



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**Estandarización e implementación de una técnica de PCR  
anidado para la amplificación de las regiones genéticas  
ORF1 y ORF2 del Torque teno sus virus 1a (TTSuV1a) y 1b  
(TTSuV1b) en tejidos porcinos afectados por el Síndrome de  
Emaciación Multisistémico post-destete (PMWS).**

Tesis profesional

Que para obtener el título de:  
Médica veterinaria y zootecnista.

Presenta:  
Diana Michele Araiza Hernández.

Asesora: Dra. Lucía Angélica García Camacho.

Co-asesor: M. en C. Alejandro Vargas Ruíz.

Cuautitlán izcalli, Estado de México 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes  
Profesionales 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 **La Tesis:**

**Estandarización e implementación de una técnica de PCR anidado para la amplificación de las regiones genéticas ORF1 y ORF2 del Torque teno sus virus 1a (TTSuV1a) y 1b (TTSuV1b) en tejidos porcinos afectados por el Síndrome de Emaciación Multisistémico post- destete (PMWS).**

Que presenta la pasante: **DIANA MICHELE ARAIZA HERNÁNDEZ**

Con número de cuenta: **41102435-0** 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 HABLARA EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 03 de octubre de 2016.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Misael Rubén Oliver González	
<b>VOCAL</b>	Dra. Lucía Angélica García Camacho	
<b>SECRETARIO</b>	M. en C. Juan Sebastián Barrientos Padilla	
<b>1er SUPLENTE</b>	Dr. Hugo Ramírez Álvarez	
<b>2do SUPLENTE</b>	M.V.Z. Jesús Arturo Sandoval Romero	

NOTA: Los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento.  
(Art 127 REP)

IHM/ntm\*

## **Agradecimientos.**

A la Dra. Lucía García Camacho, mi asesora, por aceptarme como su alumna, por el tiempo dedicado a este trabajo y por las enseñanzas que deja en mí.

Al Mtro. Alejandro Vargas Ruiz por ayudarme sobre todo en las cuestiones prácticas de este trabajo, por la paciencia y por las largas horas de trabajo.

A cada uno de los jurados por tomarse el tiempo para enriquecer este trabajo.

A la FESC- UNAM por brindarme las herramientas necesarias para mi vida profesional.

A MVZ. Blanca Moreno Cardenti por el apoyo recibido durante mi servicio social así como el apoyo para que comenzara este trabajo.

A Lic. Mauro Hernández Espino porque siempre ha sido referencia académica en mi vida y por su apoyo siempre.

A pMVZ. Saúl Escobedo Aguirre por darme ánimos en cada momento de este difícil proceso, por la paciencia, por creer en mí y por ser más que mi colega, mi compañero de vida.

A Rigoberto Araiza por el apoyo económico y emocional que recibí durante toda mi vida escolar. A Ramón Araiza por llenar de alegría mi vida.

## **Dedicatoria.**

A Martha Hernández, mi madre.

Gracias por todo tú amor, por ser mi mejor amiga y porque siempre creíste que lo lograría, te amo.

## RESUMEN

El Torque teno virus (TTV) fue identificado por primera vez en 1997 en muestras de sueros humanos con hepatitis post transfusión de etiología desconocida. Es un agente viral de 30-32 nm, icosaédrico, no envuelto con genoma de ADN circular de cadena sencilla y sentido negativo que contiene 2 a 3.9 kilobases. El Torque teno sus virus (TTSuV) pertenece a la familia *Anelloviridae*, género *lotatorquevirus* presentando dos especies: Torque teno sus virus 1a (TTVSuV1a) y Torque teno sus virus 1b (TTVSuV1b).). El tamaño del TTSuV1a es de 2.8-2.9 Kb (2863-2913 nt) y del TTSuV1b es de 2.7-2.8 Kb (2735-2803 nt). Con respecto a la PCVAD, la presentación clínica más documentada es el PMWS, se describe al circovirus porcino tipo 2 (PCV2) como el agente causal del PMWS. Con la finalidad de estandarizar una técnica de PCR anidado para la amplificación de secuencias parciales de TTSuV1a y del TTSuV1b, se utilizaron tejidos porcinos afectados por el síndrome de emaciación multisistémico post-destete (PMWS) positivos a TTVSuV1a y/o TTVSuV1b. Con base a las condiciones estandarizadas, se amplificaron todas las secuencias de ambas especies de *lotatorquevirus* a partir de las muestras empleadas. El análisis filogenético demostró que las secuencias amplificadas son específicas de *lotatorquevirus*. Los protocolos de PCR validados en el presente trabajo contribuirán al estudio de ambas especies de Torque teno sus virus ya que las regiones amplificadas presentan alta variabilidad genómica, particularmente en el ORF2. Así mismo, proporcionarán datos acerca de la dinámica poblacional de estos virus misma que pueden reflejar el efecto de la comercialización global de cerdos.

## ÍNDICE

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Índice de tablas y figuras</b>	<b>3</b>
<b>Tabla de abreviaturas</b>	<b>4</b>
<b>Introducción</b>	
<b>I. Antecedentes</b>	<b>5</b>
<b>II. Generalidades del Torque teno sus virus</b>	<b>5</b>
<b>III. Transmisión y patogenia</b>	<b>6</b>
<b>IV. Distribución y prevalencia</b>	<b>7</b>
<b>V. Co-infección con el circovirus porcino tipo 2 (PCV2)</b>	<b>7</b>
<b>VI. Relación del Torque teno sus virus con la enfermedad asociada a PCV2</b>	<b>8</b>
<b>Justificación</b>	<b>9</b>
<b>Objetivos</b>	
<b>I. Generales</b>	<b>10</b>
<b>II. Particulares</b>	<b>10</b>
<b>Materiales y métodos</b>	
<b>I. Selección de casos</b>	<b>11</b>
<b>II. Diseño de iniciadores</b>	<b>12</b>
<b>III. Extracción de ADN</b>	<b>14</b>
<b>IV. PCR anidada</b>	<b>15</b>
<b>V. Visualización de productos amplificados</b>	<b>15</b>
<b>VI. Recuperación de productos amplificados</b>	<b>17</b>
<b>VII. Secuenciación</b>	<b>17</b>
<b>VIII. Análisis de datos</b>	<b>17</b>
<b>Resultados</b>	<b>18</b>
<b>Discusión</b>	<b>24</b>
<b>Conclusión</b>	<b>27</b>
<b>Referencias</b>	<b>28</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

• Figura 1. Iniciador sentido positivo de TTSuV1a.	12
• Figura 2. Iniciador anidado sentido positivo de TTSuV1a.	12
• Figura 3. Iniciador sentido positivo de TTSuV1b.	13
• Figura 4. Iniciador anti sentido de TTSuV1b.	13
• Figura 5. Iniciador anidado sentido positivo de TTSuV1b.	13
• Figura 6. Iniciador anidado anti sentido de TTSuV1b.	13
• Figura 7. Amplificación obtenida por PCR de TTSuV1a y de TTSuV1b.	19
• Figura 8. Gradiente de temperatura de TTSuV1a.	19
• Figura 9. Gradiente de temperatura de TTSuV1b.	20
• Figura 10. Gradiente de concentración de MgCl <sub>2</sub> para TTSuV1a.	20
• Figura 11. Gradiente de concentración de MgCl <sub>2</sub> para TTSuV1b.	21
• Figura 12. Gradiente de concentración de templado de TTSuV1a.	21
• Figura 13. Árbol filogenético de TTSuV1a.	22
• Figura 14. Árbol filogenético de TTSuV1b.	23

## ÍNDICE DE TABLAS

✓ Tabla 1. Muestras seleccionadas de TTSuV1a y TTSuV1b.	11
✓ Tabla 2. Iniciadores diseñados y utilizados.	16



## ABREVIATURAS

μl- Microlitros.

aa- Aminoácidos.

ADN- Ácido desoxirribonucleico.

AL- Buffer de lisis

ATE- Buffer de elución

ATL- Buffer de lisis tisular

AW1/2- Buffer de lavado

dNTP's- Nucleótidos fosfatados.

Fw- Iniciador sentido.

HPRT- Hipoxantín-guanín  
fosforibosiltransferasa

ICTV- Comité internacional de taxonomía  
viral.

Kb- kilo bases.

MgCl<sub>2</sub>- Cloruro de magnesio.

min- Minutos.

ml- Mililitros.

mM- Milimoles.

ng- Nanogramos.

nm- Nanómetros.

NS- Proteína no estructural

nt- Nucleótidos.

ORF- Marco de lectura abierta.

PCR- Reacción en cadena de la  
polimerasa.

PCV2- Circovirus porcino tipo 2.

PCVAD- Enfermedad asociada a circovirus  
porcino.

PDNS- Síndrome de dermatitis y  
nefropatía porcina.

PMWS- Síndrome multisistémico de  
emaciación post-destete.

PRRS- Síndrome respiratorio y  
reproductivo porcino.

rpm- Revoluciones por minuto.

Rv- Iniciador anti-sentido.

TTSuV- Torque teno sus virus.

TTV- Torque teno virus.

UTR- Región no traducible.



## INTRODUCCIÓN

### I. Antecedentes.

El Torque teno virus (TTV) fue identificado por primera vez en 1997 en Japón, en muestras de sueros humanos con hepatitis post transfusión de etiología desconocida (Nishizawa *et al.*, 1997; Okamoto *et al.*, 1998). Su nombre proviene de los términos latinos “*torque*” que significa collar y “*tenius*” que significa delgado (Kekarainen *et al.*, 2009). La infección por este virus es prevalente en los seres humanos y primates no humanos así como en una gran variedad de especies animales tales como cerdos, jabalíes, vacas, pollos, perros, gatos y leones marinos (Brassard *et al.*, 2008; Catroxo *et al.*, 2008; Kekarainen *et al.*, 2007; Leary *et al.*, 1999). En los humanos, se ha determinado que la infección por TTV es común en individuos asintomáticos pero la viremia presenta mayor incidencia en pacientes con una variedad de enfermedades tales como hepatitis viral, VIH, asma y en condiciones de afección respiratoria relacionadas con la infancia (Krakowka *et al.*, 2008).

### II. Generalidades del virus.

El TTV es un agente viral de 30-32 nm, icosaédrico, no envuelto, con genoma de ADN circular de cadena sencilla y sentido negativo que contiene 2.0 a 3.9 kilobases (Kb). Recientemente, el comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV) ha establecido que este virus pertenece a la familia *Anelloviridae* la cual contiene 9 géneros que exhiben extrema diversidad genética (Biagini *et al.*, 2011). En el cerdo doméstico, se han identificado hasta el momento dos especies (Niel *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2006; Ng *et al.*, 2009; Okamoto, 2009; Carstens 2009; Biagini *et al.*, 2011).

El Torque teno sus virus (TTSuV) fue descubierto por primera vez en cerdos en 1999. Sin embargo, los estudios retrospectivos realizados en España han demostrado que el virus ha estado presente por lo menos desde 1985 (Leary *et al.*, 1999; Segalés *et al.*, 2009). Actualmente, el TTSuV se clasifica en el género *lotatorquevirus* el cual contiene dos especies: Torque teno sus virus 1a (TTSuV1a) y Torque teno sus virus 1b (TTSuV1b) (Davison, 2016, <http://www.ictvonline.org/>). El tamaño del genoma de TTSuV1a es de 2.8-2.9 Kb (2863-2913 nucleotidos/nt) y del TTSuV1b es de 2.7-2.8 Kb (2735-2803 nt). En el TTSuV1a, el ORF1 se localiza en las secuencias nucleótídicas que inician entre el 1914 y el 1950 y codificando una proteína entre 638 y 650 aa mientras que el ORF2 comienza en la posición 428-432, abarcando aproximadamente 153 nt, codificando 72-73 aa. En el TTSuV1b, el inicio del ORF1 se encuentra entre la posición 486 y 2360 nt (620-627 aa codificados) y el ORF2 comienza en la posición 394-413, abarcando hasta 209 nt con 69 aa codificados (Cortey *et al.*, 2011; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

El ORF3 genera un empalme con el ORF2 de 500 nt para TTSuV1a y de 400 nt para TTSuV1b. Adicionalmente, contienen regiones no traducibles (UTR) de longitud variable que ocupa entre el 28 y 29% del genoma viral, para el TTSuV1a es de 838 a 844 nt para y 793-797 nt para TTSuV1b las cuales son extremadamente variables (Cortey *et al.*, 2011).

El ORF 1 codifica para la proteína de la cápside viral mientras que en los ORF2 y ORF3 las de tipo no estructural (NS). Las proteínas codificadas en el ORF2 codifica están involucradas en la replicación viral y en la supresión de la vía de transcripción mediada por NF-KB (Hijikata *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 2007). El TTSuV1a exhibe mayor variabilidad genética (> 30%) que el TTSuV1b (<15%) (Huang *et al.*, 2010; Cortey *et al.*, 2012).

Actualmente, la infección con ambas especies se considera ubicua en cerdos domésticos (Bigarre *et al.*, 2005; Niel *et al.*, 2005; Kekarainen *et al.*, 2006; Martelli *et al.*, 2006; Brasard *et al.*, 2008; Taira *et al.*, 2009; Gallei *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2010; Aramouni *et al.*, 2011) y en jabalíes sanos y enfermos (Martínez *et al.*, 2006). Hasta el momento, el diagnóstico de la infección por TTSuV se basa en la detección del ADN viral por PCR anidada convencional y ensayos de PCR cuantitativa (Gallei *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2010; Kekarainen *et al.*, 2006).

### **III. Transmisión y patogenicia**

Ambas especies de TTSuV se han detectado en semen, calostro, suero, heces, saliva, cavidad nasal y muestras de tejidos de cerdos infectados, lo que indica sus diversas vías de transmisión; horizontal y vertical (Fumaco *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2010; Kekarainen *et al.*, 2007; Pozzuto *et al.*, 2009; Sibila *et al.*, 2009). En los cerdos sanos, tanto el TTSuV1a como el TTSuV1b, han sido detectados en la médula ósea, pulmón, riñón, hígado, íleon, los ganglios linfáticos mediastínicos y mesentéricos, el corazón y bazo (Aramouni *et al.*, 2010; Nieto *et al.*, 2013) y en animales de rastro en el hígado, el músculo, la vesícula biliar, bilis, los ganglios linfáticos y tonsilas (Brassard *et al.*, 2013). Hasta el momento se desconoce con exactitud su presencia y estabilidad en alimentos y subproductos alimenticios (Leblanc *et al.*, 2014). En un estudio realizado por Pérez *et al.*, (2011) se observaron que 10 de los 40 casos (25%) de cerdos estaban infectados de forma simultánea con TTSuV1a y TTSuV1b. Por otro lado Kekarainen *et al.*, (2009) mencionan un 55% de co-infección, y Huang *et al.*, (2010) menciona en su trabajo que la co-infección entre especies de TTSuV1a y TTSuV1b es de 32%.

#### **IV. Distribución y prevalencia**

Se ha determinado que el TTSuV se encuentra ampliamente distribuido en varios países, entre ellos Canadá, Estados Unidos, China, Tailandia, Corea, Italia, Francia, España, Brasil, Alemania y Japón (Aramouni *et al.*, 2010; Gallei *et al.*, 2010; Kekarainen *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2010; McKeown *et al.*, 2004; Niel *et al.*, 2005). La frecuencia del TTSuV1a oscila entre 24% al 100% (McKeown *et al.*, 2004; Martelli *et al.*, 2006) y en el caso del TTSuV1b la frecuencia observada va desde 32% al 77% (Kekarainen *et al.*, 2006; Taira *et al.*, 2009). Independientemente de la especie de TTSuV, la prevalencia se incrementa con la edad (Aramouni *et al.*, 2010).

Los TTSuVs presentan una alta tasa de sustitución de nucleótidos la cual es considerablemente mayor que la observada en virus ADN típicos (Cortey *et al.*, 2011). La región genética ORF2 difiere considerablemente entre los genotipos de TTSuV lo cual ayuda al estudio de la variabilidad, Cadar *et al.*, (2013) y Cortey *et al.*, (2011) han presentado estudios sobre la variabilidad de los TTSuV mediante la construcción de árboles filogenéticos.

Debido a la aparente falta de presiones selectivas como la vacunación y la eliminación de animales enfermos, se considera que la selección y la deriva natural son las principales razones que configuran la evolución de TTSuV. Por tal motivo, el TTSuV ha sido utilizado como un modelo para evaluar los efectos del comercio mundial en la heterogeneidad viral ya que el movimiento de cerdos vivos puede afectar la evolución de poblaciones virales (Cortey *et al.*, 2012).

#### **V. Co-infección con el circovirus porcino tipo 2 (PCV2)**

El PCV2 es un virus que pertenece a la familia *Circoviridae*, no envuelto, isométrico con ADN circular monocatenario que tiene un tamaño de 1767-1768 nt (McNulty *et al.*, 2000; Hamel *et al.*, 1998; Meehan *et al.*, 1998; Mankertz *et al.*, 2000). Es ubicuo en la población de cerdos. En la mayoría de los cerdos, la infección por PCV2 es subclínica (Madec *et al.*, 2008; Segalés *et al.*, 2005). La co-infección de ambos virus de TTSuV con PCV2 ha sido reportada extensivamente (Kekarainen *et al.*, 2006; Krakowka *et al.*, 2008; Ellis *et al.*, 2008; Aramouni *et al.*, 2011). En un estudio realizado por Ritterbusch *et al.*, (2012), se determinó una mayor prevalencia de co-infección del TTSuV1b con PCV2. Por otro lado, en otro estudio se demostró que TTSuV1a es capaz de inducir hiperplasia linfoide, sugiriendo que estos hallazgos pueden favorecer la replicación de PCV2 (Lee *et al.*, 2015).

## VI. Relación del Torque teno sus virus con la enfermedad asociada a PCV2 (PCVAD)

Con respecto a la PCVAD, la presentación clínica más documentada es el PMWS mismo que fue descrito por primera vez en 1991 en Canadá y que se ha extendido por todo el mundo, representando un importante problema de salud en los cerdos. Por consenso, se describe al circovirus porcino tipo 2 (PCV2) como el agente causal del PMWS. Sin embargo, se menciona que se requieren factores adicionales para el desarrollo del cuadro clínico completo tales como, la edad, el medio ambiente, la genética del cerdo y variabilidad genómica del PCV2. Así mismo, se ha sugerido la participación de otros virus en co-infección con el PCV2 (Finsterbusch *et al.*, 2009; Grau-Roma *et al.*, 2010; Lohse *et al.*, 2008; Madec *et al.*, 2008; Segalés *et al.*, 2005). En modelos gnotobióticos, se demostró que el uso de homogenizados de TTSuV1a no desarrollaron enfermedad clínica pero indujeron lesiones histológicas leves características del PMWS (Krakowka *et al.*, 2008). Así mismo, las manifestaciones clínicas y lesiones características del síndrome de dermatitis y nefropatía porcina (PDNS) fueron reproducidas por TTSuV1a inoculando 13 cerdos gnotobioticos con aislados de TTSuV1a (Krakowka *et al.*, 2008). En un estudio realizado por Ellis *et al.* (2008), se sugiere que ambas especies del TTSuV deben ser considerados en el grupo de los agentes infecciosos que promueven el desarrollo de PMWS. Teniendo en cuenta que PMWS es una de las principales enfermedades endémicas de los cerdos, la identificación de los agentes involucrados con su desarrollo y el proceso de la infección son relevantes en el estudio de esta compleja enfermedad (Blomström *et al.*, 2010). Por otro lado en un estudio realizado por Krakowka *et al.*, (2008) donde se inocularon cerdos gnotobioticos con PDNS tuvieron resultados negativos a PCV2, aquí mismo se evidenció que TTV es crítico para la expresión de lesiones de PDNS. Por tal motivo, el TTSuV1a fue propuesto como el factor adicional (factor X) para el desarrollo de enfermedad asociada a circovirus (PCVAD) (Segalés *et al.* 2009).

Por otra parte, TTSuV1b podría ser un indicador potencial de la inmunosupresión en los cerdos (Aramouni *et al.*, 2013). Un estudio previo realizado reveló que la infección natural con TTSuV suprime la respuesta inmune del huésped y exacerba el síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), esto debido a que la proteína del ORF2 afecta la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B, la activación de NF- $\kappa$ B es una respuesta protectora del huésped frente a patógenos virales, regula la respuesta inflamatoria, este hallazgo podría explicar por qué TTV puede replicar a un alto nivel de copias de ADN sin dar lugar a una severa inflamación, y podría ser un mecanismo de supervivencia que el virus ha desarrollado con el tiempo para evitar ser eliminado por la respuesta inmune (Zheng *et al.*, 2012).

## JUSTIFICACIÓN

La PCVAD es económicamente importante en la industria porcina ya que tiene un impacto en los parámetros productivos y reproductivos (Kekarainen *et al.*, 2006). Por tal motivo, es relevante establecer la relación del TTSuV1a y/o TTSuV1b con la PCVAD. Así mismo, la tipificación de ambas especies es relevante ya que de este modo se pueden determinar los tipos prevalentes de TTSuV en la población porcina nacional debido a que existe poca información al respecto, esto mediante estudios filogenéticos basados en el ORF2 ya que difiere considerablemente entre especies de TTSuV.

La técnica de PCR en conjunto con la secuenciación de los productos amplificados son herramientas indispensables para la implementación de estudios filogenéticos; por tal motivo, varios estudios han validado protocolos de PCR y construcción de árboles filogenéticos con nucleótidos de TTSuV (Martínez *et al.*, 2006; Fumaco *et al.*, 2013; Segalés *et al.*, 2009; Cortey *et al.*, 2012). De este modo, la estandarización e implementación de la técnica de PCR-Secuenciación del presente estudio proporcionará información sobre la presencia y biotipo del TTSuV en México y contribuirá con datos acerca de la dinámica poblacional de este virus, puesto que, como se mencionó anteriormente pueden reflejar el efecto de la comercialización global de cerdos.

## OBJETIVOS

### I. Objetivo general

Estandarizar e implementar una técnica de PCR anidada para la amplificación de las regiones genéticas ORF1 y ORF2 del Torque teno sus virus 1a (TTSuV1a) y 1b (TTSuV1b) en tejidos porcinos afectados por el Síndrome de Emaciación Multisistémico post-destete (PMWS).

### II. Objetivos particulares

- Diseñar iniciadores específicos para la amplificación del ORF2 y secuencias parciales del ORF1 TTSuV1a y TTSuV1b.
- Determinar la temperatura óptima de alineación de los iniciadores para la amplificación de TTSuV1a y TTSuV1b en la PCR anidada.
- Determinar la concentración óptima de MgCl<sub>2</sub> e iniciadores para la amplificación de TTSuV1a y TTSuV1b en la PCR anidada.
- Determinar la concentración óptima de templado y la concentración mínima de detección para los protocolos estandarizados de PCR anidada.
- Implementar la PCR anidada para la obtención del ORF2 y ORF1 parcial del TTSuV1a y TTSuV1b en tejidos porcinos positivos a TTSuV1a y/o TTSuV1b procedentes de casos de PMWS.
- Secuenciar los productos amplificados por PCR anidada.
- Construir los árboles filogenéticos con las secuencias de nucleótidos que se obtengan para cada especie de TTSuV.



## MATERIAL Y MÉTODOS

### I. Selección de casos

Se seleccionaron 24 tejidos linfoides incluidos en parafina (linfonodo o bazo) provenientes de casos positivos a PMWS con base a los criterios diagnósticos (Chae. 2005): 1) cuadro clínico de enfermedad, 2) lesiones histopatológicas características (depleción linfocítica severa e inflamación granulomatosa) y 3) patrón difuso de hibridación *in situ* positivo a PCV2. De los tejidos seleccionados, 9 casos fueron positivos a TTSuV1a y 15 casos positivos a TTSuV1b, 5 casos de los 24 fueron doble positivos (Tabla 1).

**Tabla 1.** Muestras seleccionadas, se puede observar que algunos casos son doble positivos

Muestra	TTSuV1a	TTSuV1b
13f	+	-
14a	+	-
16c	+	-
16d	+	-
16fla	+	-
17a	+	+
17e	+	+
20c	+	-
Cld4	+	-
2cc	-	+
12g	+	+
13e	-	+
14d	-	+
15c	-	+
17a	-	+
18d	-	+
20c	+	+
31-3	-	+
C3a	-	+
17e	-	+
31-21	-	+
16c	+	+
17d	-	+
18e	-	+

## II. Diseño de iniciadores

Los iniciadores se diseñaron utilizando los programas Bioedit (BioEdit v7.2.5, Ibis Bioscience, Carlsbad, CA.) y el programa Primer3 (Untergrasser, 2012). Para el diseño, se utilizaron secuencias representativas de diferentes países disponibles en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), diez para el TTSuV1a (Figura 1 y 2) y doce secuencias para el TTSuV1b (Figura 3-6). Debido a la variabilidad genómica entre las secuencias consideradas de TTSuV, se incluyeron bases degeneradas en algunos iniciadores. Para el TTSuV1a, únicamente se diseñaron iniciadores sentido positivo. Los iniciadores diseñados se sintetizaron comercialmente (IDT Integrated ADN Technologies).

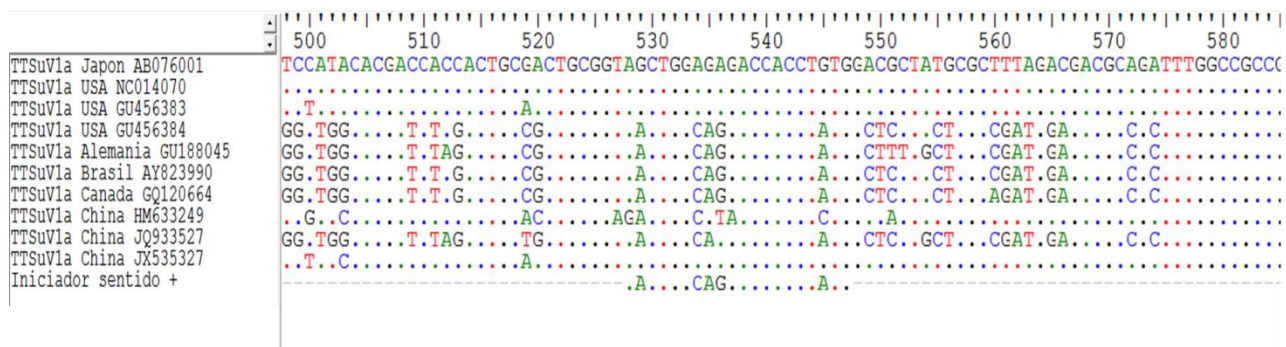


Figura 1. Iniciador sentido positivo alineado con secuencias de referencia del TTSuV1a.

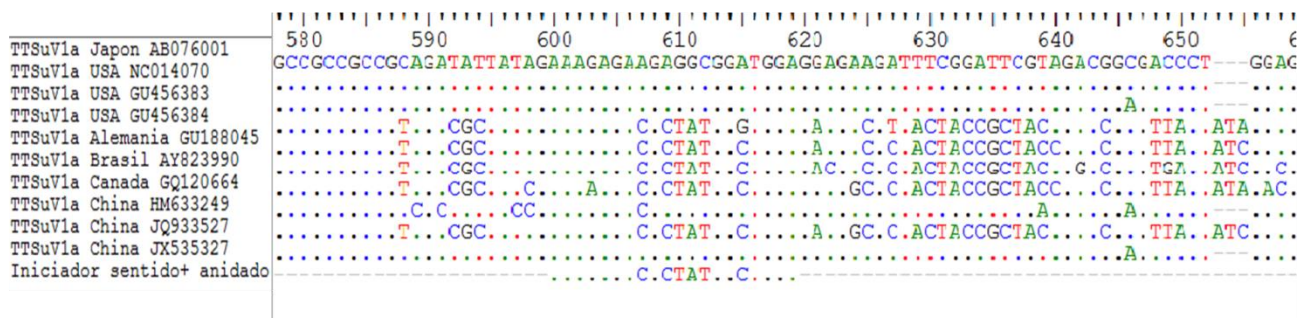


Figura 2. Iniciador anidado sentido positivo alineado con secuencias de referencia del TTSuV1a.



### III. Extracción de ADN

Se realizaron cortes de veinte micras de cada tejido incluido en parafina los cuales se colocaron en tubos Eppendorf estériles de 1.5 mililitros para la extracción de ADN del tejido parafinado, utilizando un juego de reactivos comercial (QIAamp DNA FFPE Tissue kit, Qiagen, Germany). A cada tubo Eppendorf con el tejido, se le agregó 1 ml de xilol y se agitó vigorosamente con un vortex (Scientific industries, New York, EUA) durante 10 segundos. Posteriormente, se centrifugó a una velocidad de 14,000 rpm durante dos minutos a temperatura ambiente, se removió cuidadosamente el exceso de xilol con una micropipeta para adicionar 1 ml de etanol al 99%, se mezcló con vortex durante 10 segundos y se centrifugó a 14,000 rpm durante dos minutos a temperatura ambiente. Una vez centrifugado, se retiró el exceso de etanol con una micropipeta y se incubó a 37°C por 10 minutos para evaporar el etanol y posteriormente agregar 180  $\mu$ l de buffer ATL y 20  $\mu$ l de proteinasa K. La muestra se mezcló con vortex y se incubó a 56°C en un Thermomixer (Eppendorf Hamburg, Germany) durante una hora a 350 rpm e inmediatamente después se incubó a 90°C por una hora a 350 rpm para inactivar la proteinasa K. Al finalizar la incubación, se adicionaron 200  $\mu$ l de buffer AL y se mezcló en vortex por 10 segundos para enseguida adicionar 200  $\mu$ l de etanol al 99% y mezclar en vortex por 10 segundos. Acto seguido, se centrifugó a 14,000 rpm durante un minuto y se transfirió el lisado entero a la columna MinElute con un tubo colector estéril, procurando no mojar los bordes. La columna se centrifugó a 8,000 rpm durante un minuto, se eliminó el tubo colector y se colocó otro tubo colector estéril nuevo para adicionar 500  $\mu$ l de buffer AW1 justo en el centro de la membrana sin tocar los bordes y centrifugar a 8,000 rpm durante un minuto. Nuevamente, se eliminó el tubo colector y se uso un nuevo tubo para adicionar 500  $\mu$ l de buffer AW2 y centrifugar a 8,000 rpm por un minuto, eliminar el tubo colector y colocar en uno nuevo. Posteriormente se eliminó el tubo colector, colocando otro para centrifugar a 14,000 rpm por tres minutos para secar la membrana, y tras eliminar el tubo colector correspondiente y colocar en un tubo Eppendorf a la columna MinElute, se agregaron 100  $\mu$ l de buffer ATE al centro de la membrana para incubar por 5 minutos a temperatura ambiente y centrifugar dos veces a 14,000 rpm, durante un minuto para la obtención de ADN en el tubo colector mismo que se almaceno a -20°C hasta su uso. La concentración de las muestras se cuantificó mediante espectrofotometría (Biophotometer, Eppendor, Hamburg, Germany).

#### IV. PCR anidada

El ADN genómico se utilizó como templado para la PCR anidada. Para la amplificación del TTSuV1a, se utilizaron los iniciadores sentido negativo de la primera ronda de amplificación y de la anidada descritos por Vargas *et al.*, (2012). Los iniciadores utilizados en el presente trabajo, indicando el tamaño esperado de los productos amplificados se muestran en la tabla 1. Para la optimización de las condiciones de amplificación, se realizaron gradientes de temperatura y curvas de concentración de cloruro de magnesio. La amplificación se realizó en reacciones de 50 µl en tubos Eppendorf de 0.2 ml., conteniendo 2,5 U de Taq ADN polimerasa (ADN polimerasa FlexiGoTaq, Promega Corp. Madison, WI), PCR Buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 100 pm de cada iniciador y 50 ng de templado. Se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación: Posterior a una desnaturalización inicial (94 ° C durante 5 minutos), se realizaron 40 ciclos de desnaturalización a 94 ° C durante 1 minuto, alineación a 57 ° C (TTSuV1a) o 59 ° C (TTSuV1b) durante 1 minuto y elongación a 72 ° C durante 1 minuto. Posteriormente, se realizó una elongación final de 10 minutos a 72 ° C.

#### V. Visualización de productos

La visualización de los productos amplificados se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con solución amortiguadora Tris 1M, ácido bórico anhidro 1M, Na<sub>2</sub> EDTA 2H<sub>2</sub>O 20M (TBE, Promega Corp. Madison, WI, USA) teñido con 4 µl (10 µg/µl) de bromuro de etidio (Promega Corp. Madison, WI, USA). Para el llenado de los pozos se utilizaron 4µl del producto de la PCR con 4µl del amortiguador de corrida (Glycerol 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). Se utilizó un marcador de pares de bases (100 pb ADN ladder, PromegaCorp, Madison WI, USA). La electroforesis se realizó a 80 volts durante 60 minutos y los productos se visualizaron en un transiluminador de luz UV (Apollo, Instrumentation, Claremont CA, USA).

**Tabla 2.** Iniciadores utilizados para la amplificación de las regiones genéticas ORF1 y ORF2 del TTSuV1a y del TTSuV1b.

<b>TTSuV1a</b>		
<b>Iniciador</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Producto esperado</b>
Fw	5'- AACTGGCAGGACCACCTATG -3'	612 pb
RV	5'- AGTGTBACHTCHCCACTYC -3'	
Fw anidado	5'- AAAGAGACGCTATGGCTGGA -3'	456 pb
Rv anidado	5'- TGYTTTTTCWGTGTCCCAYTGC -3'	
<b>TTSuV1b0</b>		
<b>Iniciador</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Producto esperado</b>
Fw	5'- ATGCCTTACAGACGCTATC -3'	695 pb
RV	5'- TGTGATGTTYATTTTGGTGGA -3'	
Fw anidado	5'- AAGCTCCGGTCATACAATG -3'	509 pb
Rv anidado	5'- GCTGTCCATATATTTCTCCAG -3'	

\* En negritas se muestran las bases degeneradas utilizadas.

## **VI. Recuperación de productos amplificados**

En condiciones de esterilidad se realizó la purificación de los productos amplificados a partir de la recuperación de bandas del gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio, utilizando un juego de reactivos comercial (MinElute Gel Extraction kit, Qiagen, Germany). Brevemente, se seccionó el gel con una navaja de bisturí estéril alrededor de la banda y ésta se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml para pesarla (Por cada 100 mg de gel se utilizan 100 µl de buffer QG). Posteriormente, se agregó 300 µl de buffer QG y se incubó a 50°C en un Thermomixer (Eppendorf Hamburg, Germany) a 250 rpm durante 10 min. Una vez disuelto el gel, se adicionaron 100 µl de isopropanol y se mezcló por inversión para transferir la mezcla a una columna MinElute y centrifugar a 20,000 x *g* por 1 min. El filtrado se eliminó, se colocó el mismo tubo colector para adicionar 500 µl de buffer QG a la columna y se centrifugó nuevamente a 20,000 x *g* por 1 min. Posterior a la eliminación del filtrado, se colocó el mismo tubo colector a la columna para adicionar 750 µl de buffer PE y centrifugar a 20,000 x *g* por 1 min. Se eliminó el filtrado y se colocó el mismo tubo colector a la columna para centrifugar nuevamente a 20,000 x *g* por 1 min con la finalidad de secar la membrana. Por último, se colocó la columna MinElute en un tubo Eppendorf estéril de 1.5 ml y se agregaron 10 µl de buffer EB directamente en la membrana, se incubó por 1 min, se centrifugó a 20,000 x *g* por 1 min y el filtrado obtenido se almacenó a -20°C hasta su uso.

## **VII. Secuenciación**

La secuenciación de ADN se realizó por medio de estuches que contienen enzimas de alta fidelidad, posesividad y especificidad requeridas en secuenciación y clonación molecular. Nueve productos de TTSuV1a y 15 de TTSuV1b se obtuvieron (MinElute Gel Extraction kit, Qiagen, Germany). La secuenciación se realizó en ambas direcciones, utilizando un juego de reactivos comercial (Big Dye Terminator V3.1, Applied Biosystems, Foster City, CA). Las muestras se secuenciaron (Applied Biosystems, Foster City, CA.) mediante el método de Sanger en el Instituto de Fisiología Celular (UNAM, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México).

## **VIII. Análisis de los datos**

La alineación, edición y la determinación de la matriz de identidad de las secuencias de nucleótidos se realizaron con el programa Bioedit (BioEdit v7.2.5, Ibis Bioscience, Carlsbad, CA). Los árboles filogenéticos se construyeron con el método de Maximum Parsimony, utilizando el programa MEGA5, con la distancia Tamura-Neg Gamma. La confianza estadística de la topología se aseguró con 1000 Bootstraps, resultados superiores de 70 (700) se consideraron muy significativos.

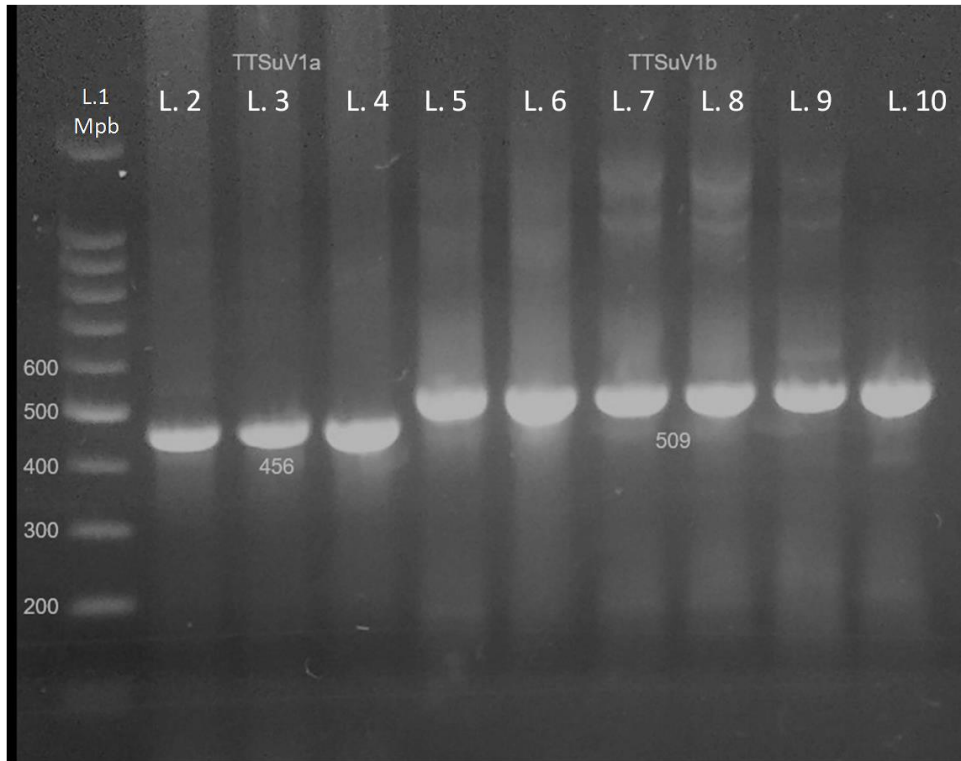
## RESULTADOS

En el presente trabajo los iniciadores diseñados para la amplificación de secuencias de TTSuV1a y TTSuV1b por PCR anidada incluyeron bases degeneradas las cuales estuvieron presentes en los iniciadores anti-sentido anidados para la amplificación del TTSuV1a mientras que para el TTSuV1b sólo se utilizó una base degenerada en el iniciador anti-sentido de la primera ronda de amplificación. El tamaño de los productos esperados mediante el uso de los iniciadores fue de 456 pb y 509 pb para el TTSuV1a y el TTSuV1b, respectivamente (Fig.7). En el gradiente de temperatura empleado para la amplificación de secuencias de TTSuV1a (Fig.8) sólo se amplificaron productos de aproximadamente 456 pb en las temperaturas de 56°C y 57°C, observándose una banda más definida en la segunda temperatura. Por otro lado, se amplificaron productos de aproximadamente 509 pb en todas las temperaturas del gradiente de temperatura utilizado para la amplificación de TTSuV1b (Fig. 9), eligiéndose como temperatura óptima la de 59°C.

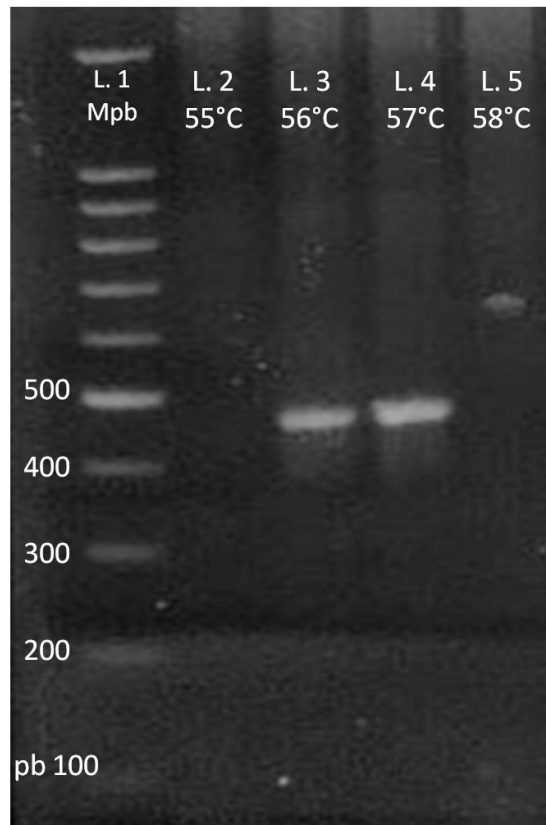
Una vez establecida la temperatura óptima para la amplificación de ambas especies, se realizaron curvas de concentración MgCl<sub>2</sub> (Fig. 10 y 11) con la finalidad de corroborar la concentración óptima, determinándose que únicamente se amplificaron productos con la concentración estándar de MgCl<sub>2</sub> (1.5 Mm). Cabe señalar que en la curva de concentración de MgCl<sub>2</sub> del TTSuV1b, con la utilización de otras concentraciones se amplificaron bandas inespecíficas mismas que estuvieron ausentes en la concentración estándar. Para ambas especies de *lotatorquevirus* se determinó que la concentración mínima de detección y de iniciadores mediante diluciones seriadas 1:2 fue de 50 ng y de 50 pM, respectivamente. La figura 12 muestra la curva de concentración de templado para el TTSuV1a.

Posteriormente, mediante la implementación de la PCR anidada con las condiciones de amplificación determinadas se amplificaron exitosamente productos de TTSuV1a y TTSuV1b en todos los casos seleccionados de tejidos linfoides seleccionados provenientes de casos positivos a PMWS. El gel representativo de las amplificaciones referidas se presenta en la figura 7. En total se obtuvieron 9 amplificados de TTSuV1a y 15 de TTSuV1b los cuales fueron secuenciados para la construcción de árboles filogenéticos (Figura 13 y 14, respectivamente), utilizando además secuencias de referencia tomadas de diferentes países disponibles en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

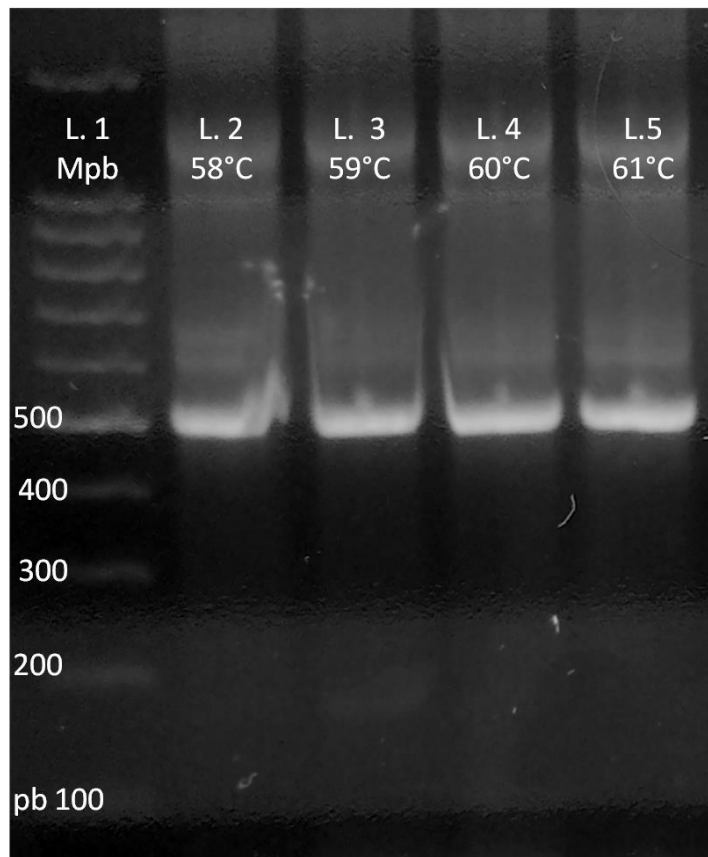




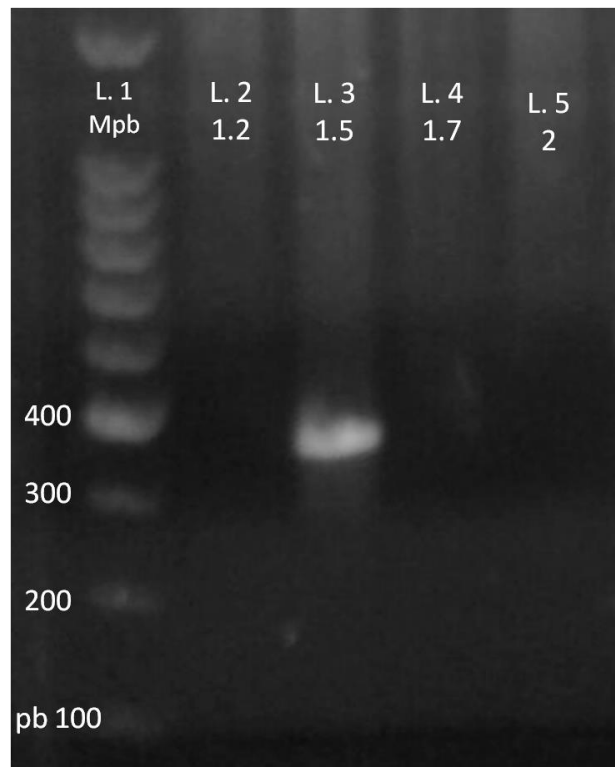
**Figura 7. Amplificación obtenida por PCR de TTSuV1a y de TTSuV1b.** En la línea 1 marcador de pares de bases (100). PCR anidada de casos positivos de TTSuV1a y TTSuV1b, las líneas 2 a 4 muestran productos amplificados de 456 pb y las líneas 5 a 10 muestran productos amplificados de 509 pb, en gel de agarosa al 1.5%.



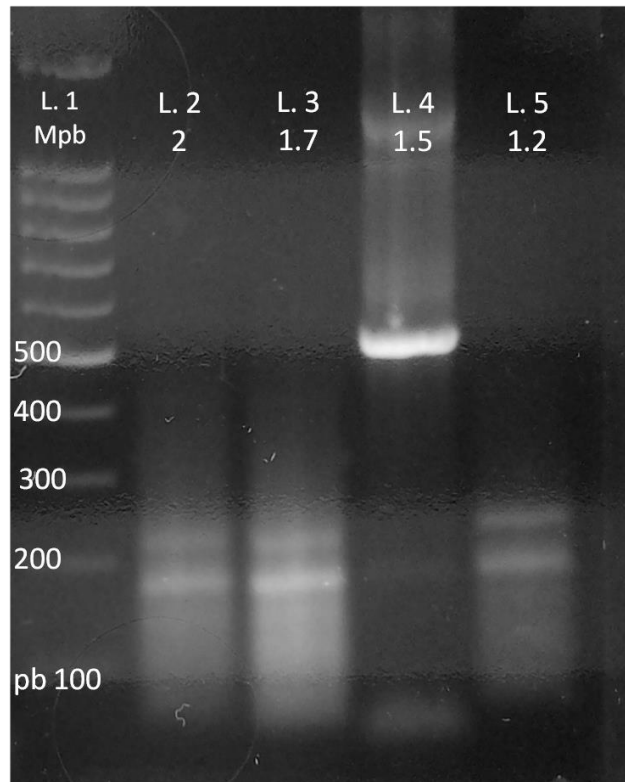
**Figura 8. Gradiente de temperatura de TTSuV1a.** Marcador de pares de bases (100) en la línea 1. PCR anidada de casos positivos a TTSuV1a, se obtuvo el mejor producto en la línea 4 a 57°C en gel de agarosa al 1.5%.



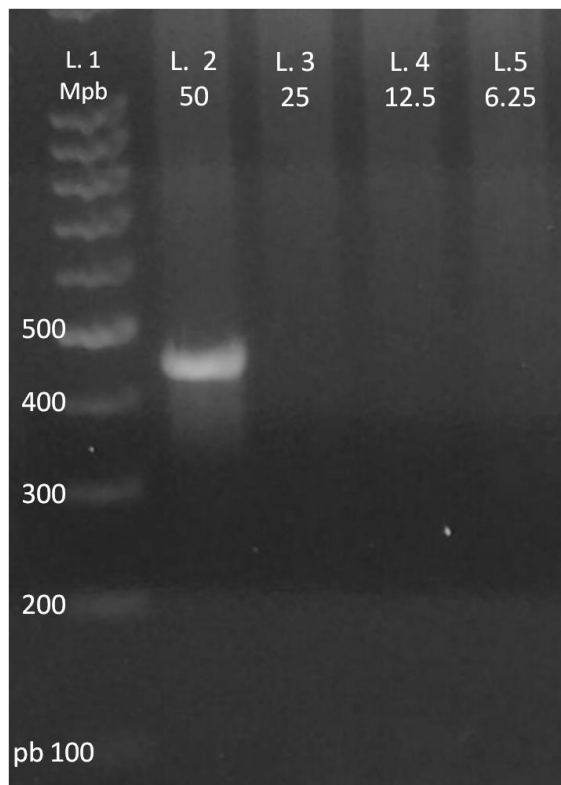
**Figura 9. Gradiente de temperatura de TTSuV1b.** Marcador de pares de bases (100) en la línea 1. PCR anidada de casos positivos a TTSuV1b, se muestra que el mejor producto se obtuvo en la línea 3 a 59°C en gel de agarosa al 1.5%.



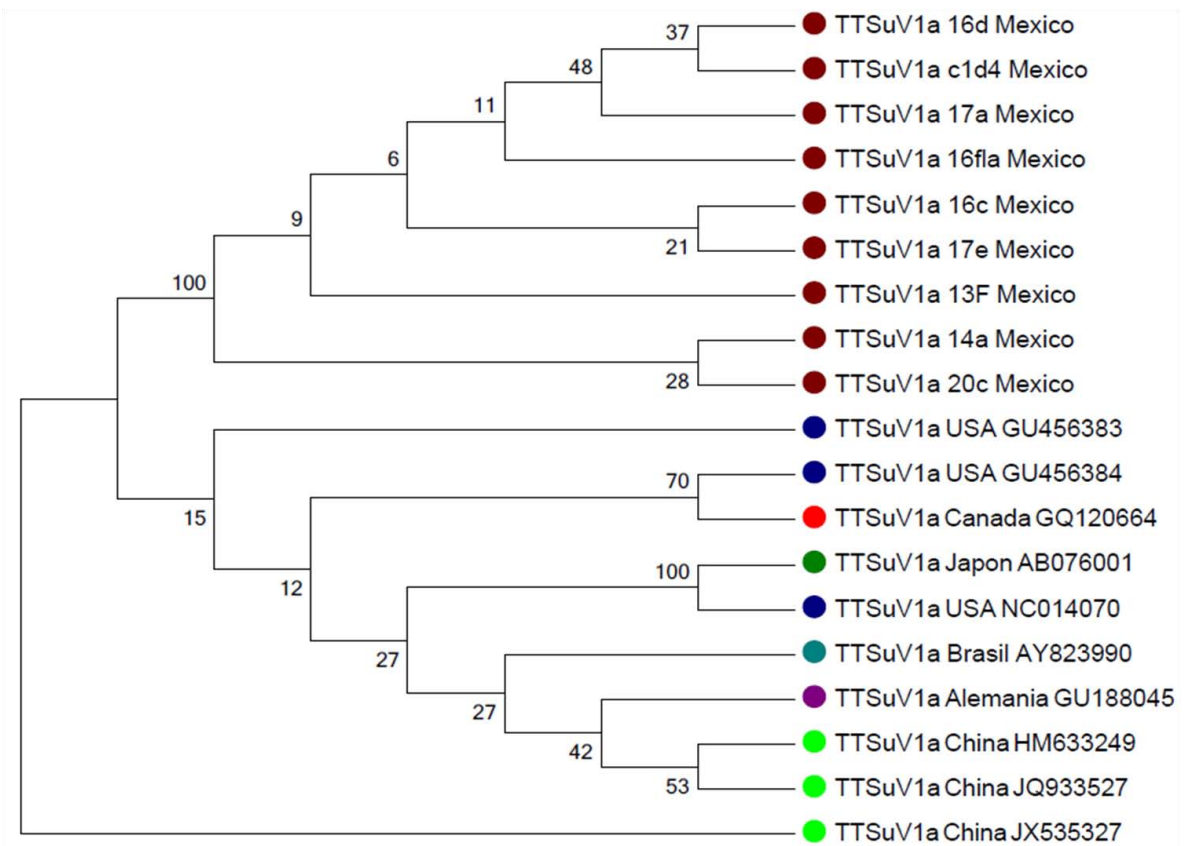
**Figura 10. Gradiente de  $MgCl_2$  para TTSuV1a.** Marcador de pares de bases (100) en la línea 1. PCR anidada de casos positivos a TTSuV1a, se muestra que el mejor producto se obtuvo en la línea 3 con concentración de 1.5 de  $MgCl_2$ , en gel de agarosa al 1.5%.



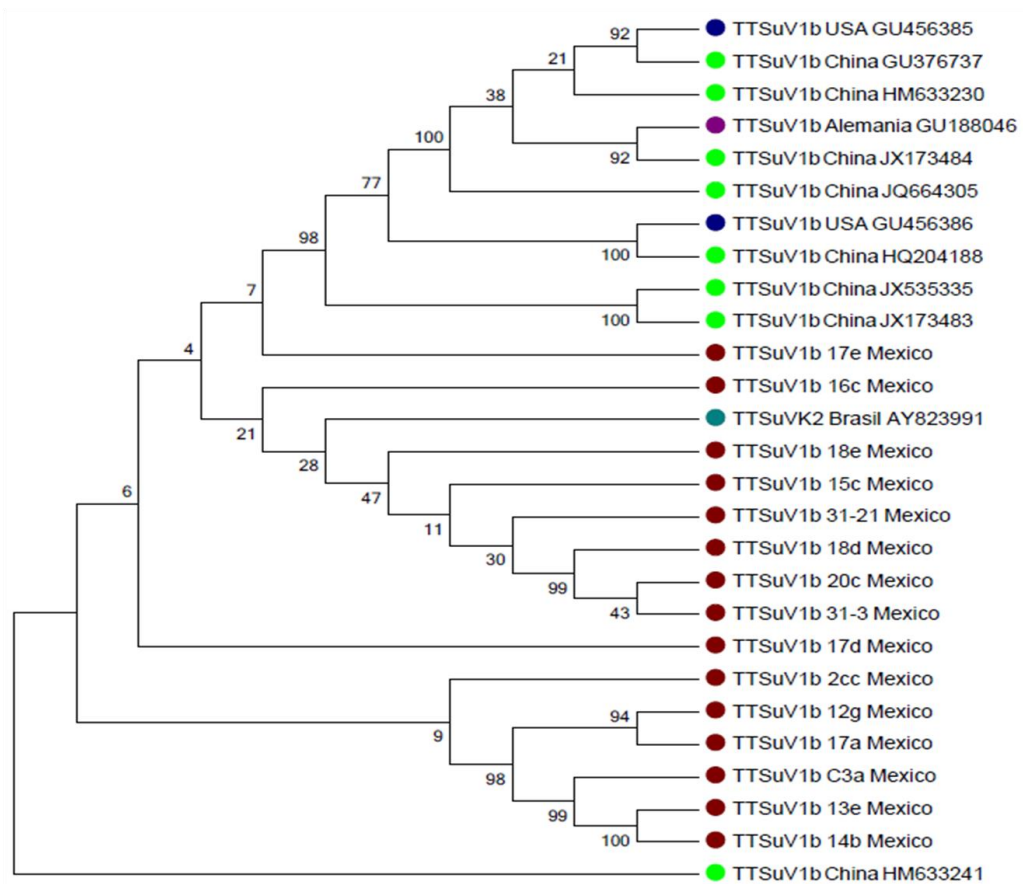
**Figura 11. Gradiente de  $MgCl_2$  para TTSuV1b.** Marcador de pares de bases (100) en la línea 1. PCR anidada de casos positivos a TTSuV1b, se muestra que el mejor producto se obtuvo en la línea 4 con concentración de 1.5 de  $MgCl_2$ , en gel de agarosa al 1.5%.



**Figura 12. Gradiente de templado de TTSuV1a.** Marcador de pares de bases (100) en la línea 1. PCR anidada de casos positivos a TTSuV1a, se muestra que el mejor producto se obtuvo en la línea 2 con concentración de 50 mM de templado, en gel de agarosa al 1.5%.



**Figura 13. Árbol filogenético de Torque teno sus virus 1a (TTSuV1a).** Se observan secuencias de nucleótidos de diferentes TTSuV1a identificados con el número de acceso de GenBank así como su país de origen.



**Figura 14. Árbol filogenético de Torque teno sus virus 1b (TTSuV1b).** Se observan secuencias de nucleótidos de diferentes TTSuV1b identificados con el número de acceso de GenBank así como su país de origen.

## DISCUSIÓN

Actualmente, el diagnóstico para la infección por TTSuV se basa en la detección del ADN viral mediante PCR anidada convencional y por ensayos de PCR cuantitativa (Gallei *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2010; Kekarainen *et al.*, 2006) esto debido a que la infección por ambas especies TTSuV es ubicua y común en cerdos domésticos (Bigarre *et al.*, 2005; Niel *et al.*, 2005; Kekarainen *et al.*, 2006; Martelli *et al.*, 2006; Brassard *et al.*, 2008; Taira *et al.*, 2009; Gallei *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2010; Aramouni *et al.*, 2011) así como en jabalíes sanos y enfermos (Martínez *et al.*, 2006).

El uso de la PCR en cualquiera de sus variantes tiene la ventaja de que las muestras utilizadas pueden ser a partir de suero o de tejidos tanto congelados como embebidos en parafina lo que nos permite detectar así como caracterizar el virus (Segalés *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta las limitaciones actuales de las técnicas para la detección de TTSuV y la relativamente alta frecuencia de infección con este virus en los cerdos domésticos (Kekarainen *et al.*, 2009) se considera a la PCR como un método fiable que puede alcanzar a reproducir resultados con diferentes muestras, así como, obtener amplificaciones de ambas especies de TTSuV derivadas a partir de un archivo de muestras afectadas por PCV2, particularmente de casos de PMWS (Gomes de Castro *et al.*, 2012). Del mismo modo en el presente trabajo se pudo estandarizar una técnica de PCR anidada mediante la utilización de muestras embebidas en parafina procedentes del archivo de casos de PCV2 las cuales presentaron un estatus positivo de TTSuV1a o de TTSuV1b, obteniéndose productos de 456 pb para TTSuV1a y de 509 pb para TTSuV1b correspondientes a su estatus de TTSuV y al tamaño esperado con base al uso de los iniciadores diseñados.

Con respecto a los parámetros optimizados la determinación de la temperatura óptima de alineación fue más estricta para la amplificación del TTSuV1a ya que sólo en dos temperaturas del gradiente empleado se pudieron amplificar productos mientras que para el TTSuV1b se obtuvieron productos en todas las temperaturas del gradiente. Este hallazgo posiblemente esté relacionado con una mayor variabilidad genómica en el TTSuV1a con respecto al TTSuV1b (Cortey *et al.*, 2011). Lo anterior concuerda con el mayor número de bases degeneradas empleadas en el diseño de los iniciadores del TTSuV1a.

Así mismo, los resultados de las curvas de concentración de MgCl<sub>2</sub> denotan que las condiciones de amplificación para ambas especies de *Iotatorquevirus* requieren alta astringencia ya que sólo se apreciaron productos en la concentración de 1.5 mM. Cabe señalar que este parámetro es fundamental debido que la eficiencia de la enzima ADN polimerasa es dependiente de magnesio (Catesese *et al.*, 1997).

Por otro lado, la concentración mínima de detección de ADN molde es alta (50 ng) con base a la curva de concentración de templado realizada lo cual compromete la sensibilidad de ambos protocolos estandarizados. Por tal motivo, en cada protocolo de PCR se debe garantizar la concentración mínima de templado con la finalidad de evitar la presencia de falsos negativos.

Los resultados de la implementación de la técnica de PCR anidada estandarizada denotaron una concordancia perfecta, ya que en todos los casos se amplificaron los productos con base al estatus de TTSuV. La secuenciación de los productos amplificados demostró que los protocolos de PCR anidada son específicos para la amplificación de ambas especies de *lotatorquevirus*.

El TTSuV1a se encuentra ampliamente distribuido en varios países, entre ellos Canadá, Estados Unidos, China, Tailandia, Corea, Italia, Francia y España, con frecuencias que van desde el 24% a 100% (Mckeown *et al.*, 2004; Martelli *et al.*, 2006) y en el caso del TTSuV1b la frecuencia observada va de 77% a 32% (Kekarainen *et al.*, 2006; Taira *et al.*, 2009). En México, la presencia de ambos géneros de TTSuV se documentan por primera vez mediante PCR anidada basada en el uso de iniciadores degenerados en casos PCVAD que cumplieron con los criterios de diagnóstico (signos clínicos, lesiones microscópicas características e hibridación in situ positiva a PCV2). En ese estudio se observó una menor frecuencia de *lotatorquevirus* con relación a la descrita en otros países. Dada la variabilidad genómica de TTSuV, es factible que las cepas TTSuV existentes en México compartan una identidad de secuencias de nucleótidos inferiores a los encontrados en los países con mayor prevalencia. Dicha variabilidad genómica podría estar relacionada con un potencial patógeno diferente en las cepas de campo en México (Vargas *et al.*, 2014). La topografía de los árboles filogenéticos construidos a partir de los productos amplificados de TTSuV1a y TTSuV1b son compatibles con dicha hipótesis ya que las secuencias Mexicanas se agrupan en cladas que exhiben alta homología entre ellas y que difieren con las secuencias de otros países, la matriz de identidad corrobora estos datos. Esta tendencia es más evidente en el árbol filogenético del TTSuV1a en el que incluso se aprecia que algunas cepas Mexicanas presentan homología con una secuencia Brasileña de TTSuVκ2 (AY823991).

En cuanto a la variabilidad de los TTSuV, Cortey *et al.*, (2011) mostró que TTSuV1a era más variable que TTSuV1b, esta variación se distribuye de manera diferente, hay regiones no traducidas más conservadas y las regiones traducibles son más variables. La ORF1 es una región más conservada mientras que la ORF2 y ORF3 son regiones menos conservadas. Lo anterior concuerda con los datos obtenidos a partir de los arboles

filogenéticos del presente estudio ya que las distancias genéticas son mayores para el TTSuV1a.

Se sugiere que el ORF2 está involucrado en la replicación viral y que la proteína codificada puede desactivar el mecanismo regulado por el factor NF- $\kappa$ B, inhibiendo considerablemente la respuesta inflamatoria. Este hallazgo podría explicar el alto nivel de replicación del TTSuV en ausencia de inflamación significativa. Así mismo, este podría ser el mecanismo de supervivencia que el virus ha desarrollado con el tiempo para evitar ser eliminado por las respuestas inmunes (Zheng *et al.*, 2007). Por otro lado, se describe que las secuencias de aa de muestras de jabalí de la región ORF2 difieren considerablemente entre genotipos TTSuV1a y TTSuV1b y que sobre la base de nucleótidos y la secuencia de alineaciones de aminoácidos del gen ORF2, cada genotipo de ambas especies de TTSuV muestran sustituciones de aminoácidos característicos y/o delección/inserción. La secuencia aa de la ORF2 de TTSuV1a difieren considerablemente entre 5 genotipos descritos y son más variables que el ORF2 de TTSuV1b (Cadar *et al.*, 2013).

Las secuencias obtenidas en el presente trabajo son de suma importancia ya que contienen la región completa del ORF2 lo que permitirá el estudio de las cepas de campo que circulan en el país y proporcionará información que puede estar relacionada con el potencial de patogenicidad del virus. Así mismo, los protocolos de PCR anidada estandarizadas en este trabajo darán la pauta para realizar un estudio filogenético exhaustivo con la finalidad de obtener información sobre la patogenicidad del virus y contribuirá a la obtención de fragmentos largos para que en un futuro se pueda obtener la secuencia completa de los TTSuV mexicanos.



## CONCLUSIONES

- ✓ Con los iniciadores diseñados se logró amplificar las regiones genéticas ORF1 y ORF2 de ambas especies de *lotatorquevirus*.
- ✓ Los protocolos de PCR anidada estandarizadas son específicos para la amplificación de TTSuV1a y TTSuV1b.
- ✓ En el México ambas especies de *lotatorquevirus* están presentes.
- ✓ La técnica de PCR anidada es una herramienta de elección para la detección de agentes virales de reciente descripción.
- ✓ El uso de bases degeneradas en el diseño de iniciadores es de gran utilidad en la detección de agentes virales que presentan alta variabilidad genómica.

## REFERENCIAS

1. Aramouni M, Kekarainen T, Ganges L, Tarradas J, Segalés J. 2013. Increased viral load and prevalence of Torque tenosus virus 2 (TTSuV2) in pigs experimentally infected with classical swine fever virus (CSFV). *Virus Res.* 172 (1-2); 81-84.
2. Aramouni M, Segalés J, Cortey M, Kekarainen T. 2010. Age-related tissue distribution of swine Torque tenosus virus 1 and 2. *Vet. Microbiol.* 146; 350-353.
3. Aramouni M, Segalés J, Sibila M, Martin-Valls G.E, Nieto D, Kekarainen T. 2011. Torque tenosus virus 1 and 2 viral loads in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) affected pigs. *Vet. Microbiol.* 153; 377-381.
4. Biagini P, Bendinelli M, Hino S, Kakkola L, Mankertz A, Niel C, Okamoto H, Raidal S, Teo C.G, Todd D. 2011. Anelloviridae. In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds), *Virus Taxonomy*, 9th Report of the ICTV. Elsevier Academic Press, London, pp. 331-341.
5. Bigarre L, Beven V, de Boisseson C, Grassland B, Rose N, Biagini P, Jestin A. 2005. Pig anelloviruses are highly prevalent in swine herds in France. *J. Gen. Virol.* 86; 631-635.
6. Blomström A, Belák S, Fossum C, Fuxler L, Wallgren P, Berg M. 2010. Studies of porcine circovirus type 2, porcine bocavirus-like virus and torque teno virus indicate the presence of multiple viral infections in post weaning multisystemic wasting syndrome pigs. *Virus res.* 152; 59-64.
7. Brasard J, Gagne M.J, Lamoureux L, Inglis G.D, Leblanc D, Houde A. 2008. Molecular detection of bovine and porcine Torque teno virus in plasma and feces. *Vet. Microbiol.* 126; 271-276.
8. Brassard J, Gagne M.J, Leblanc D. 2013. Real-time PCR study of the infection dynamics of Torque tenosus viruses in naturally infected pigs from nursery to slaughterhouse. *Vet. J.* 197; 506-508.
9. Cadar D, Kiss T, Ádám D, Cságola A, Novosel D, Tuboly T. 2013. Phylogeny, spatio-temporal phylodynamics and evolutionary scenario of Torque tenosus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) in wild boars: Fast dispersal and high genetic diversity. *Vet. Microbiol.* 166; 200-213.
10. Carstens EB. 2009. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol.* 155; 133-146.
11. Catroxo M.H.B, Nishiya A, Sabino E, Teixeira P.S, Petrella S, Milanelo L, Vieira J.C.F, Díaz R.S. 2008. Torque teno virus (TTV) is prevalent in Brazilian non-human primates and chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Int. J. Morphol.* 26; 363-372.

12. Chae C. 2005. A review of porcine Circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet. Journal.* 169; 326-336.
13. Cortey M, Macera L, Segalés J, Kekarainen T. 2011. Genetic variability and phylogeny of Torque teno virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) base on complete genomes. *Vet. Microbiol.* 148; 125-131.
14. Cortey M, Pileri E, Segalés J, Kekarainen T. 2012. Globalization and global trade influence molecular viral population genetics of Torque Teno Sus Viruses 1 and 2 in pigs. *Vet. Microbiol.* 156; 81-87.
15. Davison A.J (President). 2016. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). <http://www.ictvonline.org>
16. Ellis A.J, Allan G, Krakowka S. 2008. Effect of coinfection with genogroup 1 porcine torque teno virus on porcine circovirus type 2- associated post weaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic pigs. *American Journal Vet. Res.* 69 (12); 1608-1613.
17. Finsterbush T, Mankertz A. 2009. Porcine circoviruses-small but powerful. *Virus Res.* 143 (2); 177-183.
18. Fumaco T, Diogenes D, Samuel P, Muterle A, Mengue C, Lidiane C, Fernandes H, Franco A, Roehe P. 2013. Torque teno sus virus (TTSuV) in tissues of pigs and its relation with the occurrence of postweaning multisystemic wasting syndrome. *Virus Genes.* 47; 276-281.
19. Gallei A, Pesch S, Esking W.S, Keller C, Ohlinger V.F. 2010. Porcine Torque teno virus: determination of viral genomic loads by genogroup—specific multiplex rt-PCR, detection of frequent multiple infections with genogroups 1 or 2, and establishment of viral full-length sequences. *Vet. Microbiol.* 143; 202-212.
20. Gomes de Castro A, Favero C.M, Manzatto C, Borba M, Gomes de Castro F, Miyashiro S, De Moura J, Arruda R, Brandao P, Richtzenhain. 2012. Preliminary study of Porcine circo virus type 2 and Torque teno sus virus coinfection frequencies in Brazilian pig herds. *The Canadian J. Vet. Res.* 76; 147-179.
21. Grau-Roma L, Fraile L, Segalés J. 2010. Recent advances in the epidemiology diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. *Vet. Journal.*
22. Hamel A.L, Lin L.L, Nayar G.P.S. 1998. Nucleotide sequence of porcine circo virus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J. Virol.* 72; 5262-5267.
23. Hijikata M, Iwata K, Ohta Y, Nakao K, Matsumoto M, Matsumoto H, Kanai K, Baba K, Samokhvalov E.I, Mishiro S. 1999. Genotypes of TT virus (TTV) compared between liver disease patients and healthy individuals using a new PCR system capable of differentiating 1a and 1b types from others. *Arch. Virol.* 144; 2345-2354.

24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
25. Huang Y.W, Ni Y.Y, Dryman B.A, Meng X.J. 2010. Multiple infection of porcine Torque teno virus in a single pig and characterization of the full-length genomic sequences of four U.S. prototype PTTV strains: implication for genotyping of PTTV. *Virology*. 396; 289-297.
26. Kekarainen T, Lopez-Soria S, Segalés J. 2007. Detection of swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 in boar sera and semen. *Theriogenology*. 68; 966-971.
27. Kekarainen T, Segalés J. 2009. Torque teno virus infection in the pig and its potential role as a model of human infection. *Vet. Journal* 180; 163-168.
28. Kekarainen T, Sibila M, Segalés J. 2006. Prevalence of swine Torque teno virus in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected and non-PMWS-affected pigs in Spain. *J. Gen. Virol.* 87; 833-837.
29. Krakowka S, Ellis J.A. 2008. Evaluation of the effects of porcine genogroup 1 Torque teno virus in genotobiotics swine. *Amercian Journal. Vet. Res.* 69 (12); 1623-1629.
30. Leary T.P, Erker J.C, Chalmers M.L, Desai S.M, Mushahwar I.K. 1999. Improved detection systems for TTV virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals. *J. Gen. Virol.* 80; 2115-2120.
31. Leblanc D, Houde A, Gagné MJ, Plante D, Bellon-Gagnon P, Jones TH, Muehlhauser V, Wilhelm B, Avery B, Janecko N, Brassard J. 2014. Prevalence, viral load and characterization of Torque teno sus viruses in liver and pork chop samples at retail. *ICFMH (IUMS)*. 178; 60-64.
32. Lee S.S, Sunyoung S, Jung H, Shin J, Lyoo Y.S. 2010. Quantitative detection of porcine Torque teno virus in porcine circovirus-2-negative and porcine circovirus-associated disease-affected pigs. *Journal Vet. Diagn. Invest.* 22; 261-264.
33. Lee Y, Lin C.M, Jeng C.R, Chang H.W, Chang C.C, Pang V.F. 2015. The pathogenic role of torque teno sus virus 1 and 2 and their correlations with various viral pathogens and host immunocytes in wasting pigs. *Vet. Microbiol.* 180 (3-4); 186-195.
34. Lohse L, Bother A, Hansen A.S, Frederiksen T, Dupont K, Christensen C.S, Baekbo P, Nielsen J. 2008. Examination for a viral co-factor in post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet. Microbiol.* 129 (1/2); 97-107.
35. Madec F, Rose N, Grasland B, Cariolet R, Jestin A. 2008. Post-weaning multisystemic wasting syndrome and other PCV2-related problems in pigs: a 12-year experience. *Transbound Emerg. Dis.* 55 (7); 273-283.
36. Mankertz A, Domingo M, Folch JM, LeCann P, Jestin A, Segalés J, Chmielewicz B, Plana-Duran J, Solke D. 2000. Characterization of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Res.* 66; 65-77.

37. Martelli F, Caprioli A, di Bartolo I, Cibir V, Pezzotti G, Ruggeri F.M, Ostanello F. 2006. Detection of swine Torque teno virus in Italian pig herds. *J. Vet. Med.* 53; 234-238.
38. Martinez L, Kekarainen T, Sibila M, Ruiz-Fons F, Vidal D, Gortazar C, Segalés J. 2006. Torque teno virus (TTV) is highly prevalent in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Vet. Microbiol.* 118; 223-229.
39. Mckeown NE, Fenaux M, Halbur PG, Meng XJ. 2004. Molecular characterization of porcine TT virus, an orphan virus, in pigs from six different countries. *Vet. Microbiol.* 104; 113-117.
40. McNulty M, Dale J, Lukert P, Mankertz A, Randkes J, Tood D. 2000. *Circoviridae* In: van Regenmortel CMFMHV, bishop DHL, Cartens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J. Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR and Wickner RB (eds) Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego; Academic Press, pp. 299-303.
41. Meehan B.M, McNeilly F, Todd D, Kennedy S, Jewhurst V.A, Ellis J.A, Hassard L.E, Clark E.G, Haines D.M, Allan G.M. 1998. Characterization of novel circo virus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J. Gen. Virol.* 79; 2171-2179.
42. Ng T.F.F, Suedmeyer W.K, Wheeler E, Gulland F, Breitbart M. 2009. Novel anellovirus discovered from a mortality event of captive California sea lions. *J. Gen. Virol.* 90; 1256-1261.
43. Niel C, Diniz-Mendes L, Devalle S. 2005. Rolling-circle amplification of Torque teno virus (TTV) complete genomes from human and swine and identification of a novel swine TTV genogroup. *J. Gen. Virol.* 86; 1343-1347.
44. Nieto D, Kekarainen T, Aramouni M, Segalés J. 2013. Torque teno sus virus 1 and 2 distribution in tissues of porcine circovirus type 2-systemic disease affected and age-matched healthy pigs. *Vet. Microbiol.* 163; 364-367.
45. Nishizawa T, Okamoto H, Konoshi K, Konishi K, et al. 1997. A novel ADN virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in post-transfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun.* 241; 92-97.
46. Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, Ukita M, Ikeda H, Lizuka H, Miyakawa Y, Mayumi M. 1998. Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with post transfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatol Res.* 10; 1-16.
47. Okamoto H. 2009. TT viruses in animals. In: de Villiers, E.M., ZurHausen, H. (Eds). *TT viruses. The still elusive human pathogens.* Springer-Verlag, Berlin, pp. 35-52.
48. Pérez LJ. 2011. Molecular detection of torque tenosus virus in lymphoid tissues in concomitant infections with other porcine viral pathogens. *Res Vet Sci.* 91; 54-57.

49. Pozzuto T, Mueller B, Meehan B, Ringler S.S, Mcintosh K.A, Ellis J.A, Mankertz A, Krakowka S. 2009. In utero transmission of porcine torque teno viruses. *Vet. Microbiol.* 137; 375-379.
50. Ritterbusch G.A, Rocha C.A, Mores N, Simon N.L, Zanella E.L, Coldebella A, Ciacci-Zanella J.R. 2012. Natural co-infection of torque teno virus and porcine circovirus 2 in the reproductive apparatus of swine. *Vet. Science.* 92; 519-523.
51. Segalés J, Allan G.M, Domingo M. 2005. Porcine circovirus diseases. *Anim. Health Res. Rev.* 6 (2); 119-142.
52. Segalés J, Martínez-Guino L, Cortey M, Navarro N, Huerta E, Sibila M, Pujols J, Kekarainen T. 2009. Retrospective study on swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 infection from 1985 to 2005 in Spain. *Vet. Microbiol.* 86; 1343-1347.
53. Sibila M, Martínez-Guino L, Huerta E, Llorens A, Mora M, Grau-Roma L, Kekarainen T, Segalés J. 2009. Molecular investigation of Torque teno virus in geographically distinct porcine breeding herds of Sichuan, China. *Vet. Microbiol.* 139; 213-218.
54. Taira O, Ogawa H, Nagao A, Tuchiya K, Nunoya T, Ueda S. 2009. Prevalence of swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 in Japanese swine with suspected post-weaning multisystemic wasting syndrome and porcine respiratory disease complex. *Vet. Microbiol.* 139; 347-350.
55. Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. 2012. Primer3 new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15):e115. Koressaar T, Remm M.
56. Vargas A, Ramírez H, Rangel I, García L. 2014. Lack of relationship between TTSuV 1 and 2 with PCV2-associated reproductive failure in Mexico. IPVS Congress, Cancun, Mexico. June 8-11. P. 548.
57. Vargas A. 2012. Relación del Torque teno virus 1 (TTSuV1) en enfermedad asociada a circovirus porcino tipo 2 [Tesis de Maestría]. Cuautitlán Izcalli, Estado de México: Universidad Nacional Autónoma de México.
58. Zheng H, Ye L, Fang X, Li B, Wang Y, Xiang X, Kong L, Wang W, Zheng Y, Ye L, Wu Z, She Y, Zhou X. 2007. Torque Teno Virus (SANBAN isolate) ORF2 protein suppresses NF- $\kappa$ B pathways via interaction with I $\kappa$ B kinases. *J. Virol.* 81; 11917-11924.