ser una cepa mutante China que se alojó en la

población porcícola de Croacia que posteriormente se diseminó a Serbia y de ahí al resto de Europa. (21,29,30)

Una de las principales consecuencias de la infección por PPV1 en cerdos es la insuficiencia reproductiva, caracterizada muerte y reabsorción embrionaria, fetos momificados, mortinatos y periodos prolongados de parto, además de su papel en el complejo de enfermedades respiratorias porcinas, y el síndrome multisistémico de emaciación post-destete. Cuando los cerdos adultos susceptibles están expuestos a PPV1 en el apareamiento o durante la gestación, el virus cruza fácilmente la barrera placentaria e infecta los embriones o fetos. Las camadas infectadas con PPV1 pueden tener un número variable de fetos afectados debido a la propagación intrauterina del virus entre los fetos. La etapa de la gestación en el momento de una infección de PPV1 determina principalmente las manifestaciones clínicas resultantes. Cuando la infección transplacentaria de PPV1 ocurre antes de 35 días de gestación, la resorción de algunos o todos los fetos ocurre, dando por resultado una reducción del tamaño de la camada o de la vuelta al servicio. Si se produce una infección entre el día 35 y el día 70 de gestación, uno o más fetos pueden morir y momificarse. Las infecciones posteriores al día 70 seguirán siendo principalmente subclínicas. Los fetos son inmunes competentes para PPV1 y los lechones serológicos positivos nacían. Las infecciones agudas de cerdos, jabalíes o cerdas no gestantes usualmente no causan signos clínicos. (31,32,33,34)

1.7 PPV3

En Asia el parvovirus porcino 3 se encontró por primera vez en Hong Kong en piaras de jabalís con una incidencia del 50.54 % posteriormente se hicieron pruebas a los cerdos de producción encontrándose que también hay una prevalencia del 51.3% en el año de 2008. (30)

1.8 PPVs-PCV2

La coinfección de PCV2 y PPVs, siendo investigada desde mediados de la década pasada en diferentes países de América y Europa principalmente, se ha asociado al síndrome multisistémico de emaciación post-destete; sin embargo,

esporádicamente al incremento de los abortos. La asociación Circovirus porcino tipo 2 (PCV2) y parvovirus porcino (PPV1) ocasionan: La dilatación ventricular, miocarditis, hidrotórax, hepatomegalia y los riñones agrandados. Son resultados prominentes de la inspección post-mortem en estos animales. La examinación histopatológica reveló la infiltración severa de macrófagos, la formación de los sincitios y los cuerpos anfofílicos citoplásmicos y nucleares numerosos de la inclusión en tejidos linfoides. Lesiones no supurativas en el miocardio junto con necrosis y fibrosis. Lesiones granulomatosas eran evidentes en hígado, pulmón, riñón, páncreas, miocardio, intestinos, testículos, cerebro y salivales, tiroides y glándulas suprarrenales (30,31,32).

El parvovirus porcino se replica en las células de la serie monocito-macrófago y puede producir disfunción de las células inmunitarias, activación o inmunosupresión, lo que provoca una mayor replicación de PCV2 en cerdos afectados. Alternativamente, PCV2 puede ocasionar depleción linfoide, lo que resulta en una mayor susceptibilidad a otras infecciones virales o bacterianas (32,33).

1.9 PPV3-PCV2

Se ha detectado coinfección de PPV3 y PCV2 en Eslovaquia. Primero se contabilizó la prevalencia de PPV3 encontrando el virus distribuido por toda la región; sin embargo, el 19% de los animales muestreados dieron positivo a la prueba de PCR. Por su parte PCV2 tuvo una prevalencia de 43.8% y de igual manera distribuido en toda el área con mayor afluencia en ciertos distritos. El porcentaje de coinfección con ambos virus fue del 11,3% y parecía no estar influenciado por la edad, ya que se observaron tasas similares de coinfección en jabalíes jóvenes (11,0%) y adultos (11,8%). (35)

Por otro lado, la participación de las distintas especies de PPVs en los casos de FR-PCV2 aún no ha sido aclarada, más aún, la presencia de estas especies de PPVs en México no ha sido determinada, en particular del PPV3 y su posible asociación con PCV2 (29,35).

2.- JUSTIFICACIÓN

El Circovirus porcino tipo 2 (PCV2) es un agente viral altamente distribuido en México, el cual puede producir 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 productores de carne de cerdo de la república mexicana; 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 *Protoparvovirus de los ungulados 1* (PPV1) es un agente causal de falla reproductiva, caracterizado por producir reabsorción fetal; sin embargo, diversos reportes a nivel mundial han mencionado 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 siete especies de parvovirus (PPV2-7) que infectan al cerdo, los cuales también han demostrado una importante tasa de confección con el PCV2; sin embargo, aún no está claro si alguno de estas especies juegan un papel como factor desencadenante de la PCVAD o incluso como agente causal de falla reproductiva, en particular, se desconoce la presencia del Tetraparvovirus de los ungulados 2 (PPV3) en nuestro país.

3.- OBJETIVOS

- Objetivo general: Estandarizar e implementar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa anidado para la amplificación de la proteína estructural 1 parcial del *Tetraparvovirus* de los ungulados 2 (PPV3) en corazones fetales de cerdos procedentes de rastro para el diagnóstico correcto de la enfermedad en la República Mexicana.
- Objetivos particulares:
    - Obtener el ADN genómico a partir de tejido cardiaco de fetos de rastro con un kit comercial.
    - Diseñar iniciadores específicos para la amplificación de la VP1 parcial del *Tetraparvovirus de los ungulados* 2 (PPV3).
    - Determinar la temperatura óptima de hibridación de los iniciadores para la amplificación del VP1 parcial del *Tetraparvovirus de los ungulados 2* (PPV3) en la PCR anidada.
    - Determinar la concentración óptima de $MgCl_2$ para la amplificación del VP1 parcial del *Tetraparvovirus de los ungulados 2* (PPV3) en la PCR anidada.
    - Determinar la concentración óptima de templado y la concentración mínima de detección para el protocolo de PCR anidada.
    - Implementación de la PCR anidada para la amplificación de la VP1 parcial del *Tetraparvovirus de los ungulados 2* (PPV3) en corazones fetales de cerdos procedentes de rastro.
    - Secuenciar dos amplificaciones positivas de la PCR anidada.

4.- Material y métodos

4.1 Obtención de las muestras

Se obtuvieron úteros con fetos del último tercio de gestación obtenidos principalmente del Estado de México y del estado de Hidalgo, del rastro del municipio de Cuautitlán Izcalli (Abasto Cuautitlán S.A. ubicado en calle Adolfo López Mateos 39, San Lorenzo Río Texcoco, 54713, Cuautitlán Izcalli, México).

El tejido cardiaco se obtuvo haciendo necropsia a los fetos en el laboratorio 6 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, campo cuatro de la Universidad Nacional Autónoma de México., en la cual se realizó el procedimiento metódico sistemático establecido (36), se realizó el desmembramiento de los miembros torácicos y pélvicos con un corte de piel y músculos hasta llegar a la cápsula articular proximal de articulación humero-escapular y coxofemoral, posteriormente se realizaron dos cortes de la piel y músculos desde la sínfisis mandibular siguiendo por la cara medial de las ramas de la mandíbula, dejando en la posición la laringe , tráquea y esófago. Se cortó y se separó el musculo esternotirohioideo de la tráquea iniciando el corte delante de la laringe y tratando de no lesionar la tráquea, se siguió el corte hacia la parte caudal llegando a la entrada del tórax, se continua el corte por la unión costo condral y se continuó la incisión por los músculos abdominales hasta llegar al pubis, se realizó la extracción de diversos tejidos (corazón, pulmón, linfonodos, encéfalo, riñón, hígado). Estos tejidos se colocaron dentro de frascos limpios con formol al 10% para su fijación. Las vísceras de cada feto son colocadas en un frasco diferente y son etiquetadas para una futura selección.

4.2 Extracción de ADN

Una vez que el tejido cardiaco estaba sumergido en formol al 10% en un frasco sellado, se seleccionaron 30 corazones de fetos de diferentes cerdas, localidades y fechas de obtención de las muestras. Para la extracción de material genético se obtuvieron 0.25 mg del tabique interventricular y se siguió las instrucciones del kit comercial Pretreatment for Formalin-Fixed Tissue y el Protocol: Purification of Total DNA from Animal Tissues, Spin-Column Protocol para tejido en formalina utilizando

el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Alemania). Las muestras se lavaron dos veces con PBS para remover el fijador, posteriormente eliminando el PBS. Posteriormente, cada muestra se cortó en pequeños trozos y se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 ml, agregando 180 µl de Buffer ATL y 20µl de Mix proteasa K. Se colocó en un Thermomixer (Eppendorf Hamburg, Germany) incubando a 56ºC, poniéndolo en vortex ocasionalmente para dispersar la muestra, hasta que el tejido estuvo completamente degradado. Una vez degradado el tejido, se colocó en vortex durante 15 segundos y se le agregó 200µl de Buffer AL, se mezcló en vortex, se agregó 200µl de etanol al 99% y mezclando nuevamente en vortex. Acto seguido, cada mezcla se pipeteó (incluyendo cualquier precipitado presente) en una DNeasy Mini Spin Column colocada anteriormente en un tubo colector de 2ml y se centrifugó a 8000 rpm durante un minuto. Una vez centrifugado se eliminó el tubo colector junto con su contenido, se colocó un nuevo tubo colector y se adicionaron 500µl de Buffer AW1 justo en el centro de la membrana sin tocar los bordes. Nuevamente se centrifugo a 8000 rpm durante un minuto, se eliminó el tubo y se usó uno nuevo para adicionar 500µl de Buffer AW2 el cual se centrifugó a 14000 rpm durante tres minutos para secar la membrana. Por último, se eliminó nuevamente el tubo colector y se colocó la membrana en un tubo Eppendorf estéril de dos mililitros y se agregaron 100µl de Buffer AE directamente en la membrana, incubando a temperatura ambiente durante un minuto y después centrifugando a 8000rpm por un minuto para poder diluir la muestra. Este último paso se repitió una segunda vez maximizando la obtención de DNA. Las muestras se almacenaron a -20ºC hasta su uso.

4.3 Diseño de iniciadores

Se utilizaron nueve secuencias del PPV3 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 (37)

Los iniciadores fueron sintetizados de manera comercial (OLIGO 4t, Guanajuato).

4.4 Control positivo

Dado que se desconocía la presencia del PPV3 en nuestro país, la estrategia que se utilizó para la búsqueda de casos positivos fue utilizar dos casos del archivo de muestras del Laboratorio A: Patología Molecular Veterinaria correspondiente a linfonodos proveniente de cerdos afectados por PMWS los cuales presentaron sinología compatible con la enfermedad (adelgazamiento progresivo, linfadenopatías 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; dicha estrategia se basó en la alta tasa de coinfección entre el PCV2 y las distintas especies de PPVs incluyendo al PPV3.

4.5 Control negativo

Para evitar falsos negativos se realizó un PCR para el gen constitutivo HPRT1 a las muestras negativas con las condiciones de precalentamiento (desnaturalización inicial) de dos minutos a una temperatura de 95°C, al termino de esta se realizaron 40 ciclos con una desnaturalización a 95°C por cinco segundos, alineación a 50°C por 10 segundos, elongación a 72°C por 20 segundos. La curva de disociación tuvo las siguientes características; un ciclo a 95°C por cinco segundos, 60°C por 10 segundos y 95 °C por 10 segundos. Utilizándose el sofware MxPro qPCR (Stratagene, Agilent Technologies, USA). Para validar los casos negativos se utilizó como gen constitutivo a la Hipoxantin-guanín fosforibosil transferasa uno (HPRT1) utilizando los iniciadores; sentido 5'-TTGCTGACCTGCTGGATTAC-3' y contrasentido 5´-CTGACCAAGGAAAGCAAAGT-3´, Se realizaron 35 ciclos a temperaturas de 94°, 50° y 72°correspondientes a desnaturalización, alineación y extensión respectivamente. Una muestra negativa validada por este PCR fue utilizada en cada corrida para el PPV3 en la población experimental.

4.6 Estandarización de la prueba

El ADN se utilizó como templado para la PCR anidada. La amplificación se realizó en reacciones de 25 µl 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 cinco minutos y 40 ciclos con una desnaturalización a 94°C por 20 segundos, seguidos de una alineación (determinada por el gradiente de temperatura) por 20 segundos y una elongación a 72°C por 20 segundos; concluyendo con un ciclo de elongación final de 72°C por 10 minutos.

4.6.1 Gradiente de temperatura

Con la elaboración de los iniciadores el laboratorio indica una temperatura óptima para el funcionamiento correcto; sin embargo, se puede obtener una temperatura calculada por medio de fórmulas matemáticas tomando en cuenta las bases nucleotídicas y los enlaces de estas con sus homólogos.

Posteriormente de estas dos temperaturas obtenidas se obtiene una temperatura media, la cual nos va a servir como una temperatura inicial.

Se realizó la curva de temperatura tomando en base la temperatura media calculada, a la cual se le realizó un rango de +/- 4 °C (54°C,56°C,58°C,60°C,62°C) para tener una optimización a la replicación del ADN viral en base a la temperatura

4.6.2 Gradiente de iniciadores

Una vez establecida la mejor temperatura de hibridación (Tm) se realizó un gradiente de concentración (pmol/µl) de los iniciadores, para obtener una optimización del material biológico, tomando como referencia una concentración inicial de 100 pmol, se disminuyó la concentración 0.25 pmol de los cuatro iniciadores (100 pmol, 75 pmol, 50 pmol y 25 pmol).

4.6.3 Gradiente de magnesio

El magnesio siendo un catalizador de la reacción en cadena de la polimerasa, para establecer la concentración idónea de magnesio, se varió la cantidad de este para favorecer la amplificación, usando como base la concentración base

del master mix 1.5 mM, se aumentó la concentración en 0.25 mM (1.5 mM, 1.75 mM, 2.0 mM y 2.25 mM).

4.6.4 Sensibilidad

Se determinó el mínimo de nanogramos de ADN para obtener una banda positiva, para la cual se tomó como base 100 ng, se realizó el gradiente disminuyendo la cantidad de ADN (100 ng, 50 ng, 25 ng, 12.5 ng y 6.25 ng).

4.7 Especificidad

Dos bandas obtenidas del control positivo de los casos de PMWS se purificaron utilizando un kit comercial (EZ-10 Spin Column ADN Gel Extraction Kit, Bioline) siguiendo las instrucciones del fabricante, se describe a continuación:

Se extrajeron los fragmentos de ADN del gel con un bisturí estéril 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 se incubó a 50°C – 60°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 dos minutos, y se centrifugó a 10.000 rpm durante dos 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 anterior, 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 dos minutos y después centrifugando a 10.000 rpm durante dos minutos para diluir el ADN. El ADN purificado se almacenó a -20ºC 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).

4.8 Implementación.

Con el material genético obtenido de las muestras y con los resultados de las distintas curvas de la estandarización se implementó un total de 30 muestras para determinar la frecuencia de PPV3 en la población experimental.

4.9 Análisis de resultados.

Las secuencias obtenidas fueron editadas con los programas Bioedit (38) y posteriormente se buscaron en BLAST (39), para corroborar la especificidad, se construyó un árbol filogenético utilizando las secuencias obtenidas en el presente trabajo, así como, cinco secuencias obtenidas en el genbank (25) de las otras seis especies de parvovirus porcinos, dicho árbol se construyó usando la secuencia de nucleótidos con el programa MEGA (40) usando el algoritmo Máximum Parsimony y la distancia Tammura-Neg gamma, la validación de la filogenia se llevó a cabo a través del método Bootstrap, resultados mayores a 70 (700) fueron considerados significativos.

5.- RESULTADOS.

5.1 Estandarización.

Los iniciadores diseñados se alinearon en un sitio conservado de la ORF2 (VP1) en las distintas secuencias disponibles del Genbank, incluyendo la secuencia de referencia del ICTV para el PPV3 (Figura 6). Por otro lado, se pudieron obtener bandas del tamaño esperado (235 pb) en reacción anidada en casos de PMWS, los cuales fungieron como controles positivos.

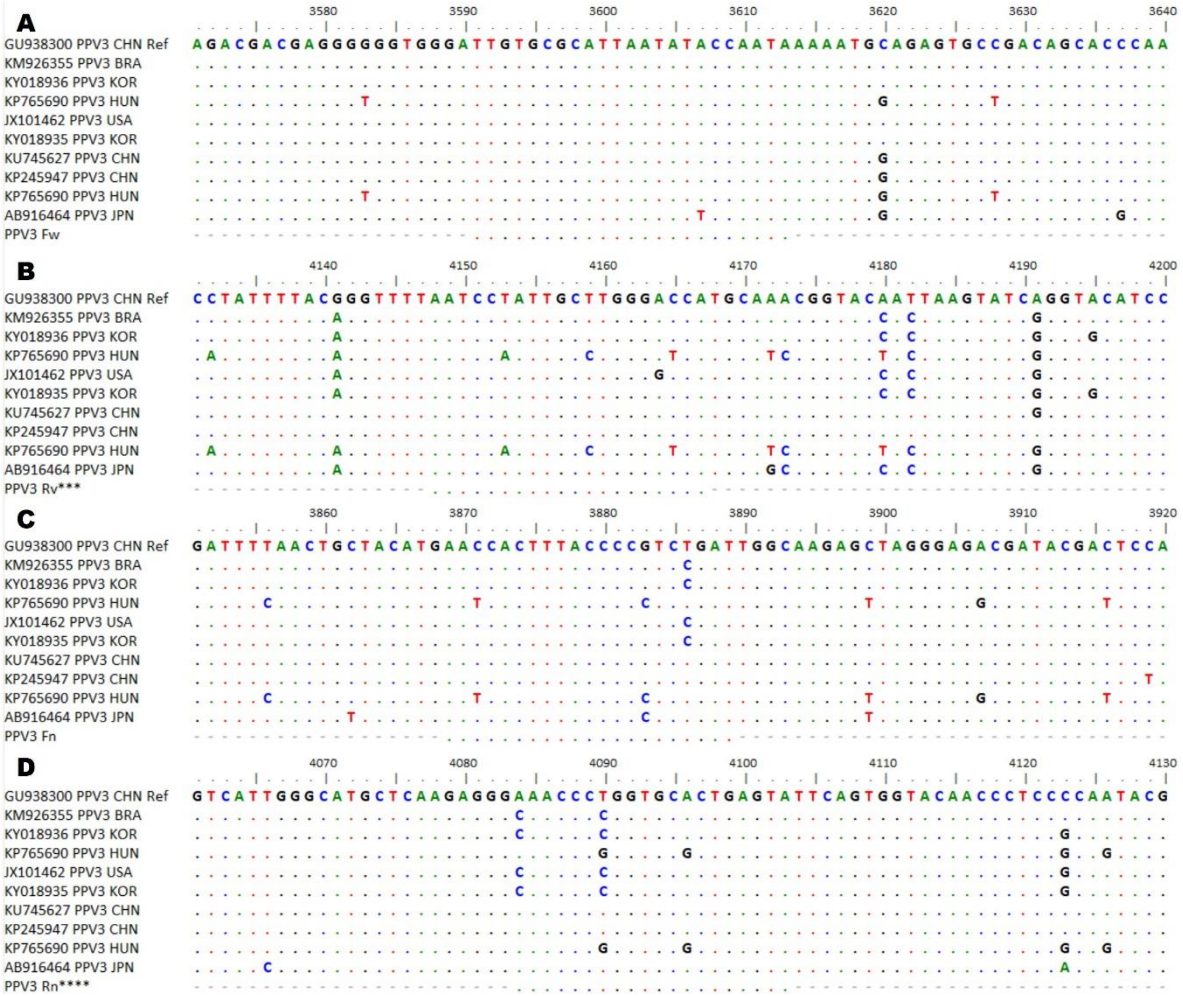


FIGURA 6. Alineación de iniciadores con las secuencias de PPV3: Alineados en el programa bioedit, se observan las áreas conservadas en las alineaciones de los iniciadores a) sentido b) contrasentido c) sentido anidado d) contrasentido anidado

La determinación de la concentración de los iniciadores en la mezcla se determinó en el gel dándonos resultados en todas las concentraciones valoradas; sin embargo, a la concentración de 75 pmol (Figura 7) la banda se visualiza con mayor claridad, por lo cual se usará esta concentración en la mezcla final.

El gradiente de temperatura mostró bandas del tamaño esperado en reacción añadida a los 60° y 58°; sin embargo, a esta última temperatura se pudo observar una banda mejor definida, utilizándose para todas las reacciones tanto de ciclo 1 como para las anidadas (Figura 8).

La concentración de material genético obtenido de la purificación de las muestras de corazones fetales es el templado de nuestra mezcla de ciclo 1, utilizándose a diferentes concentraciones se busca la mínima cantidad de templado para una buena visualización de la banda en el gel agarosa, siendo esta los 50 ng (Figura 9) y del resultado de esta mezcla funge como el templado de la reacción anidada a la misma concentración.

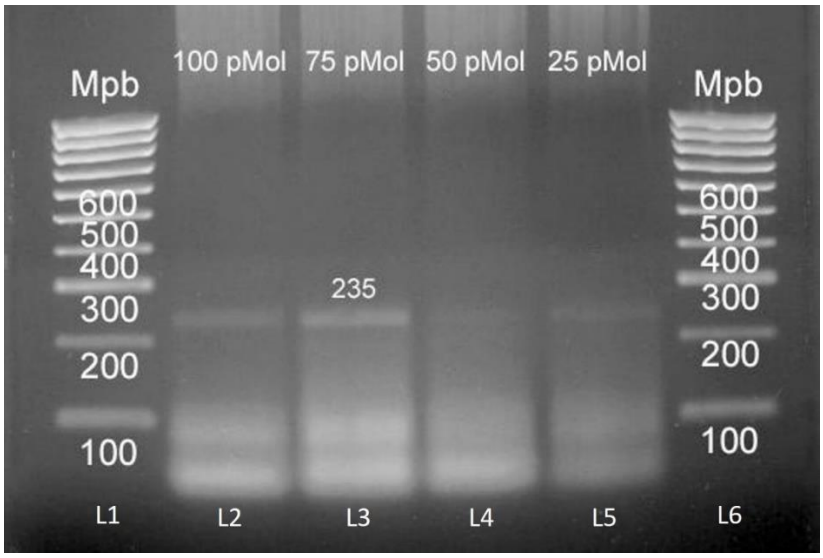


FIGURA 7. Concentración de iniciadores: Marcador de pares de bases (MPM) 100 pb (L1), se muestran productos del tamaño esperado (235 pb) en la concentración de 75 pmol (L3), gel de agarosa al 1.5%.

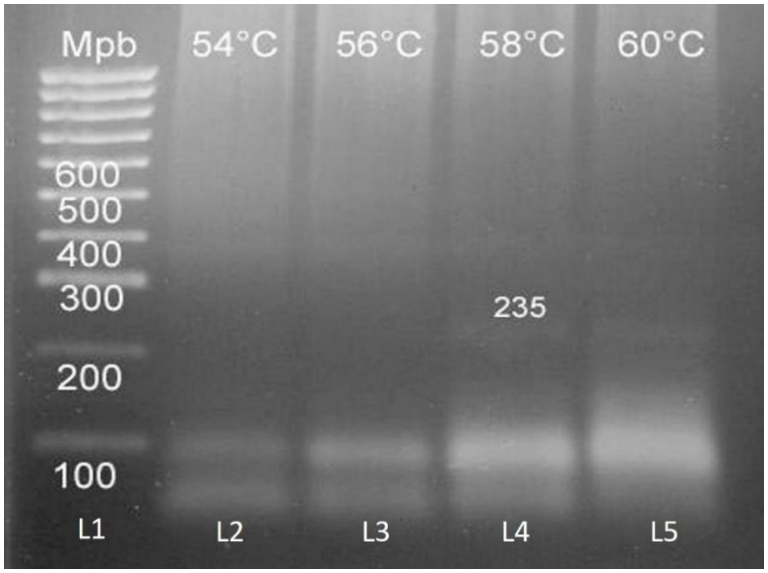


FIGURA 8. Temperatura optima de reacción: Marcador de pares de bases (MPM) 100 pb (L1), se muestran productos del tamaño esperado (235 pb) en las temperaturas de 58°C y 60°C (L4-L5), gel de agarosa al 1.5%.

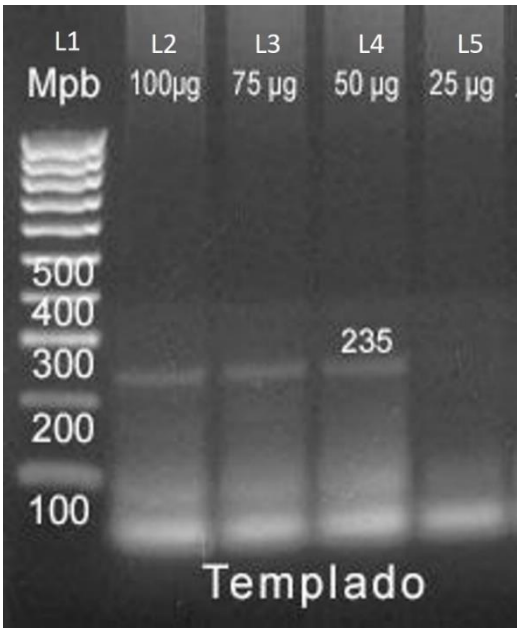


FIGURA 9. Concentración de templado: Marcador de pares de bases (MPB) 100 pb (L1), se muestran productos del tamaño esperado (235 pb) en las concentraciones de 100 ng, 75 ng y 50 ng (L2-L4) mejor definida en la concentración de 50 ng (L4), agarosa 1.5%.

Para conocer la concentración de magnesio se estima cuatro posibles concentraciones del mismo (de 1.5 a 2.25 mM), esperando que en alguna se visualice mejor la banda en el gel de agarosa, siendo esta concentración 2.0 mM (Figura 10).

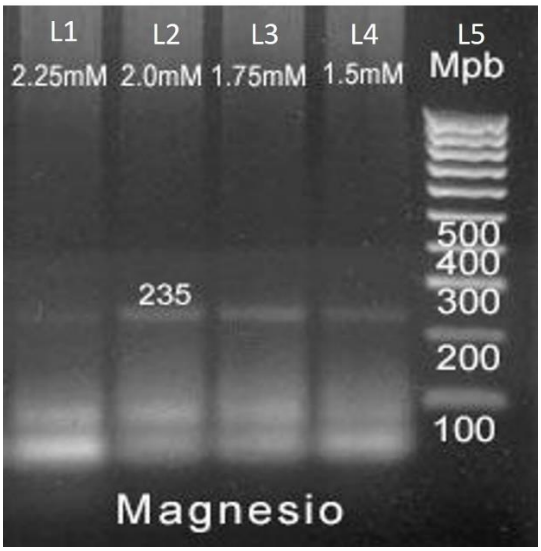


FIGURA 10. Concentración de Magnesio: Marcador de pares de bases (MPM) 100 pb (L5), se muestran productos del tamaño esperado (235 pb) en todos los carriles (L1-L4) el mejor definido corresponde a la concentración de 2.0 mM (L2), gel de agarosa al 1.5%.

5.2 Especificidad.

Las dos secuencias obtenidas al realizar la búsqueda en BLAST arrojo que las secuencias del presente trabajo mostraron una homología del 100-99.51% con secuencias reportadas como PPV3 (Figura 11).

Porcine parvovirus 3 isolate PPV3KUIP22-8, partial genome	Porcine parvovir…	381	381	100%	3e-101	100.00%	2860	OP377036.1
Porcine partetravirus strain FMV10-1437266, complete genome	Porcine partetrav…	381	381	100%	3e-101	100.00%	5403	NC_022104.1
Porcine parvovirus 3 isolate PPV3-JBNU002 capsid protein (VP1) gene, complete cds	Porcine parvovir…	381	381	100%	3e-101	100.00%	2778	MZ491186.1
Porcine hokovirus isolate BC0987BR viral protein 1 (VP1) and viral protein 2 (VP2) genes, partial cds	Porcine hokovirus	381	381	100%	3e-101	100.00%	2696	JQ700067.1
Porcine partetravirus strain FMV10-1437266, complete genome	Porcine partetrav…	381	381	100%	3e-101	100.00%	5403	KC992732.1
Porcine hokovirus isolate BW22 NS1 gene, complete cds; and VP1 and VP2 genes, partial cds	Porcine hokovirus	381	381	100%	3e-101	100.00%	4783	GQ869543.1
Porcine parvovirus 3 isolate PPV3KUIP22-2, partial genome	Porcine parvovir…	375	375	100%	1e-99	99.51%	4916	OP377042.1
Porcine parvovirus 3 isolate PPV3KUIP22-7, partial genome	Porcine parvovir…	375	375	100%	1e-99	99.51%	3141	OP377037.1
Porcine hokovirus isolate LN1725BR viral protein 1 (VP1) and viral protein 2 (VP2) genes, partial cds	Porcine hokovirus	375	375	100%	1e-99	99.51%	2696	JQ700071.1
Porcine parvovirus 3 isolate PPV3-IA40895/1998 VP1 and VP2 genes, complete cds	Porcine parvovir…	375	375	100%	1e-99	99.51%	3124	KF561854.1
Porcine parvovirus 3 isolate PPV3-IA38835/1998 VP1 and VP2 genes, complete cds	Porcine parvovir…	375	375	100%	1e-99	99.51%	3177	KF561853.1
Porcine partetravirus strain US-HK133 NS1, VP1, and VP2 genes, complete cds	Porcine partetrav…	375	375	100%	1e-99	99.51%	4982	JQ425259.1
Porcine partetravirus strain US-HK238 NS1, VP1, and VP2 genes, complete cds	Porcine partetrav…	375	375	100%	1e-99	99.51%	4982	JQ425257.1
Porcine hokovirus strain EU-ROPHoV-WB2010-681 nonstructural protein 1 (NS1), VP1, and VP2 genes, compl…	Porcine hokovirus	375	375	100%	1e-99	99.51%	5036	JF738362.1

FIGURA 11. Homología del producto secuenciado: Comparación genómica de la secuencia obtenida de la muestra utilizada como control positivo en el programa de Blast (56) para encontrar la relación hacia una secuencia especifica en la base de datos del genbank (25)

Las secuencias obtenidas en el presente trabajo fueron depositadas en el genbank y fueron identificadas con los números de acceso MH717887 y MH717888. Por otro lado, el árbol filogenético mostró 6 ramas bien definidas para cada especie de Parvovirus, las secuencias del presente trabajo se alinearon con todas las secuencias identificadas como PPV3 con un valor de boostrap del 100 (Figura 12).

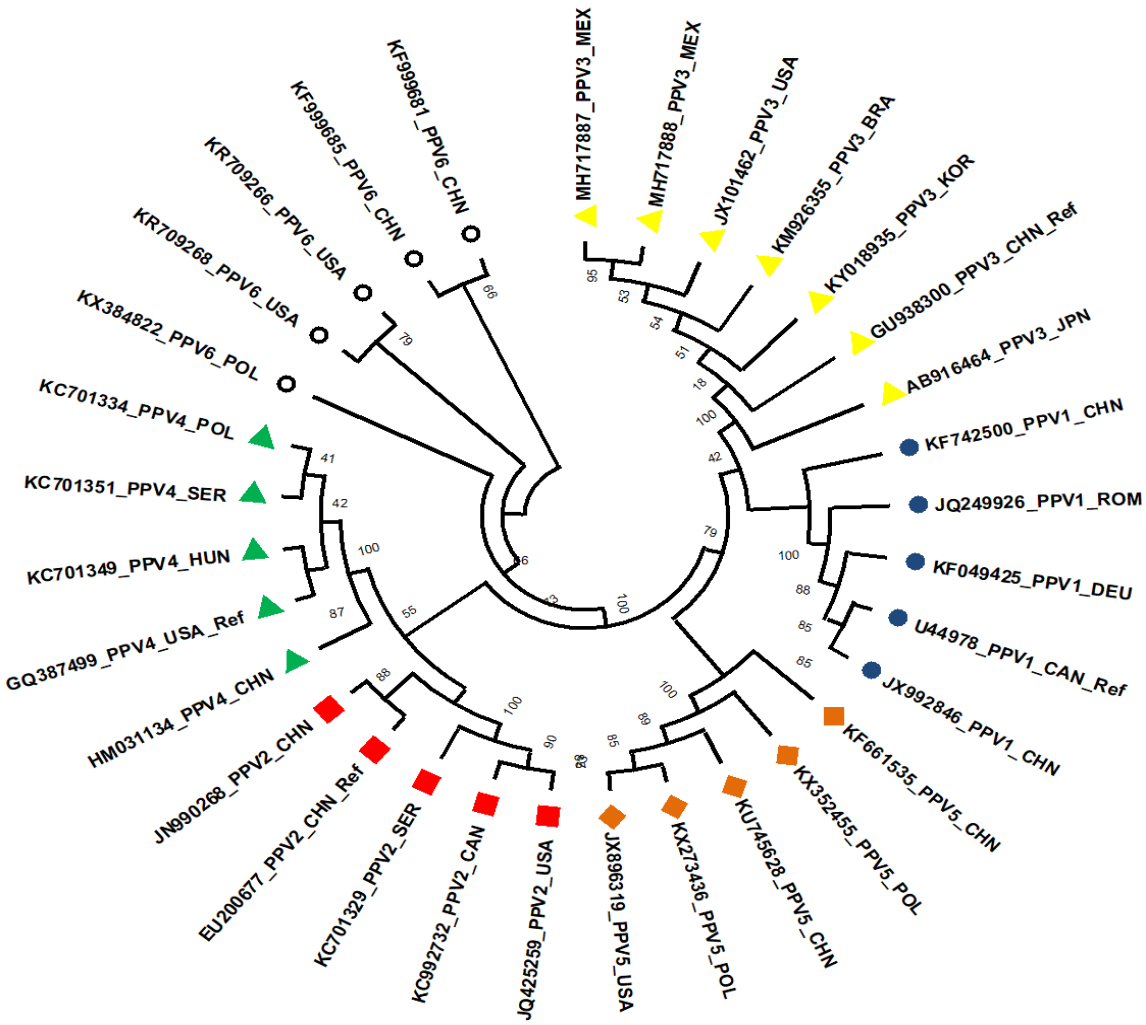


FIGURA 12. Árbol filogenético del *Tetraparvovirus de los ungulados 2* (PPV3). Se muestran números de acceso de secuencias de nucleótidos de distintas especies de PPVs. Se definen 6 líneas correspondientes a cada especie de PPVs. Las secuencias mexicanas (●MH717887 y MH717888) pertenecen a dos casos positivos del PPV3 descritos en este trabajo.

5.3 Implementación.

Con las condiciones de amplificación estandarizadas del total de muestras (30) se obtuvo un 33% de casos positivos (10/30) (Figura 13).

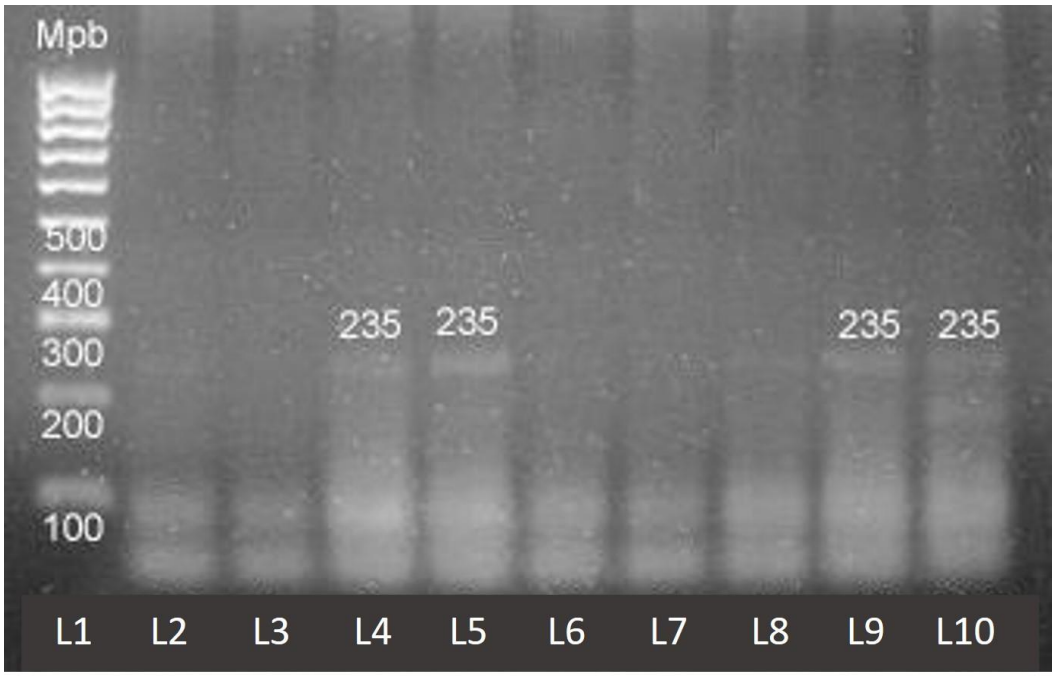


FIGURA 13. Casos positivos al PPV3: Marcador de pares de bases (MPM) 100 pb (L1), se muestran productos del tamaño esperado (235 pb) en los carriles L2, L4, L5, L9 y L10, gel de agarosa al 1.5%.

Las muestras negativas mostraron bandas positivas del peso esperado (224 pb) para el gen constitutivo HPRT1 (Figura 14).

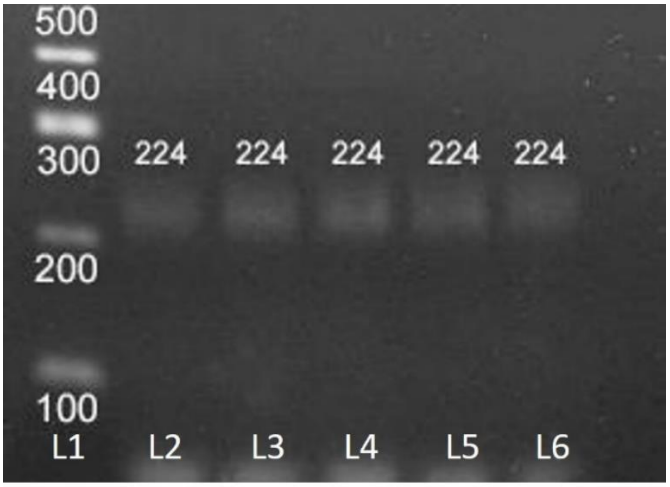


FIGURA 14. Amplificación del Gen HPRT1: Marcador de pares de bases (MPM) 100 pb (L5), se muestran productos del tamaño esperado (235 pb) en los carriles L2-L6, gel de agarosa al 1.5%.

6.- DISCUSIÓN.

Para la obtención de una muestra de ADN a partir de un tejido celular, esta puede ser fresca o conservada, el tejido celular fresco debe de ser analizado de forma rápida para que la sensibilidad no disminuya; sin embargo, para los tejidos conservados, utilizando el método de fijación en formalina o en parafina, pueden ser analizados después de meses inclusive años como se realizó en el presente estudio. En las muestras frescas pueden ser utilizados algunas pruebas diagnósticas como cultivo celular, hemoaglutinación que dan una especificidad alta. Para las muestras fijadas se pueden realizar pruebas como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en sus diferentes variantes, hibridación *in situ* o inmunohistoquímica, estas dos últimas con mayor especificidad y menor sensibilidad que la técnica de (PCR) aunque estas técnicas son más laboriosas y costosas (41,42,43).

El PPV tiene una afinidad por células con gran actividad metabólica como las células renales, hepáticas, esplénicas, sangre y en las estructuras fetales pueden encontrarse en el tonsilas, corazón, riñón e hígado; sin embargo, en los mortinatos se puede obtener de corazón, riñón y cordón umbilical ya que el virus tiene la capacidad de traspasar la barrera placentaria y afectar tanto a las estructuras placentarias como al tejido fetal (44,45,46).

Para la extracción del material genético fetal se obtienen muestras de los diferentes órganos de los fetos calculando 1cc para su procesamiento. La obtención de las muestras se realizó del tabique interventricular de los fetos, en otros estudios, con similar metodología e inclusive con diferentes pruebas diagnósticas, se han utilizado diferentes órganos como riñón, pulmón o hígado (47,48), obteniendo resultados similares.

Una vez seleccionada la muestra, el tipo de almacenamiento y fijación es indispensable seleccionar la prueba de laboratorio más confiable. La prueba de PCR tiene una alta sensibilidad y especificidad dependiendo de las partículas de virus e

interacciones antígeno-anticuerpos, siendo esta la prueba de primera elección para el diagnóstico de parvovirosis porcina. Además, la prueba de PCR puede dar resultados positivos incluso en muestras que contienen partículas virales. Las pruebas inmunomediadas como ELISA o hemoaglutinación dan una tasa más baja de sensibilidad o inclusive pueden dar falsos negativos (41).

La distribución de los parvovirus porcinos es en todo el mundo afectando a cerdos en producción tanto a cerdos ferales, siendo el PPV3 localizado en países de importancia comercial como China, Alemania, Canadá, USA, Alemania, Reino Unido y Camerún con una prevalencia que oscila entre 12% - 47%. En este estudio se obtuvo una prevalencia del 30% que entra en el rango de prevalencia global; sin embargo, la prevalencia ha ido aumentando al paso del tiempo en animales ferales y domésticos así también la detección en fetos y ya no solamente en adultos enfermos (46,49,50).

Teniendo en cuenta que el parvovirus porcino se puede encontrar en toda la población porcina de producción y silvestre en bajas concentraciones, la técnica de PCR es la prueba líder para el diagnóstico por todo lo anteriormente mencionado, las variantes de la prueba nos pueden ayudar con el porcentaje de eficacia en el resultado, si bien la PCR es de alto valor diagnóstico, la PCR anidada y PCR tiempo real nos pueden otorgar mayor cantidad de sensibilidad (51,52).

En el presente trabajo se utilizó PCR anidada para aumentar la sensibilidad que tendríamos si se utiliza una convencional, así mismo, se reduce la probabilidad de error en el manejo de los insumos como se tendría en la PCR de tiempo real dando un resultado más certero aun teniendo en cuenta los controles negativos y positivos que se requieren para la prueba, para evitar el error de contaminación del material genético (51,52).

También la PCR semianidada es una prueba utilizada por otros investigadores, sumándose a diferentes pruebas, de los cuales se ha obtenidos

similar prevalencia, dándonos un resultado similar, aunque independientemente de la prueba diagnóstica a realizar el resultado varia en +/- 10 % de prevalencia (52,53).

Los marcos de lectura, son muy importante para el PCR ya que se tiene que seleccionar los fragmentos, de la secuencia genética previamente estudiada y estandarizada, que van a dar el inicio y fin para realizar la multiplicación exponencial en la incubación de nuestro material genético. En el presente estudio se utilizó el marco de lectura de la VP1 perfectamente conocida y establecida desde los bancos genéticos mundiales, obteniendo resultados favorables para el diagnóstico del PPV3, otros autores utilizan el marco de lectura del VP2, de igual manera perfectamente conocido, demostrando que cualquiera de los dos marcos de lectura es de valor diagnóstico en la prueba de PCR (47,48,49).

Otros estudios han determinado la prevalencia del mismo virus, pero con otro marco de lectura (VP2) y en diferentes tipos de células (células de riñón, bazo, tonsilas) obteniéndose un resultado similar (19%) en la prevalencia viral (44).

La prevalencia de parvovirus porcino en purificaciones de tejido cardiaco fetal y realizando la prueba de PCR es de 30 %; sin embargo, se ha demostrado que dependiendo del área geográfica puede variar la prevalencia de la enfermedad aunado al cambio de protocolo de purificación. De acuerdo al estudio la prevalencia de una purificación extraída de células de riñón a partir de fetos y haciendo una prueba de PCR obtuvieron 35.4 % realizando una similar metodología (49).

La obtención de resultados similares se puede deber a la relación comercial que nuestro país tiene con los países mencionados en algunos trabajos similares, aunado a que uno de los mayores productores de carne de cerdo es EUA y que se encuentra estrechamente relacionado con nuestro país, esto puede ayudar a la trasmisión, ya sea por la población de cerdos ferales o bien por vectores que no se pueden controlar además que el genoma está sujeto a la diversificación, lo que nos da como consecuencia la variabilidad de la secuencia asociada con el origen

geográfico, como se ha observado en aislamientos de animales de Europa del este, partes del norte de África y los países de Norteamérica (20,27).

El sinergismo viral entre el circovirus porcino tipo 2 y parvovirus porcino tienen una gran relevancia en el síndrome multisistémico de emaciación post-destete; sin embargo, se ha demostrado que no tienen una gran diferencia con respecto a la relación entre edades juveniles y cerdos en edad adulta siendo esta tan solo de 0.8 porcentual, este sinergismo a tenido una alta prevalencia en las pruebas polivalentes siendo diagnosticadas en varias regiones del mundo. La combinación viral de parvovirus porcino 3 y circovirus porcino 2 está menos estudiada; sin embargo, se han registrado en países como Croacia, Hong Kong, EUA y en este artículo mexicano teniendo una prevalencia de este sinergismo de entre el 13 % al 25% (20,27).

7.- CONCLUSIÓNES.

El tropismo viral por las células de gran actividad metabólica sitúa a las células cardiacas como unas de las más afectadas pudiendo obtener de éstas una buena calidad de genoma viral.

Para la prueba de PCR anidada es indispensable realizar detalladamente cada uno de sus pasos como la obtención de material genético, determinar; la temperatura óptima, la concentración ideal de magnesio, iniciadores y templado para realizar una mezcla ideal y así constatar que la prueba será inequívoca y certera.

Teniendo en cuenta todos los parámetros y realizándola adecuadamente esta prueba nos es útil para diagnosticar la parvovirosis porcina.

Con la detección por PCR del virus en este estudio y las muestras siendo colectadas de los rastros circundantes al municipio de Cuautitlán se confirma la presencia en México del *Tetraparvovirus de los Ungulados 2* en corazones de fetos provenientes de cerdas aparentemente sanas.

El tejido de colección fue el tabique interventricular cardiaco fetal a lo cual nos demuestra que el virus tiene la facilidad de traspasar la barrera placentaria ocasionando lesiones y afectando tanto a la madre como a los fetos.

Así mismo este estudio deja la puerta abierta para que posteriormente se profundice en la investigación de la enfermedad, la sinergia con otras enfermedades y la programación de la medicina preventiva para tratar de evitar pérdidas importantes en la zootecnia porcina

8.- BIBLIOGRAFIA.

1. www.oie.int
2. www.gob.mx
3. Bobadilla Soto, E. E., Espinoza Ortega, A., & Martínez Castañeda, F. E. (2010). Dinámica de la producción porcina en México de 1980 a 2008. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, *1*(3), 251-268.
4. Pejsak, Z. (2004). Virus que provocan transtornos reproductivos en ganado porcino. *Avances en tecnología porcina*, *1*(2), 18-32
5. P. J. Quinn., Et al., (2011). Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. Acribia S.A., Zaragoza.
6. Maldonado, J., Segalés, J., Martınez-Puig, D., Calsamiglia, M., Riera, P., Domingo, M., & Artigas, C. (2005). Identification of viral pathogens in aborted fetuses and stillborn piglets from cases of swine reproductive failure in Spain. *The Veterinary Journal*, *169*(3), 454-456
7. Colin, W.,(1993). Ciencia y práctica de la producción porcina. Longman Group UK Limited, London.,
8. www.cfsph.iastate.edu
9. Chung, D. C. (2005). Streptococcus suis infection
10. Alarcón, Pedro. (2012). Streptococcus suis. *Revista chilena de infectología*, *29*(5), 541-542.
11. SáNCHEZ, D. M. L., & ABALOS, D. P. (2016). 2.4. ERISIPELA PORCINA. *Enfermedades animales producidas por agentes biológicos*, 49.
12. Mur Gil, L. (2015). *Nuevas estrategias para la prevención y control de la peste porcina africana* (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).
13. https://talk.ictvonline.org/
14. Carocci, M., & Bakkali-Kassimi, L. (2012). The encephalomyocarditis virus. *Virulence*, *3*(4), 351-367.

15. Clark, D. A., Fryer, J. F., Tucker, A. W., McArdle, P. D., Hughes, A. E., Emery, V. C., & Griffiths, P. D. (2003). Porcine cytomegalovirus in pigs being bred for xenograft organs: progress towards control. *Xenotransplantation*, *10*(2), 142-148.
16. Stephano, A. (2002). 3.1 Blue Eye Disease: Clinical Signs and Lesions. *Trends in Emerging Viral Infections of Swine*, 47.
17. Gómez Suárez, A. E., & Murcia Ariza, N. A. (2017). Correlación clínico-patológica de lesiones macro y microscópicas diagnosticadas en tracto reproductivo en cerdas de descarte.
18. López-Heydeck, S. M., Alonso-Morales, R. A., Mendieta-Zerón, H., & Vázquez-Chagoyán, J. C. (2015). Síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PRRS): Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, *6*(1), 69-89.
19. Parodi, V. R. E. B. (2015). *Nanotecnología: Diagnóstico para la brucelosis porcina* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de San Martín).
20. Noriega, J., Reyes, P., & Bucarey, S. (2007). Circovirus porcino: un virus pequeño que genera un gran problema. *Avances en ciencias veterinarias*, *22*(1-2).
21. Cadar, D., Lőrincz, M., Kiss, T., Novosel, D., Podgorska, K., Becskei, Z., ... & Cságola, A. (2013). Emerging novel porcine parvoviruses in Europe: origin, evolution, phylodynamics and phylogeography. *Journal of General Virology*, *94*(10), 2330-2337.
22. Streck, A. F., de Barros Moyses, A., Tadeu, J. M., & Lopes, T. S. (2019). Parvovirosis porcina: una actualización. Suis, (160), 18-22.
23. Crotore, 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.
24. Moredo, F., Larsen, A. E., & Stanchi, N. O. (2018). Patogenicidad microbiana en Medicina Veterinaria.
25. National Center for Biotechnology Information (NCBI)[Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – [cited 2020 Apr 08].
26. Simpson, A. A., Hébert, B., Sullivan, G. M., Parrish, C. R., Zádori, Z., Tijssen, P., & Rossmann, M. G. (2002). The structure of porcine parvovirus: comparison with related viruses. *Journal of molecular biology*, *315*(5), 1189-1198
27. Aguilar Faz, M. E. (2014). Análisis de la sensibilidad de métodos diagnósticos comúnmente utilizados en hospitales veterinarios para el diagnóstico de parvovirus canino (Master's thesis, Universidad Autónoma del Estado de México.).

28. Zhong, H., Li, X., Zhao, Z., An, C., Wan, P., Wu, M., ... & Qian, P. (2016). Genome sequences of the novel porcine parvovirus 3, identified in Guangxi province, China. *Genome Announc.*, *4*(2), e00036-16.
29. Opriessnig, T., Xiao, C. T., Gerber, P. F., & Halbur, P. G. (2014). Identification of recently described porcine parvoviruses in archived North American samples from 1996 and association with porcine circovirus associated disease. *Veterinary microbiology*, *173*(1-2), 9-16.
30. Sun, J., Huang, L., Wei, Y., Wang, Y., Chen, D., Du, W., ... & Liu, C. (2015). Prevalence of emerging porcine parvoviruses and their co-infections with porcine circovirus type 2 in China. *Archives of virology*, *160*(5), 1339-1344.
31. 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.
32. 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.
33. Woods, A. L., McDowell, E. J., Holtkamp, D., Pogranichniy, R. M., & Gillespie, T. G. (2009). Reproductive failure associated with porcine parvovirus and possible porcine circovirus type 2 co-infection. Journal of Swine Health and Production, 17(4), 210-216.
34. Pescador, C. A., Bandarra, P. M., Castro, L. A., Antoniassi, N. A., Ravazzolo, A. P., Sonne, L., ... & Driemeier, D. (2007). Co-infection by porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in aborted fetuses and stillborn piglets in southern Brazil. Pesquisa Veterinária Brasileira, 27(10), 425-429.
35. Sliz, I., Vlasakova, M., Jackova, A., & Vilcek, S. (2015). Characterization of porcine parvovirus type 3 and porcine circovirus type 2 in wild boars (Sus Bscrofa) in Slovakia. *Journal of wildlife diseases*, *51*(3), 703-711.
36. Manual de necropsias ***
37. Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Rozen M, Rozen SG. Primer3 - new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Res. 2012;40(15):e115.
38. Hall T. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp Ser (Oxf). 1999.
39. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

40. Tamura K, Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. (2013) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0. Mol Biol Evol 30: 2725-2729
41. Kumar, M., Nandi, S., & Chidri, S. (2010). Development of a polyclonal antibody-based AC-ELISA and its comparison with PCR for diagnosis of canine parvovirus infection. *virologica sinica*, *25*(5), 352-360.
42. Kim, J., & Chae, C. (2004). A comparison of virus isolation, polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and in situ hybridization for the detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in experimentally and naturally coinfected pigs. *Journal of Veterinary diagnostic investigation*, *16*(1), 45-50.
43. Wilhelm, S., Zimmermann, P., Selbitz, H. J., & Truyen, U. (2006). Real-time PCR protocol for the detection of porcine parvovirus in field samples. *Journal of virological methods*, *134*(1-2), 257-260.
44. Sliz, I., Vlasakova, M., Jackova, A., & Vilcek, S. (2015). Characterization of porcine parvovirus type 3 and porcine circovirus type 2 in wild boars (Sus scrofa) in Slovakia. *Journal of wildlife diseases*, *51*(3), 703-711.
45. Xiao, C. T., Giménez-Lirola, L. G., Halbur, P. G., & Opriessnig, T. (2012). Increasing porcine PARV4 prevalence with pig age in the US pig population. *Veterinary microbiology*, *160*(3-4), 290-296.
46. Bellehumeur, C., Boyle, B., Mandeville, I., & Gagnon, C. A. (2013). High-throughput sequencing revealed the presence of an unforeseen parvovirus species in Canadian swine: the porcine partetravirus. *The Canadian Veterinary Journal*, *54*(8), 787.
47. Rico, S., Molina, S., & Pabón, F. (2003). Detección y aislamiento del Parvovirus porcino en Medellín, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, *16*(1), 40-45.
48. Aspitia, C. G., Cappuccio, J. A., Dibarbora, M., Metz, G. E., Echeverría, M. G., & Serena, M. S. (2017). Aislamiento y caracterización molecular de parvovirus porcino en Argentina. In *XII Congreso Argentino de Virología, V Simposio de Virología Clínica y III Simposio de Virología Veterinaria (Buenos Aires, 26 al 28 de septiembre de 2017)*.
49. Díaz de Arce, H. D., Pérez, L. J., Castell, S., Percedo, M. I., Domínguez, P., & Frías, M. T. (2014). Porcine parvovirus infections in Cuba. *Revista de salud animal*, *31*(3), 176.
50. Adlhoch, C., Kaiser, M., Ellerbrok, H., & Pauli, G. (2010). High prevalence of porcine Hokovirus in German wild boar populations. *Virology journal*, *7*(1), 1-4.
51. Wolf, V. H. G., Menossi, M., Mourão, G. B., & Gatti, M. S. V. (2008). Molecular basis for porcine parvovirus detection in dead fetuses. *Genetics and molecular research: GMR*.

52. Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, *2*(2), 70-78.
53. Asuar, L. E. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. *Ecología molecular. Instituto Nacional de Ecología, 574p*.