



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**ESTUDIO FILOGENÉTICO DEL TORQUE TENO SUS VIRUS 1a  
(TTSuV1a) Y EL TORQUE TENO SUS VIRUS 1b (TTSuV1b) Y SU  
RELACIÓN CON LA ENFERMEDAD ASOCIADA A CIRCOVIRUS  
PORCINO TIPO 2 (PCVAD)**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD  
ANIMAL**

**ALEJANDRO VARGAS RUIZ**

**TUTOR**

**DR. JOSÉ IVÁN SÁNCHEZ BETANCOURT- FMVZ**

**COMITÉ TUTORAL**

**DR. HUGO RAMÍREZ ÁLVAREZ – FES CUAUTITLÁN**

**DR. ROGELIO ALEJANDRO ALONSO MORALES - FMVZ**

**DRA. LUCIA ANGÉLICA GARCÍA CAMACHO – FES CUAUTITLÁN**

**CUIDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE 2017**



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.

## DEDICATORIAS

- A mi esposo Miguel Angel, por ser el pilar más importante en mi vida, ya que su apoyo fue vital para poder concluir esta etapa académica, y que cada logro individual se convierte en un logro para ambos, muchas gracias por todo.
- A mis padres, por siempre creer en mí y seguir apoyándome, ya que ustedes fueron la semilla para iniciar este largo camino académico que llega a su fin.
- A mis suegras (Hortensia y Emilia) por todo su apoyo que me han brindado a lo largo de todo este viaje académico.
- A la Dra. Lucia Angélica García Camacho, por creer en mí y brindarme todo su apoyo incondicional, así como todos sus consejos, regaños y comentarios que me han permitido crecer en todos los aspectos de mi vida, ya que se convirtió en una madre, amiga y compañera.
- Al Dr. José Iván Sánchez Betancourt, por haber creído en este proyecto, por todo su apoyo, consejos y comentarios que me permitieron crecer durante esta etapa de mi vida, y corroborar el fuerte vínculo que existe entre la FES-Cuautitlán y la FMVZ, todos somos UNAM.
- Al Dr. Hugo Ramírez Álvarez por todas sus comentarios y aportaciones que fueron fundamentales para el desarrollo y finalización de este proyecto.
- A mis compañeros de laboratorio A de la UIM de la FES-Cuautitlán, Ernesto, Michele y Lilia por el excelente ambiente de trabajo, así como el apoyo que me brindaron.

## **AGRADECIMIENTOS.**

- Este proyecto fue apoyado y financiado por:
  - Proyecto CONACYT No. 254244 y la Unidad de Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.
  - Proyecto DGAPA-UNAM (PAPIIT IN203309) y el Laboratorio A: Patología Molecular Veterinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM.
- Al programa de becas CONACYT, por su compromiso en el apoyo a los estudiantes de posgrado.
- Al Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales, Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva y el Dr. Armando Pérez Torres por todas sus aportaciones y comentarios, que permitieron enriquecer este trabajo.

## RESUMEN

El Torque teno sus virus 1a (TTSuV1a) y el Torque teno sus virus 1b (TTSuV1b) son agentes que han sido relacionados con la Enfermedad Asociada a Circovirus Porcino tipo 2 (PCVAD). Para evaluar la relación de ambas especies de *Iotatorquevirus* con la PCVAD mediante PCR anidado, se seleccionaron tejidos incluidos en parafina: 23 casos del Síndrome de Emaciación Multisistémico post-destete (PMWS) y 45 casos de Falla Reproductiva Asociada a PCV2 (FR-PCV2), así como, 32 casos no afectados por Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2). Se seleccionaron 9 casos TTSuV1a+ y 15 casos TTSuV1b+ a partir de casos de PMWS, para amplificar por PCR anidado el ORF2 completo. Se realizaron árboles filogenéticos, matrices de identidad, predicción de aminoácidos, rango de sustitución de nucleótidos por sitio y predicción de epítopes dominantes. Del total de casos, el 33% fueron TTSuV1a+ y 8% TTSuV1b+. Con respecto a las presentaciones, el TTSuV1a fue detectado en casos de PMWS (39%) y FR-PCV2 (33%). El TTSuV1b solo fue amplificado en casos de PMWS (26%). Independientemente del estatus de PCV2, se encontró una menor frecuencia de ambas especies de *Iotatorquevirus* que en otros informes y no hubo relación estadística con la PCVAD ( $\chi^2 < 0,01$ ). Por otro lado, las secuencias mexicanas del ORF2 del TTSuV1a mostraron homología con secuencias del TTSuV1a genotipo B de Asia y Norte América, mientras que las secuencias mexicanas del TTSuV1b mostraron una gran diversidad geográfica. Este trabajo es pionero en la detección de ambas especies de *Iotatorquevirus*, así como, el reporte de secuencias nucleotídicas del ORF1 parcial y el ORF2 completo en México. Finalmente, las diferencias en las frecuencias reportadas a nivel mundial, puede asociarse con la variabilidad genómica del ORF2 pudiendo modificar el potencial patogénico de las especies de *Iotatorquevirus* y su posible asociación con la PCVAD.

**Palabras clave:** FR-PCV2, PCVAD, PMWS, TTSuV1a, TTSuV1b.

## ABSTRACT

Torque teno sus virus1a (TTSuV1a) and Torque teno sus virus 1b (TTSuV1b), are widely reported in association with porcine circovirus associated disease (PCVAD). To evaluate the relationship of both *Iotatorquevirus* species with PCVAD by nested PCR, formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples were selected: Forty-four cases of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), 54 cases of PCV2-associated reproductive failure (RF-PCV2), 22 cases of PCV2-associated granulomatous enteritis (GE-PCV2), and 69 Porcine Circovirus type 2 (PCV2) non-affected cases. Nine TTSuV1a+ and 15 TTSuV1b+ cases from PMWS were selected. To amplify ORF2 complete by nested PCR. Phylogenetic trees, identity matrix, predicting amino acid, nucleotide substitution rate per site and prediction dominant epitopes were performed. Overall, 33% were TTSuV1a+ and 8% TTSuV1b+. Regarding the presentations, TTSuV1a was detected in cases of PMWS (39%), and RF-PCV2 (33%). TTSuV1b was only amplify in cases of PMWS (26%). Regardless of the PCV2-status, a lower frequency of both *Iotatorquevirus* species was found than depicted in other reports and there was no statistical relationship with PCVAD ( $\chi^2 < 0.01$ ). On the other hand, the Mexican ORF2 sequences of TTSuV1a showed homology with TTSuV1a genotype B sequences from Asia and North America, while the Mexican sequences of TTSuV1b showed a great geographical diversity. This work is pioneer in the detection of both species of *Iotatorquevirus*, as well, the report of the nucleotide sequences of the partial ORF1 and the ORF2 complete in Mexico. Finally, the differences in frequencies reported worldwide may be associated with the genomic variability of ORF2 and may modify the pathogenic potential of *Iotatorquevirus* species and their possible association with PCVAD.

**Key words:** PCVAD, PMWS, RF-PCV2, TTSuV1a, TTSuV1b.

<b>ÍNDICE</b>	<b>PÁGINA</b>
➤ Dedicatorias	2
➤ Agradecimientos	3
➤ Resumen	4
➤ Abstract	5
➤ Índice	6
➤ Lista de tablas	8
➤ Lista de figuras	9
➤ Abreviaturas y siglas usadas	10
➤ <b>Capítulo 1: Introducción</b>	<b>11</b>
A. Marco teórico	11
B. Justificación	12
C. Objetivos	13
D. Hipótesis	13
E. Antecedentes	14
F. Genoma viral	15
G. Torque teno sus virus en el mundo	17
➤ <b>Capítulo 2: Estudio retrospectivo del Torque teno sus virus 1a y el Torque teno sus virus 1b y su relación con la Enfermedad Asociada a Circovirus Porcino tipo 2</b>	<b>20</b>
A. Resumen	20
B. Introducción	21
C. Material y métodos	22
1. Selección de casos	22
2. Diseño de iniciadores	23
3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	24
4. Secuenciación	25
5. Análisis de datos	25
D. Resultados	26
E. Discusión	30

F. Agradecimientos	35
G. Referencias	35
➤ <b>Capítulo 3: Estudio filogenético del ORF2 del Torque teno sus virus 1a y el Torque teno sus virus 1b en casos del Síndrome de Emaciación Multisistémico Post-destete (PMWS) en México</b>	40
A. Resumen	40
B. Introducción	41
C. Material y métodos	43
1. Selección de casos	43
2. Diseño de iniciadores	43
3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	43
4. Secuenciación	44
5. Filogenia y análisis de secuencias	44
6. Predicción de epítopes dominantes	45
D. Resultados	45
E. Discusión	55
F. Agradecimientos	59
G. Referencias	59
➤ <b>Capítulo 4: Discusión general y conclusiones</b>	65
➤ Referencias	70
➤ <b>Apéndice 1: Retrospective Study of the Relationship of Torque teno sus virus 1a and Torque teno sus virus 1b with Porcine Circovirus Associated Disease.</b>	79
➤ <b>Apéndice 2: Phylogenetic study of the ORF2 of Torque teno sus virus 1a (TTSuV1a) and Torque teno sus virus 1b (TTSuV1b) in cases of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in Mexico.</b>	88



## CAPÍTULO 2

- **Tabla I.** Secuencia de iniciadores diseñados para la amplificación de secuencias específicas del ORF1 del TTSuV1a y del TTSuV1b. 24
- **Tabla II.** Frecuencias del total de casos del PCR anidado de la región ORF1 del TTSuV1a y del TTSuV1b. 29
- **Tabla III.** Frecuencias de casos de PMWS del PCR anidado de la región ORF1 del TTSuV1a y del TTSuV1b. 29
- **Tabla IV.** Frecuencias de casos de FR-PCV2 del PCR anidado de la región ORF1 del TTSuV1a y del TTSuV1b. 30

## CAPÍTULO 3

- **Tabla I.** Cambio en los aminoácidos del ORF2 de las secuencias mexicanas del TTSuV1a con respecto a las secuencias del TTSuV1a clasificadas como genotipo B descritas en el GenBank. 48
- **Tabla II.** Cambio en los aminoácidos del ORF2 de las secuencias mexicanas del TTSuV1b con respecto a las secuencias del TTSuV1b y el TTSuVκ2 descritas en el GenBank. 53

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>CAPÍTULO 1</b>	
• <b>Figura 1.</b> Mapa genómico de ambas especies de <i>Iotatorquevirus</i> .	<b>15</b>
<b>CAPÍTULO 2</b>	
• <b>Figura 1.</b> Distribución geográfica de la población porcina en la república mexicana y origen de las muestras.	<b>23</b>
• <b>Figura 2.</b> Reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR) de las especies de <i>Iotatorquevirus</i> a partir de casos positivos a la Enfermedad Asociada a Circovirus Porcino tipo 2 (PCVAD).	<b>26</b>
• <b>Figura 3.</b> Árbol filogenético del TTSuV1a mostrando la identidad de diferentes secuencias de nucleótidos de Torque teno virus con números de acceso del GenBank, y país de origen.	<b>27</b>
• <b>Figura 4.</b> Árbol filogenético del TTSuV1b mostrando la identidad de diferentes secuencias de nucleótidos de Torque teno virus con números de acceso del GenBank, y país de origen.	<b>28</b>
<b>CAPÍTULO 3</b>	
• <b>Figura 1.</b> Árbol filogenético que muestra las secuencias de nucleótidos del ORF2 de diferentes genotipos del Torque teno sus virus 1a con números de acceso del GenBank, así como país de origen.	<b>46</b>
• <b>Figura 2.</b> Predicción de aminoácidos del ORF2 para el TTSuV1a.	<b>48</b>
• <b>Figura 3.</b> Predicción de epítopes dominantes del ORF2 del TTSuV1a.	<b>49</b>
• <b>Figura 4.</b> Árbol filogenético que muestra las secuencias de nucleótidos del ORF2 de diferentes genotipos del Torque teno sus virus 1b con números de acceso del GenBank, así como país de origen.	<b>51</b>
• <b>Figura 5.</b> Predicción de aminoácidos del ORF2 para el TTSuV1b.	<b>52</b>
• <b>Figura 6.</b> Predicción de epítopes dominantes del ORF2 del TTSuV1b.	<b>54</b>

## ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
- CAV: Virus de la anemia de las aves
- Cl<sub>2</sub>Mg: Cloruro de magnesio
- COX: Ciclo oxigenasa
- dNTP: desoxinucleótido trifosfato
- FR-PCV2: Falla Reproductiva Asociada a Circovirus Porcino tipo 2
- H-E: Hematoxilina-eosina
- HIS: Hibridación *in situ*
- HPRT1: Hipoxantina fosforribosil transferasa 1
- IFN $\gamma$ : Interferón gamma
- IKK $\beta$  o  $\alpha$ : Proteína cinasa
- I $\kappa$ B: Proteína inhibidora B
- IL: Interleucina
- Kb: Kilobase
- mM: Milimolar
- MWM: Marcador de peso molecular
- $\mu$ l: Microlitro
- ng: Nanogramo
- NF- $\kappa$ B: Factor de transcripción nuclear kappa B.
- ORF: Marco de lectura abierta
- pb: Pares de base
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- PCVAD: Enfermedad Asociada a Circovirus Porcino tipo 2
- PCV2: Circovirus Porcino tipo 2
- PDNS: Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina
- pmol: Picomol
- PMWS: Síndrome de Emaciación Multisistémico Post-destete
- PNP: Neumonía necrotizante proliferativa
- PTP-asa: Proteína-tirosina fosfatasa
- TTSuV1a: Torque teno sus virus 1a
- TTSuV1b: Torque teno sus virus 1b
- TTSuV $\kappa$ 2: Torque teno sus virus  $\kappa$ 2
- TTV: Torque teno virus
- TTMV: Torque teno mini virus
- UTR: Región sin traducir
- vPRRS: Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino

# **CAPÍTULO 1:**

## **INTRODUCCIÓN**

### **A. MARCO TEÓRICO**

En la actualidad no hay un cultivo celular o método de aislamiento descrito para especies de *Iotatorquevirus*. Los protocolos de PCR son una herramienta útil y confiable para la detección de este tipo de agentes, lo cuales poseen características particulares como el ser ubicuos en la población porcina, además de poseer una alta variabilidad en su genoma viral, particularmente observado en el ORF2 el cual se sugiere participa en la replicación, identificándose cambios en la secuencia de nucleótidos y por consecuencia también en la secuencia de aminoácidos, principalmente en el Torque teno sus virus 1a (TTSuV1a) (Cadar *et al.*, 2013); adicionalmente basado en esta variabilidad del ORF2 dos trabajos han sugerido subclasificar al TTSuV1a en cuatro genotipos (a, b, c y d) y al TTSuV1b en dos genotipos (a y b) (Cortey *et al.*, 2012, Cadar *et al.*, 2013). Los estudios realizados hasta el momento no han sido concluyentes acerca de la participación del TTSuV1a como agente primario. No obstante, la inoculación de TTSuV1a de campo en cerdos gnotobióticos demostró su capacidad de infectar y producir lesiones compatibles con PMWS (neumonía intersticial, atrofia de timo, glomerulopatía membranosa y ligeros infiltrados linfocíticos-histiocíticos en el hígado) pero no reprodujo manifestaciones clínicas (Kekarainen *et al.*, 2006). Adicionalmente, la inoculación del TTSuV1a previa a la del PCV2 facilitó el desarrollo de PMWS en cerdos gnotobióticos dado que la infección única de TTSuV1a o PCV2 no desarrollaron manifestaciones clínicas de la enfermedad (Kekarainen *et al.*, 2006). Por otra parte, la mayoría de los reportes a nivel mundial han descrito una mayor frecuencia del TTSuV1b en tejidos afectados por PMWS (Nieto *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2012; Blömstrom *et al.*, 2012; McMenamy *et al.*, 2013; Teixeira *et al.*, 2013; Vlasakova *et al.*, 2014), las frecuencias de ambas especies de *Iotatorquevirus* en tejidos porcinos afectados por PMWS o en tejidos fetales sin determinar la etiología (Martínez-Guino *et al.*, 2010) son altas (70-100%) principalmente en países del continente europeo como España, Gran Bretaña y Eslovaquia, comparados con frecuencias de entre 30% al 40% reportados en Brasil, Cuba y Japón; por lo que la situación geográfica así como la variabilidad genética de los Torque teno

sus virus pueden influir en la prevalencia y su posible asociación con la PCVAD (Cadar *et al.*, 2013).

## **B. JUSTIFICACIÓN**

Diversos reportes han sugerido la co infección de especies de *Iotatorquevirus* con otros virus, incrementando la severidad de las enfermedades como resultado del sinergismo (Gallei *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2011). Por consiguiente, ambas especies de *Iotatorquevirus* han sido objeto de investigación en el estudio de enfermedades multifactoriales tales como el complejo respiratorio porcino (Taira *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2011; Rammohan *et al.*, 2012) y la PCVAD, que es una de las principales asociaciones descritas (Kekarainen *et al.*, 2006; Ellis *et al.*, 2008; Krakowka *et al.*, 2008; Blömstrom *et al.*, 2010; Aramouni *et al.*, 2011; Aramouni *et al.*, 2013). En conjunto, la información actual no solo revela una alta prevalencia de las especies de *Iotatorquevirus* a nivel mundial, sino también una estrecha asociación en casos de PCVAD pudiendo fungir como el factor X o el elemento desencadenante para el desarrollo de la PCVAD (Segalés, 2009). Sin embargo, la relación del TTSuV1a y el TTSuV1b con el desarrollo de la PCVAD todavía no está claro. Y dado el PCV2 se encuentra distribuido en los estados mexicanos con alta densidad de población porcina (Quintero-Ramírez *et al.*, 2010) y a pesar de que se ha demostrado la presencia del TTSuV1a en cerdos nacionales (Vargas *et al.*, 2012), no se ha reportado el TTSuV1b en México, y en este sentido se desconocen los tipos de TTSuV1a y del TTSuV1b circulantes en las granjas del país y su posible relación con la PCVAD como ha sido reportado en otros trabajos a nivel mundial.

## **C. OBJETIVOS**

### ***General***

- Realizar un análisis filogenético del Torque teno sus virus 1a (TTSuV1a) y del Torque teno sus virus 1b (TTSuV1b) del gen ORF2, presentes en granjas de cerdos nacionales y su relación con la enfermedad asociada a PCV2 (PCVAD).

### ***Particulares***

- Amplificar fragmentos parciales del ORF1 que demuestren la presencia del TTSuV1a y TTSuV1b en México, a partir del ADN de tejidos incluidos en parafina de cerdos infectados de forma natural por PCVAD.
- Establecer la posible relación entre la presencia del Torque teno sus virus 1a y/o el Torque teno sus virus 1b con la PCVAD.
- Obtener secuencias completas del ORF2 del TTSuV1a y del TTSuV1b, a partir de ADN de tejidos incluidos en parafina de cerdos infectados de forma natural por PCVAD.

## **D. HIPÓTESIS**

1. Las secuencias nucleotídicas del TTSuV1a y TTSuV1b son filogenéticamente cercanas a las secuencias descritas del Torque teno sus virus de cerdos infectados en Norteamérica.
2. El TTSuV1b está asociado a la PCVAD mientras que el TTSuV1a no tiene relación.

## E. ANTECEDENTES

El Torque teno virus fue descubierto en muestras de pacientes humanos con hepatitis post-transfusional de etiología desconocida en 1997 (Gallei *et al.*, 2010). En humanos los Torque teno virus han sido implicados en hepatitis, falla renal, neoplasias, así como en el incremento de la severidad del asma, condiciones reumatoides y gastritis asociada a *Helicobacter pylori* (Savic *et al.*, 2010).

El Torque teno virus porcino es un agente que ha sido reclasificado a lo largo del tiempo, en 1999 se propuso incluirlo en la familia *Circinoviridae* (Mushahwar *et al.*, 1999; Miyata *et al.*, 1999) por las características que compartía con Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2), en el 2002 se propuso integrarlo a la familia *Circoviridae* formando un género nuevo *Anellovirus* (Yzébe *et al.*, 2002; Blagini *et al.*, 2004), adicionalmente se propusieron 2 genotipos, el Torque teno virus porcino 1 (g1-TTVsw) y el Torque teno virus porcino 2 (g2-TTVsw) (Peng *et al.*, 2002; Niel *et al.*, 2005), en el 2009 el Comité de Taxonomía Viral establece la familia *Anelloviridae* el cual contempla al género *Iotatorquevirus* con dos especies, el torque teno sus virus 1 (TTSuV1) y el Torque teno sus virus 2 (TTSuV2) (Davison, 2017). Con en aumento en la investigación y los avances en la secuenciación diversos trabajos han propuesto clasificaciones nuevas, basado en secuencias completas en el 2010 proponen dos genotipos para el Torque teno virus 1 (TTSuV1a y TTSuV1b) y subtipos para el Torque teno virus 2 (TTSuV2b y TTSuV2c) (Huang *et al.*, 2010), posteriormente se describieron 4 subtipos para el TTSuV1 y 2 para el TTSuV2 (Cortey *et al.*, 2011), finalmente en el 2011 el ICTV basado en la secuenciación del ORF1 establece el género *Iotatorquevirus* con 2 especies, Torque teno sus virus 1a (TTSuV1a antes TTSuV1) y Torque teno sus virus 1b (TTSuV1b antes TTSuV2) y el género *Kappatorquevirus* con la especie Torque teno sus virus  $\kappa 2$  (TTSuV $\kappa 2$  antes TTSuV3) (Davison, 2017).

Aunque existen diversos estudios a nivel mundial en donde han podido demostrar la presencia del TTSuV1a y el TTSuV1b como posible agente asociado a PCV2 en los cuadros del Síndrome de Emaciación Multisistémico Post-destete (PMWS) y el Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina (PDNS), no es clara la asociación, por lo que estudiar la variabilidad genómica de ambas especies de *Iotatorquevirus*, es un punto de partida para

esclarecer la asociación de estos agentes virales con la PCVAD y su posible relación geográfica.

## F. GENOMA VIRAL

Los Torque teno sus virus poseen una cadena sencilla circular de sentido negativo de ADN, se han descrito diferencias entre el TTSuV1a y el TTSuV1b, principalmente en el tamaño. El TTSuV1b posee 2.7 a 2.8 kb (2735-2803 nucleótidos) y el tamaño del TTSuV1a es de 2.8 a 2.9 kb (2863-2913 nucleótidos). Esta diferencia se debe principalmente a varios grupos de inserción-delección situados alrededor de las posiciones 700-900, 1400-1500 y 1650-1750 (Cortey *et al.*, 2011). Adicionalmente se han descrito diferencias en la distribución del genoma viral del Torque teno sus virus 1a (figura 1A), y del Torque teno sus virus 1b (figura 1B).

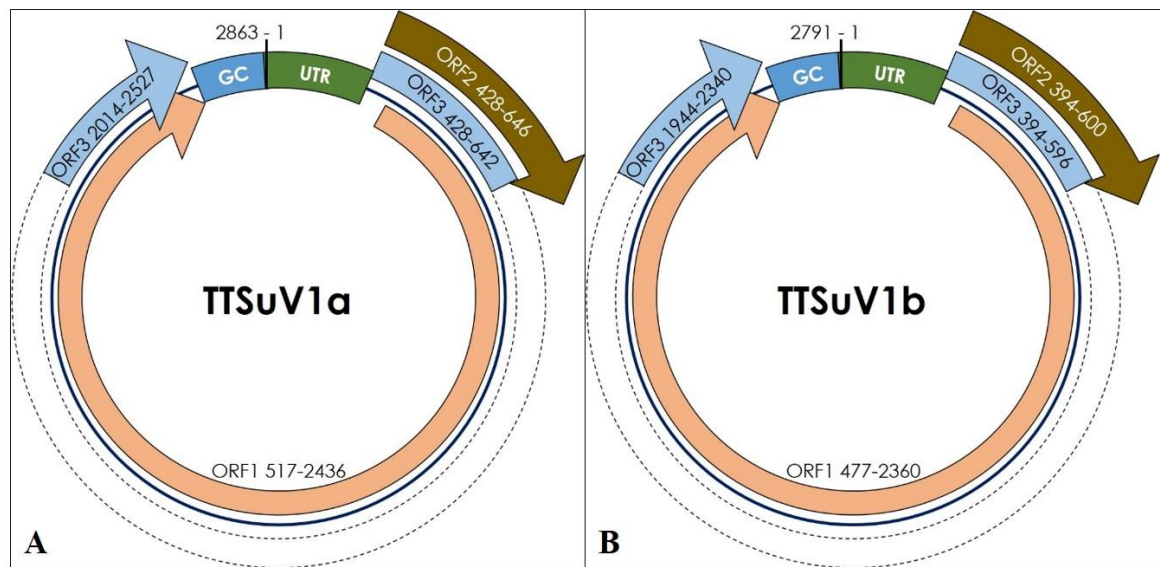


Figura 1. Mapa genómico de ambas especies de *Iotatorquevirus*. (A) TTSuV1a; (B) TTSuV1b.

Los Torque teno virus poseen tres marcos de lectura abiertos, ORF1, ORF2, ORF3 y una región con alto contenido de GC dentro de la región sin traducir (UTR) (Huang *et al.*, 2010; Cortey *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011). El Torque teno sus virus 1a y el Torque teno sus virus 1b poseen un 80% de similitud.



La UTR es una zona altamente conservada en la familia *Anelloviridae*, la cual ha sido utilizada como blanco en pruebas de diagnóstico (Hino, 2006) y como marcador molecular de los Torque teno virus en los cerdos (Segales *et al.*, 2009).

El ORF1 codifica un ARNm de 1914-1950 nucleótidos (638-650 aminoácidos) para el TTSuV1a, mientras que en el TTSuV1b el ARNm es de 1875-1884 nucleótidos (625-628 aminoácidos) (Cortey *et al.*, 2011), por analogía con el virus de la Anemia Infecciosa Aviar y el Circovirus Porcino, el ORF1 codifica la proteína de cápside (Huang *et al.*, 2010; Cortey *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011), esta proteína ha sido detectada en el núcleo y nucleólo de células infectadas experimentalmente, adicionalmente se ha propuesto que esta proteína puede potencialmente contribuir a la supresión del IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (Singh *et al.*, 2016). Por otra parte, se ha descrito que el ORF1 es una región con alta variabilidad y es utilizado por el ICTV para la clasificación de los TTSuV (Davison, 2017).

Con respecto al ORF2 un ARNm de 219-222 nucleótidos (73-74 aminoácidos) y 207 nucleótidos (69 aminoácidos) para el TTSuV1a y el TTSuV1b, respectivamente (Cortey *et al.*, 2011). El ORF2 codifica una proteína-tirosina fosfatasa (PTP-asa) (Bigiani *et al.*, 2009) que ha sido detectada en el citoplasma y núcleo de células experimentalmente infectadas (Singh *et al.*, 2016), esta proteína se ha asociado a la replicación viral y con su potencial patogénico, ya que en analogía con el Torque teno virus humano, esta PTP-asa puede interactuar con el IKK $\alpha$  y el IKK $\beta$  para inhibir I $\kappa$ B $\alpha$  degradando e inhibiendo la activación de la ruta canónica y no canónica del NF- $\kappa$ B, inhibiendo a la IL-6, IL-8 y al COX $_2$ , además de inhibir las señales proinflamatorias, factores de crecimiento y proteínas antiapoptóticas (Hijikata *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 2007). Adicionalmente, el ORF2 es una región con alta variabilidad genética (Cortey *et al.*, 2012; Cadar *et al.*, 2013).

El ORF3 se genera a partir de dos zonas del genoma después del corte y remodelación formando un ARNm de 663-696 nucleótidos (221-232 aminoácidos) para el TTSuV1a y de 600-609 nucleótidos (200-203 aminoácidos) para el TTSuV1b (Cortey *et al.*, 2011), que codifica para una proteína de función desconocida.

## G. TORQUE TENO SUS VIRUS EN EL MUNDO

El TTSuV1a y el TTSuV1b son ubicuos en cerdos domésticos y salvajes, han sido detectados en cerdos en Europa ( Hungría, Italia, Francia y España), Asia (China, Corea, Japón y Tailandia) y América (Canadá y EUA). La co-infección del TTSuV especie 1a (TTSuV1a) con la especie 1b (TTSuV1b) tiene una alta prevalencia en cerdos domésticos y ha sido documentado en todo el mundo. Recientemente, se ha demostrado la existencia de infecciones múltiples de TTSuV con distintos subtipos de la misma especie. Un estudio en Estados Unidos, encontró una prevalencia del 31.5% para TTSuV1a, 16.8% para TTSuV1b y una co-infección entre ambos del 32%. Sólo un 20% del total de las muestras fueron negativas a TTSuV (Huang *et al.*, 2010). En otro estudio, se demostró la infección intrauterina y la presencia del virus en el calostro, lo cual representa una relevante ruta pre y post-parto de infección vertical. Además, se postula que la transmisión congénita puede ser posible ya que se ha detectado el TTSuV en semen (Martínez-Guinó *et al.*, 2009).

Sin embargo, aún no se ha establecido si la infección por TTSuV causa una enfermedad específica como agente primario y sigue siendo debatible, debido a que el agente es ubicuo en cerdos saludables y domésticos en todo el mundo (Huang *et al.*, 2011). No obstante, se menciona que el TTSuV1a puede contribuir al desarrollo de enfermedades severas en co-infección con otros virus. Por otro lado, el TTSuV1b podría estar asociado con abortos en cerdas (Gallei *et al.*, 2010). Por otra parte, la infección experimental con el TTSuV1a en lechones gnotobióticos desarrolló neumonía intersticial, atrofia transitoria del timo, glomerulopatía e infiltrado linfocitario en el hígado (Krakowka *et al.*, 2008; Savic *et al.*, 2010). Lo anterior sugiere que el papel del TTSuV radica en la regulación de la respuesta inmune innata y adaptativa del huésped y, pudiendo contribuir en la asociación y desarrollo de síndromes y relacionarse con otros agentes virales (Savic *et al.*, 2010). Se menciona que la probabilidad de causar o exacerbar enfermedades o síndromes específicos depende de la prevalencia relativa de las especies y/o de la carga viral del TTSuV en el huésped, tal y como sucede en la infección por Circovirus Porcino tipo 2 (Gallei *et al.*, 2010).

A nivel mundial, la principal asociación descrita para el TTSuV es con la Enfermedad Asociada a Circovirus Porcino tipo 2 (PCVAD, por sus siglas en inglés), particularmente en casos de Síndrome de Emaciación Multisistémico Post-destete (PMWS) y de Síndrome de Nefropatía y Dermatitis Porcina (PDNS). De hecho, se ha propuesto que el TTSuV puede ser el factor adicional necesario (factor X) para el desarrollo de la PCVAD (Segalés, 2009). Cabe señalar que la PCVAD tiene un alto impacto económico en la industria porcina al afectar los parámetros productivos y reproductivos. Aunque existen diversos estudios a nivel mundial en donde han podido demostrar la presencia del TTSuV1a y el TTSuV1b (Kekarainen *et al.*, 2006; Krakowka *et al.*, 2008) como posible agente asociado a PCV2 en los cuadros de PMWS y PDNS, no es clara la asociación. Con respecto a la asociación de TTSuV1a y el TTSuV1b con el desarrollo de Falla Reproductiva Asociada a PCV2 (FR-PCV2), no existen datos en la literatura.

Un estudio realizado en México demostró la presencia de TTSuV1a en casos de la PCVAD mediante PCR anidada utilizando iniciadores con bases degeneradas y reveló que no existe una relación estadísticamente significativa entre la presencia de TTSuV1a y el desarrollo de PCVAD, particularmente en casos de Falla Reproductiva Asociada a PCV2. Así mismo, el estudio referido postuló la necesidad de evaluar la participación del TTSuV1b (Vargas *et al.* 2012), esto debido a que en Alemania un estudio reveló una relación estadística significativa entre la presencia del TTSuV1b y la presentación de casos de PMWS (Gallei *et al.* 2010). Por otro lado, un estudio realizado en España que utilizó cerdos afectados y no afectados por PMWS se detectó por PCR en tiempo real una menor frecuencia del TTSuV1a que del TTSuV1b tanto en cerdos sanos como afectados clínicamente.

Otro estudio, se determinó que la presencia de TTSuV1a no mostró una diferencia estadísticamente entre los cerdos sanos y los afectados por PMWS a lo largo del estudio mientras que la presencia del TTSuV1b sólo reveló una diferencia estadística significativa en un muestreo realizado. (Nieto *et al.*, 2011). Adicionalmente, la utilización del sistema de amplificación con iniciadores degenerados empleado por Vargas *et al.*, 2012 se fundamentó en la gran variabilidad en las secuencias disponibles de TTSuV1a en las bases de datos. Lo anterior sugiere la posibilidad de demostrar diferencias entre las secuencias de TTSuV

circulantes en nuestro país mediante un estudio filogenético de ambas especies que puedan esclarecer divergencias acerca de las asociaciones con PCVAD descritas en diferentes localizaciones geográficas.

## CAPÍTULO 2:

### **ESTUDIO RETROSPECTIVO DEL TORQUE TENO SUS VIRUS 1A Y EL TORQUE TENO SUS VIRUS 1B Y SU RELACIÓN CON LA ENFERMEDAD ASOCIADA A CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2**

#### **A. RESUMEN**

El género *Iotatorquevirus* posee 2 especies, el Torque teno sus virus 1a y el Torque teno sus virus 1b, los cuales son ubicuos en la población porcina y han sido ampliamente reportados en asociación con la enfermedad asociada a Circovirus Porcino tipo 2 (PCVAD). Para evaluar la relación con la PCVAD, se utilizaron 100 tejidos fijados en formol embebidos en parafina, para detectar ambas especies de *Iotatorquevirus* por PCR anidado y secuenciación. Sesenta y ocho casos de PCVAD fueron seleccionados, así como, 32 casos no afectados por Circovirus porcino tipo 2 (PCV2). Del total de casos, 33 de 100 casos fueron positivos al Torque teno sus virus 1a y 8 de 100 fueron positivos al Torque teno sus virus 1b. Solo 24 de 68 (35%) casos de la PCVAD fueron positivos al Torque teno sus virus 1a; 39% (9/23) de los casos de Síndrome de Emaciación Multisistémico Post-destete, y 33% (15/45) en los casos de Falla Reproductiva Asociada a PCV2. Entre los casos no afectados por PCV2, el 28% de los casos fueron positivos al Torque teno sus virus 1a y el 6% fueron positivas al Torque teno sus virus 1b. El Torque teno sus virus 1b no fue detectado en casos de falla reproductiva asociada a PCV2. Independientemente del estatus del PCV2, se encontró una baja frecuencia de ambas especies de *Iotatorquevirus* en contraste con lo reportado en otros trabajos y no hay relación estadística con la PCVAD ( $\chi^2 < 0.01$ ). Dado la variabilidad genómica mundial de ambas especies de *Iotatorquevirus*, es posible que las especies predominantes en México compartan una menor identidad con secuencias nucleotídicas de otras regiones. Lo que conduce a diferentes potenciales patogénicos.

**Palabras clave:** *Iotatorquevirus*, TTSuV1a, TTSuV1b, PCV2, PCVAD.

## B. INTRODUCCIÓN

El Torque teno virus (TTV) es un virus ADN de cadena sencilla circular de sentido negativo, que posee 4 marcos de lectura abierta (ORF); ORF1, ORF2, ORF1/1 y ORF2/2 (que forman el ORF3) y una región rica en GC dentro de la región sin traducir (UTR). El TTV se descubrió en muestras de humanos con hepatitis post-transfucional de etiología desconocida en 1997 (Gallei *et al.*, 2010). Actualmente, con base en el comité internacional de taxonomía viral (Davison *et al.*, 2015), todos los TTV humanos y animales están incluidos en la familia *Anelloviridae*. El género *Iotatorquevirus* comprende 2 especies, el TTSuV1a (antes TTSuV1) y el TTSuV1b (antes TTSuV2). La relación filogenética de secuencias parciales ha propuesto 4 biotipos (a, b, c y d) para el TTSuV1a y 2 biotipos (a y b) para el TTSuV1b (Cortey *et al.*, 2011; Cadar *et al.*, 2013). Por otro lado, el género *Kappatorquevirus* posee solo una especie: el Torque teno sus virus  $\kappa 2$  (Davison *et al.*, 2015). En todo el mundo se ha documentado una alta prevalencia de co-infección entre el TTSuV1a y el TTSuV1b. Las especies de *Iotatorquevirus* son ubicuas en cerdos domésticos y salvajes, y han sido identificados en Europa (Hungría, Italia, Francia y España), Asia (China, Corea del Sur, Japón y Tailandia) y Norte América (Estados Unidos y Canadá). La transmisión entre cerdos es horizontal y principalmente por la vía fecal-oral, pero la transmisión a través de otras vías puede ser importante (Cortey *et al.*, 2011). Se desconoce si la infección por el TTSuV1a y TTSuV1b promueve una enfermedad específica como agente primario o en co-infección con otros patógenos (Huang *et al.*, 2011).

Sin embargo, se ha sugerido que en co-infección con otros virus, el TTSuV1a puede promover un incremento en la severidad o virulencia de la enfermedad y el TTSuV1b podría estar asociado a Falla Reproductiva (Gallei *et al.*, 2010). En este escenario, diversos estudios han sugerido la participación de ambas especies de *Iotatorquevirus* en la Enfermedad Asociada a Circovirus Porcino tipo 2 (PCVAD), dado que en los casos del Síndrome de Emaciación Multisistémico Post-destete (PMWS) se ha demostrado una alta prevalencia de especies de *Iotatorquevirus* (Kekarainen *et al.*, 2006, Ellis *et al.*, 2008). Además, se ha podido reproducir manifestaciones clínicas y lesiones características del Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina (PDNS) inoculando al TTSuV1a en lechones gnotobióticos (Krakowka

*et al.*, 2008). De hecho, se ha propuesto al TTSuV1a como el factor adicional (factor X) para el desarrollo de la PCVAD (Segalés *et al.*, 2009). La Enfermedad Asociada a Circovirus Porcino tipo 2 es económicamente importante en la industria porcina, ya que tiene un impacto en los parámetros productivos y reproductivos. A pesar de que todas las presentaciones clínicas de la PCVAD [PMWS, PDNS, Falla Reproductiva Asociada a Circovirus Porcino tipo 2 (FR-PCV2) y Enteritis Granulomatosa] en México han sido confirmadas por hibridación *in situ* (García-Camacho *et al.*, 2006), la prevalencia de las especies de *Iotatorquevirus* o su posible asociación con la PCVAD no ha sido registrada. El objetivo del presente trabajo fue identificar al TTSuV1a y/o al TTSuV1b en casos bien documentados de PCVAD con el fin de evaluar la posible relación con la aparición de la PCVAD en una población de cerdos no vacunada.

## **C. MATERIAL Y MÉTODOS**

### ***1. Selección de casos***

Se seleccionaron 100 tejidos porcinos fijados en formol y embebidos en parafina (linfonodo, bazo, tonsilas y corazones fetales) del 2001-2009. Sesenta y ocho casos fueron de cerdos no vacunados afectados por la PCVAD basado en signos clínicos, lesiones microscópicas características e hibridación *in situ* (Chae 2005). Los casos fueron subdivididos de la siguiente manera: 23 tejidos afectados por PMWS (linfonodos y bazo), exhibiendo depleción linfoide severa e inflamación granulomatosa, y un patrón difuso de hibridación *in situ* (HIS) positivo a PCV2 y 45 casos de FR-PCV2, mostrando corazones fetales con miocarditis, así como, un patrón aleatorio de HIS positivo a PCV2. Los casos positivos a la PCVAD provienen de 13 estados de la República Mexicana con alta densidad de población porcina (figura 1). Adicionalmente, 32 casos no afectados por PCV2 fueron evaluados y consistieron en 12 tejidos (linfonodo y tonsila) de cerdos negativos a PCV2 por HIS de la misma edad de afectación, sanos, no vacunados, provenientes de granjas no afectadas por PCV2 de acuerdo a criterios clínicos (McIntosh *et al.*, 2008) y 20 corazones no afectados por la PCVAD de fetos abortados enviados a diagnóstico. Cada tejido fue evaluado individualmente.



**Figura 1. Distribución geográfica de la población porcina en la República Mexicana.** ■ Estados de la República Mexicana con alta producción porcina ([www.sagarpa.gob.mx](http://www.sagarpa.gob.mx)), ● Estados de origen de las muestras

## 2. *Diseño de iniciadores*

Dada la variabilidad genómica entre las secuencias disponibles, se diseñaron iniciadores con posiciones degeneradas teniendo como blanco el ORF1 del TTSuV1a y el TTSuV1b, usando Primer3 input v.0.4.0 (Untergrasser *et al.*, 2012) y el software BioEdit v7.2.0 (Hall *et al.*, 1999). Diez secuencias del TTSuV1a de diferentes países disponibles en la base de datos del GenBank fueron usadas para el diseño de los iniciadores (números de acceso: HM633249, HM633253, HM633258, AY823990, HM633257, AB076001, GU188045, GU456383, GU456384 y GQ120664). Para el TTSuV1b, 12 secuencias disponibles en el GenBank de diferentes países fueron utilizadas para el diseño de los iniciadores (números de acceso del GenBank: HM633230, JX173484, HQ204188, GU376737, KC461227, JQ782385, HM633218, GU456386, GU188046, GU570207, AY823991 y NC014092). El iniciador antisentido de la primera ronda de PCR contiene solo una base degenerada. Los iniciadores fueron sintetizados comercialmente (IDT Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa).



### 3. Reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR)

La extracción de ADN de todos los tejidos se realizó usando un kit comercial (QIAamp DNAFFPE Tissue kit; Qiagen, Alemania), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, el ADN fue eluido en agua grado molecular en un volumen de 200 µl y almacenado a -20° C. El límite mínimo de detección fue determinado por diluciones seriadas (1:2) y fue de 12.5 ng/µl. Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) anidada se realizaron en un volumen de 50 µl, usando un juego de iniciadores degenerados (Tabla I) en un termociclador (Eppendorf, Hamburg, Alemania) conteniendo 2.5 U de Taq ADN polimerasa (GoTaq Flexi DNA polymerase; Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EUA), buffer para PCR 1x, cloruro de magnesio 2.25 mM (TTSuV1a)/1.5 mM (TTSuV1b), 0.2 mM de cada dideoxinucleótidos (dNTP), 100 pmol de cada iniciador, y 20 ng de templado. Seguido de un ciclo térmico: un paso de activación inicial a 94°C por 3 min seguido por 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 56°C (TTSuV1a) o 53°C (TTSuV1b) y 1 min a 72 °C, finalmente, un paso de extensión por 10 min a 72°C. Los productos de PCR fueron separados electroforéticamente en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. El gel fue visualizado bajo luz ultravioleta (Apollo Instrumentation, Claremont, California, EUA) y foto documentado (Doc-It System; UVP BioImaging Systems, Cambridge, UK).

**Tabla I.** Secuencia de iniciadores diseñados para la amplificación de secuencias específicas del ORF1 del TTSuV1a y del TTSuV1b.

Secuencia 3' - 5'	Iniciador	Producto Esperado	Especie
AACTGGCAGGACCACCTATG	Sentido	481 pb	TTSuV1a
<b>AGTGT</b> BAC <b>H</b> T <b>C</b> HCCACTYC	Antisentido		
AAAGAGACGCTATGGCTGGA	Sentido anidado	255 pb	
<b>TGY</b> TTTT <b>C</b> WGTGTCC <b>C</b> AYTGC	Antisentido anidado		
ATGCCTTACAGACGCTATC	Sentido	605 pb	TTSuV1b
TGTGATGTTYATTTTGGTGGA	Antisentido		
AAGCTCCGGTCATACAATG	Sentido anidado	211 pb	
GCTGTCCATATATTTCTCCAG	Antisentido anidado		

Las letras en negritas indican base degenerada. pb= pares de bases

#### **4. Secuenciación**

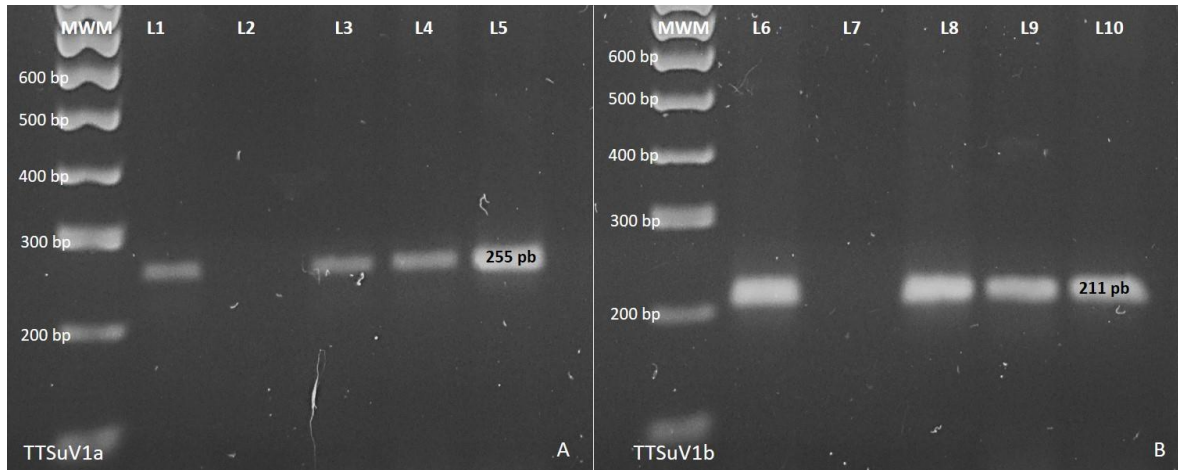
Dos productos amplificados de cada especie se seleccionaron aleatoriamente y se purificaron del gel de agarosa usando un kit comercial (Min Elute Gel Extraction kit; Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuenciación de los productos de PCR purificados se realizó usando un kit de enzimas de alta fidelidad, procesividad, y especificidad (Taq Platinum Polymerase; High Fidelity, Carlsbad, California, EUA). Los iniciadores internos fueron usados para obtener secuencias parciales del ORF1, usando un secuenciador (Model 3100; Applied Biosystems, Foster, California, EUA).

#### **5. Análisis de datos**

Las secuencias de nucleótidos fueron editadas, alineadas y analizadas usando un programa bioinformático (BioEdit v7.2.0) (Hall *et al.*, 1999). El análisis filogenético se realizó usando un análisis de genética evolutiva versión 7 (MEGA7) (Tamura *et al.*, 2013). El árbol filogenético se realizó con el algoritmo maximum likelihood utilizando la distancia Tamura-Neg gamma. El soporte estadístico del árbol se realizó con 1000 bootstrap y los gaps se trataron con delección en parejas. Se realizaron cuadros de contingencia de dos por dos basados en los resultados de la PCR para evaluar la relación del TTSuV1a y el TTSuV1b con la PCVAD usando la prueba de Ji-cuadrada con un intervalo de confianza del 99% ( $P < 0.01$ ).

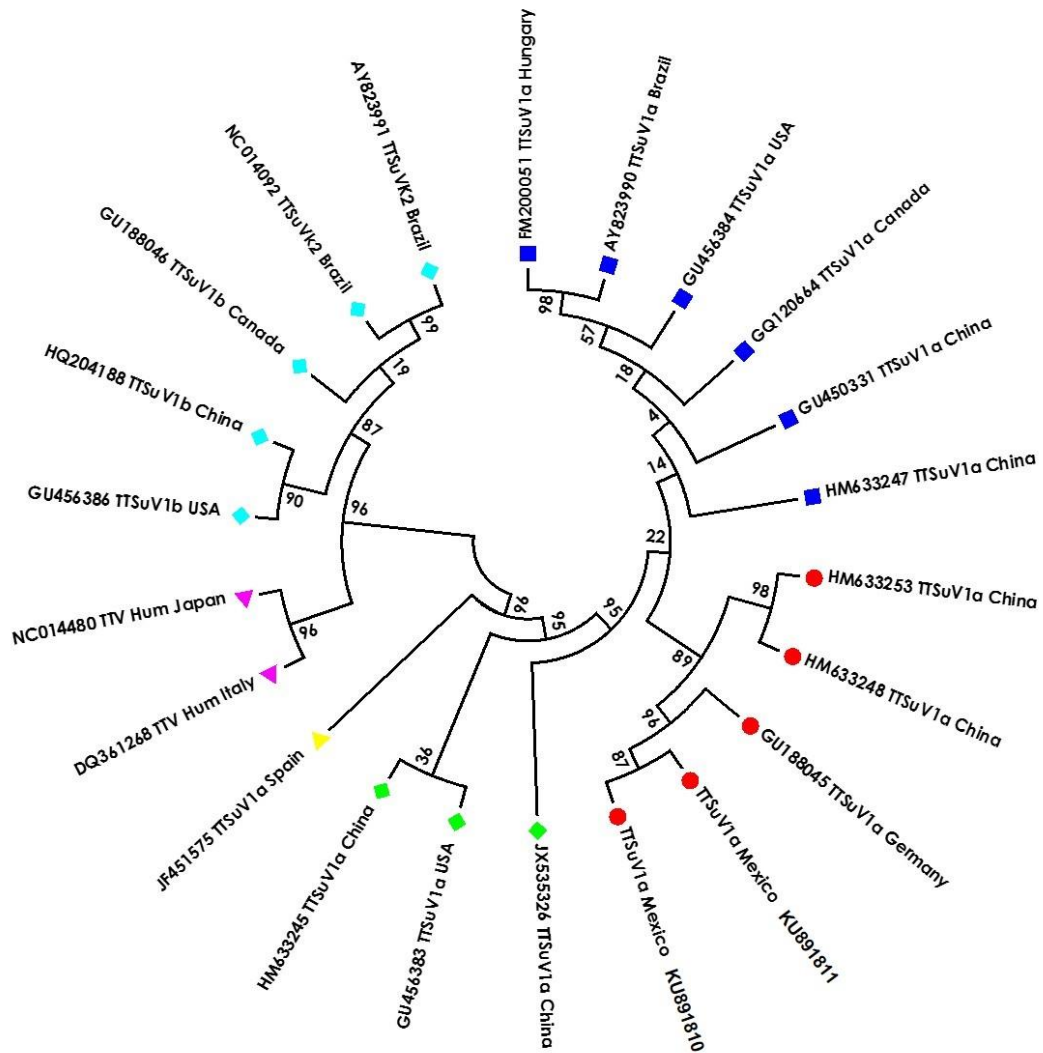
## D. RESULTADOS

Los protocolos de la PCR usando los iniciadores degenerados específicos para amplificar al TTSuV1a y al TTSuV1b fueron optimizados para obtener 255 pb (figura 2A) y 211 pb (figura 2B), respectivamente, a partir de casos de PCVAD.



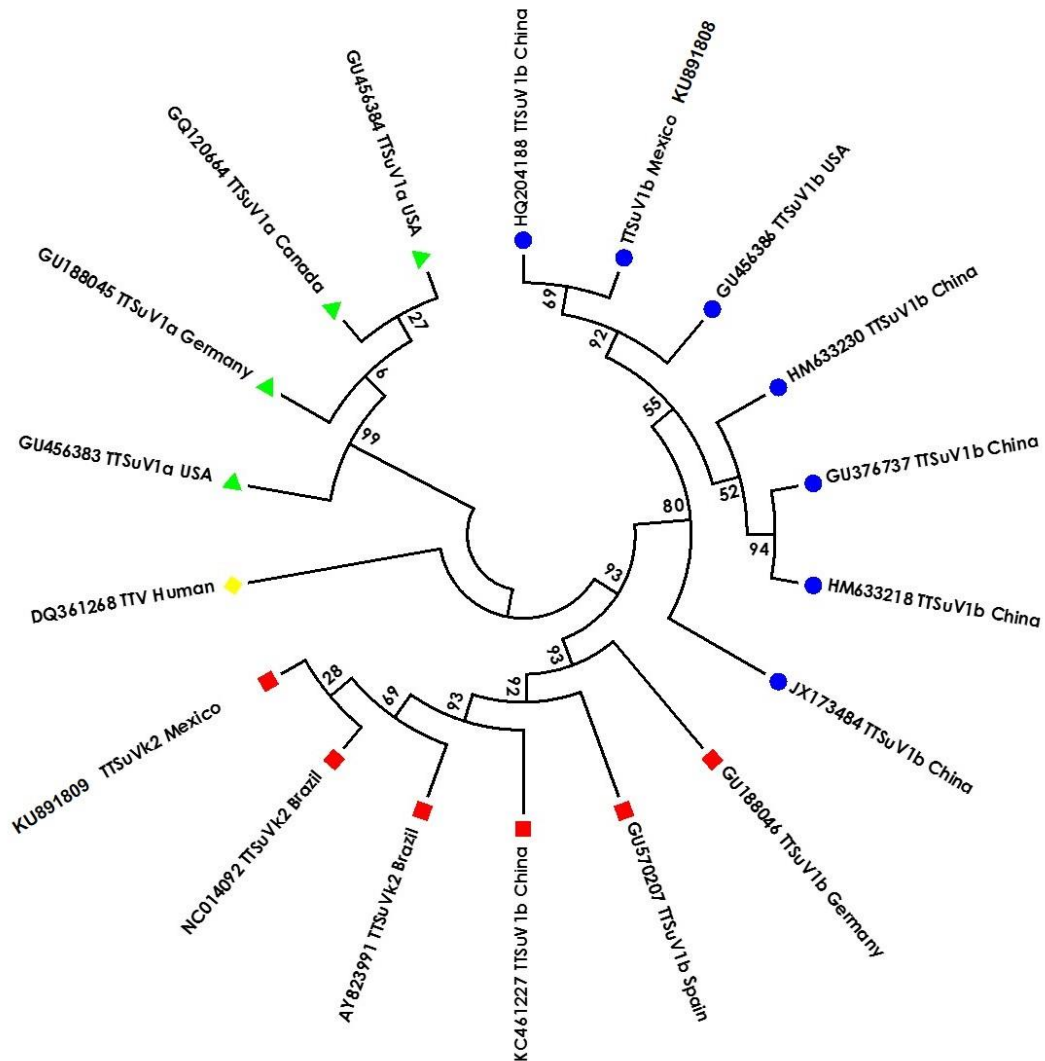
**Figura 2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada de las especies de *Iotatorquevirus* a partir de casos positivos a la enfermedad asociada a circovirus porcino tipo 2 (PCVAD).** (A) PCR anidada del TTSuV1a a partir de casos positivos de falla reproductiva asociada a PCV2 (FR-PCV2). MWM marcador de peso molecular de cien pares de bases. Línea 1 control positivo, línea 2 control negativo, líneas 3, 4 y 5 mostrando productos amplificados de 255 pb. (B) PCR anidada del TTSuV1b a partir de casos positivos al síndrome de emaciación multisistémico post-destete (PMWS). MWM marcador de peso molecular de cien pares de bases. Línea 6 control positivo, línea 7 control negativo, líneas 8, 9 y 10 mostrando productos amplificados de 211 pb, gel de agarosa al 2%.

La secuenciación de 2 productos de cada especie viral probó la especificidad de la PCR (números de acceso en GenBank: KU891810 y KU891811 para el TTSuV1a, KU891808 para el TTSuV1b y KU891809 para el TTSuVκ2). Al alineamiento, las regiones amplificadas de cada especie viral fueron altamente conservadas entre las secuencias disponibles. La topografía del árbol filogenético del TTSuV1a (figura 3) reveló que las secuencias amplificadas pertenecen a la especie 1a, conformando un grupo bien definido (secuencias mexicanas, alemana y chinas) soportado con valores de bootstrap de 89.



**Figura 3. Árbol filogenético construido con secuencias nucleotídicas del TTSuV de distinto tipo genético y región geográfica.** Las secuencias están identificadas con número de acceso y país de origen. Las secuencias del TTSuV1a se distribuyeron en el árbol en tres ramas principales. ● Rama que incluye secuencias mexicanas, alemana y china, ■ Rama que incluye secuencias canadienses, chinas, americana, brasileñas y húngara, ◆ Rama que incluye secuencias china y americana. ▲ Rama que incluye secuencia española. ▼ Rama que incluye secuencia italiana y japonesa del TTV Humano, ◆ Secuencias canadiense, china, americana y brasileña del TTSuV1b. Las secuencias mexicanas (KU891810 y KU891811) pertenecen a 2 casos positivos al TTSuV1a descritos en este trabajo. La longitud de la rama representa la distancia genética entre las secuencias.

Por el contrario, el árbol filogenético construido con secuencias del TTSuV1b (figura 4) mostró que una de las secuencias mexicanas se agrupó con secuencias americanas y chinas, pero la otra secuencia mexicana se ubicó en un clado diferente, revelando una mayor relación filogenética con secuencias brasileñas del TTSuVκ2 (números de acceso en GenBank: AY823991 y NC014092).



**Figura 4. Árbol filogenético construido con secuencias nucleotídicas del TTSuV de distinto tipo genético y región geográfica.** Las secuencias están identificadas con número de acceso y país de origen. Las secuencias del TTSuV1b se distribuyeron en el árbol en dos ramas principales. ● Rama que incluye secuencias chinas, americana y mexicanas, ■ Rama que incluye secuencias alemana, española, brasileña, china y mexicana, ▲ Rama que incluye secuencias americana, alemana y canadiense del TTSuV1a, ◆ Rama que incluye secuencia italiana del TTV Humano. Las secuencias mexicanas (KU891810 y KU891811) pertenecen a 2 casos positivos al TTSuV1a descritos en este trabajo. La longitud de la rama representa la distancia genética entre las secuencias.

En el presente estudio retrospectivo se utilizaron 100 casos, 68 afectados por la PCVAD, y 32 no afectados por la PCVAD. Del total, el 33% (33/100) fueron positivos al TTSuV1a (TTSuV1a+) y el 8% (8/100) fueron positivos al TTSuV1b (TTSuV1b+). Del total de casos de PCVAD, el 35% (24/68) fueron TTSuV1a+ y el 9% (6/68) fueron TTSuV1b+, mientras que el 28% (9/32) y el 6% (2/32) de los casos no afectados fueron positivos al TTSuV1a y al TTSuV1b respectivamente (tabla II).

**Tabla II.** Frecuencias del total de casos evaluados por PCR anidado de la región ORF1 del TTSuV1a y del TTSuV1b. \*No hay diferencia estadística entre los casos de PCVAD afectados y los PCVAD no afectados, con un valor  $P$ - 0.01 (prueba  $J^2$ ).

	TTSuV1a+	TTSuV1a+	TTSuV1a-	TTSuV1a-	Total
	TTSuV1b+	TTSuV1b-	TTSuV1b+	TTSuV1b-	
PCVAD afectados	3	21	3	41	68
PCVAD no afectados	0	9	2	21	32
Total*	3	30	5	62	100

La frecuencia en los casos afectados por PMWS comparados con lechones clínicamente sanos de la misma edad de afectación se muestra en la tabla III. Treinta y uno por ciento (11/35) del total de casos fueron TTSuV1a+ y el 22.8% (8/35) fueron TTSuV1b+. De los cerdos clínicamente sanos evaluados, el 17% (2/12) fueron TTSuV1a+ y el 17% (2/12) fueron TTSuV1b+. Co-infección fue encontrada solo en casos de PMWS, 3% (3/100) en el total de casos y 13% (3/23) en casos afectados por PMWS.

**Tabla III.** Frecuencias de casos de PMWS evaluados por PCR anidado de la región ORF1 del TTSuV1a y del TTSuV1b. \*No hay diferencia estadística entre los casos de PMWS afectados y los tejidos sanos, con un valor  $P$ - 0.01 (prueba  $J^2$ ). <sup>c</sup>Co-infección solo en casos de PMWS afectados.

	TTSuV1a+	TTSuV1a+	TTSuV1a-	TTSuV1a-	Total
	TTSuV1b+	TTSuV1b-	TTSuV1b+	TTSuV1b-	
PMWS afectados	3 <sup>c</sup>	6	3	11	23
Sanos	0	2	2	8	12
Total*	3	8	5	19	35

En cuanto a los casos de falla reproductiva en cerdas (tabla IV), el 34% (22/65) del total de casos y el 33% (15/45) de los casos de FR-PCV2 fueron TTSuV1a+. Del mismo modo, el 35% (7/20) de los casos de falla reproductiva no asociada a PCV2 fueron TTSuV1a+. Ningún caso de falla reproductiva fue positivo al TTSuV1b. No hubo relación estadística entre la manifestación de la PCVAD y la presencia del TTSuV1a o el TTSuV1b mediante la prueba de Ji<sup>2</sup>.

**Tabla IV.** Frecuencias de casos de FR-PCV2 evaluados por PCR anidado de la región ORF1 del TTSuV1a y del TTSuV1b. <sup>a</sup>No hay diferencia estadística entre los casos de FR-PCV2 afectados y los FR-PCV2 no afectados, con un valor *P*- 0.01 (prueba J<sup>2</sup>). <sup>b</sup>Sin casos positivos al TTSuV1b.

	TTSuV1a+	TTSuV1a+	TTSuV1a-	TTSuV1a-	Total
	TTSuV1b+	TTSuV1b-	TTSuV1b+	TTSuV1b-	
FR-PCV2 afectados	0	15	0	30	45
FR-PCV2 no afectados	0	7	0	13	20
Total <sup>a</sup>	0	22	0 <sup>b</sup>	23	65

## E. DISCUSIÓN

Diversos informes han sugerido que la co-infección entre especies de *Iotatorquevirus* con otros virus podría incrementar la severidad de las enfermedades como resultado del sinergismo (Gallei *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2011). En consecuencia, ambas especies de *Iotatorquevirus* han sido objeto de investigación para el estudio de enfermedades multifactoriales como el Complejo Respiratorio Porcino (Pensaert *et al.*, 2004; Taira *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011; Rammohan *et al.*, 2012) y la Enfermedad Asociada a Circovirus Porcino tipo 2 (PCVAD) (Kekarainen *et al.*, 2006; Ellis *et al.*, 2008; Krakowka *et al.*, 2008; Blömstrom *et al.*, 2010; Aramouni *et al.*, 2011; Aramouni *et al.*, 2013).

En casos naturales de PMWS, se ha descrito una alta frecuencia de co-infección entre TTSuV1a y el PCV2 (Kekarainen *et al.*, 2006). En modelos de cerdos gnotobióticos, se propuso que el TTSuV1a podría actuar como factor agravante en casos de PMWS (Ellis *et al.*, 2008) y se reprodujeron lesiones características de PDNS en cerdos negativos a PCV2 después de la inoculación del TTSuV1a y el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (Krakowka *et al.*, 2008). En cerdos afectados por PMWS, se ha encontrado una alta

prevalencia e incremento de la carga viral del TTSuV1b más que el TTSuV1a (Kekarainen *et al.*, 2006; Aramouni *et al.*, 2011). Además, se ha propuesto una posible asociación del TTSuV1b con la Falla Reproductiva en cerdas (Gallei *et al.*, 2010; Sibila *et al.*, 2009). En conjunto, la información actual no sólo revela una alta prevalencia mundial de especies de *Iotatorquevirus*, sino también una estrecha asociación en su detección en casos de PCVAD. Sin embargo, la relación de ambos TTSuV1a y TTSuV1b con el desarrollo de PCVAD todavía no está claro.

En el presente trabajo, la PCR anidada basada en el uso de iniciadores con bases degeneradas demostró amplificar secuencias específicas de TTSuV1a y TTSuV1b del ORF1. Los resultados de la PCR anidada revelaron que TTSuV1a y TTSuV1b están ampliamente distribuidos en los estados mexicanos con alta densidad de población porcina, como se describe para el PCV2 (Quintero-Ramírez *et al.*, 2010). Además, ambas especies fueron amplificadas de los casos de PCVAD. En el escenario actual, sólo el 35% del total de casos fueron positivos para TTSuV1a. Se obtuvieron resultados similares independientemente de la presentación clínica de la PCVAD, 39% (9/23) de los casos de PMWS y 33% (15/45) de los casos de FR-PCV2 (tabla IV). Las frecuencias globales del presente trabajo son muy inferiores a las reportadas en otros países como España (90%), Corea (85%) y China (80%), pero comparables a las frecuencias en Tailandia y Estados Unidos, siendo del 40% y del 33%, respectivamente (McKweon *et al.*, 2004). En la misma serie de casos, se encontró que las frecuencias en Canadá eran muy variables (46-100%); sugiriéndose que la diferencia en la densidad de cerdos podrían influir en la prevalencia de TTSuV1a (McKweon *et al.*, 2004). Sin embargo, se observó una baja prevalencia de TTSuV1a en los estados mexicanos con una mayor proporción de granjas porcinas (<http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2014B401.aspx>). Con respecto al TTSuV1b, los datos recopilados del presente trabajo mostraron mayor disparidad ya que los países europeos han reportado frecuencias más altas (Kekarainen *et al.*, 2006; Blömstrom *et al.*, 2010; Aramouni *et al.*, 2011; Nieto *et al.*, 2011).

La detección de TTSuV1a y / o TTSuV1b se ha asociado fuertemente con casos de PMWS, particularmente en Europa. Entre los cerdos afectados por PMWS, se ha reportado en España



una seroprevalencia de 66-76% de TTSuV1a (Kekarainen *et al.*, 2006; Aramouni *et al.*, 2011; Aramouni *et al.*, 2013; Nieto *et al.*, 2011). Del mismo modo, en Suecia (Blömstrom *et al.*, 2010) y Eslovaquia (Vlasakova *et al.*, 2014) se han registrado frecuencias de 77% y 71,4% para el TTSuV1a, mientras que la detección de TTSuV1a fue de 41% y 58% en Gran Bretaña de tejidos frescos y sueros, respectivamente (McMenamy *et al.*, 2013). Por otro lado, la frecuencia de TTSuV1b encontrada entre los casos afectados por PMWS mostró aún más discrepancia ya que países europeos, como España, han reportado frecuencias del 91% (Kekarainen *et al.*, 2006; Nieto *et al.*, 2011) y 100% (Aramouni *et al.*, 2011) que son consistentes con la prevalencia de cerdos de Suecia de 94% (Blömstrom *et al.*, 2010). Por otra parte, la prevalencia del TTSuV1b reportada en Gran Bretaña (McMenamy *et al.*, 2013) y Eslovaquia (Vlasakova *et al.*, 2014) es del 71% y 64,3% respectivamente.

En conjunto, los hallazgos del presente trabajo en los casos afectados por el PMWS no son consistentes con la prevalencia en Europa, pero son comparables a la prevalencia del TTSuV1a del 48%, 40% y 30% en Brasil (Teixeira *et al.*, 2013), Cuba (Pérez *et al.*, 2011) y Japón (Taira *et al.*, 2009) en ese orden. Sin embargo, estos 2 últimos estudios se realizaron en cerdos emaciados sin confirmación adicional de laboratorio de la condición de PCVAD en tejidos afectados, ya sea por HIS o por inmunohistoquímica. Una explicación podría estar asociada con la relación geográfica dentro de Asia y Norteamérica, pero la prevalencia del TTSuV1b del 94,7% encontrada en Brasil (Teixeira *et al.*, 2013) en cerdos afectados por PCV2 no concuerda con esa hipótesis. La prevalencia de 37.5% y 31% reportada en Cuba (Pérez *et al.*, 2011) y Japón (Taira *et al.*, 2009) es aún más cercana a nuestros hallazgos.

Las diferencias en las prevalencias de las especies de *Iotatorquevirus* entre los estudios podrían estar relacionadas con el tejido blanco utilizado. Por ejemplo, se observaron frecuencias más bajas (41% para TTSuV1a y 79% para TTSuV1b) utilizando como muestra un pool de tejidos frescos (pulmón, hígado, riñón, bazo y linfonodos frescos), comparado con una mayor prevalencia de ambas especies (77% para TTSuV1a y 94% para TTSuV1b) a partir de linfonodos frescos (Blömstrom *et al.*, 2010). Estas diferencias están probablemente asociadas con los tejidos blanco del PCV2, siendo que los linfonodos y el bazo son considerados los órganos principalmente afectados en cardos con PMWS, presentando

mayores cargas virales de PCV2 (Rosell *et al.*, 1999). Por lo que, utilizar muestras de linfonodos frescos podría aumentar la probabilidad de detectar especies del TTSuV (Kekarainen *et al.*, 2006; Aramouni *et al.*, 2011). En el presente estudio, los resultados fueron considerablemente más bajos en comparación con la mayoría de los informes, a pesar de que utilizaron tejidos afectados por PCV2 de manera severa y difusa. En consecuencia, la prevalencia de TTSuV1a y TTSuV1b de cerdos afectados por PMWS parece ser baja en México.

La prevalencia de especies de *Iotatorquevirus* en los casos de PMWS es mayor que en cerdos sanos (Gallei *et al.*, 2010; Blömstrom *et al.*, 2010). En este sentido, aunque los resultados de este trabajo mostraron una prevalencia notablemente menor en cerdos sanos que lo reportado en otros trabajos, se observó la misma tendencia; sin embargo, no hubo relación estadísticamente significativa con la PCVAD. La co-infección de ambas especies de *Iotatorquevirus* en los casos de PMWS fue muy inferior a la reportada en España (76%) (Aramouni *et al.*, 2011), pero similar a la reportada en Japón (10%) (Taira *et al.*, 2009). No obstante, en el trabajo actual, no se observó co-infección en cerdos sanos en la misma edad de afectación por el PMWS (Gallei *et al.*, 2010; Aramouni *et al.*, 2011; Sibila *et al.*, 2009).

La inmunosupresión causada por la infección del PCV2 se ha sugerido como un factor predisponente para el hallazgo de TTSuV1b en casos de PMWS, dado que se ha determinado un aumento en la carga viral del TTSuV1b en cerdos afectados por PMWS, en comparación con la carga viral de los cerdos sanos. Por lo tanto, los cerdos sanos podrían restringir la infección tanto de los *Iotatorquevirus* como del PCV2 (Nieto *et al.*, 2011). Tales reportes concuerdan con los datos del presente trabajo, dado que la co-infección se encontró en una baja proporción y sólo en los casos afectados por PMWS.

Se ha propuesto la interacción del *Iotatorquevirus* en casos falla reproductiva. A juicio de los autores, no hay informes del TTSuV1a ni de TTSuV1b en casos de FR-PCV2. Sin embargo, se ha detectado una mayor seroprevalencia de TTSuV1a (60-75%) en comparación con el TTSuV1b (30-34%) en cerdas sanas (Sibila *et al.*, 2009; Martínez-Guinó *et al.*, 2009). Se ha reportado que en cerdas sanas infectadas con el TTSuV1a o el TTSuV1b mostraron que el

43% y el 19%, de sus lechones fueron TTSuV1a + y TTSuV1b +, respectivamente (Sibila *et al.*, 2009). Del mismo modo, otro trabajo encontró que el 50% de los nacidos muertos fueron TTSuV1a +, pero el 7% de los nacidos muertos fueron TTSuV1b +, lo que sugiere que ambas especies pueden causar infección *in útero* (Martínez-Guinó *et al.*, 2009). La viremia en cerdas es un requisito demostrado para la transmisión vertical, siendo el corazón fetal un tejido frecuentemente afectado (Pensaert *et al.*, 2004). Un trabajo en México, mostró por estudios histopatológicos que los corazones fetales a partir de casos de Falla Reproductiva en cerdas mostraban miocarditis no supurativa, así como, HIS específica de PCV2 en 39% de casos de FR-PCV2 y 47% de transmisión transplacentaria (Enríquez *et al.*, 2012). Estos tejidos fueron incluidos en el presente trabajo, revelando una baja frecuencia del TTSuV1a y una ausencia de TTSuV1b, sin relación estadística significativa entre la aparición de FR-PCV2 y la presencia de TTSuV1a.

Un equipo de trabajo británico utilizó un pool de tejidos de fetos abortados, reportando una tasa de detección del TTSuV1a y TTSuV1b del 17% y 30%; respectivamente. El corazón fetal era parte de este pool de tejidos, pero no se pudo identificar el sitio preciso de la infección por el TTSuV1a o el TTSuV1b (Martínez-Guinó *et al.*, 2010). Los corazones fetales fueron estudiados de forma individual y utilizados en el presente estudio, aunque no se evaluaron otros tejidos fetales que pudieran albergar ambas especies de *Iotatorquevirus*, por lo que no puede descartarse definitivamente la posibilidad de detectar al TTSuV1a o el TTSuV1b en los casos de FR-PCV2. Sin embargo, dado que el corazón fetal es el principal órgano blanco para la transmisión vertical, estos hallazgos preliminares sugieren que la participación de TTSuV1b con respecto a FR-PCV2 es poco probable.

El presente trabajo es notable dado que se utilizó una población porcina no vacunada contra PCV2, dado que, se evaluó desde un período de tiempo anterior al inicio de los programas de inmunización contra PCV2 a través de todo el mundo. Por lo tanto, puede pensarse en una dinámica viral distinta, del cómo se ha influenciado el estado inmunológico de los cerdos, cambiando la naturaleza evolutiva de los virus. Además, se logró amplificar una secuencia que mostro alta homología con el TTSuV $\kappa$ 2, especie perteneciente al género

*Kappatorquevirus* (Davison *et al.*, 2017). Por lo tanto, una mejor clasificación del TTSuV1b es esencial para diferenciarlo de las especies TTSuVκ2.

En conjunto, los datos descritos están de acuerdo con la falta de relación entre las especies de *Iotatorquevirus* y el desarrollo de la PCVAD. Actualmente, se está realizando un amplio estudio filogenético para determinar las especies de *Anelloviridae* en México, así como, su variabilidad genómica la cual podría explicar un potencial patogénico distinto.

*Este trabajo fue publicado en ingles en la revista Canadian Journal of Veterinary Research (Apéndice 1).*

## **F. AGRADECIMIENTOS**

Los autores agradecen a la M. en C. Karina Enriquez Ramírez por su excelente contribución técnica en la hibridación *in situ* para PCV2. Los autores agradecen al programa de becas CONACYT por su compromiso de apoyar a los estudiantes de posgrado. Este trabajo fue apoyado financieramente por el programa DGAPA-UNAM (PAPIIT IN203309).

## **G. REFERENCIAS**

1. Gallei A, Pesch S, Esking WS, Keller C, Ohlinger VF. Porcine Torque teno virus: Determination of viral genomic loads by genogroup-specifics multiplex rt-PCR, detection of frequent multiple infections with genogroups 1 or 2, and establishment of viral full-length sequences. *Vet Microbiol* 2010;143:202-212.
2. Davison AJ, ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus taxonomy 2017. Available at <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> (accessed June 20, 2017).
3. Cortey M, Macera L, Segalés J, Kekarainen T. Genetic variability and phylogeny of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) based on complete genomes. *Vet Microbiol* 2011;148:125-131.
4. Cadar D, Kiss T, Ádám D, Cságola A, Novosel D, Tuboly T. Phylogeny, spatio-temporal phylodynamics and evolutionary scenario of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2

- (TTSuV2) in wild boars: fast dispersal and high genetic diversity. *Vet Microbiol* 2013;166:200-213.
5. Huang YW, Harrall KK, Dryman BA, Beach NM, Kenney SP, Opriessnig T, Vaughn EM, Roof MB, Meng XJ. Expression of the putative ORF1 capsid protein of Torque teno sus virus 2 (TTSuV2) and development of western blot and ELISA serodiagnostic assay: Correlation between TTSuV2 viral load and IgG antibody level in pigs. *Virus Res* 2011;158:79-88.
  6. Kekarainen T, Sibila M, Segalés J. Prevalence of swine Torque teno virus in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and no-PMWS-affected pigs in Spain. *J Gen Virol* 2006;87:833-837.
  7. Ellis JA, Allan G, Krakowka S. Effect of coinfection with genogroup 1 porcine torque teno virus on porcine circovirus type 2-associated post weaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic pigs. *Am J Vet Res* 2008;69:1608-1614.
  8. Krakowka S, Ellis JA. Evaluation of induction of porcine dermatitis and nephropathy syndrome in gnotobiotic pigs with negative results for porcine circovirus type 2. *Am J Vet Res* 2008;69:1615-1622.
  9. Segalés J, Martínez-Guinó L, Cortey M, Navarro N, Huerta E, Sibila M, Pujols J, Kekarainen T. Retrospective study on swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 infection from 1985 to 2005 in Spain. *Vet Microbiol* 2009;134:199–207.
  10. García-Camacho LA, Enriquez-Ramírez K, Araiza-Nava D, Rangel-Rodríguez IC, Quintero-Ramírez V, García-Reyna PB. Porcine circovirus 2-associated syndromes in Mexican farms as detected by in situ hybridization. *Com 57th and 41st Annual Meet Am Coll Vet Pathol and Am S Vet Clin Pathol Vet Pathol* 2006;43:819.
  11. Chae C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet J* 2005;169:326-336.
  12. McIntosh K, Harding J, Parker S, Krakowka S, Allan G, Ellis J. Quantitative polymerase chain reaction for Porcine circovirus-2 in swine feces in a Porcine circovirus disease-affected commercial herd and a nonaffected commercial herd. *Can Vet J* 2008;49:1189-1194.

13. 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.
14. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999;41:95–98.
15. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0. *Mol Biol Evol* 2013;30:2725-2729.
16. Pérez LJ, Díaz de Arce H, Frías MT, Perera CL, Ganges L, Nuñez JI. Molecular detection of torque teno sus virus in lymphoid tissues in concomitant infections with other porcine viral pathogens. *Res Vet Sci* 2011;91:e154-e157.
17. Pensaert B, Sanchez RE, Ladekjaer-Mikkelsen AS, Allan GM, Nauwynck HJ. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. *Vet Microbiol* 2004;98:175-183.
18. Taira O, Ogawa H, Nagao A, Tuchiya K, Nunoya T, Ueda S. Prevalence of swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 in Japanese swine with suspected post-weaning multisystemic wasting syndrome and porcine respiratory disease complex. *Vet Microbiol* 2009;139:347-350.
19. Lee S, Shin J, Kim C, Lyoo YS. Comparison of Torque teno sus Virus (TTSuV) viral load in Porcine circovirus type 2 vaccinated and non-vaccinated pig herds. *Res Vet Sci* 2011;93:1039-1041.
20. Rammohan L, Xue L, Wang C, Chittick W, Ganesan S, Ramamoorthy S. Increased prevalence of torque teno viruses in porcine respiratory disease complex affected pigs. *Vet Microbiol* 2012;157:61-68.
21. Blömstrom A, Belák S, Fossum C, Fuxler L, Wallgren P, Berg M. Studies of porcine circovirus type 2, porcine bocavirus and torque teno virus indicate the presence of multiple viral infections in post weaning multisystemic wasting syndrome pigs. *Virus Res* 2010;152:59-64.
22. Aramouni M, Segalés J, Sibila M, Martin-Valls GE, Nieto D, Kekarainen T. Torque teno sus virus 1 and 2 viral loads in post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) affected pigs. *Vet Microbiol* 2011;153:377-381.

23. Aramouni M, Kekarainen T, Ganges L, Tarradas J, Segalés J. Increased viral load and prevalence of Torque teno sus virus 2 (TTSuV2) in pigs experimentally infected with classical swine fever virus (CSFV). *Virus Res* 2013;172:81-84.
24. Sibila M, Martínez-Guinó L, Huerta E, Mora M, Grau-Roma L, Kekarainen T, Segalés J. Torque teno virus (TTV) infection in sows and suckling piglets. *Vet Microbiol* 2009;137:354-358.
25. Quintero-Ramirez V, Romero Y, Enriquez K, García-Camacho LA. Reproductive failure associated to PCV2 and its distribution in the Mexican Republic. *Proc 21st IPVS Congress* 2010:470.
26. McKweon NE, Fenaux M, Halbur PG, Meng XJ. Molecular characterization of porcine TT virus, an orphan virus, in pigs from six different countries. *Vet Microbiol* 2004;104:113-117.
27. Nieto D, Aramouni M, Grau-Roma L, Segalés J, Kekarainen T. Dynamics of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) DNA loads in serum of healthy and post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected pigs. *Vet Microbiol* 2011;152:284-290.
28. Vlasakova M, Leskova V, Sliz I, Jackova A, Vilcek S. The presence of six potentially pathogenic viruses in pigs suffering from post-weaning multisystemic wasting syndrome. *BMC Vet. Res.* 2014;10:221.
29. McMenamy MJ, McKillen J, McNair I, Duffy C, Blomström A, Charreyre C, Welsh M, Allan G. Detection of a porcine boca-like virus in combination with porcine circovirus type 2 genotypes and torque teno sus virus in pigs from post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected farms in archival samples from Great Britain. *Vet Microbiol* 2013;164:293-298.
30. Teixeira TF, Dezen S, Cibulski SP, Varela APM, Sheffer CM, Holz CL, Fernandes H, Franco AC, Roche PM. Torque teno sus virus (TTSuV) in tissues of pigs and its relation with the occurrence of postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vir Gen* 2013;47:276-281.
31. Rosell C, Segalés J, Plana-Durán J, Balasch M, Rodríguez-Arrijo GM, Kennedy S, Allan GM, McNeilly F, Latimer KS, Domingo M. Pathological, immunohistochemical, and in-

- situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J Comp Pathol* 1999;120:59-78.
32. Martínez-Guinó L, Kekarainen T, Segalés J. Evidence of Torque teno virus (TTV) vertical transmission in swine. *Theriogenology* 2009;71:1390-1395.
  33. Sibila M, Martínez-Guinó L, Huerta E, Llorens A, Mora M, Grau-Roma L, Kekarainen T, Segalés J. Swine torque teno virus (TTV) infection and excretion dynamics in conventional pig farms. *Vet Microbiol* 2009;139:213-218.
  34. Enríquez K. Evaluation of participation of Porcine Circovirus type 2 (PCV2) in reproductive failure. [MSc dissertation]. Cuautitlán Izcalli, Estado de México: National University of Mexico, 2012:38-40.
  35. Martínez-Guinó L, Kekarainen T, Maldonado J, Aramouni M, Llorens A, Segalés J. Torque teno sus virus (TTV) detection in aborted and slaughterhouse collected fetuses. *Theriogenology* 2010;74:277-281.



## CAPÍTULO 3

### **Estudio filogenético del ORF2 del Torque teno sus virus 1a y el Torque teno sus virus 1b en casos del síndrome de emaciación multisistémico post-destete (PMWS) en México.**

#### **A. RESUMEN**

En todo el mundo las especies de Torque teno sus virus han sido consideradas como un posible agente asociado con la Enfermedad Asociada a Circovirus Porcino tipo 2. En México, ha sido demostrada la presencia del TTSuV1a y el TTSuV1b en tejidos afectados por PCV2, sin mostrar relación con el desarrollo de la Enfermedad Asociada a Circovirus Porcino tipo 2. Las especies de *Iotatorquevirus* poseen una alta variabilidad genómica, lo que sugiere diversos genotipos distribuidos geográficamente. Con el fin de validar la variabilidad genómica de ambas especies de *Iotatorquevirus* en cerdos afectados por el síndrome de emaciación multisistémico post-destete, nueve y quince ADN genómicos de cerdos con estatus predeterminado de TTSuV1a y TTSuV1b, respectivamente, fueron utilizados para amplificar el ORF2 completo de cada especie por PCR anidado para realizar un análisis filogenético. Se encontró que las secuencias del TTSuV1a pertenecen al genotipo B, compartiendo origen filogenético, alta similitud en secuencia de nucleótidos y aminoácidos, así como la conformación de sus epítopes dominantes con países comercialmente vinculados, como son EUA, Canadá y China; mientras que las secuencias Mexicanas del TTSuV1b pertenecen al genotipo A, mostrando una mayor divergencia entre sí y mostrando una baja identidad nucleotídica con otras secuencias del genotipo A, sugiriendo cepas endémicas del TTSuV1b. La predicción de la secuencia de aminoácidos de ambas especies de *Iotatorquevirus* exhibieron el motivo conservado de la proteína PTPasa, siendo más conservada entre las secuencias mexicanas del TTSuV1b que entre las secuencias mexicanas del TTSuV1a en las que se encontraron varias sustituciones. Estos cambios influyen en la conformación de los epítopes dominantes, ya que se encontraron diversos arreglos entre los genotipos del TTSuV1a. Los hallazgos del presente trabajo implican que la variabilidad del ORF2 puede modificar potencialmente la replicación viral y la respuesta inmune, explicando una patogenicidad y una prevalencia diferente a nivel mundial.

**Palabras clave:** Filogenia, ORF2, PMWS, TTSuV1a, TTSuV1b.

## B. INTRODUCCIÓN

El Torque teno sus virus es un agente que ha sido reclasificado con el tiempo. En el año de 1999 se propuso incluirlo en la familia *Circoviridae* debido a las características que compartía con el Circovirus porcino (Mushahwar *et al.*, 1999; Miyata *et al.*, 1999); durante el 2002 se propuso integrar este virus en la familia *Circoviridae*, formando un nuevo género llamado *Anellovirus* (Yzébe *et al.*, 2002; Blagini *et al.*, 2004). Adicionalmente, se propusieron 2 genotipos, Torque teno virus porcino 1 (g1-TTVsw) y el Torque teno virus porcino 2 (g2-TTVsw) (Peng *et al.*, 2002; Niel *et al.*, 2005). En el 2009, el Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV) estableció la familia *Anelloviridae*, el cual incluye el género *Iotatorquevirus* con dos especies, el Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) y el Torque teno sus virus 2 (TTSuV2) (Davison 2017). Con el incremento en la investigación y los avances en la secuenciación, diversos trabajos han propuesto nuevas clasificaciones basados en secuencias completas; por ejemplo, en el año 2010 se propusieron dos genotipos para el Torque teno virus 1 (TTSuV1a y TTSuV1b) y subtipos para el Torque teno virus 2 (TTSuV2b y TTSuV2c) (Huang *et al.*, 2010). Subsecuentemente, 4 subtipos fueron descritos para el TTSuV1 y 2 para el TTSuV2 (Cortey *et al.*, 2011); finalmente, el ICTV en el 2011, basado en la secuencia del marco de lectura abierta 1 (ORF1), estableció el género *Iotatorquevirus* con 2 especies, el Torque teno sus virus 1a (TTSuV1a, anteriormente denominado TTSuV1) y el Torque teno sus virus 1b (TTSuV1b, anteriormente denominado TTSuV2), y el género *Kappatorquevirus* con el Torque teno sus virus  $\kappa 2$  (TTSuV $\kappa 2$ , anteriormente denominado TTSuV3) (Davison 2017). Por otro lado, el TTSuV1a tiene 2.8 a 2.9 kb (2863-2913 nucleótidos), mientras que el TTSuV1b posee 2.7 a 2.8 kb (2735-2803 nucleótidos) (Huang *et al.*, 2010). Dicha diferencia se debe principalmente a sitios de inserción y/o delección localizados alrededor de las posiciones 700-900, 1400-1500 y 1650-1750 (Cortey *et al.*, 2011). El Torque teno sus virus posee 3 marcos de lectura abierta (ORF1, ORF2 y ORF3) así como una región no traducible (UTR) corta y rica en GC (Huang *et al.*, 2010; Cortey *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011). La UTR es altamente conservada en la familia *Anelloviridae*, incluidos el TTV humano, la cual es utilizada como blanco en los test de diagnóstico (Hino, 2006). Además, esta zona ha sido propuesta como un marcador molecular para los Toque

teno sus virus en cerdos (Segalés *et al.*, 2009). Por analogía con el virus de la Anemia de los Pollos (CAV) y los Circovirus Porcinos (PCV), se ha establecido que el ORF1 codifica para la proteína de la cápside (Huang *et al.*, 2010; Cortey *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011). El ORF1 posee alta variabilidad, la cual es utilizada por el ICTV para la clasificación de los TTSuV (Davison, 2017). El ORF2 es una región que posee también alta variabilidad genómica (Cortey *et al.*, 2012; Cadar *et al.*, 2013) y codifica una proteína fosfatasa tirosina (PTPasa) la cual es conservada en los Torque teno virus (Biagini *et al.*, 2009). En el Torque teno virus humano, esta proteína ha sido asociada con la replicación viral, así como, con su potencial patogénico dado que disminuye la expresión de la IL-6, IL-8 y el COX<sub>2</sub> al interactuar con el IKK $\beta$  y el IKK $\alpha$  (Hijikata *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 2007), sugiriendo por analogía que estos eventos pueden presentarse en el TTSuV. El ORF3 codifica para una proteína de función desconocida. Hasta el momento, no se ha establecido si la infección por el TTSuV causa una enfermedad específica como agente primario, siendo controversial al ser ubicuo en cerdos domésticos sanos alrededor del mundo (Huang *et al.*, 2011).

Diversos estudios a nivel mundial han demostrado la presencia del TTSuV1a y el TTSuV1b en casos del Síndrome de Emaciación Multisistémico Post-destete (PMWS) y en el Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina (PDNS). Sin embargo, su asociación con la Enfermedad Asociada a Circovirus Porcino tipo 2 (PCVAD) sigue siendo incierta. En México, se realizó un estudio retrospectivo para detectar la presencia del TTSuV1a y el TTSuV1b en casos de PCVAD, el cual encontró una baja frecuencia de ambas especies de *Iotatorquevirus* independientemente del estatus de PCV2 como ha sido descrito en otros trabajos. Además, no hubo relación estadística con la PCVAD. Se propuso que la prevalencia de las especies de *Iotatorquevirus* en México podría deberse a una variabilidad genómica que podría estar relacionado con un potencial patogénico distinto (Vargas-Ruiz *et al.*, 2017). Por lo tanto, el estudio de la variabilidad genómica de ambas especies de *Iotatorquevirus* representa una de las divergencias sobre la asociación con la PCVAD que ha sido asociada a las diferentes regiones geográficas. El objetivo del presente trabajo es realizar un estudio filogenético de la región ORF2 de las especies de *Iotatorquevirus* en casos de PMWS de diferentes regiones de México.

## C. MATERIAL Y MÉTODOS

### a. Selección de casos

Nueve y quince ADN genómicos de cerdos con estatus positivo predeterminado para el TTSuV1a y el TTSuV1b, respectivamente, fueron utilizados para amplificar el gen ORF2 completo por PCR anidada. El ADN genómico se obtuvo del archivo de tejidos fijados en formol embebidos en parafina de una población de cerdos no vacunada, compuesta de linfonodos afectados por PCV2, con estatus confirmado de PMWS basado en los criterios diagnósticos (Chae, 2005) y linfonodos negativos a PCV2 de lechones sanos de la misma edad de afectación. El estatus de las especies de *Iotatorquevirus* fue validado a través de la PCR anidada de un estudio retrospectivo (Vargas-Ruiz *et al.*, 2017).

### b. Diseño de iniciadores

Los iniciadores fueron diseñados para amplificar el gen ORF2 completo del TTSuV1a y el TTSuV1b usando el programa Primer3 input (v4.0.0, Institute for Biomedical Research, Boston, MA) y analizados con el programa BioEdit (v7.2.5, Ibis Bioscience, Carlsbad, CA). Para el diseño de los iniciadores del TTSuV1a, se utilizaron 10 secuencias de diferentes países disponibles en el GenBank (números de acceso HM633249, HM633253, HM633258, AY823990, HM633257, AB076001, GU188045, GU456383, GU456384 y GQ120664). Del mismo modo, se utilizaron 12 secuencias para el TTSuV1b (HM633230, JX173484, HQ204188, GU376737, KC461227, JQ782385, HM633218, GU456386, GU188046, GU570207, AY823991 y NC014092).

### c. Reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR)

La extracción de ADN de todos los tejidos se realizó usando un kit comercial, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (QIAamp DNAFFPE Tissue kit; Qiagen, Alemania). Brevemente, el ADN fue eluido en un volumen de 200 µl de agua grado molecular y almacenado a -20°C. La PCR anidada se realizó en reacciones de 50 µl, conteniendo 2.5 U de ADN Taq polimerasa (GoTaq Flexi DNA polymerase, Promega Corp. Madison, WI) buffer para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 1x, cloruro de magnesio (TTSuV1a

2.25 mM/1.5 mM TTSuV1b), 0.2 mM de cada deoxinucleótido (dNTP), 100 pmol de cada iniciador (TTSuV1a primera ronda sentido 5'-CAGTTCCGAATGGCTGAGTT-3' y antisentido 5'-AGTGTBACHTCHCCACTYC-3'; sentido anidado 5'-ATCCCAGATCCGGAGTCAA-3' y antisentido anidado 5'-TGTTTTTCWGTGTCCCAYTGC-3'; TTSuV1b sentido primera ronda 5'-CTGCAAATTACAGCTAAAACCACA-3' y antisentido 5'-TAAAGGGGAGACAGGTACGGA-3', sentido anidado 5'-CCACAGGAAACTGTGCAAAA-3' y antisentido anidado 5'-CCATTGTATGACCGGAGCTT-3') y 50 ng de templado se colocaron en un termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg, Alemania). Los ciclos de temperatura se realizaron de la siguiente manera: un paso de activación inicial de 94° por 5 min, seguidos de 40 ciclos a 94° por 1 min, 57° (TTSuV1a) o 59° (TTSuV1b) por 1 min y 72° por 1 min, seguidos por un paso de extensión final a 72° por 10 min. Los productos de PCR de tamaño esperado de 456 pb y 509 pb para el TTSuV1a y el TTSuV1b; respectivamente, fueron separados electroforéticamente en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio y visualizados bajo luz ultravioleta (polo, Instrumentation, Claremont CA) y fotodocumentados (Doc-It System, UVP BioImaging Systems, Cambridge, UK).

#### d. *Secuenciación*

Los productos amplificados de cada especie fueron purificados del gel de agarosa usando un kit comercial (Min Elute Gel Extraction kit; Qiagen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuenciación de los productos se realizó utilizando un kit comercial (BigDye Terminator V3.1, Applied Biosystems, USA) y un secuenciador (Applied Biosystems, Foster, California, EUA).

#### e. *Filogenia y análisis de secuencias*

Las secuencias de nucleótidos fueron editadas, alineadas y analizadas con el programa BioEdit (v7.2.5, Ibis Bioscience, Carlsbad, CA). El análisis filogenético se realizó usando el programa MEGA7 (Tamura *et al.*, 2013). Para comparar la similitud y divergencia de las secuencias mexicanas del ORF2 del TTSuV1a, se utilizaron 11 secuencias completas del

TTSuV1a, así como, 20 secuencias parciales clasificadas en genotipos A, B, C y D (Cadare *et al.*, 2013). De forma similar, se utilizaron 6 secuencias completas del TTSuV1b, así como, 17 secuencias parciales clasificadas en genotipos A y B (Cadare *et al.*, 2013). De manera adicional, se utilizó el ORF2 de 2 secuencias completas del TTSuVκ2 para compararlas con las secuencias mexicanas. Posteriormente, se llevó a cabo, una predicción de aminoácidos y una matriz de identidad de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos con el programa BioEdit (v7.2.5, Ibis Bioscience, USA). Los árboles filogenéticos fueron construidos a partir de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos, usando el método Maximum Parsimony, con el programa MEGA7 (Tamura *et al.*, 2013) y la distancia Tamura-Neg gamma. El soporte de las ramas se aseguró con 1000 bootstrap, resultados mayores a 65 (650) fueron considerados significantes. La evaluación de las mutaciones no sinónimas ( $d_N$ ) y sinónimas ( $d_S$ ) y la sustitución de nucleótidos por sitio (rango  $d_N/d_S$ ) del ORF2 completo de cada genotipo de las especies de *Iotatorquevirus* se realizó usando el programa SNAP v2.11 (Korber, 2000) disponible en [www.hiv.lanl.gov](http://www.hiv.lanl.gov) basado en el conjunto de secuencias de nucleótidos alineadas con codones.

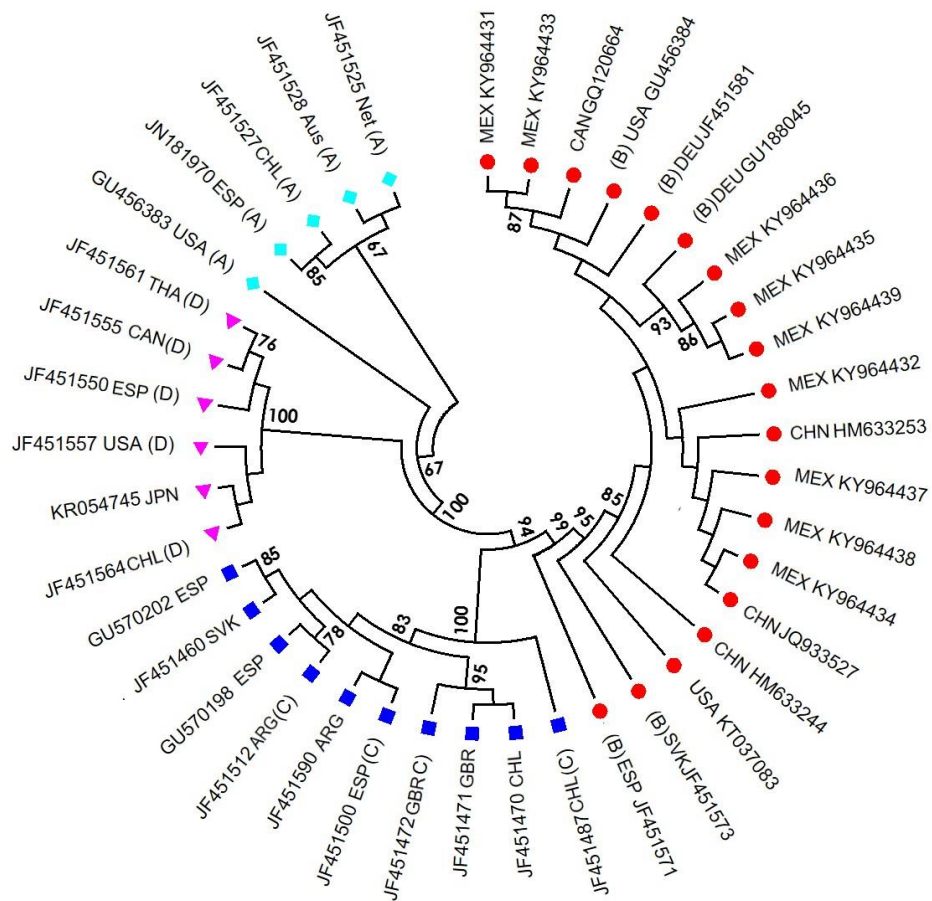
#### *f. Predicción de epítopes dominantes*

La predicción de epítopes dominantes se realizó utilizando el programa Antibody Epitope Prediction (IEDB Analysis Resource, Vita *et al.*, 2014) con el método de predicción de determinantes antigénicos en proteínas (Kolaskar and Tongaonkar 1990).

### **D. RESULTADOS**

Los protocolos de PCR fueron optimizados para obtener productos de 456 pb para el Torque teno sus virus 1a y de 509 pb para el Torque teno sus virus 1b. Nueve productos anidados del TTSuV1a fueron secuenciados, obteniendo 397 nucleótidos que corresponden a 39 nucleótidos terminales de la UTR, 219 nucleótidos del ORF2 completo y 289 nucleótidos del ORF1 (incluidos 120 nucleótidos de empalme con el ORF2). La topografía del árbol filogenético del TTSuV1a (figura 1) mostró una diversificación en cuatro clados bien definidos, correspondiente a los cuatro genotipos reportados. Las nueve secuencias mexicanas del TTSuV1a (KY964431, KY964432, KY964433, KY964434, KY964435,

KY964436, KY964437, KY964438 y KY964439) se asocia con secuencias del genotipo B, pero se incluyeron en un subclado diferente, cuatro secuencias mexicanas se agruparon en la misma rama que incluyo secuencias China; tres secuencias mexicanas se alinearon con una secuencia de Alemania soportada con valores de bootstrap de 92. Las dos secuencias mexicanas restantes se agruparon con una secuencia de Canadá soportada con valores de bootstrap de 85. Adicionalmente, las secuencias de España y Eslovaquia también clasificadas como genotipo B, se encontraron en el mismo clado pero en distinta rama que las secuencias mexicanas.



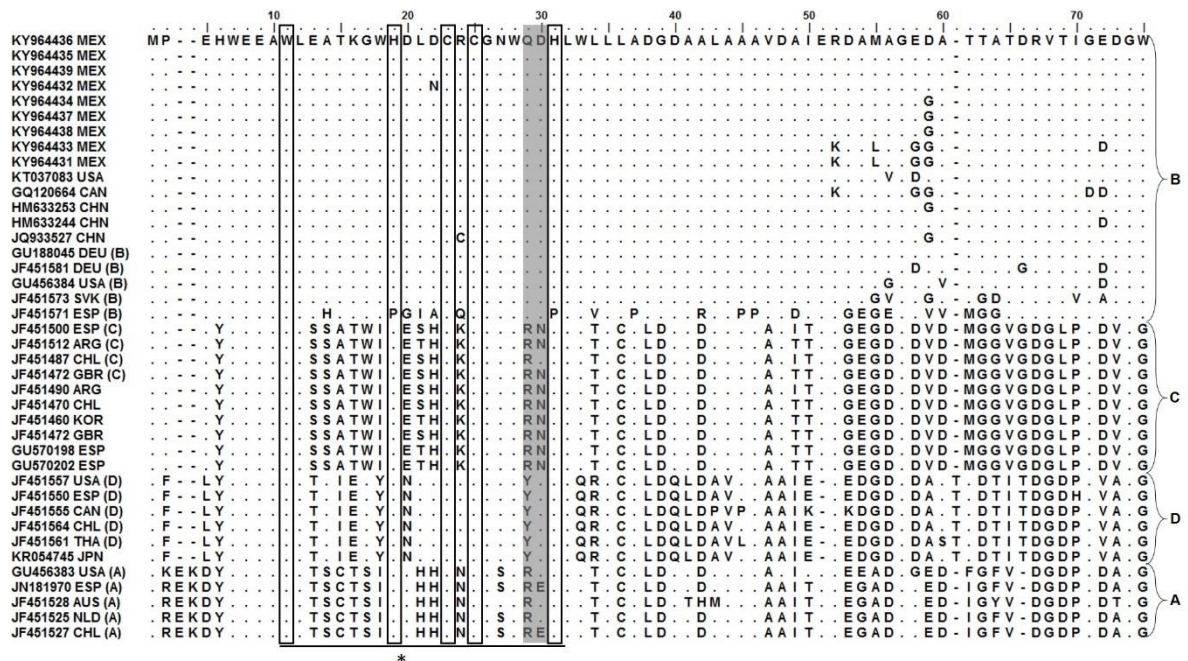
**Figura 1. Árbol filogenético que muestra las secuencias de nucleótidos del ORF2 de diferentes genotipos del Torque teno sus virus 1a con números de acceso del GenBank, así como el país de origen.** Las secuencias se distribuyeron en 4 clados. (Genotipo B ●mexicanas, canadiense, americana, alemana, china, española y eslovaca; genotipo C ■argentinas, chilena, inglesa, española y coreana; genotipo D ▼canadiense, americana, chilena, japonesa, española y tailandesa; genotipo A ◆americana, chilena, española, holandesa y australiana). Las secuencias mexicanas (● KY964431, KY964432, KY964433, KY964434, KY964435, KY964436, KY964437, KY964438 y KY964439) pertenecen a nueve casos positivos del TTSuV1a descritos en este trabajo. La longitud de la rama representa la distancia genética entre las secuencias.

Los rangos de similitud de nucleótidos (nts) y aminoácidos (aa) entre las secuencias mexicanas fue del 93.6%-100% y del 91.6-100%, respectivamente. Por otro lado, los niveles de similitud de nts y aa de las secuencias mexicanas con respecto a los diferentes genotipos B fue del 93.1%-99% y del 91.6%-100% respectivamente. Sin embargo, estos rangos fueron más amplios en comparación con una secuencia española y una secuencia eslovaca que también pertenecen al genotipo B (77.6%-92.6% a nivel de nts y del 65.2%-91.6% a nivel de aa). En cuanto a los rangos de similitud de las secuencias mexicanas con otros genotipos de nts y aa, respectivamente, fueron de: 58.4%-61.6% y del 43%-45.8% para el genotipo C, 50.6%-54.3% y del 37.5%-40% para el genotipo D y del 27.8%-31.9% y del 10.9%-13.6% para el genotipo A.

Por otra parte, la deducción de aminoácidos del genotipo B, C y D genero un ORF de 72 aa mientras que en el genotipo A este un ORF2 fue de 73 aa como se muestra en la figura 2. Además, las secuencias de aa de todos los genotipos de TTSuV1a, exhibieron un dominio conservado (W<sub>x7</sub>H<sub>x3</sub>C<sub>x1</sub>C<sub>x5</sub>H) (figura 2\*), el cual corresponde a la proteína-tirosina fosfatasa (PTPasa) (Peters *et al.*, 2002). Adicionalmente, los dos residuos de aa previos a la última histidina del dominio conservado fue diferente entre los genotipos del TTSuV1a, como se describe a continuación: para el genotipo B (KK→QD), genotipo C (KK→RN), genotipo D (KK→YD) y genotipo A (KK→RD) (figura 2 áreas en gris).

Los cambios en los aminoácidos entre las secuencias mexicanas y las secuencias de referencia del genotipo B se muestran en la tabla I. Por otro lado, los valores de ( $d_N$ ) entre las secuencias mexicanas fueron de 0.015 y entre las secuencias mexicanas y las secuencias de referencia del genotipo B usadas en el presente trabajo fue de 0.043, mientras que el valor de las mutaciones ( $d_S$ ) fue de 0.15 y 0.19 respectivamente. Del mismo modo, el rango  $d_N/d_S$  fue de 15.39 entre las secuencias mexicanas y de 9.33 entre todas las secuencias del genotipo B.





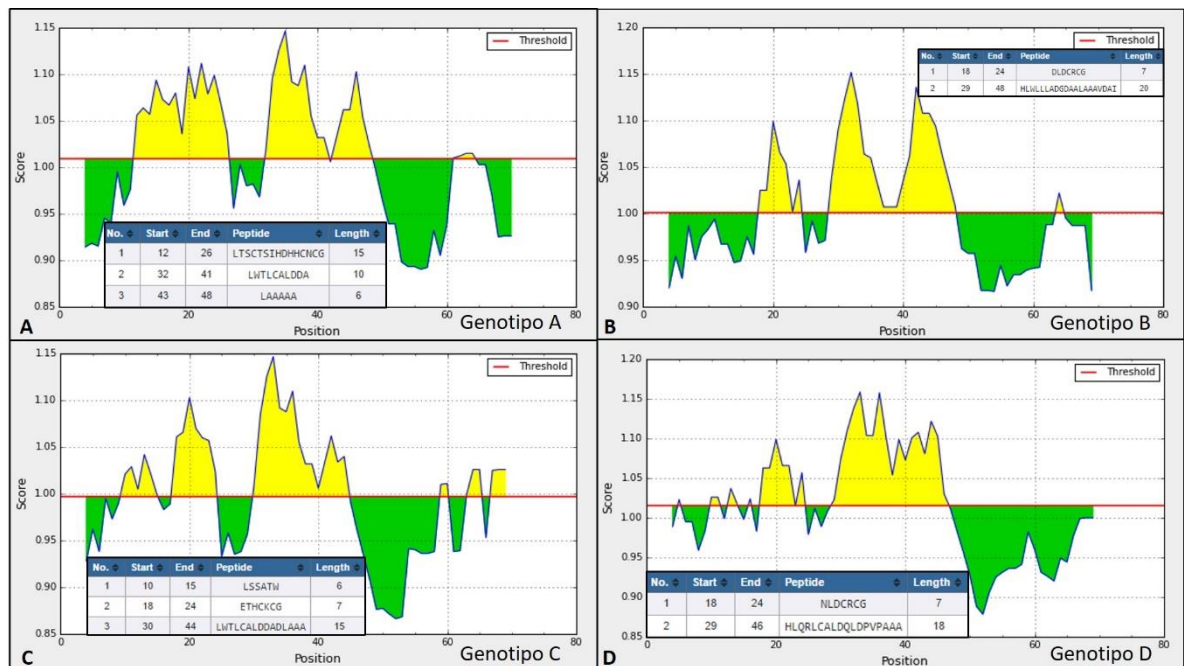
**Figura 2. Predicción de aminoácidos del ORF2 para el TTSuV1a.** Se muestran los cuatro genotipos descritos para TTSuV1a (A, B, C y D) y sus respectivos cambios en aminoácidos. \*Motivos conservados de la proteína tirosina-fosfatasa (PTPasa); El rectángulo gris muestra los dos residuos previos a la última histidina descrita en la PTPasa, que se observa diferente para cada genotipo de TTSuV1a.

**Tabla I.** Cambio en los aminoácidos del ORF2 de las secuencias mexicanas del TTSuV1a con respecto a las secuencias del TTSuV1a clasificadas como genotipo “B” descritas en el GenBank. \*Secuencias mexicanas generadas en este trabajo

Posición	Aminoácido predominante	Aminoácido sustituto	Secuencias con los cambios
20	D	N	KY964432*
50	R	K	KY964431*, KY964433* y GQ120664
53	M	L	KY964431* y KY964433*
56	E	G	KY964431*, KY964433* y GQ120664
57	D	G	KY964432*, KY964431*, KY964433*, KY964437*, y KY964438*, GQ120664, HM633253, JQ933527 y JF451573.
69	E	D	KY964431*

Finalmente, el análisis de la predicción de epítopes dominantes, este arroja cuatro arreglos bien definidos por genotipo: las secuencias del genotipo B (incluyendo las nueve secuencias mexicanas) poseen dos epítopes dominantes, conformados por un péptido de siete aa (DLDCRCG) y un péptido de 20 aa (HLWLLLADGDAALAAAVDAI), como se muestra en la figura 3B (KY964436). Sin embargo, la secuencia de España (JF451571) de este

genotipo mostró 4 péptidos, conformado por uno de: siete (GIACQCG), ocho (PLWVLLPD), ocho (RLAPPVDD) y seis (GEVVMG) aa. Por otro lado, el genotipo C reveló tres epítopes dominantes formado por un péptido de seis aa (LSSATW), un péptido de siete (ETHCKCG) y un péptido de quince (LWTLCALDDADLAAA) figura 3C (JF451512). El genotipo D posee dos epítopes dominantes formado por un péptido de siete aa (NLDCRCG) y otro de 18 aa (HLQRLCALDQLDAVAAAA) figura 3D (JF451557); finalmente, el genotipo A mostró tres epítopes dominantes formados por un péptido de 15 aa (LTSCTSIHDHHCNCG), uno de 10 aa (LWTLCALDDA) y uno de seis aa (LAAAAA) figura 3A (JN181970).

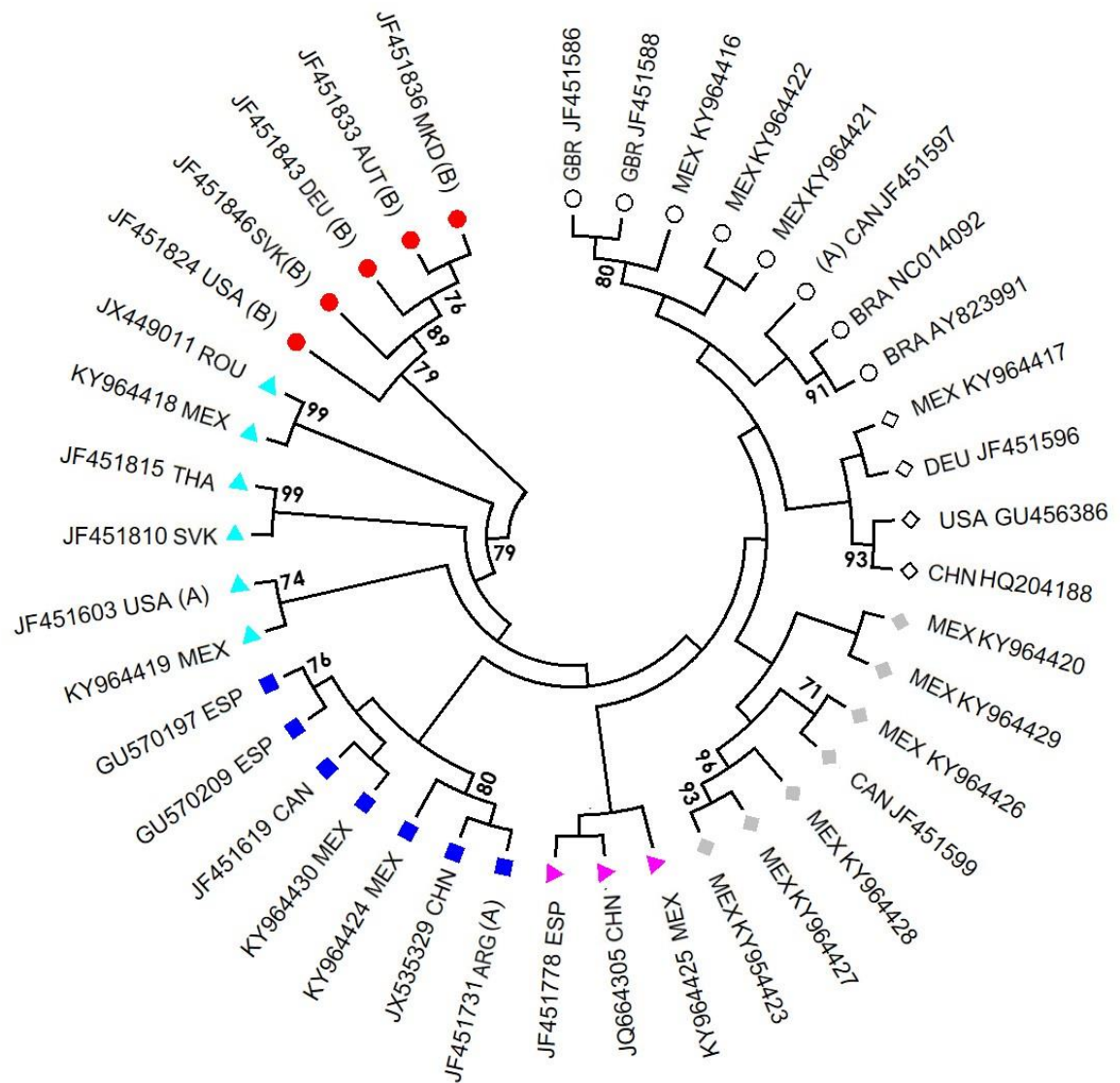


**Figura 3. Predicción de epítopes dominantes del ORF2 del TTSuV1a.** (A) Muestra los tres péptidos que conforman los epítopes dominantes del genotipo A; (B) Muestra los dos péptidos que conforman los epítopes dominantes del genotipo B; (C) Muestra los tres péptidos que conforman los epítopes dominantes del genotipo C; (D) Muestra los dos péptidos que conforman los epítopes dominantes del genotipo D.

Con lo que respecta al TTSuV1b, se secuenciaron 15 productos, obteniéndose 545 nucleótidos, compuestos por 232 nucleótidos terminales de la UTR, 207 nucleótidos del ORF2 completa y 139 nucleótidos del ORF1 (incluidos 126 nucleótidos de empalme con el ORF2). La topografía del árbol filogenético del TTSuV1b (figura 4) reveló una alta diversificación de la relación filogenética entre las secuencias mexicanas, agrupándose en

diferentes clados del genotipo A del TTSuV1b de diferentes países de tres continentes (América, Asia y Europa). Interesantemente, tres secuencias mexicanas (KY964416, KY964421 y KY964422) fueron agrupados en el mismo subclado que secuencias de Reino Unido del TTSuV1b (JF451586 y JF451588) y secuencias brasileñas (AY823991 y NC014092) las cuales fueron reclasificadas como TTSuVκ2.

El análisis de similitud de nts y aa entre las secuencias mexicanas revelaron rangos del 83.5%-99% y del 82.3-100%, respectivamente, pero la similitud entre las secuencias mexicanas y las secuencias del genotipo A del TTSuV1b de diferentes países fue del 91.6%-100% a nivel de nts y del 82.3%-100% a nivel de aa. Sin embargo, la secuencia mexicana (KY964418) y la secuencia de Rumania genotipo A (JX449011), mostraron rangos bajos de similitud de 78.7%-83.5% y del 54.4%-64.7%, respectivamente. Sin embargo, los rangos de similitud identificados entre las secuencias mexicanas del TTSuV1b y las secuencias brasileñas del TTSuVκ2 también fueron menores, 83%-98% y 57.3%-94.1% en nts y aa respectivamente. Finalmente, las secuencias del genotipo B del TTSuV1b mostraron una similitud del 69.5%-86.6% en nts y del 40.5%-82.6% en aa, respectivamente, con las secuencias mexicanas.

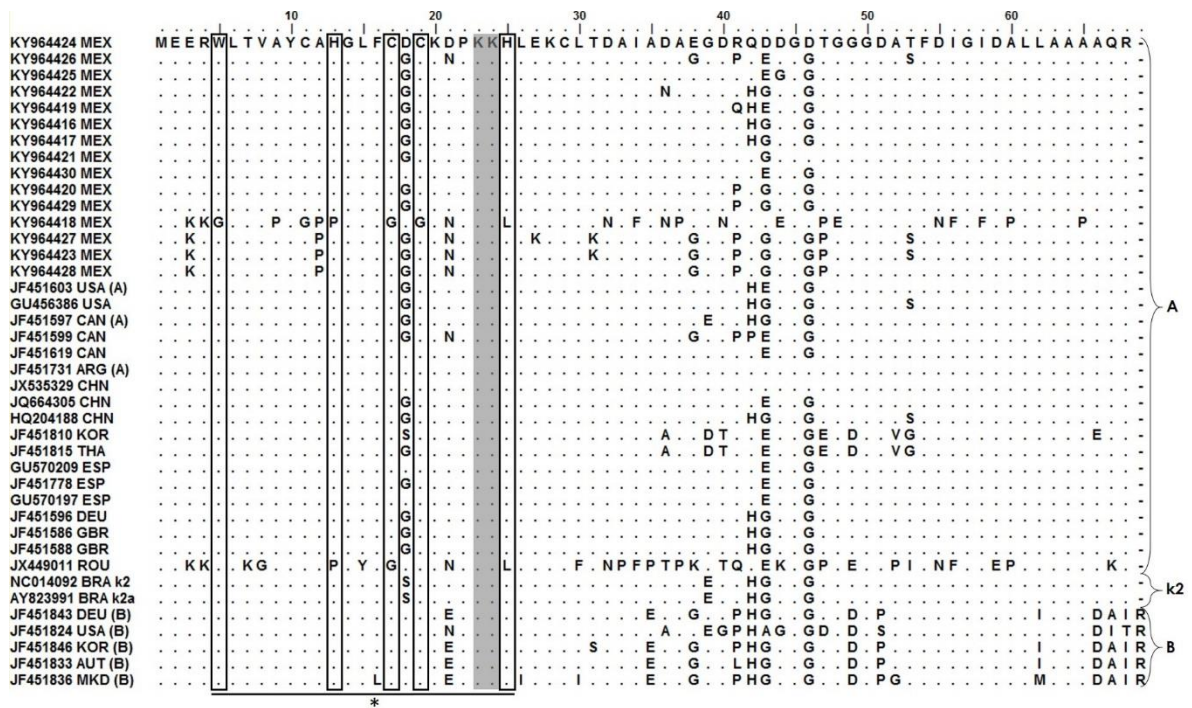


**Figura 4.** Árbol filogenético que muestra las secuencias de nucleótidos del ORF2 de diferentes genotipos del Torque teno sus virus 1b con números de acceso del GenBank, así como país de origen. Genotipo B ● americana, alemana, australiana, coreana y macedonia; ▲ mexicanas (KY964418 y KY964419), americana (genotipo A), Tailandesa y coreana; ■ mexicanas (KY964424 y KY964430), argentina (genotipo A), canadiense, española y china; ▼ mexicana (KY964425), china y española; ◆ mexicanas (KY964427, KY964428, KY964423, KY964429, KY964426 y KY964420) y canadiense, ◇ mexicana (KY964417), Americana, china y alemana; ○ mexicana (KY964416, KY964421 y KY964422), canadiense (genotipo A) y Brasileña (TTSuVκ2). Las secuencias mexicanas (KY964416, KY964417, KY964418, KY964419, KY964420, KY964421, KY964422, KY964423, KY964424, KY964425, KY964426, KY964427, KY964428, KY964429 y KY964430) pertenecen a quince casos positivos del TTSuV1b descritos en este trabajo. La longitud de la rama representa la distancia genética entre las secuencias.



Por otro lado, la deducción de la secuencia de aa del genotipo B y el TTSUV $\kappa$ 2 reveló un ORF2 de 68 aa mientras que el genotipo A exhibió un ORF2 de 69 aa (Figura 6). Todas las secuencias mostraron el motivo conservado de la PTPasa (W<sub>X7</sub>H<sub>X3</sub>C<sub>X1</sub>C<sub>X5</sub>H) como se describió para las secuencias del TTSuV1a. Los dos residuos de lisina antes de la última histidina del dominio de la PTPasa fueron conservados en ambos genotipos y en el TTSuV $\kappa$ 2. En este sentido, los cambios en los aa entre las secuencias mexicanas y las secuencias de referencia del genotipo A y secuencias del TTSuV $\kappa$ 2 se muestran en la tabla II.

Por otra parte, los valores ( $d_N$ ) entre las secuencias mexicanas fue de 0.060 y 0.050 entre las secuencias de referencia del genotipo A y del TTSuV $\kappa$ 2, mientras que el valor ( $d_S$ ) de las mutaciones fue de 0.064 y 0.060 respectivamente, y el rango  $d_N/d_S$  fue de 1.82 entre las secuencias mexicanas, y de 1.98 entre todas las secuencias del genotipo A y del TTSuV $\kappa$ 2.



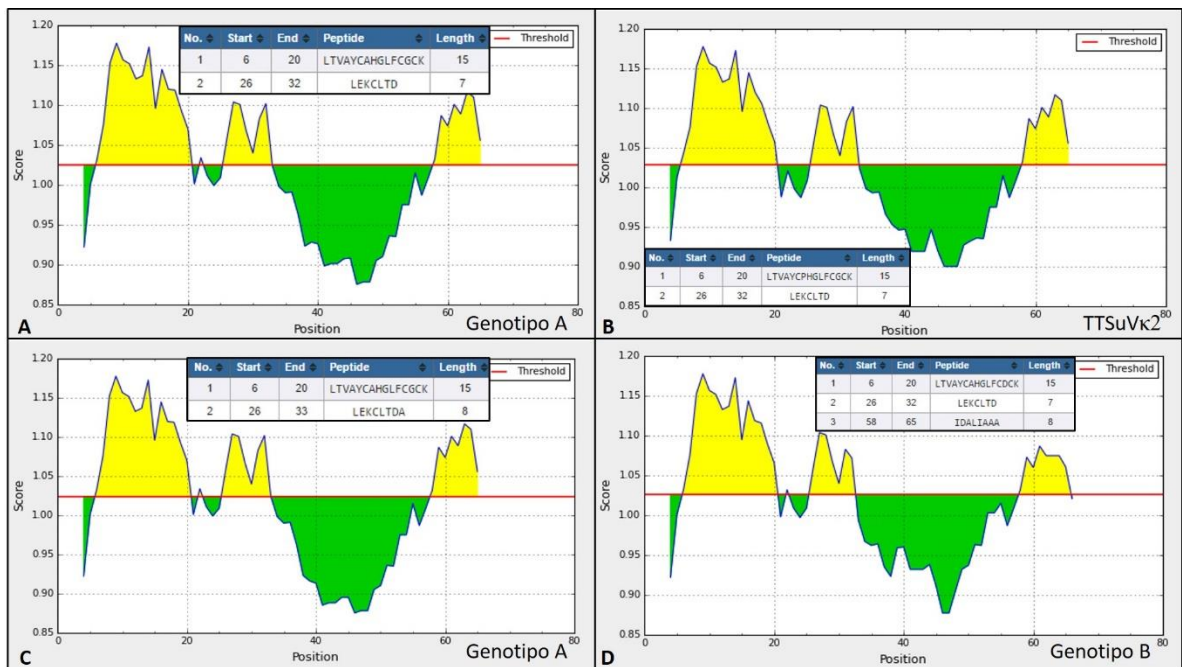
**Figura 5. Predicción de aminoácidos del ORF2 del TTSuV1b.** Se muestran los dos genotipos descritos para TTSuV1b (A y B), la especie TTSuV $\kappa$ 2, así como, las secuencias mexicanas y sus respectivos cambios en aminoácidos. \*Motivos conservados de la proteína tirosina-fosfatasa (PTPasa); El rectángulo gris muestra los dos residuos previos a la última histidina descrita en la PTPasa, que se observa conservado para cada genotipo TTSuV1b y en el TTSuV $\kappa$ 2

**Tabla II.** Cambio en los aminoácidos del ORF2 de las secuencias mexicanas del TTSuV1b con respecto a las secuencias del TTSuV1b y el TTSuVκ2 descritas en el GenBank.

Posición	Aminoácido predominante	Aminoácido sustituto	Secuencias con los cambios
3	E	K	KY964427, KY964428, KY964423, KY964418 y JX449011
12	A	P	KY964427, KY964428, KY964423 y KY964418
18	G	D	KY964424, KY964430, KY964418, GU570209, GU570197, JF451619, JF451731 y JX449011.
21	D	N	KY964426, KY964427, KY964428, KY964423, KY964418, JF451599 y JX449011
27	E	K	KY964427
31	T	K	KY964427 y KY964423
36	D	N	KY964422
38	E	G	KY964426, KY964427, KY964428, KY964423 y JF451599
41	R	P	KY964426, KY964427, KY964428, KY964423, KY964420, KY964429 y JF451599
42	Q	H	KY964416, KY964417, KY964422, KY964419, JF451586, JF451588, JF451596, GU456386, HQ204188, JF451597, NC014092, AY823991 y JF451603
43	G	E	KY964430, KY964426, KY964421, KY964419, GU570209, GU570197, JF451619, JF451599, JQ664305, JF451778, JF451603 y JX449011
44	D	G	KY964425
46	G	D	KY964424, KY964421, KY964418, JX535329, y JF451731
47	T	P	KY964427, KY964428, KY964423, KY964418 y JX449011
53	T	S	KY964426, KY964427, KY964423, GU456386 and HQ204188

La predicción de epítopes dominantes de todas las secuencias comparadas, mostraron dos motivos. Un primer grupo formado por secuencias de China (JX535329 y JQ664305), Argentina (JF451731), Canadá (JF451619), España (GU570197, GU570209 y JF451778), Tailandia (JF451815) y cuatro secuencias de México (KY964424, KY964425, KY964421 y KY964430) las cuales poseen dos epítopes dominantes formados por un péptido de 15 aa (LTVAYCAHGLFCGCK) y un péptido de 8 aa (LEKCLTDA) Figura 6A. El segundo grupo abarca un mayor número de secuencias: EUA (GU456386 y JF451603), Canadá (JF945197 y JF451599), China (HQ204188), Reino Unido (JF451586 y JF451588), Alemania (JF451596), nueve secuencias de México (KY964417, KY964426, KY964422, KY964419, KY964416, KY964420, KY964429, KY964427, KY964423 y KY964428) Figura 6C y dos secuencias de Brasil clasificadas como TTSuVκ2 (AY823991 y NC014092) Figura 6B. Estas secuencias poseen dos epítopes dominantes formados por un péptido de 15 aa (LTVAYCAHGLFCGCK), y uno de siete aa (LEKCLTD). Sin embargo, el genotipo B está

conformado por tres epítopes dominantes formados por un péptido de 15 aa (LTVAYCAHGLFCGCK), uno de siete aa (LEKCLTD) y otro de ocho aa (IDALIAAA) Figura 6D. En el caso de las secuencias de Rumania (JX449011) y de México (KY964418), las cuales se alinearon en la misma rama del árbol filogenético, presentaron importantes diferencias en la conformación de sus epítopes; la secuencia mexicana posee dos epítopes dominantes (uno de 11 aa GLTVPYGPPGL y otro de 10 aa KKLLEKCLTN), mientras que la secuencia Rumana posee un epítopes dominantes (8 aa KGAYCAPG).



**Figura 6. Predicción de los epítopes dominantes del ORF2 del TTSuV1b.** (A) Muestra los dos péptidos que conforman los epítopes dominantes del genotipo A KY964417; (B) Muestra los dos péptidos que conforman los epítopes dominantes del TTSuVκ2; (C) Muestra los dos péptidos que conforman los epítopes dominantes del genotipo A JF451778; (D) Muestra los tres péptidos que conforman los epítopes dominantes del genotipo B.

## E. DISCUSIÓN

Diversos estudios han sugerido co-infección entre las especies de *Iotatorquevirus* y otros agentes virales, incrementando la severidad de las enfermedades como resultado del sinergismo (Gallei *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2011); siendo la principal asociación con la PCVAD (Kekarainen *et al.*, 2006; Ellis *et al.*, 2008; Krakowka *et al.*, 2008; Blömstrom *et al.*, 2010; Aramouni *et al.*, 2011; Aramoni *et al.*, 2013). En casos naturales de PMWS, se ha descrito una alta frecuencia del TTSuV1a y el PCV2 (Kekarainen *et al.*, 2006). En un modelo usando lechones gnotobioticos, el TTSuV1a fue propuesto como un posible factor desencadenante para el desarrollo de PMWS (Ellis *et al.*, 2008). Adicionalmente, el PDNS pudo reproducirse en cerdos negativos a PCV2, inoculando previamente al TTSuV1a y al virus del PRRS (Krakowka *et al.*, 2008). Por otro lado, la seroprevalencia del TTSuV1a en Europa ha sido alta, siendo del 66-76% en España (Kekarainen *et al.*, 2008; Aramouni *et al.*, 2011; Aramouni *et al.*, 2013; Nieto *et al.*, 2011), 77% en Suecia (Blömstrom *et al.*, 2010), 71.4% en Eslovaquia (Vlasakova *et al.*, 2014), mientras que en Gran Bretaña es de 41-48% pero a partir de tejidos frescos (McMenamy *et al.*, 2013). Sin embargo, otros informes de Brasil (Teixeira *et al.*, 2013), Cuba (Pérez *et al.*, 2011) y Japón (Taira *et al.*, 2009) mostraron valores del 48%, 40% y 30% respectivamente. Por otro lado, los datos del TTSuV1b son aún más contrastantes, ya que España ha reportado frecuencias del 91% (Kekarainen *et al.*, 2006; Nieto *et al.*, 2011) al 100% (Aramouni *et al.*, 2011), consistente con el 94% reportado en Suecia (Blömstrom *et al.*, 2010) y el 64% reportado en Reino Unido (McMenamy *et al.*, 2013) y Eslovaquia (Vlasakova *et al.*, 2014). Dichas prevalencias son considerablemente diferentes a lo reportado en un estudio retrospectivo en México, en el cual la prevalencia de ambas especies de *Iotatorquevirus* fue notablemente menor y adicionalmente no se encontró relación significativa con la observación de la PCVAD en cerdos no vacunados (Vargas-Ruiz *et al.*, 2017). Los datos reunidos de diversos estudios sugieren que la prevalencia de las especies de *Iotatorquevirus* podría estar relacionada con el origen geográfico. Dada la variabilidad genómica, es posible que las cepas mexicanas compartan una menor identidad genética con cepas europeas, lo que podría sugerir un potencial patogénico distinto.



Se afirma que la alteración de los genes virales funcionales debido a la presencia de inserciones, deleciones o cambios en la secuencia de nucleótidos o aminoácidos puede tener diferentes repercusiones en el ciclo patogénico, evolutivo o infectivo de los agentes virales (Biagini *et al.*, 2009). Debido a que el ORF2 de ambas especies de *Iotatorquevirus* codifica para una proteína-tirosina fosfatasa (PTPasa) conservada, la cual está implicada en la replicación y en su potencial patogénico (Bigiani *et al.*, 2009), la variabilidad en la secuencia de esta región puede representar un potencial patogénico distinto.

El gen ORF2 del TTSuV1a posee una alta variabilidad, el cual ha sido utilizado para la clasificación de 4 genotipos: A, B, C y D (Cortey *et al.*, 2012; Cadar *et al.*, 2013). Además, se sabe que el comercio mundial de cerdos contribuye con la diversidad de los virus (Cortey *et al.*, 2012). Debido a que el análisis filogenético reveló que las secuencias mexicanas poseen una alta identidad de nts con las secuencias de Norte América (EUA y Canadá) y Asia (China) del genotipo B. Dado el estrecho vínculo comercial de México con esos países, tal similitud podría explicar el origen de las cepas de TTSuV1a presentes actualmente en la población de cerdos mexicanos. Por otro lado, el genotipo A del TTSuV1a no ha sido reportado en América (Cortey *et al.*, 2012; Cadar *et al.*, 2013). Dado que este genotipo mostró los niveles de similitud de nts y aa más bajos en el presente trabajo, es factible que tal disimilitud contribuya a las marcadas diferencias en las frecuencias reportadas en México con respecto a los países europeos donde se encuentra comúnmente el genotipo A.

Por otro lado, el TTV humano, el Torque teno mini virus y el CAV poseen dos residuos de lisina (KK) antes del último residuo de histidina en el sitio conservado de la PTPasa (Biagino *et al.*, 2009; Peters *et al.*, 2002); sin embargo, en el TTSuV1a ha sido reportado un cambio en el primer residuo de lisina (K→R/Q/Y) (Cadar *et al.*, 2013). En este estudio, se pudo identificar la sustitución de ambos residuos de lisina variando entre los genotipos del TTSuV1a: A (KK→RD), B (KK→QD), C (KK→RN) y D (KK→YD). Estas sustituciones pueden modificar la replicación viral, ya que los cambios en los dos residuos de lisina en el CAV modifican la replicación, atenuando este virus (Peters *et al.*, 2006; Peters *et al.*, 2007). En este escenario, las marcadas diferencias en las prevalencias que han sido encontradas a nivel mundial muestran un rango del 80%-90% en España y China (McKweon *et al.*, 2004)

a valores más bajos como del 40%-33% reportado en EUA (McKweon *et al.*, 2004) y México (Vargas *et al.*, 2012), lo cual podría deberse a cambios en los aa en los residuos de lisina entre los diferentes genotipos del TTSuV1a. Tales variaciones pueden disminuir la habilidad del huésped para iniciar una respuesta inmune mediante por la supresión del ORF2 al Factor de transcripción nuclear kappa B (Zheng *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2016).

La estructura terciaria de las proteínas se debe a muchas interacciones donde la hidrofobicidad de sus aa juega un rol determinante. Un cambio conformacional en el sitio preciso de los epítomos dominantes puede tener un impacto relevante en la función inmune, particularmente en la producción de inmunoglobulinas. Se ha reportado la presencia de IgGs capaces de unirse a productos del ORF1 (Jarasova *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013; Giménez-Lirola *et al.*, 2014; Nieto *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2016) y el ORF2 (Jiménez-Melsio *et al.*, 2015) del TTSuV1a y el TTSuV1b.

Es importante enfatizar que las secuencias del genotipo B del TTSuV1a mexicanas, de Norte América y de Asia comparten los epítomos dominantes, lo que sugiere una vez más una posible relación geográfica. Por el contrario, la secuencia del genotipo B del TTSuV1a de España mostró una región distinta de epítomos dominantes con respecto a las secuencias del ORF2 de Norte América del genotipo B, así como los genotipos A, C y D. Dichas secuencias mostraron una mayor distancia filogenética con las secuencias mexicanas, dado que se encontraron en un clado diferente y con una menor similitud en nts y aa. Sosteniendo la afirmación de la disparidad geográfica.

Con lo que respecta al TTSuV1b, el árbol filogenético mostró una amplia distribución de las secuencias mexicanas, observándose valores bajos de bootstrap, lo cual puede sugerir la presencia de cepas endémicas de México. Por otro lado, las secuencias pertenecientes al TTSuVκ2 indicaron una mayor homología con secuencias mexicanas del TTSuV1b. Este hallazgo es relevante dado que representan dos agentes virales de diferentes géneros, sugiriendo que el ORF2 es conservado en ambos géneros; a diferencia del ORF1, el cual es usado por el Comité Internacional de Taxonomía Viral (Davison, 2017) para clasificarlos en diferentes géneros.

El ORF2 del TTSuV1b, posee dos residuos de lisina (KK) conservados antes del último residuo de histidina en el motivo de la PTPasa como se describe para el TTSuV1a (Cortey *et al.*, 2012; Cadar *et al.*, 2013). Este motivo está presente en las secuencias mexicanas del TTSuV1b reportadas en el presente trabajo. Cabe mencionar, que estos mismos residuos de lisina de la PTPasa también son conservados en ambos genotipos A y B, así como en el TTSuVκ2. Adicionalmente, la variabilidad genética del TTSuV1b fue menor que la del TTSuV1a (Cadar *et al.*, 2013), hecho que es consistente con los datos obtenidos en el presente estudio. En este sentido, la predicción de epítopes dominantes reveló un motivo que tienen la mayoría de las secuencias mexicanas. Así como las secuencias de referencia del genotipo A del TTSuV1b y del TTSuVκ2 del GenBank. Sin embargo, las secuencias de Eslovaquia, Rumania y una secuencia de México (KY964418), que compartieron el mismo clado del árbol filogenético con altos valores de bootstrap, poseen diferentes regiones de sus epítopes dominantes con respecto a la mayoría de las secuencias descritas en este trabajo.

En conjunto, los datos obtenidos son de notable importancia dado que demuestran que las cepas mexicanas de ambas especies de *Iotatorquevirus* son considerablemente diferentes a las reportadas a nivel mundial, particularmente de cepas europeas y proporciona información relevante sobre el potencial patogénico de las cepas distribuidas geográficamente. Se deben realizar estudios filogenéticos adicionales para validar la variabilidad de los genotipos endémicos de los Torque teno virus porcinos en todo el mundo, con el fin de establecer su participación en casos clínicos severos al interactuar con el PCV2 o con otros virus que generen pérdidas económicas para la industria porcina.

*Este trabajo fue enviado para su publicación en la revista Archives of virology (Apéndice 2).*

## **F. AGRADECIMIENTOS**

Este proyecto fue financiado por el proyecto CONACYT No. 254244 y la Unidad de Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. También, agradecemos a DGAPA-UNAM (PAPITT IN203309) y al programa de becas CONACYT por su compromiso de apoyar a los estudiantes de posgrado.

## **G. REFERENCIAS**

1. Mushahwar I, Erker J, Muerhoff A, Leary T, Simons J, Birkenmeyer L, Chalmers M, Pilot-Matias T, Dexai S. Molecular and biophysical characterization of TT virus: Evidence for a new virus family infecting humans. *Proc Natl Acad Sci.* 1999;96:3177-3182.
2. Miyata H, Tsunoda H, Kazi A, Yamada A, Khan M, Murakami J, Kamahora T, Shiraki K, Hino S. Identificación de una región rica en GC de 113 nucleótidos para completar el genoma circular, de cadena simple de ADN del virus TT, el primer circovirus humano. *J Virol.* 1999;73:3582-3586.
3. Yzebe D, Xueref S, Baratin D, Bouletreau A, Fabry J, Vanhems P. TT virus. A review of the literature. *Panminerva Med.* 2002;44:167–177.
4. Biagini P, Todd D, Bendinelli M. Anelloviruses. In *Virus taxonomy: Eight Report 455 of the International Committee on taxonomy viruses.* Elsevier/Academis press. 2004:335-341.
5. Peng Y, Nishizawa T, Takahashi M, Ishikawa T, Yoshikawa A, Okamoto H. Analysis of the entire genome of thirteen TT virus variants clasificables into the fourth and fifth genetic groups, isolated from viremic infants. *Arch Virol.* 2002;147:21-41.
6. Niel C, Diniz-Mendes L, Devalle S. Rolling-circle amplification of Torque teno virus (TTV) complete genomes from human and swine sera and identificación de un nuevo grupo genético de TTV. *J Gen Virol.* 2005;86:1343–1347.
7. Davison AJ, ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses. *Virus taxonomy* 2017. Disponible en: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
8. Huang YW, Dryman BA, Harrall KK, Vaughn EM, Roof MB, Meng XJ. Development of SYBR green-based real time PCR and duplex nested PCR assay for quantitation and

- differential detection of species or type specific porcine Torque Teno viruses. *Journal of virological methods*. 2010;170:140-148.
9. Cortey M, Macera L, Segalés J, Kekarainen T. Genetic variability and phylogeny of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) based on complete genomes. *Vet Microbiol*. 2011;148:125-131.
  10. Huang YW, Harrall KK, Dryman BA, Beach NM, Kenney SP, Opriessnig T, Vaughn EM, Roof MB, Meng XJ. Expression of the putative ORF1 capsid protein of Torque teno sus virus 2 (TTSuV2) and development of western blot and ELISA serodiagnostic assay: Correlation between TTSuV2 viral load and IgG antibody level in pigs. *Virus Res*. 2011;158:79-88.
  11. Hino S and Miyata H. Torque teno virus (TTV): current status. *Rev Med Virol*. 2006;17:45-47.
  12. Segalés J, Martínez-Guinó L, Cortey M, Navarro N, Huerta E, Sibila M, Pujols J, Kekarainen T. Retrospective study on swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 infection from 1985 to 2005 in Spain. *Vet Microbiol*. 2009;134:199–207.
  13. Cortey M, Pileri E, Segales J, Kekarainen T. Globalisation and global trade influence molecular viral population genetics of Torque Teno Sus Viruses 1 and 2 in pigs. *Vet Microbiol*. 2012;156:81-87.
  14. Cadar D, Kiss T, Ádám D, Cságola A, Novosel D, Tuboly T. Phylogeny, spatio-temporal phylodynamics and evolutionary scenario of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) in wild boars: fast dispersal and high genetic diversity. *Vet Microbiol*. 2013;166:200-213.
  15. Biagini P. Classification of TTV and related virus (anelloviruses). *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009;331:21-33.
  16. Hijikata M, Iwata K, Ohta Y, Nakao K, Matsumoto M, Matsumoto H, Kanai K, Baba K, Samokhvalov E, Mishiro S. 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*. 1999;144:2345–2354.

17. Zheng H, Ye L, Fang X, Li B, Wang Y, Xiang X, Kong L, Wang W, Zeng Y, Ye L, Wu Z, She Y, Zhou X. Torque Teno Virus (SANBAN Isolate) ORF2 Protein Suppresses NF- $\kappa$ B Pathways via Interaction with I $\kappa$ B Kinases. *J Virol.* 2007;81(21):11917-11924.
18. Vargas-Ruiz A, Ramírez -Álvarez H, Sánchez-Betancourt JI, Quintero-Ramírez V, Rangel-Rodríguez CI, Vázquez-Pérez J, García-Camacho LA. Retrospective Study of the Relationship of Torque teno sus virus 1a and Torque teno sus virus 1b with Porcine Circovirus Associated Disease. *Can J Vet Res.* 2017;81:178-185.
19. Chae C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet J.* 2005;169:326-336.
20. Tamura K, Stecher G, Peterson D, FilipSKI A, Kumar S. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0. *Mol Biol Evol.* 2013;30:2725-2729.
21. Korber B. HIV Signature and Sequence Variation Analysis. *Computational Analysis of HIV Molecular Sequences.* 2000; Chapter 4, pages 55-72.
22. Vita R, Overton JA, Greenbaum JA, Ponomarenko J, Clark JD, Cantrell JR, Wheeler DK, Gabbard JL, Hix D, Sette A, Peters B. The immune epitope database (IEDB) 3.0. *Nucleic Acids Res.* 2014 Oct 9. pii: gku938. [Epub ahead of print] PubMed PMID:25300482
23. Kolaskar A, Tongaonkar P. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett.* 1990 Dec 10;276(1-2):172-4.
24. Gallei A, Pesch S, Eskin WS, Keller C, Ohlinger VF. Porcine Torque teno virus: Determination of viral genomic loads by genogroup-specifics multiplex rt-PCR, detection of frequent multiple infections with genogroups 1 or 2, and establishment of viral full-length sequences. *Vet Microbiol.* 2010;143:202-212.
25. Pérez LJ, Díaz de Arce H, Frías MT, Perera CL, Ganges L, Nuñez JI. Molecular detection of torque teno sus virus in lymphoid tissues in concomitant infections with other porcine viral pathogens. *Res Vet Sci.* 2011;91:e154-e157.
26. Kekarainen T, Sibila M, Segalés J. Prevalence of swine Torque teno virus in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and no-PMWS-affected pigs in Spain. *J Gen Virol.* 2006;87:833-837.

27. Ellis JA, Allan G, Krakowka S. Effect of coinfection with genogroup 1 porcine torque teno virus on porcine circovirus type 2-associated post weaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic pigs. *Am J Vet Res.* 2008;69:1608-1614.
28. Krakowka S, Ellis JA. Evaluation of induction of porcine dermatitis and nephropathy syndrome in gnotobiotic pigs with negative results for porcine circovirus type 2. *Am J Vet Res.* 2008;69:1615-1622.
29. Blömstrom A, Belák S, Fossum C, Fuxler L, Wallgren P, Berg M. Studies of porcine circovirus type 2, porcine boca-like virus and torque teno virus indicate the presence of multiple viral infections in post weaning multisystemic wasting syndrome pigs. *Virus Res.* 2010;152:59-64.
30. Aramouni M, Segalés J, Sibila M, Martin-Valls GE, Nieto D, Kekarainen T. Torque teno sus virus 1 and 2 viral loads in post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) affected pigs. *Vet Microbiol.* 2011;153:377-381.
31. Aramouni M, Kekarainen T, Ganges L, Tarradas J, Segalés J. Increased viral load and prevalence of Torque teno sus virus 2 (TTSuV2) in pigs experimentally infected with classical swine fever virus (CSFV). *Virus Res.* 2013;172:81-84.
32. Nieto D, Aramouni M, Grau-Roma L, Segalés J, Kekarainen T. Dynamics of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) DNA loads in serum of healthy and post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected pigs. *Vet Microbiol.* 2011;152:284-290.
33. Vlasakova M, Leskova V, Sliz I, Jackova A, Vilcek S. The presence of six potentially pathogenic viruses in pigs suffering from post-weaning multisystemic wasting syndrome. *BMC Vet. Res.* 2014;10:221.
34. McMenamy MJ, McKillen J, McNair I, Duffy C, Blomström A, Charreyre C, Welsh M, Allan G. Detection of a porcine boca-like virus in combination with porcine circovirus type 2 genotypes and torque teno sus virus in pigs from post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected farms in archival samples from Great Britain. *Vet Microbiol.* 2013;164:293-298.

35. Teixeira T, Dezen S, Cibulski S, Varela A, Sheffer C, Holz C, Fernandes H, Franco A, Roche P. Torque teno sus virus (TTSuV) in tissues of pigs and its relation with the occurrence of postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vir Gen.* 2013;47:276-281.
36. Taira O, Ogawa H, Nagao A, Tuchiya K, Nunoya T, Ueda S. Prevalence of swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 in Japanese swine with suspected post-weaning multisystemic wasting syndrome and porcine respiratory disease complex. *Vet Microbiol.* 2009;139:347-350.
37. Peters M, Jackson D, Crabb B, Browning G. Chicken anemia virus VP2 is a novel dual specificity protein phosphatase. *J Biol Chem.* 2002;277:39566– 39573.
38. Peters M, Crabb B, Washington E, Browning G. Site-directed mutagenesis of the VP2 gene of chicken anemia virus affect virus replication, cytopathology and host-cell MHC class 1 expression. *J Gen Virol.* 2006;87:823-831.
39. Peters M, Crabb B, Tivendale K, Browning G. Attenuation of chicken anemia virus by site-directed mutagenesis of VP2. *J Gen Virol.* 2007;88:2168–2175.
40. McKweon NE, Fenaux M, Halbur PG, Meng XJ. Molecular characterization of porcine TT virus, an orphan virus, in pigs from six different countries. *Vet Microbiol.* 2004;104:113-117.
41. Vargas A. 2012. Relación del Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) en enfermedad asociada a circovirus porcino tipo 2 [Tesis de Maestría]. Cuautitlán Izcalli, Estado de México: Universidad Nacional Autónoma de México
42. Singh P, Ramamoorthy S. Immune gene expression in swine macrophages expressing the Torque Teno Sus Virus 1 (TTSuV1) ORF-1 and 2 proteins. *Vir Res.* 2016;220:33-38.
43. Jarasova V, Celer V. Preliminary epitope mapping of Torque teno sus virus 1 and 2 putative capsid protein and serological detection of infection in pigs. *J Gen Virol.* 2013;94:1351-1356.
44. Liu J, Gou L, Zhang L, Wei Y, Huang L, Wu H, Liu C. Three new emerging subgroups of torque teno sus viruses (TTSuVs) and co-infection of TTSuVs with porcine circovirus type 2 in China. *Virol J.* 2013;10:189.
45. Giménez-Lirola L, Gerbera P, Rowland R, Halbura P, Huang Y, Meng X, Opriessnig T. Development and validation of a 4-plex antibody assay for simultaneous detection of IgG



- antibodies against Torque teno sus virus 1 (TTSuV1), TTSuV2, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus types 1 and 2. *Res Vet Sc.* 2014;96:543-550.
46. Nieto D, Martínez-Guinó L, Jiménez-Melsio A, Segalés J, Kekarainen T. Development of and indirect ELISA assay for the detection of IgG antibodies against the ORF1 of Torque teno sus viruses 1 and 2 in conventional pigs. *Vet Microbiol.* 2015;180:22-27.
47. Jiménez-Melsió A, Rodríguez F, Darji A, Segalés J, Cornelissen-Keijsers V, van der Born E, Kekarainen T. Vaccination of pigs reduces Torque teno sus virus viremia during natural infection. *Vaccine.* 2015;33:3497-3503.

## CAPÍTULO 4:

### **DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES**

En la actualidad no hay un cultivo celular o método de aislamiento descrito para especies de *Iotatorquevirus*, por lo que el diagnóstico de estos agentes ha sido basado en técnicas de biología molecular, tales como PCR punto final (Bigarré *et al.* 2005; Kekarainen *et al.* 2006; Martínez-Guinó *et al.* 2009; Segalés *et al.* 2009; Teixeira *et al.* 2011; Blomström *et al.* 2012; Cortey *et al.* 2012; Wang *et al.* 2012; Liu *et al.* 2013; Teixeira *et al.* 2013, Liu *et al.* 2016; Ssemadaali *et al.* 2016), PCR anidada (McKeown *et al.* 2004; Pozzuto *et al.* 2009; Wu *et al.* 2011; Zhu *et al.* 2012), PCR tiempo real (Brassard *et al.* 2010; Gallei *et al.* 2010; Huang *et al.* 2010; Nieto *et al.* 2011; Xiao *et al.* 2012), rolling circle (Macera *et al.* 2011; Comelissen *et al.* 2012), hibridación *in situ* (Aramouni *et al.* 2013) y ELISA (Jarasova *et al.* 2013), siendo la PCR la herramienta más utilizada.

Por otra parte la PCR anidada es una técnica que se utiliza cuando la cantidad de ADN viral presente en las muestras es baja, adicionalmente aumenta la sensibilidad de la prueba, detectando cantidades mínimas de ADN viral; en este sentido protocolos de PCR tradicional para la detección de las diversas especies de *Iotatorquevirus* han utilizado 100 ng de templado (Pozzuto *et al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 2011), por lo que ensayos de rolling circle han demostrado ser más sensibles al tener una reacción positiva con el uso de 20 ng de templado (Macera *et al.*, 2011), por lo que la PCR anidada para la amplificación del ORF1 del presente trabajo demostró tener una mayor sensibilidad que este último ensayo, al lograr resultados positivos con el uso de 12.5 ng de templado mínimo de detección, por lo que la PCR anidada es una herramienta útil con alta sensibilidad que aunque el tiempo empleado es mayor que en otras técnicas como el rolling circle, el costo es más reducido.

Por otra parte, el éxito de la amplificación en un PCR depende mucho de la región del genoma viral que se desea amplificar. en este sentido diversos trabajos han basado la detección de ambas especies de *Iotatorquevirus* utilizando como blanco la UTR tanto para protocolos de PCR punto final como para PCR tiempo real, dado que esta región del genoma viral es muy conservada en los TTSuV (Wu *et al.* 2011) incluso en el TTV humano (Okamoto *et al.* 2002; Hino *et al.* 2006), adicionalmente se ha propuesto ser un marcador molecular en los TTSuV

(Segalés *et al.* 2009), por otra parte el ORF1 el cual codifica para la cápside ha sido utilizado como blanco para la detección de especies de *Iotatorquevirus* (Blomström *et al.* 2012), siendo el ORF1 una zona con mayor variabilidad que podría permitir distinguir las distintas especies de torque teno sus virus (Comelisen *et al.*, 2012), adicionalmente podría dar mayor información del origen evolutivo de las secuencias dado que el gen de la cápside presumiblemente está bajo una selección de purificación (Brink *et al.*, 2012) . En este sentido los iniciadores diseñados en este trabajo demostraron ser eficientes en la amplificación de un fragmento del ORF1.

Los tejidos fijados en formol embebidos en parafina (FFPE) representan una herramienta útil para la conservación de tejidos, permitiendo obtener fragmentos de al menos 1.18 kb (Santos *et al.*, 2009), en la actualidad existen diversos protocolos y kits comerciales para la extracción de DNA obteniendo valores de pureza aceptables y comparables con tejidos congelados (Aramouni *et al.*, 2013), adicionalmente la detección de ambas especies de *Iotatorquevirus* en tejidos FFPE ha sido documentada (Aramouni *et al.*, 2013). En este sentido los casos negativos obtenidos en el presente trabajó lograron amplificar al HPRT1 utilizado como gen constitutivo, demostrando así la integridad del ADN. Por otra parte, diversos trabajos han utilizado el suero como muestra para la detección de ambas especies de *Iotatorquevirus* (Blömstrom *et al.*, 2012; Brink *et al.*, 2012; Comelissen *et al.*, 2012; Cortey *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2012; McMenemy *et al.*, 2013; Mei *et al.*, 2013; Nieto *et al.*, 2013; Zhai *et al.*, 2013; Blois *et al.*, 2014; Teixeira *et al.*, 2015), sin embargo, no se ha descrito la patogenia completa de los Torque teno virus, por lo que el tiempo que permanece en sangre es desconocido, y dado que la distribución en tejidos y la célula blanco en muy similar al PCV2 (Lee *et al.*, 2015), diversos trabajos han utilizados linfonodos, bazo e hígado principalmente como muestra para la detección de especies de Torque teno virus (Bigarre *et al.*, 2005; Blömstrom *et al.*, 2010; Savic *et al.*, 2010; Perez *et al.*, 2011; Tshering *et al.*, 2012; Ritterbush *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2012; Aramouni *et al.*, 2013; Cadar *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013; McMenemy *et al.*, 2013; Nieto *et al.*, 2013; Teixeira *et al.*, 2013; Vlasakova *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014).

Con lo que respecta al ORF2, este posee una alta variabilidad genómica, se sugiere participa en la replicación, observándose cambios en la secuencia de nucleótidos y por consecuencia también en la secuencia de aminoácidos, principalmente en el TTSuV1a (Cadar et al., 2013), adicionalmente basado en esta variabilidad del ORF2 dos trabajos han sugerido subclasificar al TTSuV1a en cuatro genotipos (A, B, C y D) y el TTSuV1b en dos genotipos (A y B) (Cortey et al., 2012, Cadar et al., 2013), por lo que el diseño de iniciadores del presente trabajo tuvo como blanco el ORF2 tanto del TTSuV1a como del TTSuV1b, buscando regiones conservadas en la UTR para colocar iniciadores sentido (reacción 1 y anidado) para ambas especies de *Iotatorquevirus*, mientras que el iniciador antisentido (reacción 1 y anidado) se anclo en el ORF1 para el TTSuV1b, ya que para el TTSuV1a se utilizó los iniciadores reverse descrito por Vargas et al., 2012 anclado en el ORF1. Dichos iniciadores fueron utilizados en los protocolos de PCR anidada los cuales probaron amplificar secuencias específicas del ORF2 del TTSuV1a y del TTSuV1b. Además, el PCR logró amplificar secuencias del TTSuVk2 porque 3 secuencias mostraron una cercana identidad con la secuencia Brasileña de referencia para el TTSuVk2 (AY823991). Por otra parte al no contar con un control positivo se utilizaron casos de PMWS, dado que hay diversos trabajos que sugieren una co-infección entre especies de *Iotatorquevirus* y con otros agentes virales incrementando la severidad de la enfermedad como resultado del sinergismo (Gallei et al., 2010; Huang et al., 2011; Perez et al., 2011), aunque su principal asociación ha sido con el PCV2 (Aramouni et al., 2011; Blömstrom et al., 2010; Ellis et al., 2008; Kekarainen et al., 2006; Krakowka et al., 2008; McMennamy et al., 2013; Nieto et al., 2011; Taira et al., 2009). Los estudios realizados hasta el momento no han concluido acerca de la participación del TTSuV1a como agente primario. No obstante, la inoculación de TTSuV1a de campo en gnotobióticos demostró su capacidad de infectar y producir lesiones compatibles con PMWS (neumonía intersticial, atrofia de timo, glomerulopatía membranosa, y ligeros infiltrados linfocíticos-histiocíticos en el hígado) pero no reprodujo manifestaciones clínicas (Kekarainen et al., 2006). Adicionalmente, la inoculación del TTSuV1a previa a la del PCV2 facilitó el desarrollo de PMWS en cerdos gnotobióticos dado que la infección única de TTSuV1a o PCV2 no desarrollaron manifestaciones clínicas de la enfermedad (Kekarainen et al., 2006). Dichos resultados derivan de estudios realizados en Norteamérica (Estados

Unidos y Canadá), países con los cuales México está relacionado comercialmente y de donde proceden la mayoría de los cerdos de pie de cría. En este sentido, en México no existen reportes de la detección del TTSuV1a y del TTSuV1b por lo que no se puede contar con un control positivo, en este sentido la estrategia del presente trabajo fue considerar que diversas investigaciones han establecido una alta tasa de prevalencia de estas especies de *Iotatorquevirus* en casos de PCVAD principalmente en casos naturales y experimentales de PMWS (Kekarainen et al., 2006; Ellis et al., 2008), por lo que la búsqueda de casos positivos se centró en tejidos como linfonodos y bazo, los cuales se conoce son órganos blanco de la infección por PCV2 (Rosell et al., 1999), por otra parte un punto central fue contar con casos perfectamente documentados como positivos a PCV2, los cuales cumplieron con los criterios diagnósticos avalados internacionalmente (Chae 2005), dichos tejidos provenían de lechones clínicamente afectados por PMWS, sus tejidos mostraron depleción linfoide y formación de sincitios en linfonodos y bazo bajo tinción de H-E, adicionalmente mostraron un patrón multifocal de hibridación *in situ*. Dado que no ha sido establecido un método de aislamiento viral o alguna técnica específica para la detección del TTSuV1a y del TTSuV1b la PCR ha sido una técnica ampliamente utilizada a nivel mundial por diversos grupos de investigadores para la detección de estos agentes.

En este sentido la prevalencia del TTSuV1a y el TTSuV1b fue considerablemente más bajo en comparación con la mayoría de los informes, a pesar de que utilizaron tejidos afectados por PCV2 de manera severa y difusa. El presente trabajo es notable dado que se utilizó una población porcina no vacunada contra PCV2, dado que, se evaluó desde un período de tiempo anterior al inicio de los programas de inmunización contra PCV2 a través de todo el mundo. Por lo tanto, puede pensarse en una dinámica viral distinta, del cómo se ha influenciado el estado inmunológico de los cerdos, cambiando la naturaleza evolutiva de los virus. En conjunto, los datos descritos en este trabajo, están de acuerdo con la falta de relación entre las especies de *Iotatorquevirus* y el desarrollo de la PCVAD. Finalmente, el TTSuV1a presenta una mayor tasa de variabilidad en el ORF2, lo cual se asocia a la presencia de genotipos (Cadar *et al.*, 2013). La detección de secuencias de los genotipos de torque teno virus porcinos en México abre una puerta de investigación para detectar su participación en

los cuadros clínicos severos cuando interactúa con el PCV2 generando pérdidas económicas a la porcicultura nacional.

## **CONCLUSIONES GENERALES**

- ✓ El Torque teno sus virus 1a se encuentra distribuido en los estados de la república mexicana con alta producción de cerdos, pudo detectarse en casos de FR-PCV2, EG-PCV2 y de PMWS de una población de cerdos no vacunados contra el PCV2.
- ✓ Las frecuencias del TTSuV1a en México son considerablemente bajas en relación a los reportes de países de Europa (España, Eslovaquia y Reino Unido) y Sudamérica (Brasil); sin embargo, frecuencias comparables con los reportes de países de Norte América (Canadá y EUA) y Asia (China).
- ✓ El Torque teno sus virus 1b se encuentra presente en México, y pudo detectarse solo en casos de PMWS de una población de cerdos no vacunados contra el PCV2.
- ✓ Las frecuencias del TTSuV1b en México son muy bajas comparadas con los reportes a nivel mundial.
- ✓ No hay relación estadística entre la presencia del TTSuV1a y/o el TTSuV1b y el desarrollo de la Enfermedad Asociada a Circovirus Porcino tipo 2 (PCVAD).
- ✓ Las secuencias mexicanas nucleotídicas y de aminoácidos del ORF2 del TTSuV1a son filogenéticamente cercanas a las secuencias de Norte América (EUA y Canadá) y Asia (China) clasificadas como genotipo B, países con estrechas relaciones comerciales con México, pudiendo sugerir el movimiento de los agentes virales.
- ✓ Las secuencias mexicanas nucleotídicas y de aminoácidos del ORF2 del TTSuV1b se encontraron ampliamente distribuidas entre las secuencias clasificadas como genotipo A, sugiriendo la presencia de cepas endémicas mexicanas.

## REFERENCIAS

1. Aramouni M, Segalés J, Sibila M, Martin-Valls GE, Nieto D, Kekarainen T. Torque teno sus virus 1 and 2 viral loads in post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) affected pigs. *Vet Microbiol.* 2011;153:377-381.
2. Aramouni M, Kekarainen T, Ganges L, Tarradas J, Segalés J. Increased viral load and prevalence of Torque teno sus virus 2 (TTSuV2) in pigs experimentally infected with classical swine fever virus (CSFV). *Virus Res.* 2013;172:81-84.
3. Biagini P, Todd D, Bendinelli M. Anelloviruses. In *Virus taxonomy: Eight Report 455 of the International Committee on taxonomy viruses.* Elsevier/Academis press. 2004:335-341.
4. Biagini P. Classification of TTV and related virus (anelloviruses). *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009;331:21-33.
5. Bigarre L, Beven V, de Boisseson C, Grassland B, Rose N, Biagini P, Jestin A. Pig anelloviruses are highly prevalent in swine herds in France. 2005. *J. Gen. Virol.* 86:631-635.
6. Brassard J., Gagné M. J., Lamoureux L., Inglis G. D., Leblanc D., Houde A. Molecular detection of bovine and porcine Torque teno virus in plasma and feces. *Vet Microbiol.* 2008; 126: 271-276.
7. Brassard J, Gagné M, Houde A, Poitras E, Ward P. Development of a real-time TaqMan PCR assay for the detection of porcine and bovine Torque teno virus. *J Apl Microbiol.* 2010;108:2191-2198.
8. Brink M, Ståhl K, Masembe C, Okurut A, Berg M, Blomström A. First time molecular detection and phylogenetic relationships of torque teno sus virus 1 and 2 in domestic pigs in Uganda: further evidence for a global distribution. *Virol J.* 2012;9:39.
9. Blois S, Mallus F, Liciardi M, Pilo C, Camboni T, Macera L, Maggi F, Manzin A. High Prevalence of Co-Infection with Multiple Torque Teno Sus Virus Species in Italian Pig Herds. *Plos one.* 2014;9(11):e113720.

10. Blömstrom A, Belák S, Fossum C, Fuxler L, Wallgren P, Berg M. Studies of porcine circovirus type 2, porcine bocavirus and torque teno virus indicate the presence of multiple viral infections in post weaning multisystemic wasting syndrome pigs. *Virus Res.* 2010;152:59-64.
11. Cadar D, Kiss T, Ádám D, Cságola A, Novosel D, Tuboly T. Phylogeny, spatio-temporal phylodynamics and evolutionary scenario of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) in wild boars: fast dispersal and high genetic diversity. *Vet Microbiol.* 2013;166:200-213.
12. Chae C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet J.* 2005;169:326-336.
13. Cornelissen-Keijsers V, Jiménez-Melsio A, Sonnemans D, Cortey M, Segalés J, van den Born E, Kekarainen T. Discovery of a novel Torque teno sus virus species: genetic characterization, epidemiological assessment and disease association. *J Gen Virol.* 2012;93:2682-2691.
14. Cortey M, Macera L, Segalés J, Kekarainen T. Genetic variability and phylogeny of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) based on complete genomes. *Vet Microbiol.* 2011;148:125-131.
15. Cortey M, Pileri E, Segalés J, Kekarainen T. Globalisation and global trade influence molecular viral population genetics of Torque Teno Sus Viruses 1 and 2 in pigs. *Vet Microbiol.* 2012;156:81-87.
16. Davison AJ, ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus taxonomy 2015. Disponible en: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
17. Ellis JA, Allan G, Krakowka S. Effect of coinfection with genogroup 1 porcine torque teno virus on porcine circovirus type 2-associated post weaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic pigs. *Am J Vet Res.* 2008;69:1608-1614.
18. Enríquez K. Evaluation of participation of Porcine Circovirus type 2 (PCV2) in reproductive failure. [MSc dissertation]. Cuautitlán Izcalli, Estado de México: National University of Mexico, 2012:38-40.



19. Gagnon A, Tremblay D, Tijssen P, Venne E, Houde A, Elahai M. The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. *Can Vet Jor.* 2007;48(8):811-819.
20. Gallei A, Pesch S, Esking WS, Keller C, Ohlinger VF. Porcine Torque teno virus: Determination of viral genomic loads by genogroup-specifics multiplex rt-PCR, detection of frequent multiple infections with genogroups 1 or 2, and establishment of viral full-length sequences. *Vet Microbiol.* 2010;143:202-212.
21. García-Camacho LA, Enriquez-Ramírez K, Araiza-Nava D, Rangel-Rodríguez IC, Quintero-Ramírez V, García-Reyna PB. Porcine circovirus 2-associated syndromes in Mexican farms as detected by in situ hybridization. *Com 57th and 41st Annual Meet Am Coll Vet Pathol and Am S Vet Clin Pathol Vet Pathol.* 2006;43:819.
22. Giménez-Lirolaa L, Gerbera P, Rowland R, Halbura P, Huang Y, Meng X, Opriessnig T. Development and validation of a 4-plex antibody assay for simultaneous detection of IgG antibodies against Torque teno sus virus 1 (TTSuV1), TTSuV2, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus types 1 and 2. *Res Vet Sc.* 2014;96:543-550.
23. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1999;41:95–98.
24. Hijikata M, Iwata K, Ohta Y, Nakao K, Matsumoto M, Matsumoto H, Kanai K, Baba K, Samokhvalov E, Mishiro S. 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.* 1999;144:2345–2354.
25. Hino S and Miyata H. Torque teno virus (TTV): current status. *Rev Med Virol.* 2006;17:45-47.
26. Huang YW, Dryman BA, Harrall KK, Vaughn EM, Roof MB, Meng XJ. Development of SYBR green-based real time PCR and duplex nested PCR assay for quantitation and differential detection of species or type specific porcine Torque Teno viruses. *Journal of virological methods.* 2010;170:140-148.
27. Huang YW, Harrall KK, Dryman BA, Beach NM, Kenney SP, Opriessnig T, Vaughn EM, Roof MB, Meng XJ. Expression of the putative ORF1 capsid protein of Torque teno sus virus 2 (TTSuV2) and development of western blot and ELISA serodiagnostic assay:

- Correlation between TTSuV2 viral load and IgG antibody level in pigs. *Virus Res.* 2011;158:79-88.
28. Jarasova V, Celer V. Preliminary epitope mapping of Torque teno sus virus 1 and 2 putative capsid protein and serological detection of infection in pigs. *J Gen Virol.* 2013;94:1351-1356.
  29. Jiménez-Melsió A, Rodríguez F, Darji A, Segalés J, Cornelissen-Keijsers V, van der Born E, Kekarainen T. Vaccination of pigs reduces Torque teno sus virus viremia during natural infection. *Vaccine.* 2015;33:3497-3503.
  30. Kekarainen T, Sibila M, Segalés J. Prevalence of swine Torque teno virus in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and no-PMWS-affected pigs in Spain. *J Gen Virol.* 2006;87:833-837.
  31. Krakowka S, Ellis JA. Evaluation of induction of porcine dermatitis and nephropathy syndrome in gnotobiotic pigs with negative results for porcine circovirus type 2. *Am J Vet Res.* 2008;69:1615-1622.
  32. Kolaskar A, Tongaonkar P. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett.* 1990 Dec 10;276(1-2):172-4.
  33. Korber B. HIV Signature and Sequence Variation Analysis. *Computational Analysis of HIV Molecular Sequences.* 2000; Chapter 4, pages 55-72.
  34. Lee S, Shin J, Kim C, Lyoo Y. Comparison of Torque teno sus Virus (TTSuV) viral load in Porcine circovirus type 2 vaccinated and non-vaccinated pig herds. *Am J Vet Res.* 2011. 69(12);1623-1629.
  35. Lee Y, Lin C, Jeng C, Chang H, Chang C, Pang V. 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 microbial.* 2015;180:186-195.
  36. Liu J, Gou L, Zhang L, Wei Y, Huang L, Wu H, Liu C. Three new emerging subgroups of torque teno sus viruses (TTSuVs) and co-infection of TTSuVs with porcine circovirus type 2 in China. *Virol J.* 2013;10:189.
  37. Macera L, Cortey M, Maggi F, Segalés J, Kekarainen T. A novel Rolling circle amplification assay to detect members of the family *Anelloviridae* in pigs and humans. *Vir Res.* 2011;160:424-427.

38. Martínez-Guinó L, Kekarainen T, Segalés J. Evidence of Torque teno virus (TTV) vertical transmission in swine. *Theriogenology*. 2009;71:1390-1395.
39. Martínez-Guinó L, Kekarainen T, Maldonado J, Aramouni M, Llorens A, Segalés J. Torque teno sus virus (TTV) detection in aborted and slaughterhouse collected fetuses. *Theriogenology*. 2010;74:277-281.
40. Mei M, Zhu L, Xu Z, Zhao L, Zhou Y, Wu Y, Li S, Wei H, Wuo W. Molecular investigation of *Torque teno sus virus* in geographically distinct porcine breeding herds of Sichuan, China. *Virol J*. 2013;10:161.
41. McIntosh K, Harding J, Parker S, Krakowka S, Allan G, Ellis J. Quantitative polymerase chain reaction for Porcine circovirus-2 in swine feces in a Porcine circovirus disease-affected commercial herd and a nonaffected commercial herd. *Can Vet J*. 2008;49:1189-1194.
42. McKweon NE, Fenaux M, Halbur PG, Meng XJ. Molecular characterization of porcine TT virus, an orphan virus, in pigs from six different countries. *Vet Microbiol*. 2004;104:113-117.
43. McMenamy MJ, McKillen J, McNair I, Duffy C, Blomström A, Charreyre C, Welsh M, Allan G. Detection of a porcine boca-like virus in combination with porcine circovirus type 2 genotypes and torque teno sus virus in pigs from post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected farms in archival samples from Great Britain. *Vet Microbiol*. 2013;164:293-298.
44. Miyata H, Tsunoda H, Kazi A, Yamada A, Khan M, Murakami J, Kamahora T, Shiraki K, Hino S. Identificación of a novel GC-Rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus. *J Virol*. 1999;73:3582-3586.
45. Mushahwar I, Erker J, Muerhoff A, Leary T, Simons J, Birkenmeyer L, Chalmers M, Pilot-Matias T, Dexai S. Molecular and biophysical characterization of TT virus: Evidence for a new virus family infecting humans. *Proc Natl Acad Sci*. 1999;96:3177-3182.

46. Niel C, Diniz-Mendes L, Devalle S. Rolling-circle amplification of Torque teno virus (TTV) complete genomes from human and swine sera and identification of a novel swine TTV genogroup. *J Gen Virol.* 2005;86:1343–1347.
47. Nieto D, Aramouni M, Grau-Roma L, Segalés J, Kekarainen T. Dynamics of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) DNA loads in serum of healthy and post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected pigs. *Vet Microbiol.* 2011;152:284-290.
48. Nieto D, Martínez-Guinó L, Jiménez-Melsio A, Segalés J, Kekarainen T. Development of and indirect ELISA assay for the detection of IgG antibodies against the ORF1 of Torque teno sus viruses 1 and 2 in conventional pigs. *Vet Microbiol.* 2015;180:22-27.
49. Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Tawara A, Fukai K, Muramatsu U, Naito Y, Yoshikawa A. Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaias. *J Gen Virol.* 2002;83:1291-1297.
50. Peng Y, Nishizawa T, Takahashi M, Ishikawa T, Yoshikawa A, Okamoto H. Analysis of the entire genome of thirteen TT virus variants classifiable into the fourth and fifth genetic groups, isolated from viremic infants. *Arch Virol.* 2002;147:21-41.
51. Pensaert B, Sanchez R, Ladekjaer-Mikkelsen A, Allan G, Nauwynck H. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. *Vet Microbiol.* 2004;98:175-183.
52. Pérez LJ, Díaz de Arce H, Frías MT, Perera CL, Ganges L, Nuñez JI. Molecular detection of torque teno sus virus in lymphoid tissues in concomitant infections with other porcine viral pathogens. *Res Vet Sci.* 2011;91:e154-e157.
53. Peters M, Jackson D, Crabb B, Browning G. Chicken anemia virus VP2 is a novel dual specificity protein phosphatase. *J Biol Chem.* 2002;277:39566– 39573.
54. Peters M, Crabb B, Washington E, Browning G. Site-directed mutagenesis of the VP2 gene of chicken anemia virus affect virus replication, cytopathology and host-cell MHC class 1 expression. *J Gen Virol.* 2006;87:823-831.
55. Peters M, Crabb B, Tivendale K, Browning G. Attenuation of chicken anemia virus by site-directed mutagenesis of VP2. *J Gen Virol.* 2007;88:2168–2175.

56. Pozzuto T, Mueller B, Meehan B, Ringler S, McIntosh K, Ellis J, Mankertz A, Krakowka S. *In utero* transmission of porcine torque teno viruses. *Vet microbial.* 2009;137:375-379.
57. Quintero-Ramirez V, Romero Y, Enriquez K, García-Camacho LA. Reproductive failure associated to PCV2 and its distribution in the Mexican Republic. *Proc 21st IPVS Congress.* 2010:470.
58. Rammohan L, Xue L, Wang C, Chittick W, Ganesan S, Ramamoorthy S. Increased prevalence of torque teno viruses in porcine respiratory disease complex affected pigs. *Vet Microbiol.* 2012;157:61-68.
59. Ritterbusch G, Rocha C, Mores N, Simon N, Zanella E, Coldebella A, Ciacci-Zanella J. Natural co-infection of Torque teno virus and porcine circovirus 2 in the reproductive apparatus of swine. *Res Vet Sc.* 2012;92:519-523.
60. Rosell C, Segalés J, Plana-Durán J, Balasch M, Rodríguez-Arrijo GM, Kennedy S, Allan GM, McNeilly F, Latimer KS, Domingo M. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J Comp Pathol.* 1999;120:59-78.
61. Savic B, Milicevic V, Bojkovski J, Kureljusic B, Ivetic V, Pavlovic I. Detection rates of the swine Torque teno virus (TTVs), porcine circovirus type 2 (PCV2) and hepatitis E virus (HEV) in the livers of pigs with hepatitis. *Vet Res C.* 2010;34: 641-648.
62. Segalés J, Martínez-Guinó L, Cortey M, Navarro N, Huerta E, Sibila M, Pujols J, Kekarainen T. Retrospective study on swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 infection from 1985 to 2005 in Spain. *Vet Microbiol.* 2009;134:199–207.
63. Sibila M, Martínez-Guinó L, Huerta E, Mora M, Grau-Roma L, Kekarainen T, Segalés J. Torque teno virus (TTV) infection in sows and suckling piglets. *Vet Microbiol.* 2009;137:354-358.
64. Sibila M, Martínez-Guinó L, Huerta E, Llorens A, Mora M, Grau-Roma L, Kekarainen T, Segalés J. Swine torque teno virus (TTV) infection and excretion dynamics in conventional pig farms. *Vet Microbiol.* 2009b;139:213-218.
65. Singh P, Ramamoorthy S. Immune gene expression in swine macrophages expressing the Torque Teno Sus Virus 1 (TTSuV1) ORF-1 and 2 proteins. *Vir Res.* 2016;220:33-38.

66. Ssemadaali M, Effertz K, Singh P, Kolyvushko O, Ramamoorthy S. Identification of heterologous Torque Teno Viruses in humans and swine. *Sci Rep.* 2016;6:26655.
67. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0. *Mol Biol Evol.* 2013;30:2725-2729.
68. Taira O, Ogawa H, Nagao A, Tuchiya K, Nunoya T, Ueda S. Prevalence of swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 in Japanese swine with suspected post-weaning multisystemic wasting syndrome and porcine respiratory disease complex. *Vet Microbiol.* 2009;139:347-350.
69. Teixeira T, Dezen S, Cibulski S, Varela A, Sheffer C, Holz C, Fernandes H, Franco A, Roche P. Torque teno sus virus (TTSuV) in tissues of pigs and its relation with the occurrence of postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vir Gen.* 2013;47:276-281.
70. Teixeira T, Cibulski S, Fernandes dos Santos H, Wendlant A, de Sales F, Schmidt C, Franco A, Roche P. Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) viral loads in serum of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and healthy pigs in Brazil. *Res Vet Sc.* 2015;101:38-41.
71. Ting X, Giménez L, Wei H, Jin M, Opriessnig T. The prevalence of Torque Tenos us virus (TTSuv) is common and increased with age of growing pigs in the United States. *J Virol Meth.* 2012;183:40-44.
72. Tshering C, Takagi M, Deguchi E. Detection of Torque teno sus virus 1 and 2 in tissues from stillborn piglets delivered by sows via natural farrowing. *J Vet Sc.* 2012;13(4):425-427.
73. 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.
74. Vargas A. 2012. Relación del Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) en enfermedad asociada a circovirus porcino tipo 2 [Tesis de Maestría]. Cuautitlán Izcalli, Estado de México: Universidad Nacional Autónoma de México
75. Vargas-Ruiz A, Ramírez -Álvarez H, Sánchez-Betancourt JI, Quintero-Ramírez V, Rangel-Rodríguez CI, Vázquez-Pérez J, García-Camacho LA. Retrospective Study of the Relationship of Torque teno sus virus 1a and Torque teno sus virus 1b with Porcine Circovirus Associated Disease. *Can J Vet Res.* 2017;In press.

76. Vita R, Overton JA, Greenbaum JA, Ponomarenko J, Clark JD, Cantrell JR, Wheeler DK, Gabbard JL, Hix D, Sette A, Peters B. The immune epitope database (IEDB) 3.0. *Nucleic Acids Res.* 2014 Oct 9. pii: gku938. [Epub ahead of print] PubMed PMID:25300482
77. Vlasakova M, Leskova V, Sliz I, Jackova A, Vilcek S. The presence of six potentially pathogenic viruses in pigs suffering from post-weaning multisystemic wasting syndrome. *BMC Vet. Res.* 2014;10:221.
78. Wu Z, Wang H, Yang X, Guan Z, Zhou Y. Molecular detection of Torque teno virus in different breeds of swine. *Vir J.* 2011;8:503.
79. Yzebe D, Xueref S, Baratin D, Bouletreau A, Fabry J, Vanhems P. TT virus. A review of the literature. *Panminerva Med.* 2002;44:167–177.
80. Zhai S, Long J, Wei W, Chen Q, Luo M, Lv D, Wu D, Gao F, Yuan S, Tong G, Wei Z. High prevalence of torque teno sus virus in China and genetic diversity of the 5' non-coding region. *Arch Virol.* 2013;158:1567-1573.
81. Zheng H, Ye L, Fang X, Li B, Wang Y, Xiang X, Kong L, Wang W, Zeng Y, Ye L, Wu Z, She Y, Zhou X. Torque Teno Virus (SANBAN Isolate) ORF2 Protein Suppresses NF- $\kappa$ B Pathways via Interaction with I $\kappa$ B Kinases. *J Virol.* 2007;81(21):11917-11924.
82. Zhu Z, Yuan C, Cui L, Yu Y, Liu Z, Zhao R, Hua X. Molecular detection of Torque teno sus virus from tissues samples of sick pigs in China. 2012;165:225-230.

**Apéndice 1: Retrospective Study of the Relationship of Torque teno sus virus 1a and Torque teno sus virus 1b with Porcine Circovirus Associated Disease.**



# Retrospective study of the relationship of Torque teno sus virus 1a and Torque teno sus virus 1b with porcine circovirus associated disease

Alejandro Vargas-Ruiz, Hugo Ramírez-Álvarez, José I. Sánchez-Betancourt, Víctor Quintero-Ramírez, Ignacio C. Rangel-Rodríguez, Joel A. Vázquez-Perez, Lucia A. García-Camacho

## Abstract

Genus *Iotatorquevirus* consists of 2 species, Torque teno sus virus 1a and Torque teno sus virus 1b, which are ubiquitous in swine populations, and are widely reported in association with porcine circovirus associated disease (PCVAD). To evaluate the relationship with PCVAD, 100 formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples were used to detect both *Iotatorquevirus* species by nested PCR and sequencing. Sixty-eight PCVAD cases were selected as well as 32 porcine circovirus type 2 (PCV2) non-affected cases. Overall, 33 of the 100 cases were positive for Torque teno sus virus 1a and 8 of 100 were positive for Torque teno sus virus 1b. Only 24 of 68 (35%) PCVAD cases were positive for Torque teno sus virus 1a; 39% (9/23) of post-weaning multisystemic wasting syndrome, and 33% (15/45) of PCV2-associated reproductive failure cases. Among PCV2 non-affected cases, 28% were positive for Torque teno sus virus 1a and 6% were positive for Torque teno sus virus 1b. Torque teno sus virus 1b was not detected in PCV2-associated reproductive failure cases. Regardless of the PCV2-status, a lower frequency of both *Iotatorquevirus* species was found than depicted in other reports and there was no statistical relationship with PCVAD ( $\chi^2 > 0.01$ ). Given the worldwide genomic variability of *Iotatorquevirus* species, it is feasible that species prevalent in Mexico share a lower nucleotide sequence identity, leading to different pathogenic potential.

## Résumé

Le genre *Iotatorquevirus* consiste en deux espèces, le virus Torque teno sus 1a et le virus Torque teno sus 1b, qui sont ubiquitaires dans la population porcine, et couramment rapportés en association avec la maladie associée au circovirus porcin (MACVP). Afin d'évaluer la relation avec MACVP, 100 échantillons de tissus fixés dans la formaline et enrobés de paraffine ont été utilisés pour détecter les deux espèces de *Iotatorquevirus* par réaction d'amplification en chaîne par la polymérase nichée et séquençage. Soixante-huit cas de MACVP ont été sélectionnés ainsi que 32 cas non-affectés d'infection par le circovirus porcin de type (CVP2). Globalement, 33 des 100 cas étaient positifs pour le virus Torque teno sus 1a et 8 des 100 étaient positifs pour le virus Torque tenos sus 1b. Seulement 24 des 68 (35 %) cas de MACVP étaient positifs pour le virus Torque tenos sus 1a; 39 % (9/23) du syndrome de dépérissement post-sevrage, et 33 % (15/45) des cas de problèmes reproducteurs associés au CVP2. Parmi les cas non-affectés de CVP2, 28 % étaient positifs pour le virus Torque teno sus 1a et 6 % étaient positifs pour le virus Torque tenos sus 1b. Le virus Torque tenos sus 1b n'a pas été détecté dans les cas de problèmes reproducteurs associés au CVP2. Indépendamment du statu vis-à-vis le CVP2, une fréquence plus basse des deux espèces d'*Iotatorquevirus* fut trouvée comparativement à ce qui est décrit dans d'autres études et il n'y avait pas de relation statistiquement significative avec MACVP ( $\chi^2 > 0,01$ ). Étant donné la variabilité génomique mondiale des espèces d'*Iotatorquevirus* il est possible que les espèces prévalentes au Mexique partagent une plus faible identité de séquences nucléotidiques, entraînant ainsi un potentiel pathogène différent.

(Traduit par Docteur Serge Messier)

## Introduction

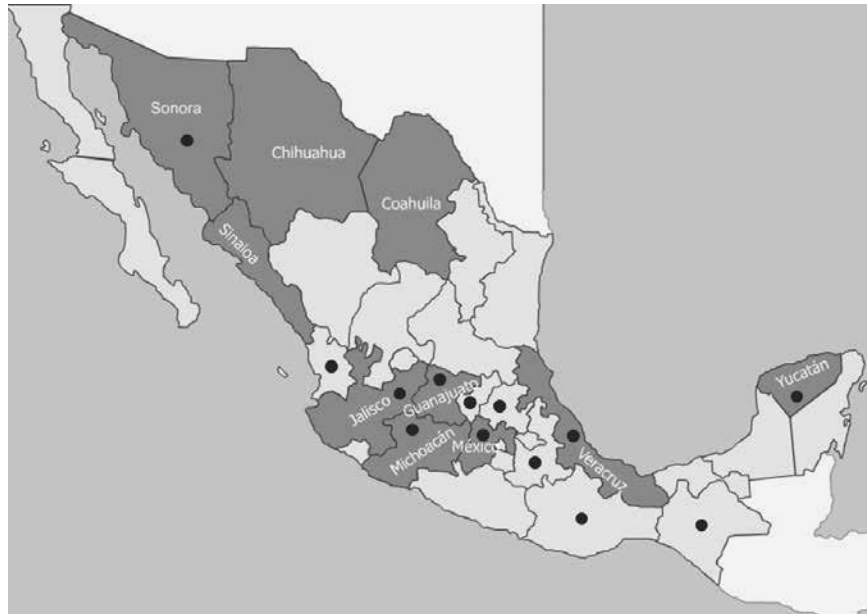
Torque teno virus (TTV) is a circular single-stranded negative sense DNA virus that enclosed 4 open reading frames (ORF); ORF1, ORF2, ORF 1/1, and ORF 2/2 (former ORF3), and a GC-rich region within an un-translated region (UTR), which was first discovered in human samples with post-transfusion hepatitis of unknown etiology in 1997 (1). Currently, based on the International Committee

on Taxonomy of Viruses (2), all human and animal TTV belong to *Anelloviridae* family. Genus *Iotatorquevirus* comprises of 2 species, TTSuV1a (former TTSuV1) and TTSuV1b (former TTSuV2). The phylogenetic relationship of incomplete sequences has proposed 4 biotypes (a, b, c, and d) of TTSuV1a, and 2 biotypes (a and b) of TTSuV1b (3,4). Genus *Kappatorquevirus*, however, includes only one species: Torque teno sus virus k2 (2). High prevalence of co-infection between TTSuV1a and TTSuV1b has been documented worldwide.

Department of Biological Sciences, College of Superior Studies (FESC), National University of Mexico (UNAM), Carretera Cuautitlán-Teoloyucan Km 2.5, Cuautitlán Izcalli, 54714, Estado de México (Vargas-Ruiz, Ramírez-Álvarez, Quintero-Ramírez, Rangel-Rodríguez, García-Camacho); Department of Swine Production, College of Veterinary Medicine, National University of Mexico (UNAM), Av. Universidad 3000, Col. Cd. Universitaria, Del. Coyoacán, CP 04510, Distrito Federal (Sánchez-Betancourt); Infectious Diseases Research Center, National Institute of Respiratory Diseases, Mexico City, Mexico (Vázquez-Perez).

Address all correspondence to Dr. Lucia A. García-Camacho; tel: 5623 1854; e-mail: luciangie30@hotmail.com

Received September 22, 2016. Accepted January 20, 2017.



**Figure 1. Geographical distribution of porcine population in the Mexican Republic. ■ Mexican states with higher swine production (27). ● States from which samples were submitted.**

*lotatorquevirus* species are ubiquitous in domestic and wild pigs, and have been identified in Europe (Hungary, Italy, France, and Spain), Asia (China, Korea, Japan, and Thailand), and North America (Canada and USA).

Transmission among pigs is horizontal and mainly via fecal-oral, but transmission through other routes may be important (3). It is unknown whether TTSuV1a and TTSuV1b infection promotes a specific disease as a primary agent or in co-infection with other pathogens (5). However, it has been suggested that in co-infections with other viruses, TTSuV1a might promote increased disease severity or virulence and TTSuV1b might be associated with reproductive failure (1). In this scenario, several studies have suggested an involvement of both species with porcine circovirus associated disease (PCVAD) since cases of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) have shown a high prevalence of *lotatorquevirus* species (6,7). Moreover, clinical manifestations and characteristic lesions of porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) have been reproduced by TTSuV1a inoculation in gnotobiotic pigs (8). In fact, TTSuV1a has been proposed as the additional factor (X-factor) for the development of PCVAD (9). Porcine circovirus associated disease is economically important to the swine industry since it has an impact on production and reproduction parameters. Although all clinical presentations of PCVAD [PMWS, PDNS, porcine circovirus 2-associated reproductive failure (PCV2-RF), and granulomatous enteritis] in Mexico have been confirmed by *in situ* hybridization (10), the prevalence of *lotatorquevirus* species or their possible association with PCVAD has not been recorded. The aim of the present work was to identify TTSuV1a and/or TTSuV1b from well-documented cases of PCVAD in order to assess their potential relationship with the occurrence of PCVAD in an unvaccinated population.

## Materials and methods

### Case selection

Archived formalin-fixed paraffin-embedded porcine tissues (lymph node, spleen, tonsils, and fetal hearts) from 2001 to 2009 were selected from 100 swine cases. Sixty-eight cases were from non-vaccinated swine with confirmed PCVAD on the basis of clinical signs, characteristic microscopic lesions, and *in situ* hybridization (11). The cases were subdivided as follows: 23 PMWS-affected tissues (lymph nodes and spleen), depicting severe lymphoid depletion and granulomatous inflammation, and a diffuse pattern of PCV2-positive *in situ* hybridization (ISH) and 45 cases of PCV2-RF, consisting of fetal hearts with non-suppurative myocarditis as well as a random ISH pattern positive for PCV2. The PCVAD-positive cases were submitted from 13 states of the Mexican Republic with a high-density swine population (Figure 1). Additionally, 32 PCV2 non-affected cases were evaluated and consisted of 12 tissues (lymph node and tonsil) negative for PCV2 by ISH from age-matched, clinically normal, non-vaccinated pigs from a PCV2 non-affected farm according to clinical criteria (12) and 20 hearts from PCVAD non-infected aborted fetuses submitted for diagnosis. Each tissue was tested individually.

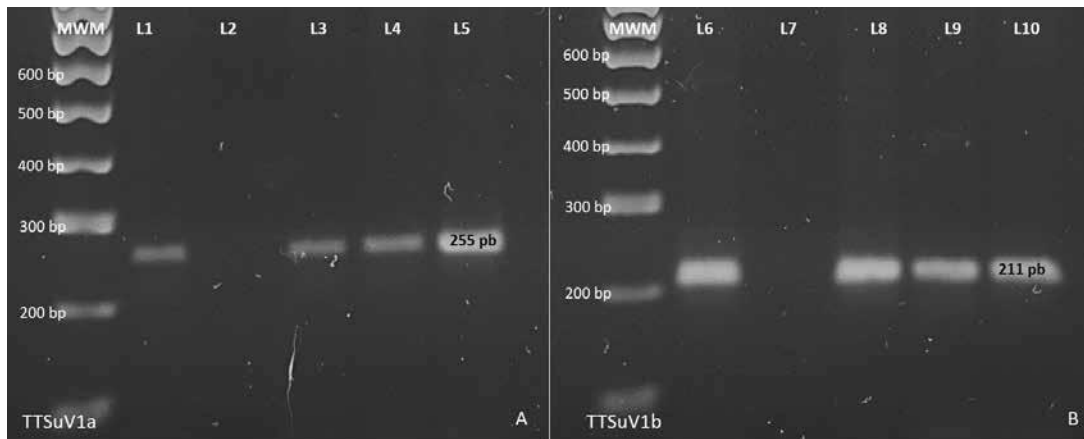
### Primer design

Due to genomic variability among available sequences, degenerate primers that target ORF1 of TTSuV1a and TTSuV1b were designed using computer software [Primer3 input program (v3.0.0; Institute for Biomedical Research, Boston, Massachusetts, USA) (13) and Bioedit software program (v7.2.5; Ibis Bioscience, Carlsbad, California, USA) (14)]. Ten TTSuV1a sequences from different

**Table I. Sequences of the primers utilized for nested polymerase chain reaction (PCR)**

Species	Sequence	Primer	Length
TTSuV1a	5'-AACTGGCAGGACCACCTATG-3'	Forward	481 bp
	5'-AGTGTBACHTCHCCACTYC-3'	Reverse	
	5'-AAAGAGACGCTATGGCTGGA-3'	Forward nested	255 bp
	5'-TGYTTTCWGTGTCCTCCAYTGC-3'	Reverse nested	
TTSuV1b	5'-ATGCCTTACAGACGCTATC-3'	Forward	605 bp
	5'-TGTGATGTTAATTTGGTGGGA-3'	Reverse	
	5'-AAGCTCCGGTCATACAATG-3'	Forward nested	211 bp
	5'-GCTGTCCATATTTCTCCAG-3'	Reverse nested	

Sequences of the primers utilized the detection to the TTSuV1a and TTSuV1b for nested PCR. Bold letters indicate degenerate base. All primers were synthesized by another source (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA).



**Figure 2. Iotatorquevirus species nested polymerase chain reaction (PCR) from porcine circovirus associated disease (PCVAD) positive cases. A — TTSuV1a nested PCR from FR-PCV2 positive cases. One hundred base pairs molecular weight marker (MWM). Lanes 1 positive control, lane 2 negative control, line 3, 4, and 5 showing 255 bp amplified products. B — TTSuV1b nested PCR from post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) positive cases. One hundred base pairs MWM. Lanes 5 positive control, lane 7 negative control, line 8, 9 and 10 display 211 bp amplified products, 2% agarose gel.**

countries available in the NCBI database were used to design the primers (GenBank accession numbers: HM633249, HM633253, HM633258, AY823990, HM633257, AB076001, GU188045, GU456383, GU456384, GQ120664). For TTSuV1b, 12 sequences available in the NCBI database from different countries were used to design the primers (GenBank accession numbers: HM633230, JX173484, HQ204188, GU376737, KC461227, JQ782385, HM633218, GU456386, GU188046, GU570207, AY823991, NC014092). First-round reverse primer contains only 1 degenerate base. Primers were synthesized commercially (IDT Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA).

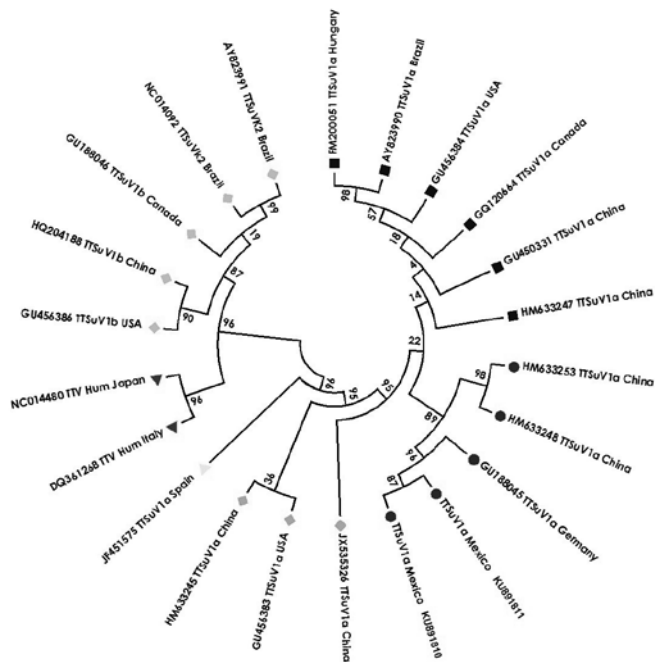
### Nested polymerase chain reaction (PCR)

DNA extraction from all tissues was done separately using commercial kits according to the manufacturer's instructions (QIAamp DNAFFPE Tissue kit; Qiagen, Germany). Briefly, DNA was eluted in a volume of 200  $\mu$ L molecular grade water, and stored at 220°C. The lowest limit of detection was determined by serial dilution (1:2) and was of 12.5 ng/mL. Nested 50- $\mu$ L polymerase chain reaction (PCR) were done using the sets of degenerate primers (Table I) in a thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) containing 2.5 *U*Taq DNA

polymerase (*GoTaq* Flexi DNA polymerase; Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) PCR buffer 13, magnesium chloride 2.25 mM (TTSuV1a)/1.5 mM (TTSuV1b), 0.2 mM of each deoxy-nucleotide (dNTP), 100 pmol of each primer, and 20 ng of template. The following thermal cycle was as follows: the initial activation step at 94°C for 3 min followed by 40 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 56°C (TTSuV1a) or 53°C (TTSuV1b) and 1 min at 72°C, finally last extension step of 10 min at 72°C. The PCR products were electrophoretically separated in a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide. The gel was visualized under ultraviolet light (Apollo Instrumentation, Claremont, California, USA) and photodocumented (Doc-It System; UVP BioImaging Systems, Cambridge, UK).

### Sequencing

Two amplified products from each species were randomly selected and purified from agarose gel using a commercial kit (Min Elute Gel Extraction kit; Qiagen) following the manufacturer's instructions. The sequencing of the purified PCR products was done using high fidelity, processing, and specificity enzyme kits (*Taq* Platinum Polymerase; High Fidelity, Carlsbad, California,



**Figure 3.** Phylogenetic tree of the TTSuV1a showing the nucleotide sequences of different identified Torque teno virus with GenBank accession number, and country of origin. The sequences were distributed in 3 TTSuV1a sequence groups (□ Canadian, Chinese, American, Brazilian, and Hungarian; □ Mexican, German, and Chinese; □ Chinese and American; □ Spanish). TTSuV1b sequences (□ Canadian, Chinese, American, and Brazilian), and TTV human sequences (□ Italian and Japanese) are included. The Mexican sequences (□ KU891810 and KU891811) belong to the 2 TTSuV1a positive cases described in this work. The length of the branch represents the genetic distance among the sequences.

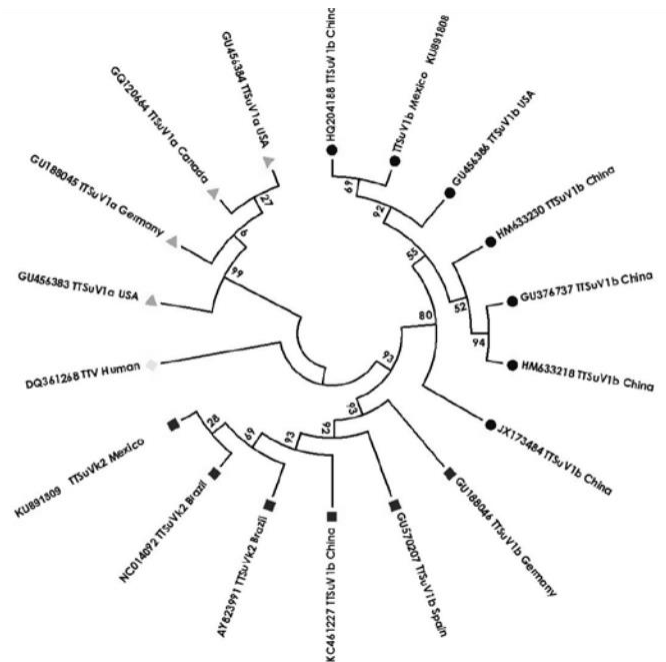
USA). Internal primers were used to sequence partial sequences of ORF1, using a sequencer (Model 3100; Applied Biosystems, Foster, California, USA).

## Data analysis

Nucleotide sequences were edited, aligned, and analyzed using computer software (Bioedit software v7.2.0) (13). Phylogenetic analysis were done using molecular evolutionary genetics analysis version 6 (MEGA6) (15). The maximum likelihood tree was computed using Tamura-Neg Gamma distance. The test of phylogeny was carried out through bootstrap method with 1000 number of replication and the gaps/missing data treated with pairwise deletion. Two by four contingency frames were made based on PCR results to evaluate the relationship of TTSuV1a and TTSuV1b with PCVAD using a Chi-squared test at a trust interval of 99% ( $P > 0.01$ ).

## Results

The PCR protocols using specific degenerate primers to amplify TTSuV1a and TTSuV1b were optimized to obtain of 255 bp (Figure 2A), and 211 bp (Figure 2B), respectively, from PCVAD cases. The sequences of 2 nested products of each virus species proved to be specific (GenBank accession numbers: KU891810 and KU891811 TTSuV1a, KU891808 TTSuV1b and KU891809 TTSuVk2). At alignment, the amplified regions of each species were highly



**Figure 4.** Phylogenetic tree of the TTSuV1b showing the nucleotide sequences of different identified Torque teno virus with GenBank accession number, and country of origin. The sequences were distributed in 2 TTSuV1b sequence groups (□ Chinese, American, and Mexican; □ German, Spanish, Brazilian, Chinese, and Mexican). TTSuV1a sequences (□ American, German, and Canadian) and TTV human sequences (□ Italian) are included. The Mexican sequences (□ KU891808 and KU891809) belong to the 2 TTSuV1b positive cases described in this work. The length of the branch represents the genetic distance among the sequences.

conserved among available sequences. The topography of the phylogenetic tree of TTSuV1a (Figure 3) revealed that the amplified sequences belong to the species 1a, conforming a well-defined cluster (Mexican, German, and Chinese sequences) standing supported with bootstrap values of 89. Conversely, the phylogenetic tree of TTSuV1b (Figure 4) showed that one Mexican sequence clustered with American and Chinese sequences, but another sequence was located in a different clade, revealing a major phylogenetic relationship with TTSuVk2 Brazilian sequences (GenBank accession numbers: AY823991, NC014092).

In the current retrospective study, 100 cases were used (68 PCVAD-affected, and 32 PCVAD-non affected). Overall, 33% (33/100) were positive to TTSuV1a (TTSuV1a 1) and 8% (8/100) were positive to TTSuV1b (TTSuV1b 1). From all the PCVAD cases, 35% (24/68) were TTSuV1a 1 and 9% (6/68) were TTSuV1b 1, whereas 28% (9/32) and 6% (2/32) of the non-affected cases were positive to TTSuV1a and TTSuV1b, respectively (Table II). The frequency of PMWS-affected cases compared to age-matched clinically normal piglets is shown in Table III. Thirty-one percent (11/35) of total cases were TTSuV1a 1 and 22.8% (8/35) were TTSuV1b 1. Thirty-nine percent (9/23) of PMWS-affected cases were positive for TTSuV1a, 26% (6/23) were TTSuV1b 1. Of the clinically normal pigs evaluated, 17% (2/12) were TTSuV1a 1 and 17% (2/12) were TTSuV1b 1. Co-infection was found only in PMWS cases, 3% of the total cases, and 9% (3/35) of PMWS cases. Concerning cases of reproductive failure in sows

**Table II. Overall nested polymerase chain reaction (PCR) results for open reading frame (ORF1) region of TTSuV1a and TTSuV1b (n = 100)**

	TTSuV1a 1 TTSuV1b 1	TTSuV1a 1 TTSuV1b 2	TTSuV1a2 TTSuV1b 1	TTSuV1a2 TTSuV1b2	Total
PCVAD affected	3	21	3	41	68
PCVAD non-affected	0	9	2	21	32
Total <sup>a</sup>	3	30	5	62	100

<sup>a</sup> Not statistically different between porcine circovirus-associated disease (PCVAD)-affected and PCVAD non-affected at P-value 0.01 ( $\chi^2$  test).

**Table III. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) nested polymerase chain reaction (PCR) results for open reading frame (ORF1) region of TTSuV1a and TTSuV1b**

	TTSuV1a 1 TTSuV1b 1	TTSuV1a 1 TTSuV1b2	TTSuV1a2 TTSuV1b 1	TTSuV1a2 TTSuV1b2	Total
PMWS-affected	3 <sup>b</sup>	6	3	11	23
Age-matched clinically normal piglets	0	2	2	8	12
Total <sup>a</sup>	3	8	5	19	35

<sup>a</sup> Not statistically different between PMWS-affected and age matched healthy piglets at P-value 0.01 ( $\chi^2$  test).

<sup>b</sup> Co-infection only in PMWS-affected.

**Table IV. Reproductive failure nested polymerase chain reaction (PCR) results for open reading frame (ORF1) region of TTSuV1a and TTSuV1b**

	TTSuV1a 1 TTSuV1b 1	TTSuV1a 1 TTSuV1b2	TTSuV1a2 TTSuV1b 1	TTSuV1a2 TTSuV1b2	Total
PCV2-RF	0	15	0	30	45
non PCV2-RF	0	7	0	13	20
Total <sup>a</sup>	0	22	0 <sup>b</sup>	43	65

<sup>a</sup> Not statistically different between porcine circovirus type 2-associated reproductive failure (PCV2-RF) and non-PCV2-RF at P-value 0.01 ( $\chi^2$  test).

<sup>b</sup> Not TTSuV1b positive cases.

(Table IV), 34% (22/65) of cases and 33% (15/45) of PCV2-RF cases were TTSuV1a 1. Similarly, 35% (7/20) of the reproductive failure cases not associated with PCV2 were positive for TTSuV1a 1. No case of reproductive failure was positive for TTSuV1b. There was no statistical relationship between the manifestation of PCVAD and the presence of TTSuV1a or TTSuV1b by  $\chi^2$  test.

species with other viruses might increase severity of disease as a result of synergy (1,5,16). Consequently, both species have been the target of research for the study of multifactorial diseases, such as porcine respiratory disease complex (17–20) and PCVAD (6–8,21–23).

In natural cases of PMWS, a high frequency of co-infection between TTSuV1a and PCV2 has been described (6). In gnotobiotic

pig models, TTSuV1a was proposed to act as an aggravating factor of PMWS (7) and characteristic PDNS lesions were reproduced in PCV2-negative pigs after inoculation with TTSuV1a and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (8). In PMWS-affected pigs, higher prevalence and increase viral load have been found with TTSuV1b than with TTSuV1a (6,22). In addition, a possible association of TTSuV1b with reproductive failure in sows has been proposed (1,24). Taken altogether, current information not only reveals high worldwide prevalence of *Iotatorquevirus* species but also a close association of its occurrence in cases of PCVAD. However, a relationship of both TTSuV1a and TTSuV1b with development of PCVAD is still unclear.

In the present study, the degenerate nested PCR proved to amplify TTSuV1a and TTSuV1b ORF1 specific sequences. The nested PCR results revealed that TTSuV1a and TTSuV1b are widely distributed in Mexican states with a high cluster of pig population, as it



is described for PCV2 (25). Also, both species were amplified from cases of PCVAD. In the current scenario, only 35% of total cases were positive to TTSuV1a. Similar findings were obtained regardless of presentation, 39% (9/23) of PMWS cases and 33% (15/45) of PCV2-RF cases (Table II). The global frequencies of the present work are far lower than reported in other countries, such as Spain (90%), Korea (85%), and China (80%), but comparable to frequencies in Thailand and the United States, which are reported to be 40% and 33%, respectively (26). In the same case series, frequencies in Canada were found to be highly variable (46% to 100%); it was suggested that differences in pig density might influence TTSuV1a prevalence (26). However, we observed a low prevalence of TTSuV1a from Mexican states with the highest proportion of swine farms (27). With regard to TTSuV1b, the gathered data of the present work showed more disparity since European countries have reported higher frequencies (6,21,22,28).

Detection of TTSuV1a and/or TTSuV1b has been strongly associated with cases of PMWS, particularly in Europe. Among PMWS-affected pigs, TTSuV1a seroprevalence of 66% to 76% has been reported in Spain (6,22,23,28). Likewise, TTSuV1a frequencies of 77% and 71.4% were reported in Sweden (21) and Slovakia (29), respectively. Whereas TTSuV1a detection was 41% and 58% in Great Britain from fresh tissues and sera, respectively (30). Frequency of TTSuV1b among PMWS-affected cases, however, showed even more discrepancy since European countries, such as Spain, have reported frequencies of 91% (6,28) and 100% (22) that are consistent with the Sweden prevalence of 94% (21). Moreover, TTSuV1b occurrence of 71% and 64.3% were found in Great Britain (30) and Slovakia (29), respectively.

Altogether, PMWS-affected findings of the present work are not consistent with prevalence in Europe, but are comparable to TTSuV1a prevalence of 48%, 40%, and 30% reported in Brazil (31), Cuba (16), and Japan (18), respectively. However, the latter 2 studies were performed on emaciated pigs without further laboratory confirmation of PCVAD status in affected tissues by ISH or immunohistochemistry. An explanation might be linked to geographic relationship within Asia and North America, but TTSuV1b prevalence of 94.7% found in Brazil (30) from PCV2-affected pigs is not in agreement with that hypothesis. Prevalence rates of 37.5% and 31% reported in Cuba (16) and Japan (18), respectively, are still closer to our findings.

Differences in *Iotatorquevirus* species prevalence rates among studies might be related to target tissue. For instance, lower frequencies were found (41% for TTSuV1a and 79% for TTSuV1b) using pools of fresh lung, liver, kidney, spleen, and lymph node, but higher prevalence of both species (77% for TTSuV1a and 94% for TTSuV1b) was obtained from fresh lymph nodes (21). Such differences are most likely associated with PCV2-target tissues because lymph nodes and spleen are regarded as the main target of PMWS-affected pigs, displaying higher PCV2 loads (32). Therefore, testing fresh lymph node samples alone might increase the likelihood of detecting TTSuV species (6,22). In the current study, results were considerably lower compared to most reports despite the fact that severely and diffusely PCV2-affected lymphoid tissues were used. Consequently, the prevalence of TTSuV1a and TTSuV1b from PMWS-affected pigs appears to be low in Mexico.

Prevalence of *Iotatorquevirus* species in cases of PMWS is reported as higher than that of clinically normal pigs (1,21). Results indicate

that the prevalence is noticeably lower with PCVAD, however, though the same trend was noted, it is not statistically significant. Co-infection of both species in PMWS cases was much lower than that reported in Spain (76%) (22), but similar to that reported in Japan (10%) (18). However, in the current work, co-infection of age-matched clinically normal pigs was not observed (1,22,24).

Immune suppression caused by PCV2 infection has been suggested as a predisposing factor for the finding of TTSuV1b in PMWS cases because an increased viral load of TTSuV1b was seen in PMWS-affected pigs compared to the viral load of clinically normal pigs. Thus, clinically normal pigs might restrain infection with both *Iotatorquevirus* species and PCV2 (28). Such statements are in agreement with the data presented herein since co-infection, though in low proportion, was only found in PMWS-affected cases.

The role of *Iotatorquevirus* in reproductive failure has been proposed. To the authors' knowledge, there are no reports of TTSuV1a nor TTSuV1b in cases of PCV2-RF. A higher seroprevalence of TTSuV1a (60% to 75%), compared to TTSuV1b (30% to 34%), has been detected in healthy sows (24,33). Litters from clinically normal sows infected with TTSuV1a or TTSuV1b showed that 43% and 19% of piglets were TTSuV1a 1 and TTSuV1b 1, respectively (34). Likewise, 50% of stillbirths were TTSuV1a 1 but 7% of stillbirths were TTSuV1b 1, suggesting that both species may cause in utero infection (33). Viremia in sows is a prerequisite for vertical transmission, with the heart being a frequently affected tissue (17). Histopathology of fetal hearts from cases of reproductive failure in sows showed both non suppurative myocarditis and PCV2-specific ISH (35) in 39% of PCV2-RF and 47% of transplacental transmission. These tissues were included in the present work, revealing a low frequency of TTSuV1a and an absence of TTSuV1b with no significant statistical relation between the occurrence of PCV2-RF and the presence of TTSuV1a.

Using tissue pools from aborted fetuses, the frequency rates of TTSuV1a and TTSuV1b were 17% and 30%, respectively. Heart tissue was part of this tissue pool, but the precise site of infection could not be identified (36). Fetal hearts were one of the individual tissues evaluated in the current study, but other additional tissues that could potentially harbor *Iotatorquevirus* species were not evaluated, thus *Iotatorquevirus* species could not be definitively ruled out in cases of PCV2-RF. Nevertheless, since the heart is the main target organ for vertical transmission, preliminary findings suggest that participation of TTSuV1b regarding PCV2-RF is unlikely.

The current retrospective work is noteworthy because a non-vaccinated porcine population was evaluated from a time period prior to the start of through and worldwide immunization programs. Therefore, it may elucidate distinct viral dynamics as influenced by changing immune status and add to the understanding of the evolving nature of viruses. In addition, a TTSuVk2 sequence was amplified based on a new taxonomy (2). Thus, further classification of TTSuV1b is essential to separate it from TTSuVk2 species.

Taken together, the data reported herein are in agreement with a lack of relationship between *Iotatorquevirus* species and occurrence of PCVAD. Currently, a broad phylogenetic study is being done to ascertain prevailing swine *Anelloviridae* species in Mexico as well as its genomic variability that might account for a distinctive pathogenic potential.

## Acknowledgments

The authors thank Karina Enriquez-Ramirez MSc. for her excellent technical contribution to PCV2-*in situ* hybridization. The authors are grateful to the CONACYT scholarship program for its commitment to support graduate students. This work was financially supported by a grant from DGAPA-UNAM (PAPIIT IN203309).

## References

1. Gallei A, Pesch S, Esking WS, Keller C, Ohlinger VF. Porcine Torque teno virus: Determination of viral genomic loads by genogroup-specifics multiplex rt-PCR, detection of frequent multiple infections with genogroups 1 or 2, and establishment of viral full-length sequences. *Vet Microbiol* 2010;143:202–212.
2. Davison AJ. ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus taxonomy 2015. [Website on Internet]. Available from: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> Last accessed May 26, 2017.
3. Cortey M, Macera L, Segalés J, Kekarainen T. Genetic variability and phylogeny of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) based on complete genomes. *Vet Microbiol* 2011;148:125–131.
4. Cadar D, Kiss T, Ádám D, Cságola A, Novosel D, Tuboly T. Phylogeny, spatio-temporal phylodynamics and evolutionary scenario of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) in wild boars: Fast dispersal and high genetic diversity. *Vet Microbiol* 2013;166:200–213.
5. Huang YW, Harrall KK, Dryman BA, et al. Expression of the putative ORF1 capsid protein of Torque teno sus virus 2 (TTSuV2) and development of western blot and ELISA serodiagnostic assay: Correlation between TTSuV2 viral load and IgG antibody level in pigs. *Virus Res* 2011;158:79–88.
6. Kekarainen T, Sibila M, Segalés J. Prevalence of swine Torque teno virus in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and no-PMWS-affected pigs in Spain. *J Gen Virol* 2006;87:833–837.
7. Ellis JA, Allan G, Krakowka S. Effect of coinfection with genogroup 1 porcine torque teno virus on porcine circovirus type 2-associated post weaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic pigs. *Am J Vet Res* 2008;69:1608–1614.
8. Krakowka S, Ellis JA. Evaluation of induction of porcine dermatitis and nephropathy syndrome in gnotobiotic pigs with negative results for porcine circovirus type 2. *Am J Vet Res* 2008;69:1615–1622.
9. Segalés J, Martínez-Guinó L, Cortey M, et al. Retrospective study on swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 infection from 1985 to 2005 in Spain. *Vet Microbiol* 2009;134:199–207.
10. García-Camacho LA, Enriquez-Ramírez K, Araiza-Nava D, Rangel-Rodríguez IC, Quintero-Ramírez V, García-Reyna PB. Porcine circovirus 2-associated syndromes in Mexican farms as detected by *in situ* hybridization. Com 57th and 41st Annual Meet Am Coll Vet Pathol and Am S Vet Clin Pathol Vet Pathol 2006;43:819.
11. Chae C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet J* 2005;169:326–336.
12. McIntosh K, Harding J, Parker S, Krakowka S, Allan G, Ellis J. Quantitative polymerase chain reaction for Porcine circovirus-2 in swine feces in a Porcine circovirus disease-affected commercial herd and a nonaffected commercial herd. *Can Vet J* 2008;49:1189–1194.
13. Untergrasser A, Cutcutache J, Koressaar T, et al. Primer3 – New capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 2012;40:e115.
14. Hall TA. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999;41:95–98.
15. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013;30:2725–2729.
16. Pérez LJ, Díaz de Arce H, Frías MT, Perera CL, Ganges L, Nuñez JI. Molecular detection of torque teno sus virus in lymphoid tissues in concomitant infections with other porcine viral pathogens. *Res Vet Sci* 2011;91:e154–e157.
17. Pensaert B, Sanchez RE, Ladekjaer-Mikkelsen AS, Allan GM, Nauwynck HJ. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. *Vet Microbiol* 2004;98:175–183.
18. Taira O, Ogawa H, Nagao A, Tuchiya K, Nunoya T, Ueda S. Prevalence of swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 in Japanese swine with suspected post-weaning multisystemic wasting syndrome and porcine respiratory disease complex. *Vet Microbiol* 2009;139:347–350.
19. Lee S, Shin J, Kim C, Lyoo YS. Comparison of Torque teno sus Virus (TTSuV) viral load in Porcine circovirus type 2 vaccinated and non-vaccinated pig herds. *Res Vet Sci* 2011;93:1039–1041.
20. Rammohan L, Xue L, Wang C, Chittick W, Ganesan S, Ramamoorthy S. Increased prevalence of torque teno viruses in porcine respiratory disease complex affected pigs. *Vet Microbiol* 2012;157:61–68.
21. Blömstrom A, Belák S, Fossum C, Fuxler L, Wallgren P, Berg M. Studies of porcine circovirus type 2, porcine boca-like virus and torque teno virus indicate the presence of multiple viral infections in post weaning multisystemic wasting syndrome pigs. *Virus Res* 2010;152:59–64.
22. Aramouni M, Segalés J, Sibila M, Martin-Valls GE, Nieto D, Kekarainen T. Torque teno sus virus 1 and 2 viral loads in post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) affected pigs. *Vet Microbiol* 2011;153:377–381.
23. Aramouni M, Kekarainen T, Ganges L, Tarradas J, Segalés J. Increased viral load and prevalence of Torque teno sus virus 2 (TTSuV2) in pigs experimentally infected with classical swine fever virus (CSFV). *Virus Res* 2013;172:81–84.
24. Sibila M, Martínez-Guinó L, Huerta E, et al. Torque teno virus (TTV) infection in sows and suckling piglets. *Vet Microbiol* 2009;137:354–358.
25. Quintero-Ramírez V, Romero Y, Enriquez K, García-Camacho LA. Reproductive failure associated to PCV2 and its distribution in the Mexican Republic. *Proc 21st IPVS Congress* 2010:470.
26. McKweon NE, Fenaux M, Halbur PG, Meng XJ. Molecular characterization of porcine TT virus, an orphan virus, in pigs from six different countries. *Vet Microbiol* 2004;104:113–117.

27. México exportó 86 mil 294 toneladas de carne de cerdo en 2013. Secretariat of Agriculture, Livestock, Rural Development, Fisheries and Food. [Website on the Internet]. Available from: <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2014B401.aspx#> Last accessed on April 25, 2017.
28. Nieto D, Aramouni M, Grau-Roma L, Segalés J, Kekarainen T. Dynamics of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) DNA loads in serum of healthy and post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected pigs. *Vet Microbiol* 2011;152:284–290.
29. Vlasakova M, Leskova V, Sliz I, Jackova A, Vilcek S. The presence of six potentially pathogenic viruses in pigs suffering from post-weaning multisystemic wasting syndrome. *BMC Vet Res* 2014;10:221.
30. McMenamy MJ, McKillen J, McNair I, et al. Detection of a porcine bocavirus-like virus in combination with porcine circovirus type 2 genotypes and torque teno sus virus in pigs from post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected farms in archival samples from Great Britain. *Vet Microbiol* 2013;164:293–298.
31. Teixeira TF, Dezen S, Cibulski SP, et al. Torque teno sus virus (TTSuV) in tissues of pigs and its relation with the occurrence of postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vir Gen* 2013;47:276–281.
32. Rosell C, Segalés J, Plana-Durán J, et al. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J Comp Pathol* 1999;120:59–78.
33. Martínez-Guinó L, Kekarainen T, Segalés J. Evidence of Torque teno virus (TTV) vertical transmission in swine. *Theriogenology* 2009;71:1390–1395.
34. Sibila M, Martínez-Guinó L, Huerta E, et al. Swine torque teno virus (TTV) infection and excretion dynamics in conventional pig farms. *Vet Microbiol* 2009;139:213–218.
35. Enríquez K. Evaluation of participation of Porcine Circovirus type 2 (PCV2) in reproductive failure. [MSc dissertation]. Cuautitlán Izcalli, Estado de México: National University of Mexico, 2012:38–40.
36. Martínez-Guinó L, Kekarainen T, Maldonado J, Aramouni M, Llorens A, Segalés J. Torque teno sus virus (TTV) detection in aborted and slaughterhouse collected fetuses. *Theriogenology* 2010;74:277–281.



**Apéndice 2: Phylogenetic study of the ORF2 of Torque teno sus virus 1a (TTSuV1a) and Torque teno sus virus 1b (TTSuV1b) in cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Mexico.**

# Archives of Virology

## Phylogenetic study of the ORF2 of Torque teno sus virus 1a (TTSuV1a) and Torque teno sus virus 1b (TTSuV1b) in cases of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Mexico --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	ARVI-D-17-00656	
<b>Full Title:</b>	Phylogenetic study of the ORF2 of Torque teno sus virus 1a (TTSuV1a) and Torque teno sus virus 1b (TTSuV1b) in cases of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Mexico	
<b>Article Type:</b>	Original Article	
<b>Corresponding Author:</b>	Jose Ivan Sanchez-Betancourt, Ph.D Faculty of Veterinary Medicine, UNAM Mexico D.F., City of Mexico MEXICO	
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>		
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Faculty of Veterinary Medicine, UNAM	
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>		
<b>First Author:</b>	Alejandro Vargas-Ruiz	
<b>First Author Secondary Information:</b>		
<b>Order of Authors:</b>	Alejandro Vargas-Ruiz	
	Lucía Angélica García Camacho	
	Hugo Ramírez-Alvarez	
	Ignacio Carlos Rangel-Rodríguez	
	Rogelio Alonso-Morales	
	Jose Ivan Sanchez-Betancourt, Ph.D	
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>		
<b>Funding Information:</b>	CONACYT (No. 254244)	Dr. Jose Ivan Sanchez-Betancourt
	PAPIIT (IN203309)	Dr Lucía Angélica García Camacho
<b>Abstract:</b>	<p>Worldwide Torque teno sus virus (TTSuV) species have been regarded as a possible agent associated with porcine circovirus associated disease. In Mexico, the presence of TTSuV1a and TTSuV1b has been demonstrated in PCV2-affected tissues, showing no relationship with the observation of porcine circovirus associated disease. lotatorquevirus species possesses high genomic variability, suggesting there are diverse geographically distributed genotypes. In order to validate the genomic variability of both lotarorquevirus species in pigs with post-weaned multisystemic wasting syndrome, nine and fifteen genomic DNA with predetermined positive status of TTSuV1a and TTSuV1b; respectively, was used to amplify the complete ORF2 of each species by nested PCR to perform a phylogenetic analysis. It was found that Mexican TTSuV1a sequences belong to genotype B, sharing phylogenetic origin, high nucleic acid and amino acid sequence similarity as well as akin dominant epitope conformation with commercially linked countries, such as USA, Canada and China whereas the Mexican TTSuV1b sequences belong to genotype A, being more divergent among each other, and displaying low nucleotide identity with other genotype A sequences, suggesting TTSuV1b are endemic strains. The predicted amino acid sequence of both lotarorquevirus species exhibit a PTPasa-like signature motif, being more conserved for Mexican TTSuV1b sequences than Mexican TTSuV1a sequences in which several substitutions were found. These changes influence the conformation of dominant epitopes since different arrays were found among TTSuV1a genotypes. The current</p>	

work findings imply that ORF2 variability may potentially modify viral replication and immune response, accounting for a different pathogenicity and worldwide prevalence.

Ciudad Universitaria, México D.F. July 31, 2017

Editors

Archives of Virology

I am submitting to be considered for publication in Archives of Virology the manuscript entitled “**Phylogenetic study of the ORF2 of Torque teno sus virus 1a (TTSuV1a) and Torque teno sus virus 1b (TTSuV1b) in cases of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Mexico**” by Alejandro Vargas-Ruiz, Lucía Angélica García-Camacho, Hugo Ramírez-Alvarez, Ignacio Carlos Rangel-Rodriguez, Rogelio Alejandro Alonso-Morales and José Iván Sánchez-Betancourt.

We consider that this work is very important for publishing in your Journal because it shows by first time the phylogenetic analysis of Torque teno sus virus 1a (TTSuV1a) and Torque teno sus virus 1b (TTSuV1b) in México.

I state that all the authors participated in: 1. Obtaining the scientific data; 2. Writing the manuscript, in addition to the design, interpretation approving of the final manuscript version, and 3.- Taking public responsibility for the content of the paper.

Furthermore, we declare that the material of the submitted paper has never been published or being considered elsewhere.

If you have any question or comment, please do not hesitate and contact me at the addresses above indicated.

I appreciate in advance your assistance and will look forward hearing from you soon.

Sincerely,

Dr. José Ivan Sánchez Betancourt  
Corresponding Author.  
Email: aisb\_7@yahoo.com.mx  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,  
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).  
Av. Universidad No. 3000 Col. Copilco, Del. Coyoacán,  
CP 04510 Distrito Federal, México.  
Tel. (52) 5556225854



1  
2  
3  
4 **26 Abstract**

5  
6 27 Worldwide Torque teno sus virus (TTSuV) species have been regarded as a possible agent associated with  
7  
8 28 porcine circovirus associated disease. In Mexico, the presence of TTSuV1a and TTSuV1b has been  
9  
10 29 demonstrated in PCV2-affected tissues, showing no relationship with the observation of porcine circovirus  
11  
12 30 associated disease. *Iotatorquevirus* species possesses high genomic variability, suggesting there are diverse  
13  
14 31 geographically distributed genotypes. In order to validate the genomic variability of both *Iotaroquevirus*  
15  
16 32 species in pigs with post-weaned multisystemic wasting syndrome, nine and fifteen genomic DNA with  
17  
18 33 predetermined positive status of TTSuV1a and TTSuV1b; respectively, was used to amplify the complete  
19  
20 34 ORF2 of each species by nested PCR to perform a phylogenetic analysis. It was found that Mexican  
21  
22 35 TTSuV1a sequences belong to genotype B, sharing phylogenetic origin, high nucleic acid and amino acid  
23  
24 36 sequence similarity as well as akin dominant epitope conformation with commercially linked countries, such  
25  
26 37 as USA, Canada and China whereas the Mexican TTSuV1b sequences belong to genotype A, being more  
27  
28 38 divergent among each other, and displaying low nucleotide identity with other genotype A sequences,  
29  
30 39 suggesting TTSuV1b are endemic strains. The predicted amino acid sequence of both *Iotatorquevirus* species  
31  
32 40 exhibit a PTPasa-like signature motif, being more conserved for Mexican TTSuV1b sequences than Mexican  
33  
34 41 TTSuV1a sequences in which several substitutions were found. These changes influence the conformation of  
35  
36 42 dominant epitopes since different arrays were found among TTSuV1a genotypes. The current work findings  
37  
38 43 imply that ORF2 variability may potentially modify viral replication and immune response, accounting for a  
39  
40 44 different pathogenicity and worldwide prevalence.  
41  
42

43  
44  
45 46 *Keywords:* Anelloviridae, ORF2, PCV2, Torque teno sus virus  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 **53 INTRODUCTION**

54 Torque teno sus virus is an agent that has been reclassified over time. In the year of 1999, it was within family  
55 Circoviridae because certain characteristics were shared with Porcine Circovirus [1, 2]; afterwards in 2002 it  
56 was integrated into Circoviridae family forming a new genus named as *Anellovirus* [3, 4]. Additionally, 2  
57 genotypes were proposed, Torque teno virus porcine 1 (g1-TTVsw) and Torque teno virus porcine 2 (g2-  
58 TTVsw) [5, 6]. In 2009, the Viral Taxonomy Committee (ICTV) established *Anelloviridae* family, which  
59 includes the *Iotatorquevirus* genus with two species, Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and Torque teno sus  
60 virus 2 (TTSuV2) [7]. The advances in sequencing have increased research of *Iotatorquevirus* species,  
61 generating sufficient data to propose a new classifications based on complete sequences. In 2010, two  
62 genotypes of Torque teno virus 1 (TTSuV1a and TTSuV1b) and subtypes for the Torque teno virus 2  
63 (TTSuV2b and TTSuV2c) were proposed [8]. Subsequently, 4 subtypes were described for TTSuV1 and 2 for  
64 TTSuV2 [9]. Currently, the ICTV, based on Open Reading Frame 1 (ORF1) sequencing, established genus  
65 *Iotatorquevirus* with 2 species, Torque teno sus virus 1a (TTSuV1a, previously known as TTSuV1) and  
66 Torque teno sus virus 1b (TTSuV1b, previously named as TTSuV2), and *Kappatorquevirus* genus which  
67 includes Torque teno his virus k2 species (TTSuVk2), previously known as TTSuV [7].  
68 TTSuV1a has 2.8 to 2.9 kb (2863-2913 nucleotides), while TTSuV1b has 2.7 to 2.8 kb (2735-2803  
69 nucleotides) [8]. Such difference is mainly due to several insertions and/or deletions located around the 700-  
70 900, 1400-1500 and 1650-1750 positions [9]. Torque teno sus virus has 3 ORF (ORF1, ORF2, and ORF3) as  
71 well as a GC-rich short untranslated region (UTR) [8-10]. UTR is highly-conserved in the *Anelloviridae*  
72 family; including human TTV, being used as a target in diagnostic tests [11]. Also, this zone has been  
73 proposed as a molecular marker for Torque teno sus viruses in pigs [12]. By analogy with chicken anemia  
74 virus (CAV) and porcine circoviruses (PCV), it has been established that ORF1 encodes the capsid protein [8-  
75 10]. ORF1 comprises high variability which is used for ICTV classification of TTSuV [7]. ORF2 region also  
76 encompasses high genomic variability [13, 14] and codifies for a conserved tyrosine phosphatase (PTPasa)-  
77 like protein [15]. In human Torque teno virus, this protein has been associated with viral replication and  
78 pathogenic potential due to a decrease of IL-6, IL-8 and COX2 expression through an interaction with IKK $\beta$   
79 and IKK $\alpha$  [16, 17]. By analogy, it is postulated such events might be present in TTSuV. ORF3 encodes for an  
80 unknown function protein.

1  
2  
3  
4 81 Thus far, it has not yet been established whether TTSuV infection causes a specific disease as the primary  
5  
6 82 agent, being controversial since it is ubiquitous in healthy and domestic pigs around the world [10]. Several  
7  
8 83 worldwide studies have been conducted where the presence of TTSuV1a and TTSuV1b has been  
9  
10 84 demonstrated in cases of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and porcine dermatitis and  
11  
12 85 nephropathy syndrome (PDNS). However, their association with porcine circovirus associated disease  
13  
14 86 (PCVAD) remains unclear. In Mexico, a retrospective study was performed to detect the presence of  
15  
16 87 TTSuV1a and TTSuV1b in cases of PCVAD in which was found a lower frequency of both *Iotatorquevirus*  
17  
18 88 species than shown in other reports in spite of the PCV2-status. Furthermore, there was no statistic  
19  
20 89 relationship with PCVAD. It was proposed that Mexican prevalent *Iotatorquevirus* species might have a  
21  
22 90 different genomic variability, accounting for a distinct pathogenic potential [18]. Therefore, the study of the  
23  
24 91 genomic variability of *Iotatorquevirus* species, which has been portrayed a geographic trend, might be useful  
25  
26 92 to elucidate divergences concerning its association with PCVAD. The aim of the present work is to perform a  
27  
28 93 phylogenetic analysis of region ORF2 of *Iotatorquevirus* species in cases of PMWS from different regions of  
29  
30 94 Mexico.

## 31 32 33 34 35 96 **MATERIAL AND METHODS**

### 36 37 97 **Case selection**

38  
39 98 Nine and fifteen genomic DNA with predetermined positive status of TTSuV1a and TTSuV1b; respectively,  
40  
41 99 were used to amplify the complete ORF2 by nested PCR. The genomic DNA was obtained from archival  
42  
43 100 formalin-fixed paraffin-embedded tissues from a non-vaccinated pig population composed of PCV2-affected  
44  
45 101 tissues with confirmed PMWS based on diagnostic criteria [19], and PCV2-negative lymph nodes from age-  
46  
47 102 matched, healthy pigs. The *Iotatorquevirus* status was validated through nested PCR in a retrospective study  
48  
49 103 [18].

### 50 51 104 **Primer design**

52  
53 105 The primers were designed to amplify the complete ORF2 of TTSuV1a and TTSuV1b using the Primer 3  
54  
55 106 input program (v3.0.0, Institute for Biomedical Research, Boston, MA) [20], and analyzed with the Bio Edit  
56  
57 107 program (v7.2.5, Ibis Bioscience, Carlsbad, CA) [21]. For the design of the TTSuV1a primers, 10 sequences  
58  
59 108 from different countries available in Gen Bank (HM633249, HM633253, HM633258, AY823990,



1  
2  
3  
4 109 HM633257, AB076001, GU188045, GU456383, GU456384, and GQ120664) were used. Likewise, 12  
5  
6 110 sequences of TTSuV1b (HM633230, JX173484, HQ204188, GU376737, KC461227, JQ782385, HM633218,  
7  
8 111 GU456386, GU188046, GU570207, AY823991, and NC014092) were utilized.  
9

### 10 112 **Nested PCR**

11  
12 113 The DNA extraction from all tissues was separately performed using commercial kits according to the  
13  
14 114 manufacturer's instructions (QIAamp DNAFFPE Tissue kit, Qiagen, Germany). Briefly, DNA was eluted in a  
15  
16 115 volume of 200 µL molecular grade water, and stored at -20°C. The nested PCR was done in 50 µL reactions,  
17  
18 116 containing 2.5 U Taq DNA polymerase (GoTaq Flexi DNA polymerase, Promega Corp. Madison, WI)  
19  
20 117 polymerase chain reaction (PCR) buffer 1X, magnesium chloride 2.25 mM (TTSuV1a)/1.5 mM (TTSuV1b),  
21  
22 118 0.2 mM of each deoxynucleotide (dNTP), 100 pmol of each primer (TTSuV1a first round forward 5'-  
23  
24 119 CAGTTCCGAATGGCTGAGTT-3' and reverse 5'-AGTGTBACHTCHCCACTYC-3'; nested forward 5'-  
25  
26 120 ATCCAGATCCGGAGTCAA-3' and reverse 5'-TGYTTTTTCWGTGTCCCAYTGC-3'; TTSuV1b first  
27  
28 121 round 5'-CTGCAAAATTACAGCTAAAACCACA-3' and reverse 5'-TAAAGGGGAGACAGGTACGGA-  
29  
30 122 3', nested forward 5'-CCACAGGAACTGTGCAAAA-3' reverse 5'-CCATTGTATGACCGGAGCTT-3'),  
31  
32 123 and 50 ng of template in a thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg, Germany) The thermal  
33  
34 124 cycle was as follows: the initial activation step at 94°C for 5 min followed by 40 cycles of 1 min at 94°C, 1  
35  
36 125 min at 57°C (TTSuV1a) or 59°C (TTSuV1b) and 1 min at 72°C, finally last extension step of 10 min at 72°C.  
37  
38 126 The PCR products expected size products of 456 bp and 509 bp for TTSuV1a for TTSuV1b; respectively,  
39  
40 127 were electrophoretically separated on a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide visualized under  
41  
42 128 ultraviolet light (Apollo, Instrumentation, Claremont CA), and photodocumented (Doc-It System, UVP  
43  
44 129 BioImaging Systems, Cambridge, UK.)  
45  
46

### 47 130 **Sequencing**

48  
49 131 The amplified products from each species were purified from agarose gel using a commercial kit (Min Elute  
50  
51 132 Gel Extraction kit, Qiagen, Germany) following the manufacturer's instructions. The products were  
52  
53 133 sequenced through a commercial kit (BigDye Terminator V3.1, Applied Biosystems, USA) using a sequencer  
54  
55 134 (3500 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA).  
56

### 57 135 **Phylogeny and sequence analysis**

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

136 The nucleotide sequences were edited, aligned, and analyzed with Bioedit software (v7.2.5, Ibis Bioscience,  
137 Carlsbad, CA) [21]. The phylogenetic analysis was performed using MEGA7 [22]. To compare the  
138 homology, identity and divergence of the TTSuV1a ORF2 Mexican sequences, 11 ORF2 from complete  
139 sequences of TTSuV1a were used, as well as 20 ORF2 partial sequences classified into genotypes A, B, C and  
140 D [14]. Similarly, the ORF2 of 6 TTSuV1b complete sequences as well as the ORF2 from 17 partial  
141 sequences classified in genotypes A and B [14] were utilized. In addition, the ORF2 from 2 complete  
142 sequences of the TTSuVκ2 was used to compare with the Mexican sequences. Subsequently, an aminoacid  
143 prediction and an identity matrix with nucleotide sequences and amino acid sequences was conducted with the  
144 Bio Edit program (v7.2.5, Ibis Bioscience, USA) [22]. Phylogenetic trees were constructed from nucleotide  
145 and aminoacid sequences using the Maximun Parsimony method, with the MEGA7 program [22] and the  
146 Tamura-Neg Gamma distance. The statistic trust of the topology was assured with bootstrap values, 1000  
147 repetitions. Bootstrap results over 65 (650) were considered significant. The assessment of non-synonymous  
148 ( $d_N$ ) and synonymous ( $d_S$ ) mutations, and the nucleotide substitution by site ( $d_N/d_S$  ratios) for the complete  
149 ORF2 of each *Iotatorquevirus* species genotype was performed using SNAP v2.11 program [23] based on the  
150 set of allele-coded nucleotide sequences.

151 **Prediction of dominant epitopes**

152 The prediction of dominant epitopes was performed using the Antibody Epitope Prediction program (IEDB  
153 Analysis Resource) [24] with the Kolaskar and Tongaonkar antigenicity scale method [25].

154  
155 **RESULTS**

156 The nested PCR protocol was optimized to obtain 456 bp products for TTSuV1a and 509 bp products for  
157 TTSuV1b. Nine nested TTSuV1a products were sequenced, obtaining 397 nucleotides that corresponded to  
158 the 39 terminal nucleotides of the UTR, 219 nucleotides of the full ORF2 and 289 nucleotides of the ORF1  
159 (including 120 splicing nucleotides shared with the ORF2). The topography of the TTSuV1a phylogenetic  
160 tree (Fig. 1) showed a high diversification in four well-defined clades, corresponding to the four genotypes  
161 reported. The nine Mexican sequences of TTSuV1a (KY964431, KY964432, KY964433, KY964434,  
162 KY964435, KY964436, KY964437, KY964438 and KY964439) belong to genotype B, but were included in  
163 a different sub-clade wherein four Mexican sequences clustered in the same branch of a Chinese sequence;

1  
2  
3  
4 164 three Mexican sequences clustered with a German sequence supported with bootstrap value of 92. The  
5  
6 165 remaining two Mexican sequences are grouped with the Canadian sequence supported with bootstrap value of  
7  
8 166 85. Additionally, Spanish and Slovakian sequences are also classified as genotype B which were located in  
9  
10 167 this same clade but in a distinct branch from the Mexican sequences.  
11  
12 168 The nucleotides (nt) and amino acid (aa) similarity levels among Mexican sequences were 93.6% -100% and  
13  
14 169 91.6% -100%, respectively. In addition, the nt and aa similarity levels of the Mexican sequences with regard  
15  
16 170 to different genotypes B was 93.1% -99% and 91.6% -100%, respectively. However, these ranges were wider  
17  
18 171 compared to one Spanish sequence and Slovakian sequences that also belonged to genotype B (77.6% -92.6%  
19  
20 172 at the nt level and 65.2% -91.6% at the aa level). Concerning the similarities of Mexican sequences with other  
21  
22 173 genotypes the ranges of nt and aa, respectively, were: 58.4%-61.6% and 43%-45.8% for genotype C, 50.6% -  
23  
24 174 54.3% and 37.5%-40% for genotype D, and 27.8% -31.9% and 10.9% -13.6% for genotype A.  
25  
26 175 Concerning the aa prediction, genotypes B, C and D codify for 72 aa whereas genotype A exhibited an ORF2  
27  
28 176 for 73 aa as shown in figure 2. Furthermore, the aa sequences of all TTSuV1a genotypes herein compared,  
29  
30 177 exhibited a conserved motif (Wx<sub>7</sub>Hx<sub>3</sub>Cx<sub>1</sub>Cx<sub>5</sub>H), corresponding to the protein-tyrosine phosphatase (PTP-ase)  
31  
32 178 signature motif [26]. Additionally, the two aa residues before the last histidine of the signature motif were  
33  
34 179 dissimilar among the TTSuV1a genotypes as follows: for genotype B (KK→QD), genotype C (KK→RN),  
35  
36 180 genotype D (KK→YD) and genotype A (KK→RD). The aa changes among the Mexican sequences and the  
37  
38 181 reference sequences of genotype B are shown in the table 1. On the other hand, the value (d<sub>N</sub>) between  
39  
40 182 Mexican sequences was 0.015 and between Mexican compared to the reference genotype B sequences used in  
41  
42 183 the current work was 0.043, while the value (d<sub>S</sub>) mutations was 0.15 and 0.19 respectively. Likewise, the  
43  
44 184 d<sub>N</sub>/d<sub>S</sub> ratio was 15.39 within Mexican sequences, and 9.33 among all genotype B sequences.  
45  
46 185 Finally, the prediction of dominant epitopes resulted in four well-defined genotype arrays; genotype B  
47  
48 186 sequences (including the nine Mexican sequences) had two dominant epitopes consisting of a seven aa  
49  
50 187 peptide (DLDCRCG) and a 20 aa peptide (HLWLLADGDAALAAAVDAI) as shown in figure 3B  
51  
52 188 (KY964436). However, the Spain sequence of this genotype showed four peptides composed of seven  
53  
54 189 (GIACQCG), eight (PLWVLLPD), eight (RLAPPVDD) and six (GEVVMG) aa. The genotype C displayed  
55  
56 190 three dominant epitopes formed by a six aa peptide (LSSTAW), a seven aa peptide (ETHCKCG) and a 15 aa  
57  
58 191 peptide (LWTLCALDDADLAAA) as shown in figure 3C (JF451512). Genotype D had two dominant  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 192 epitopes, consisting of seven aa (NLDCRCG) and 18 aa (HLQRLCALDQLDAVAAAA) as shown in figure  
5  
6 193 3D (JF451557). Finally, genotype A showed three dominant epitopes formed by 15 aa  
7  
8 194 (LTSCTSIHDHHCNCG), one of 10 aa (LWTLCALDDA) and one of six aa (LAAAAA) as shown in figure  
9  
10 195 3A (JN181970).  
11  
12 196 Regarding TTSuV1b, the fifteen nested products were sequenced, obtaining 545 nucleotides which are  
13  
14 197 composed of 232 UTR terminal nt, 207 nt of the complete ORF2, and 139 nt of ORF1, including 126 splicing  
15  
16 198 nt. shared with ORF2. The topography of the TTSuV1b phylogenetic tree (Figure 4) revealed a high  
17  
18 199 diversification of the phylogenetic relation amidst Mexican sequences, being clustered in different clades of  
19  
20 200 TTSuV1b genotype A sequences from different countries of three continents (America, Asia and Europe).  
21  
22 201 Interestingly, three Mexican sequences (KY964416, KY964421 and KY964422) were clustered in the same  
23  
24 202 sub-clade of TTSuV1b United Kingdom sequences (JF451586 and JF451588), and Brazilian sequences  
25  
26 203 (AY823991 and NC014092) that were re-classified as TTSuVκ2.  
27  
28 204 The analysis of nt and aa similarity among TTSuV1b Mexican sequences revealed ranges of 83.5%-99% and  
29  
30 205 82.3% -100%, respectively, but the similarity between the Mexican sequences and the TTSuV1b genotype A  
31  
32 206 sequences from different countries was 91.6% -100% at nt level and 82.3% -100% at aa level. In addition, the  
33  
34 207 Mexican sequence (KY964418) and the genotype A Romanian sequence (JX449011), showed the lowest nt  
35  
36 208 and aa similarity ranges 78.7%-83.5% and 54.4%-64.7%, respectively. Nevertheless, the similarity ranges  
37  
38 209 identified between the Mexican TTSuV1b and TTSuVκ2 sequences from Brazil were also low, 83% -98%  
39  
40 210 and 57.3% -94.1% in nt and aa respectively. Finally, the TTSuV1b sequences of genotype B showed  
41  
42 211 similarity of 69.5%-86.6% in nt and 40.5%-82.6% in aa, respectively, with the Mexican sequences.  
43  
44 212 Pertaining to the prediction of the aa sequence, TTSuV1b genotype B and TTSuVκ2 revealed an ORF2 for 68  
45  
46 213 aa whereas genotype A exhibited an ORF2 for 69 aa (Figure 6). These sequences also exhibited the PTP-ase  
47  
48 214 signature motif (W<sub>x7</sub>H<sub>x3</sub>C<sub>x1</sub>C<sub>x5</sub>H) as described for TTSuV1a sequences. The two Lysine residues before the  
49  
50 215 last histidine of the PTPase domain were conserved in both genotypes and the TTSuVκ2 species. In this  
51  
52 216 sense, the aa changes between the Mexican sequences and the reference sequences of genotype A and  
53  
54 217 TTSuVκ2 sequences are shown in the table 2. On the other hand, the value (d<sub>N</sub>) between Mexican sequences  
55  
56 218 was 0.060 and 0.050 among the reference genotype A and TTSuVκ2 sequences, while the value (d<sub>S</sub>)  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

219 mutations was 0.0064 and 0.060 respectively, and  $d_N/d_S$  ratio was 1.82 in Mexican sequences, and 1.98  
220 among all genotype A and TTSuVk2 sequences.

221 The prediction of dominant epitopes from all sequences herein compared, showed two arrangements. A first  
222 group formed by the sequences of China (JX535329 and JQ664305), Argentina (JF451731), Canada  
223 (JF451619), Spain (GU570197, GU570209 and JF451778), Thailand (JF451815) and four sequences from  
224 Mexico (KY964424, KY964425, KY964421 and KY964430) which had two dominant epitopes composed of  
225 15 aa (LTVAYCAHGLFCGCK), and 8 aa (LEKCLTDA) as shown in figure 6A (KY964424). The second  
226 group encompasses a larger number of sequences: USA (GU456386 and JF451603), Canada (JF945197 and  
227 JF451599), China (HQ204188), United Kingdom (JF451586 and JF451588), Germany (JF451596), nine  
228 sequences from Mexico (KY964417, KY964426, KY964422, KY964419, KY964416, KY964420,  
229 KY964429, KY964427, KY964423 and KY964428) as shown in figure 6C (KY964417), also, two TTSuVk2  
230 Brazilian sequences (AY823991 and NC014092). These sequences had two dominant epitopes formed by 15  
231 aa (LTVAYCAHGLFCGCK), and 7 aa (LEKCLTD) as shown in figure 6B (AY823991). In addition, the B  
232 genotype had three dominant epitopes composed of 15 aa (LTVAYCAHGLFCDCK), 7 aa (LEKCLTD), and  
233 8 aa (IDALIAAA) as shown in figure 6D (JF451843). In the case of Romania (JX449011) and Mexico  
234 (KY964418), which were clustered on the same branch in the phylogenetic tree, presented important  
235 differences in the conformation of their epitopes; the Mexican sequence possess two dominant epitopes (11  
236 aa, GLTVPYGPPGL and other of 10 aa, KKLLEKCLTN), while the Romanian sequence had one dominant  
237 epitope (8 aa, KGAYCAPG).

238

## 239 **DISCUSSION**

240 Several studies have suggested that co-infection of *Iotatorquevirus* species with another virus increases  
241 severity of disease as a result of synergism [10, 27, 28]; being the main association with PCVAD [29-33]. In  
242 natural cases of PMWS, a high frequency of TTSuV1a and PCV2 has been described [29]. In a model using  
243 gnotobiotic piglets, TTSuV1a was proposed as a possible trigger for the development of PMWS [30].  
244 Additionally, PDNS could be reproduced in PCV2 negative pigs by previously inoculating TTSuV1a and  
245 PRRS viruses [31]. In this sense, the TTSuV1a seroprevalence in Europe has been high, being 66-76% in  
246 Spain [29, 33-35], 77% in Sweden [32], 71.4% in Slovakia [36], while in Gran Brittany was 41-48% but from

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

247 fresh tissues [37]. Nevertheless, several reports from Brazil [38], Cuba [28] and Japan [39] showed values of  
248 48%, 40% and 30%, respectively. Conversely, the data regarding TTSUV1b are even more contrasting, since  
249 Spain has reported a frequency of 91% [29, 35] to 100% [33], consistent with the 94% reported in Sweden  
250 [32] and the 64% found in the UK [37] and Slovakia [36]. Such prevalence is considerably dissimilar to that  
251 found in a Mexican retrospective study in which the prevalence of both *Iotatorquevirus* species was markedly  
252 lower, showing no significant relationship with the observation of PCVAD in non-vaccinated pigs [18]. The  
253 gathered data elsewhere have suggested that the prevalence of *Iotatorquevirus* species might be related to the  
254 geographical origin. Given the genomic variability, it is feasible that Mexican strains share a lower nucleotide  
255 identity, accounting for a different pathogenicity.

256 It is claimed that alteration of functional viral genes due to presence of insertions, deletions or changes in the  
257 nucleotide or aminoacid sequences might have different repercussions in the pathogenic, evolution or  
258 infective cycle of viral agents [15]. Because the ORF2 of both *Iotatorquevirus* species encodes for a  
259 conserved tyrosine phosphatase (PTPase)-like protein, which is involved in the replication and in its  
260 pathogenic potential [15], the sequence variability of this region may portray a distinctive pathogenic  
261 potential.

262 ORF2 gene of TTSuV1a possesses the higher variability, being used for classifying TTSuV1a into 4  
263 genotypes: A, B, C and D [13, 14]. In addition, it is known that global trade of pigs contributes with diversity  
264 of carrying viruses [13]. Because the phylogenetic analysis revealed that Mexican sequences have high nt.  
265 identity with North American (USA and Canada) and Asian (China) genotype B sequences. Given the close  
266 commercial link of Mexico with those countries, such similarity might account for the origin of TTSuV1a  
267 strains currently present in the Mexican pig population. On the other hand, TTSuV1a genotype A has not been  
268 reported in America [13, 14]. Since this genotype showed the lowest nt. and a.a. sequence identity in the  
269 current work, it is feasible that such dissimilarity contributes to the marked prevalence differences informed  
270 in Mexico with respect to European countries where genotype A is commonly found.

271 Likewise, the human TTV, Torque teno mini virus and chicken anemia virus (CAV) have two Lysine residues  
272 (KK) ahead before the last Histidine residue of the PTPase-like signature motif [15, 26]. At present, only one  
273 change in the first Lysine residue (K→R/Q/Y) has been reported in *Iotatorquevirus* species [14]. In this study,  
274 the substitution was identified in both Lysine residues varying among TTSuV1a genotypes: “A” (KK→RD),

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

275 “B” (KK→QD), “C” (KK→RN) and “D” (KK→YD). These substitutions might modify viral replication of  
276 since it has been informed that changes of two Lysine residues modified viral replication of CAV, causing its  
277 attenuation [40, 41]. In this scenario, the marked prevalence differences reported worldwide, which range  
278 from 80% -90% in Spain and China [42] to lower values of 40% -33% in USA [42] and Mexico [43] might be  
279 related to aa changes in Lysine residues among different genotypes of TTSuV1a. Such variations may also  
280 decrease the host ability to start an immune response since it has been described an ORF2-associated  
281 suppression of NF- $\kappa$ B [17, 44].  
282 The tertiary structure of proteins is due to many interactions where aa hydrophobicity plays a determining  
283 role. A conformational change in the precise site of dominant epitopes can have a relevant impact in immune  
284 function, particularly on immunoglobulin production. It has been found that several IgG’s are able to bind to  
285 ORF1 products [44-48] and ORF2 [49] from TTSuV1a and TTSuV1b.  
286 Remarkably, the Mexican, North American and Asian sequences of TTSuV1a genotype B share dominant  
287 epitopes, suggesting again a possible geographical relationship. In contrast, a Spanish sequence of TTSuV1a  
288 genotype B displayed a distinct region of dominant epitopes which is similar to the ORF2 sequences of A, C  
289 and D genotypes. Such sequence showed more phylogenetic distance from the Mexican sequence since it was  
290 found in a different clade and less nt. and aa similarity, sustaining the statement of geographic disparity of  
291 Mexican TTSuV1a strains from European strains, particularly from Spain which has informed repeatedly a  
292 high prevalence of *Iotatorquevirus* species.  
293 With respect to TTSuV1b, the phylogenetic tree showed a wide distribution in the clade that included the  
294 Mexican sequences with low values of bootstrap values, which might indicate the presence of endemic  
295 Mexican strains. Moreover, the sequences belonging to the TTSuV $\kappa$ 2 revealed high homology with the  
296 Mexican TTSuV1b sequences. This finding is relevant because these sequences stand for two viral agents  
297 from different genera, suggesting that ORF2 is conserved in both genera; unlike ORF1, which is used by the  
298 International Committee on Taxonomy of Viruses [7] to classify them into different genera.  
299 ORF2 TTSuV1b, possesses two Lysine (KK) residues conserved prior to the last Histidine residue of the  
300 PTPase-like signature motif as described for TTSuV1a [13, 14]. This motif is present in the Mexican  
301 TTSuV1b sequences reported in this work, matching with TTSuV1b sequences from other countries. It is  
302 worth mentioning that these same Lysine residues of PTPase-like were also conserved for both A and B

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

303 genotypes, as well for the TTSuVk2. Furthermore, the genetic variability of TTSuV1b was lower than the one  
304 for TTSuV1a [14], a fact that is consistent with the data obtained in the current study. In this sense, the  
305 prediction of dominant epitopes revealed two regions that encompassed most of the Mexican sequences, as  
306 well as the genotype B TTSuV1b and the TTSuVk2 sequences from the GenBank. However, one Mexican  
307 TTSuV1b sequence (KY964418) as well as sequences of TTSuV1b from Thailand, South Korea, Romania;  
308 sharing the same phylogenetic tree clade with high bootstrap values, possess a rather different region of  
309 dominant epitopes from most of the sequences used in this work.  
310 Taking together, it is important to notice that all the gathered data depict that Mexican strains of  
311 *Iotatorquevirus* species considerably differ from those elsewhere reported, particularly from European strains,  
312 and provide some insights regarding the pathogenic potential of geographically distributed strains. Further  
313 phylogenetic studies must be performed to validate the variability of endemic genotypes of porcine torque  
314 teno virus throughout the world in order to establish their involvement in severe clinical cases by interacting  
315 with PCV2 or other viruses that generates economic losses to porcine industry.

316

317 **ACKNOWLEDGEMENTS**

318 Project funded by CONACYT No. 254244 and the Research Unit of the College of Veterinary Medicine and  
319 Zootechnics. Also, we are thankful to DGAPA-UNAM (PAPIIT IN203309) and CONACYT scholarship  
320 program for its commitment to support graduate students.

321  
322  
323  
324  
325  
326  
327  
328  
329  
330  
331  
332



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

333 Table 1. Changes in the amino acids of the ORF2 of the Mexican sequences of the TTSuV1a B genotype B

.Position	Predominant aminoacid	Aminoacid substitute	Sequences with the changes
20	D	N	KY964432
50	R	K	KY964431, KY964433 and GQ120664
53	M	L	KY964431 and KY964433
56	E	G	KY964431, KY964433 and GQ120664
57	D	G	KY964432, KY964431, KY964433, KY964437, KY964438, GQ120664, HM633253, JQ933527 and JF451573.
69	E	D	KY964431

334

335 Table 2. Changes in the amino acids of the ORF2 of the Mexican sequences of the TTSuV1b A genotype

Position	Predominant aminoacid	Aminoacid substitute	Sequences with the changes
3	E	K	KY964427, KY964428, KY964423, KY964418 and JX449011
12	A	P	KY964427, KY964428, KY964423 and KY964418
18	G	D	KY964424, KY964430, KY964418, GU570209, GU570197, JF451619, JF451731 and JX449011.
21	D	N	KY964426, KY964427, KY964428, KY964423, KY964418, JF451599 and JX449011
27	E	K	KY964427
31	T	K	KY964427 and KY964423
36	D	N	KY964422
38	E	G	KY964426, KY964427, KY964428, KY964423 and JF451599
41	R	P	KY964426, KY964427, KY964428, KY964423, KY964420, KY964429 and JF451599
42	Q	H	KY964416, KY964417, KY964422, KY964419, JF451586, JF451588, JF451596, GU456386, HQ204188, JF451597, NC014092, AY823991 and JF451603
43	G	E	KY964430, KY964426, KY964421, KY964419, GU570209, GU570197, JF451619, JF451599, JQ664305, JF451778, JF451603 and JX449011
44	D	G	KY964425
46	G	D	KY964424, KY964421, KY964418, JX535329, and JF451731
47	T	P	KY964427, KY964428, KY964423, KY964418 and JX449011
53	T	S	KY964426, KY964427, KY964423, GU456386 and HQ204188

336

337

338

339

340

341

342

343

344

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**345 Figure Captions**

346 Figure 1. Phylogenetic tree showing the nucleotide sequences of ORF2 belonging to the different genotypes  
347 identified from Torque teno virus 1a with GenBank accession numbers, and country of origin. The sequences  
348 were distributed into four genotypes. (B genotype ●Mexicans, Canadian, American, German, Chinese,  
349 Spanish and Slovak; C genotype ■Argentines, Chilean, English, Spanish and Korean; D genotype  
350 ▼Canadian, American, Chilean, Japanese, Spanish and Thai; A genotype ♦American, Chilean, Spanish,  
351 Dutch and Australian). The Mexican sequences (●KY964431, KY964432, KY964433, KY964434,  
352 KY964435, KY964436, KY964437, KY964438 and KY964439) belong to nine positive cases described in  
353 this paper. The length of the branch represents the genetic distance among the sequences.

354  
355 Figure 2. Phylogenetic tree showing the nucleotide sequences of ORF2 belonging to the different genotypes  
356 identified from Torque teno virus 1b with GenBank accession numbers, and country of origin. (B genotype  
357 ●American, German, Australian, Korean and Macedonian;▲Mexican (KY964418 and KY964419),  
358 American (A genotype), Thai and Korean; ■Mexican (KY964424 and KY964430), Argentine (A genotype),  
359 Canadian, Spanish and Chinese; ▼Mexican (KY964425), Chinese and Spanish; ♦Mexican (KY964427,  
360 KY964428, KY964423, KY964429, KY964426 and KY964420) and Canadian, ◇Mexican (KY964417),  
361 American, Chinese and German; ○Mexican (KY964416, KY964421 and KY964422), Canadian (A  
362 genotype) and Brazilian (TTSuVκ2). The Mexican sequences (KY964416, KY964417, KY964418,  
363 KY964419, KY964420, KY964421, KY964422, KY964423, KY964424, KY964425, KY964426,  
364 KY964427, KY964428, KY964429 y KY964430) belong to the 15 positive cases described in this paper. The  
365 length of the branch represents the genetic distance among the sequences.

366  
367 Figure 3. ORF2 aminoacid prediction for TTSuV1a. The four genotypes described for TTSuV1a (A, B, C and  
368 D) and their respective changes in aminoacids are shown. \*PTPasa-like signature motif sample; the gray  
369 rectangle shows the two residues, previous to the last histidine different for each TTSuV1a genotype.

370  
371 Figure 4. ORF2 aminoacid prediction for TTSuV1b. The two genotypes described for TTSuV1b (A  
372 y B), TTSuVκ2, the Mexican sequences and their respective changes in amino acids are shown.  
373 \*PTPasa-like signature motif sample; the gray rectangle shows the two residues, previous to the last  
374 histidine different for each preserved genotype of TTSuV1b and TTSuVκ2.

375  
376 Figure 5. Prediction of the ORF2 dominant epitopes from TTSuV1a. (A) Shows the three peptides that shape  
377 the dominant epitopes of the A genotype; (B) Shows the two peptides that shape the dominant epitopes of the  
378 “B” genotype; (C) Shows the three peptides that shape the dominant epitopes of the C genotype; (D) Shows  
379 the two peptides that shape the dominant epitopes of the D genotype.

380

1  
2  
3  
4 381 Figure 6. Prediction of the ORF2 dominant epitopes from TTSuV1b. (A) Shows the two peptides that shape  
5  
6 382 the dominant epitopes of one group of sequences to the A genotype (KY964417); (B) Shows the two peptides  
7  
8 383 that shape the dominant epitopes of the TTSuVk2 (AY823991); (C) Shows the two peptides that shape the  
9  
10 384 dominant epitopes of second group of sequences to the A genotype (JF451778); (D) Shows the three peptides  
11  
12 385 that shape the dominant epitopes of the second group of sequences to the B genotype (JF451843).  
13  
14 386

## 16 387 REFERENCES

- 18 388 1. Mushahwar I, Erker J, Muerhoff A, Leary T, Simons J, Birkenmeyer L, Chalmers M, Pilot-Matias T,  
19 389 Dexai S. Molecular and biophysical characterization of TT virus: Evidence for a new virus family  
20 390 infecting humans. *Proc Natl Acad Sci.* 1999;96:3177-3182.
- 21 391 2. Miyata H, Tsunoda H, Kazi A, Yamada A, Khan M, Murakami J, Kamahora T, Shiraki K, Hino S.  
22 392 Identificacion of a novel GC-Rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA  
23 393 genome of TT virus, the first human circovirus. *J Virol.* 1999;73:3582-3586.
- 24 394 3. Yzebe D, Xueref S, Baratin D, Bouletreau A, Fabry J, Vanhems P. TT virus. A review of the literature.  
25 395 *Panminerva Med.* 2002;44:167-177.
- 26 396 4. Biagini P, Todd D, Bendinelli M. Anelloviruses. In *Virus taxonomy: Eight Report 455 of the*  
27 397 *International Committee on taxonomy viruses.* Elsevier/Academis press. 2004:335-341.
- 28 398 5. Peng Y, Nishizawa T, Takahashi M, Ishikawa T, Yoshikawa A, Okamoto H. Analysis of the entire  
29 399 genome of thirteen TT virus variants classifiable into the fourth and fifth genetic groups, isolated from  
30 400 viremic infants. *Arch Virol.* 2002;147:21-41.
- 31 401 6. Niel C, Diniz-Mendes L, Devalle S. Rolling-circle amplification of Torque teno virus (TTV) complete  
32 402 genomes from human and swine sera and identification of a novel swine TTV genogroup. *J Gen Virol.*  
33 403 2005;86:1343-1347.
- 34 404 7. Davison AJ, ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses. *Virus taxonomy 2017.* Disponible  
35 405 en: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
- 36 406 8. Huang YW, Dryman BA, Harrall KK, Vaughn EM, Roof MB, Meng XJ. Development of SYBR green-  
37 407 based real time PCR and duplex nested PCR assay for quantitation and differential detection of species or  
38 408 type specific porcine Torque Teno viruses. *Journal of virological methods.* 2010;170:140-148.
- 39 409 9. Cortey M, Macera L, Segalés J, Kekarainen T. Genetic variability and phylogeny of Torque teno sus  
40 410 virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) based on complete genomes. *Vet Microbiol.* 2011;148:125-131.
- 41 411 10. Huang YW, Harrall KK, Dryman BA, Beach NM, Kenney SP, Opriessnig T, Vaughn EM, Roof MB,  
42 412 Meng XJ. Expression of the putative ORF1 capsid protein of Torque teno sus virus 2 (TTSuV2) and  
43 413 development of western blot and ELISA serodiagnostic assay: Correlation between TTSuV2 viral load  
44 414 and IgG antibody level in pigs. *Virus Res.* 2011;158:79-88.
- 45 415 11. Hino S and Miyata H. Torque teno virus (TTV): current status. *Rev Med Virol.* 2006;17:45-47.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

416 12. Segalés J, Martínez-Guinó L, Cortey M, Navarro N, Huerta E, Sibila M, Pujols J, Kekarainen T.  
417 Retrospective study on swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 infection from 1985 to 2005 in  
418 Spain. *Vet Microbiol.* 2009;134:199–207.

419 13. Cortey M, Pileri E, Segales J, Kekarainen T. Globalisation and global trade influence molecular viral  
420 population genetics of Torque Teno Sus Viruses 1 and 2 in pigs. *Vet Microbiol.* 2012;156:81-87.

421 14. Cadar D, Kiss T, Ádám D, Cságola A, Novosel D, Tuboly T. Phylogeny, spatio-temporal phylodynamics  
422 and evolutionary scenario of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) in wild boars: fast  
423 dispersal and high genetic diversity. *Vet Microbiol.* 2013;166:200-213.

424 15. Biagini P. Classification of TTV and related virus (anelloviruses). *Curr Top Microbiol Immunol.*  
425 2009;331:21-33.

426 16. Hijikata M, Iwata K, Ohta Y, Nakao K, Matsumoto M, Matsumoto H, Kanai K, Baba K, Samokhvalov E,  
427 Mishiro S. Genotypes of TT virus (TTV) compared between liver disease patients and healthy individuals  
428 using a new PCR system capable of differentiating 1a and 1b types from others. *Arch. Virol.*  
429 1999;144:2345–2354.

430 17. Zheng H, Ye L, Fang X, Li B, Wang Y, Xiang X, Kong L, Wang W, Zeng Y, Ye L, Wu Z, She Y, Zhou  
431 X. Torque Teno Virus (SANBAN Isolate) ORF2 Protein Suppresses NF-κB Pathways via Interaction  
432 with IκB Kinases. *J Virol.* 2007;81(21):11917-11924.

433 18. Vargas-Ruiz A, Ramírez –Álvarez H, Sánchez-Betancourt JI, Quintero-Ramírez V, Rangel-Rodríguez  
434 CI, Vázquez-Pérez J, García-Camacho LA. Retrospective Study of the Relationship of Torque teno sus  
435 virus 1a and Torque teno sus virus 1b with Porcine Circovirus Associated Disease. *Can J Vet Res.*  
436 2017;81(3):178-185.

437 19. Chae C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet J.* 2005;169:326-336.

438 20. Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Rozen M, Rozen SG. Primer3 - new  
439 capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 2012;40(15):e115.

440 21. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for  
441 Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999;41:95–98.

442 22. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics  
443 Analysis Version 7.0. *Mol Biol Evol.* 2013;30:2725-2729.

444 23. Korber B. HIV Signature and Sequence Variation Analysis. *Computational Analysis of HIV Molecular*  
445 *Sequences.* 2000; Chapter 4, pages 55-72.

446 24. Vita R, Overton JA, Greenbaum JA, Ponomarenko J, Clark JD, Cantrell JR, Wheeler DK, Gabbard JL,  
447 Hix D, Sette A, Peters B. The immune epitope database (IEDB) 3.0. *Nucleic Acids Res.* 2014 Oct 9. pii:  
448 gku938. [Epub ahead of print] PubMed PMID:25300482

449 25. Kolaskar A, Tongaonkar P. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein  
450 antigens. *FEBS Lett.* 1990 Dec 10;276(1-2):172-4.

451 26. Peters M, Jackson D, Crabb B, Browning G. Chicken anemia virus VP2 is a novel dual specificity protein  
452 phosphatase. *J Biol Chem.* 2002;277:39566– 39573.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

453 27. Gallei A, Pesch S, Esking WS, Keller C, Ohlinger VF. Porcine Torque teno virus: Determination of viral  
454 genomic loads by genogroup-specific multiplex rt-PCR, detection of frequent multiple infections with  
455 genogroups 1 or 2, and establishment of viral full-length sequences. *Vet Microbiol.* 2010;143:202-212.

456 28. Pérez LJ, Díaz de Arce H, Frías MT, Perera CL, Ganges L, Nuñez JI. Molecular detection of torque teno  
457 sus virus in lymphoid tissues in concomitant infections with other porcine viral pathogens. *Res Vet Sci.*  
458 2011;91:e154-e157.

459 29. Kekarainen T, Sibila M, Segalés J. Prevalence of swine Torque teno virus in post-weaning multisystemic  
460 wasting syndrome (PMWS)-affected and no-PMWS-affected pigs in Spain. *J Gen Virol.* 2006;87:833-  
461 837.

462 30. Ellis JA, Allan G, Krakowka S. Effect of coinfection with genogroup 1 porcine torque teno virus on  
463 porcine circovirus type 2-associated post weaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic pigs.  
464 *Am J Vet Res.* 2008;69:1608-1614.

465 31. Krakowka S, Ellis JA. Evaluation of induction of porcine dermatitis and nephropathy syndrome in  
466 gnotobiotic pigs with negative results for porcine circovirus type 2. *Am J Vet Res.* 2008;69:1615-1622.

467 32. Blömstrom A, Belák S, Fossum C, Fuxler L, Wallgren P, Berg M. Studies of porcine circovirus type 2,  
468 porcine boca-like virus and torque teno virus indicate the presence of multiple viral infections in post  
469 weaning multisystemic wasting syndrome pigs. *Virus Res.* 2010;152:59-64.

470 33. Aramouni M, Segalés J, Sibila M, Martin-Valls GE, Nieto D, Kekarainen T. Torque teno sus virus 1 and  
471 2 viral loads in post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and porcine dermatitis and  
472 nephropathy syndrome (PDNS) affected pigs. *Vet Microbiol.* 2011;153:377-381.

473 34. Aramouni M, Kekarainen T, Ganges L, Tarradas J, Segalés J. Increased viral load and prevalence of  
474 Torque teno sus virus 2 (TTSuV2) in pigs experimentally infected with classical swine fever virus  
475 (CSFV). *Virus Res.* 2013;172:81-84.

476 35. Nieto D, Aramouni M, Grau-Roma L, Segalés J, Kekarainen T. Dynamics of Torque teno sus virus 1  
477 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) DNA loads in serum of healthy and post weaning multisystemic wasting  
478 syndrome (PMWS) affected pigs. *Vet Microbiol.* 2011;152:284-290.

479 36. Vlasakova M, Leskova V, Sliz I, Jackova A, Vilcek S. The presence of six potentially pathogenic viruses  
480 in pigs suffering from post-weaning multisystemic wasting syndrome. *BMC Vet. Res.* 2014;10:221.

481 37. McMenamy MJ, McKillen J, McNair I, Duffy C, Blomström A, Charreyre C, Welsh M, Allan G.  
482 Detection of a porcine boca-like virus in combination with porcine circovirus type 2 genotypes and  
483 torque teno sus virus in pigs from post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and  
484 non-PMWS-affected farms in archival samples from Great Britain. *Vet Microbiol.* 2013;164:293-298.

485 38. Teixeira T, Dezen S, Cibulski S, Varela A, Sheffer C, Holz C, Fernandes H, Franco A, Roche P. Torque  
486 teno sus virus (TTSuV) in tissues of pigs and its relation with the occurrence of postweaning  
487 multisystemic wasting syndrome. *Vir Gen.* 2013;47:276-281.

488 39. Taira O, Ogawa H, Nagao A, Tuchiya K, Nunoya T, Ueda S. Prevalence of swine Torque teno virus  
489 genogroups 1 and 2 in Japanese swine with suspected post-weaning multisystemic wasting syndrome and  
490 porcine respiratory disease complex. *Vet Microbiol.* 2009;139:347-350.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

491 40. Peters M, Crabb B, Washington E, Browning G. Site-directed mutagenesis of the VP2 gene of chicken  
492 anemia virus affect virus replication, cytopathology and host-cell MHC class 1 expression. *J Gen Virol.*  
493 2006;87:823-831.

494 41. Peters M, Crabb B, Tivendale K, Browning G. Attenuation of chicken anemia virus by site-directed  
495 mutagenesis of VP2. *J Gen Virol.* 2007;88:2168–2175.

496 42. McKweon NE, Fenaux M, Halbur PG, Meng XJ. Molecular characterization of porcine TT virus, an  
497 orphan virus, in pigs from six different countries. *Vet Microbiol.* 2004;104:113-117.

498 43. Vargas A. 2012. Relación del Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) en enfermedad asociada a circovirus  
499 porcino tipo 2 [Tesis de Maestría]. Cuautitlán Izcalli, Estado de México: Universidad Nacional  
500 Autónoma de México

501 44. Singh P, Ramamoorthy S. Immune gene expression in swine macrophages expressing the Torque Teno  
502 Sus Virus 1 (TTSuV1) ORF-1 and 2 proteins. *Vir Res.* 2016;220:33-38.

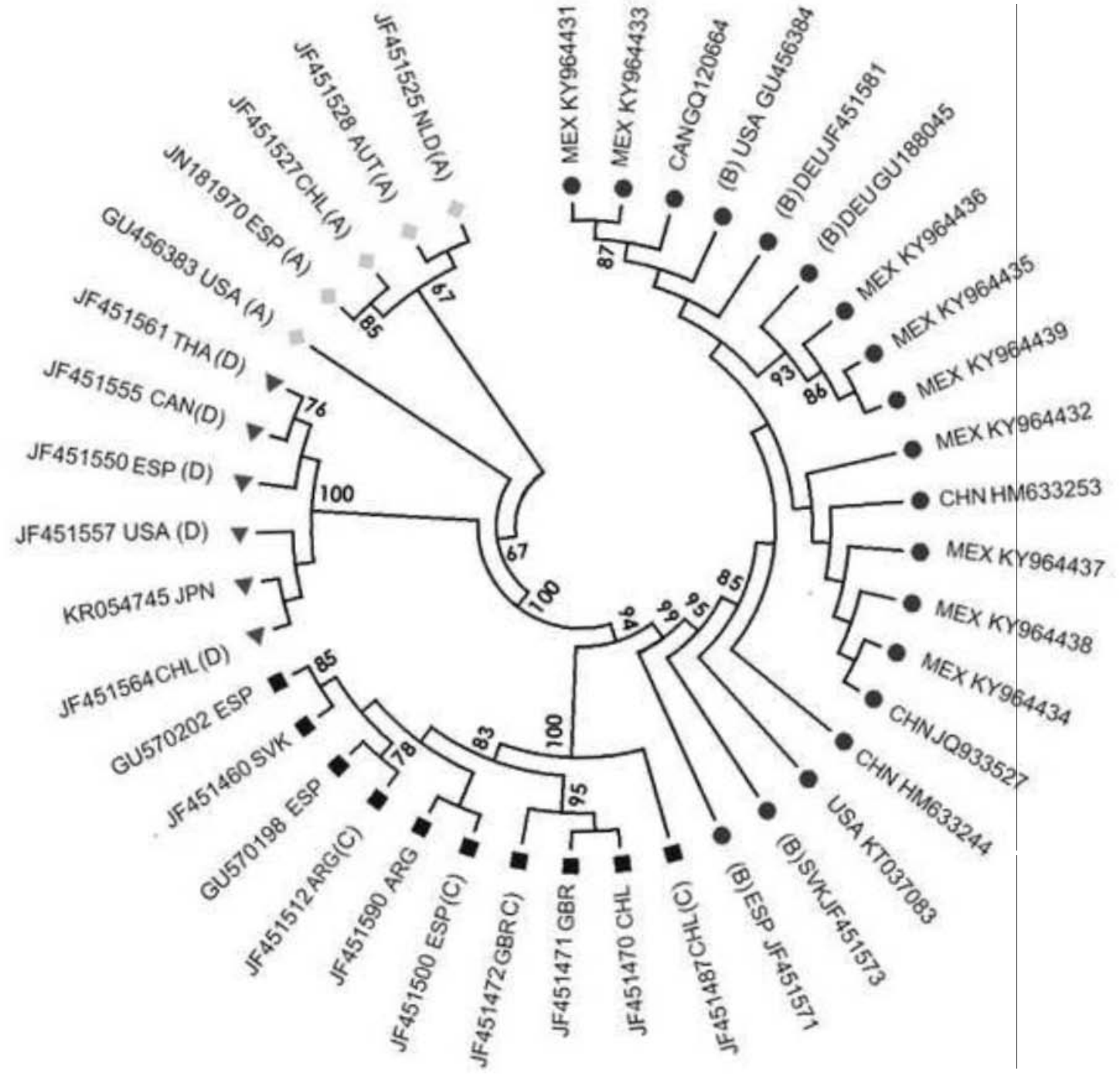
503 45. Jarasova V, Celer V. Preliminary epitope mapping of Torque teno sus virus 1 and 2 putative capsid  
504 protein and serological detection of infection in pigs. *J Gen Virol.* 2013;94:1351-1356.

505 46. Liu J, Gou L, Zhang L, Wei Y, Huang L, Wu H, Liu C. Three new emerging subgroups of torque teno  
506 sus viruses (TTSuVs) and co-infection of TTSuVs with porcine circovirus type 2 in China. *Virol J.*  
507 2013;10:189.

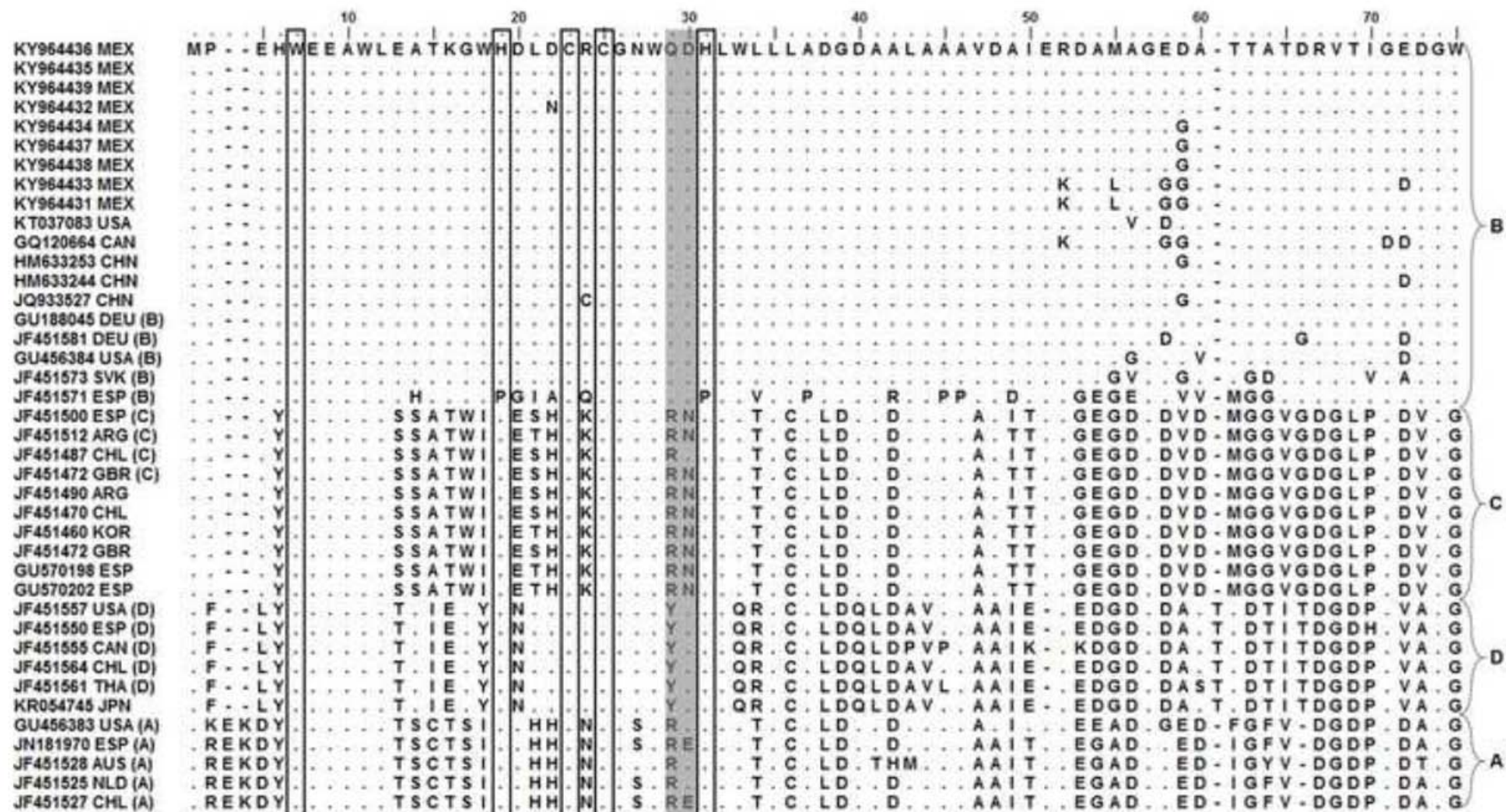
508 47. Giménez-Lirola L, Gerbera P, Rowland R, Halbura P, Huang Y, Meng X, Opriessnig T. Development  
509 and validation of a 4-plex antibody assay for simultaneous detection of IgG antibodies against Torque  
510 teno sus virus 1 (TTSuV1), TTSuV2, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus types 1  
511 and 2. *Res Vet Sc.* 2014;96:543-550.

512 48. Nieto D, Martínez-Guinó L, Jiménez-Melsio A, Segalés J, Kekarainen T. Development of and indirect  
513 ELISA assay for the detection of IgG antibodies against the ORF1 of Torque teno sus viruses 1 and 2 in  
514 conventional pigs. *Vet Microbiol.* 2015;180:22-27.

515 49. Jiménez-Melsió A, Rodríguez F, Darji A, Segalés J, Cornelissen-Keijsers V, van der Born E, Kekarainen  
516 T. Vaccination of pigs reduces Torque teno sus virus viremia during natural infection. *Vaccine.*  
517 2015;33:3497-3503.









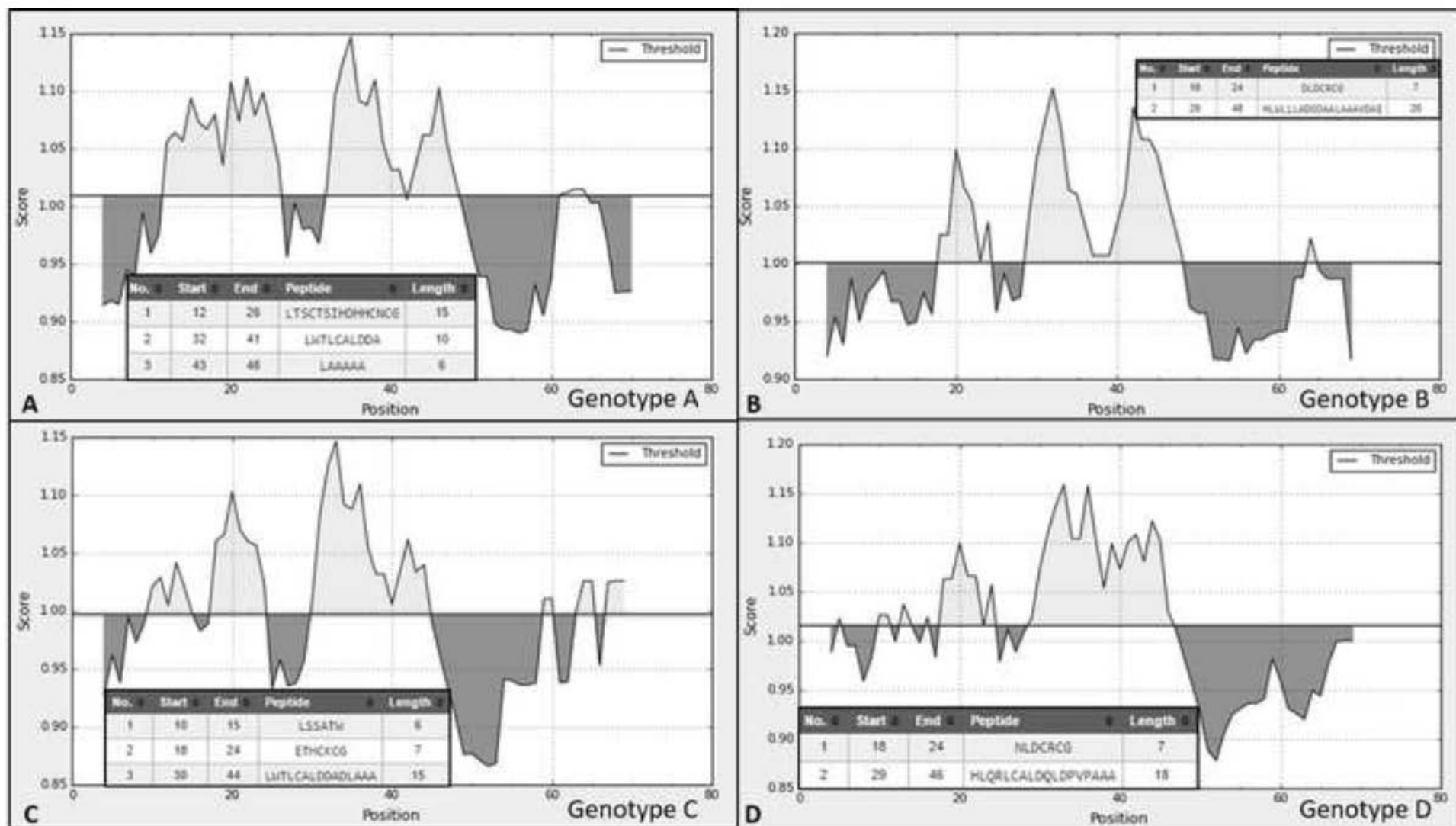


Figure 4

Click here to download Figure Fig. 4 Arbol filogenetico TTSuV1b.jpg

