



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

IMPLEMENTACIÓN DE UNA TÉCNICA DE PCR ANIDADO PARA LA
DETECCIÓN DE PARVOVIRUS PORCINO 5 (PPV5) EN SANGRE DE CERDAS
REPRODUCTORAS PRIMERIZAS

Tesis para obtener el Título de Médico Veterinario Zootecnista

Sustentante: Roberto Iván Hernández Trejo

Asesor: Dra. Lucía Angélica García Camacho

Co asesor: Dr. Alejandro Vargas Ruiz

Cuautitlan Izcalli, Estado de México, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A mis padres María de Jesús Trejo y Roberto Hernández Pérez. Gracias por su gran amor es que yo estoy aquí celebrando mis triunfos. Gracias por sus consejos y por caminar a mi lado. Les dedico este y todos mis triunfos. Los amo

A mis hermanos Ángel Alberto Hernández Trejo, Fernanda Hernández Trejo, Ximena Hernández Trejo. Nunca dejen de soñar y creer en ustedes, vuelen y llegue muy lejos.

Dr. Alejandro Vargas Ruiz y a su esposo Miguel Ángel Rodríguez. Por no dejarme caer en momentos tan difíciles, por darme palabras de aliento que siempre necesitaba, por ayudarme a no darme por vencido y demostrarme que, en efecto, me ahogaba en un vaso de agua. Gracias por su amistad y por ser mis segundos padres, a los dos les agradezco desde el fondo de mi corazón, por educarme y hacerme crecer como persona y profesionista

Dr. Ernesto Marín Flamand. Por la paciencia que me tuvo y por las risas que me hizo pasar. Porque siempre tendré un amigo en usted. Gracias por las comidas y cenas. Por ayudarme a superarme y a verle el lado gracioso a la vida

Dra. Lucia Angelica García Camacho. Porque usted se convirtió en un ejemplo de vida. Gracias por regalarme de su tiempo y su gran conocimiento.

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

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

por la Cátedra de Investigación CI 2210: "Patología Morfológica y Molecular Veterinaria.

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

A mis amigos Andrea Solano, Christian Moreno, Cecilia López, Paola Moreno, Alexandra Bullon, Alex Miranda, Alejandra López, Elizabeth Herrera, Lilia González Tapia, Diana Michele, Diana Cisneros, Fernanda Terrazas, Jorge González, Axel Morones, Avril Moreno, Kenia Flores, Daniela Jean, Francisco Montelong. A todos ustedes los llevo en el corazón. Gracias por su amistad incondicional

A la señora Rosaura Fabela Archundia y a la señora Blanca Callejas. Por ser unas segundas madres, por acobijarme y orientarme por el buen camino

A todos los animales: ratas, conejos, perros, gatos, cachorros, peces, vacas, pavos, cerdos, fueron una clave importante para mi aprendizaje y desarrollo

A los maestros que tiene la FESC (Edna Legaspi, Elisa Hernández, Tello Arcila, Elizabeth Miranda, Ignacio Soto, Maria Pichardo "Reinita", Ismael Hernández, Jorge Torres, Jorge Lopez etc...) a cada uno de ellos, gracias por ser grandes profesores.

Al Dr.Sandoval que en paz descanse, sus exalumnos jamás lo vamos a olvidar

DEDICATORIA

A mi abuela Elena Hernández Uribe, sé que estaría muy orgullosa de mí. Que en donde quiera que estés, sé que me cuidas y que me sigues amando tanto como yo a ti. Te dedico esta tesis, mis triunfos, mis victorias, mis días; ya que por ti tengo a una madre ejemplar que me enseñó lo bueno y malo de la vida. Siempre te admiraré por ser una mujer fuerte e inteligente.

Índice

Resumen	5
Índice de figuras	6
índice de tablas	6
Tabla de abreviaturas	8
1. Introducción	9
1.1 Generalidades de la familia <i>parvoviridae</i>	9
A) Taxonomía	9
B) Genoma viral	10
C) Replicación de la familia <i>parvoviridae</i>	12
D) Familia <i>parvoviridae</i> y su asociación con enfermedad	16
1.2 Especies de la familia <i>parvoviridae</i>	17
1.3 Especies de parvovirus y su asociación con <i>circovirus</i>	24
porcino tipo 2	
2. Justificación	27
3. Objetivos	28
3.1 Objetivos general	28
3.2 Objetivos particulares	28
4. Materiales y métodos	29
4.1 Selección de casos	29
4.2 Diseño de iniciadores	29
4.3 Extracción de ADN	30
4.4 PCR anidada	31
4.5 Visualización de productos amplificados	32
4.6 Purificación de productos amplificados	33
4.7 Secuenciación	34
4.8 Análisis de datos	34
5. Resultados	35
6. Discusión	42
7. Conclusiones	48
8. Bibliografía	46

RESUMEN

Dentro de la familia *Parvoviridae* se agrupa la subfamilia *Parvovirinae* que incluye virus que infectan a los porcinos tales como el *protoparvovirus* de los *ungulados* 1 (PPV1), agente causal importante de falla reproductiva en cerdas y especies emergentes de parvovirus porcinos como el Parvovirus porcino 5 (PPV5). Con el fin de demostrar la presencia del PPV5 en cerdas primerizas en México, se optimizaron las condiciones de amplificación de una técnica de PCR anidado mediante el uso de iniciadores inéditos en muestras de linfonodos embebidos en parafina procedentes de lechones afectados por el Síndrome multisistémico de emaciación post destete (PMWS). Posteriormente, el protocolo de PCR se implementó en muestras de sangre de cerdas primerizas. Se determinó que la temperatura óptima de alineación fue de 58°C y que las concentraciones óptimas de MgCl₂, iniciadores y templado fueron de 1.5 mM, 50 pM y 50 ng, respectivamente, obteniendo productos de 196 pb cuya especificidad para PPV5 se determinó por secuenciación. La implementación del protocolo en ADN de sangre de cerdas primerizas mostró que 83% de las muestras fueron positivas a PPV5, indicando alta prevalencia de ADN PPV5 en los animales probados. Lo anterior es congruente con la alta tasa de transmisión transplacentaria reportada en casos de falla reproductiva en cerdas nacionales. Por tanto, es posible que el PPV5 participe en casos de falla reproductiva en cerdas. Dicha participación debe ser evaluada en estudios posteriores.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Infección por PPV1: Fetos muertos y momificados en cerda primeriza infectada.	20
Figura 2. Representación esquemática del PPV5 comparados con los genomas del PPV4 y BPV2.	23
Figura 3. Alineación de iniciadores diseñados por Bioedit.	36
Figura 4. Homología de la secuencia obtenida con secuencias del Gen bank.	36
Figura 5. Árbol filogenético de las distintas especies de <i>Parvovirus</i> .	37
Figura 6. Gradiente de temperatura para la amplificación de PPV5.	38
Figura 7. Curva de concentración de MgCl ₂ para la amplificación de PPV5.	38
Figura 8. Curva de concentración de iniciadores para la amplificación de PPV5.	39
Figura 9. Curva de concentración de templado para la amplificación de PPV5.	39
Figura 10. PCR anidada para la amplificación de PPV5 a partir de ADN de sangre de cerdas primerizas.	40
Figura 11. PCR para la amplificación del gen constitutivo Hipoxantina-guanina- fosforibosil transferasa 1 (HPRT1) a partir de ADN de sangre de cerdas primerizas	41

INDICE DE TABLA

Tabla 1. Parvovirus y bocavirus porcinos.	21
Tabla 2. Iniciadores diseñados para la amplificación del ORF 2 del Parvovirus porcino 5.	32

TABLA DE ABREVIATURAS

°C: Grados celsius

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNss: ADN monocatenario

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

CPV: Parvovirus canino tipo 2

DDG: Días de gestación

DPI: Días post-inoculación

EG-PCV2: Enteritis granulomatosa asociada a PCV2

Fn: Iniciador sentido anidado

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

FR-PCV2: Falla reproductiva asociada a PCV2

Fw: Iniciador sentido

GPV: Parvovirus del ganso

HPRT: Hipoxantina fosforibosil-transferasa

ICTV: Comité Internacional de Taxonomía de Virus

MEV: Virus de la enteritis del bisón

MgCl₂: Cloruro de magnesio

MVM: Virus diminuto del ratón

NLS: Señales de localización nuclear

NPC: Complejo del poro nuclear

NS1: Proteína no estructural

ORF: Marco de lectura abierto

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PCV2: Circovirus porcino tipo 2

PCV2: Circovirus porcino tipo 2

PCVAD: Enfermedad asociada a Circovirus porcino tipo

PDNS: Síndrome de dermatitis y nefropatía porcino

PMSW: Síndrome multisistémico de emaciación post destete

PMWS: Síndrome del desmedro post destete

PPV: Parvovirus porcino

PPVs: parvovirus porcinos

PRRS: Síndrome respiratorio y reproductivo porcino

qPCR: PCR cuantitativa

Rn: iniciador anti-sentido anidado

RPM: Revoluciones por minuto

Rv: Iniciador anti-sentido

SMEDI: Nacidos muertos, momificación, muerte embrionaria e infertilidad

VP: Proteínas estructurales

μL: Microlitro

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades de la familia *Parvoviridae*

A) TAXONOMÍA

La familia *Parvoviridae* está compuesta por dos subfamilias: *Parvovirinae* que infecta a los vertebrados, y *Densovirinae*, que infecta a los artrópodos. Algunos miembros de la familia *Parvoviridae* infecta a una gran variedad de hospedadores, tanto insectos como primates. En los hospedadores vertebrados este puede causar enfermedades principalmente en los vertebrados jóvenes (Huffer. *et. al.*, 2003). La subfamilia *Parvovirinae* puede ser dividida en ocho géneros: *Amdoparvovirus*, *Aveparvovirus*, *Bocaparvovirus*, *Copiparvovirus*, *Dependoparvovirus*, *Erythroparvovirus*, *Protoparvovirus*, *Tetraparvovirus*. En la subfamilia *Parvovirinae* se incluyen las especies de virus que afectan a porcinos. Dentro de los géneros *Protoparvovirus* y *Tetraparvovirus* se encuentran las especies *Ungulate protoparvovirus 1* (PPV1) y *Ungulate tetraparvovirus 2* (PPV3) y *Ungulate tetraparvovirus 2* (PPV2). Mientras que en el género *Copiparvovirus* se incluye al *Ungulate copiparvovirus 2* (PPV4) y, *Ungulate copiparvovirus 4* (PPV6). El PPV5 permanece sin clasificar por el ICTV (Walker et, al., 2022). El género *Protoparvovirus* abarca la mayoría de las especies de la subfamilia *Parvovirinae* tales como el *Rodent protoparvovirus 1* (virus diminuto del ratón), *Rodent protoparvovirus 2* (virus H-1 de la rata), *Carnivore protoparvovirus 1* (parvovirus canino) *Ungulate protoparvovirus 1*(PPV). En el género *Erythrovirus* se incluyen los

parvovirus con tropismo por precursores hematopoyéticos de la línea eritroide como es el caso del *Primate erythroparvovirus 1* (parvovirus humano B19) el cual es asociado a una erupción cutánea que generalmente es leve, dicha enfermedad es más relacionada con niños la cual es denominada “quinta enfermedad”. En adultos, el parvovirus B19 es asociado a una enfermedad similar con mayor potencial mortal la cual es llamada “crisis aplásica” esta se caracteriza por la pérdida de eritroblastos (predecesores de los glóbulos rojos) de la medula roja. Sin embargo, la crisis aplásica generalmente es diagnosticada en individuos que manifiestan cualquier tipo de anemia hemolítica crónica (Norkin, 2010)

B) GENOMA VIRAL

El parvovirus fue aislado por primera vez por L. Kilham y L. Oliver en 1959, el cual fue nombrado virus del ratón (RV) y años más tarde nombrado el virus del ratón de Kilham (KRV) (Kilham *et. al.*, 1959). Los parvovirus son virus ADN de tamaño pequeño que presentan una elevada estabilidad frente a agentes fisicoquímicos que contrasta con una gran facilidad para evolucionar y adaptarse en huéspedes diversos. Su capacidad codificante es muy limitada, lo que hace que su ciclo vital y patogenia dependan estrechamente de las funciones celulares de proliferación y diferenciación. Los parvovirus han servido como modelo en el estudio de la replicación de ADN lineal (MacLachlan, *et. al.*, 2017).

La familia *Parvoviridae* está constituida por virus no envueltos, que poseen una cápside icosaédrica de un diámetro aproximado de entre 18 y 25 nm (Carrasco, 2006 y Murphy, *et. al.*, 1999) La cápside tiene propiedades hemaglutinantes y está modificada postraduccionalmente generalmente por fosforilación. El genoma es una

molécula lineal de DNA de banda simple que mide aproximadamente 4-6 kilobases (kb) (Norkin, 2010) plegada en ambos extremos mismos que poseen 6 a 10 secuencias palindrómicas, compuestas por 100 a 250 nucleótidos, conformando horquillas terminales. Las horquillas son relativamente estables y esenciales para la replicación ya que contienen el origen de replicación del DNA y las señales para empaquetamiento del genoma en cápsides (Murphy, *et. al.*, 1999, Carrasco, 2006; Maclachlan, 2017).

En el género *Parvovirus*, el extremo derecho 5' presenta dos configuraciones posibles en una proporción similar llamadas flip-flop mientras que el extremo izquierdo 3' se encuentra en una única orientación (Carrasco, 2006). La cápside de los parvovirus está compuesta por dos a cuatro cápsides proteicas diferentes (VP1 a la VP4) cuyo número depende de la especie particular de parvovirus. Una de las cápsides de los parvovirus es usualmente la más dominante. Por ejemplo, en el caso de los AAVs (virus adeno asociados), la cápside consiste en tres proteínas virales VP1 (90 kDa), VP2 (72kDa) y la VP3 (60 kDa). (Carrasco, *et. al.*, 2006; Maclachlan, 2017).

La estructura de la cápside es el resultado del plegamiento de las proteínas estructurales (VP) que adoptan una conformación de barril beta plegada con ocho laminas antiparalelas entre las que se disponen largos bucles que conforman las regiones expuestas de la cápside (Carrasco, *et. al.*, 2006) que corresponden a las horquillas esenciales para la replicación localizadas a ambos extremos. En reportes de cristalografía de alta resolución, se apreció que una fracción significativa del genoma se dispone de forma ordenada compartiendo con la cápside la simetría

icosaédrica. La encapsidación puede realizarse tanto en la banda negativa como en la positiva en diferentes proporciones dependiendo de la especie del virus y el tipo celular (Carrasco, *et. al.*, 2006).

La secuencia genómica de los parvovirus es predominantemente codificante (> 90%), conformando dos genes compuestos por regiones conservadas con marcos de lectura abierta (open reading frame/ORF por sus siglas en inglés) denominados ORF1 y ORF2, respectivamente, que codifican para proteínas no estructurales (NS1 y NS2) y para proteínas de la cápside (VPs). Algunos miembros, como el género *Bocaparvovirus* poseen un ORF adicional (Xiao *et. al.*, 2013).

Cada uno de los parvovirus porcinos emergentes muestran la organización genómica característica de los miembros de la subfamilia Parvovirinae, con excepción del PPV4 que contiene un ORF adicional (ORF3) localizado entre el ORF1 y el ORF2, compartiendo esta característica con el género *Bocavirus* (Cheung *et. al.*, 2010; Huang *et. al.*, 2010; Murphy, *et al.*, 1999).

C). REPLICACIÓN DE LA FAMILIA PARVOVIRIDAE

La proteína NS1 es multifuncional con localización preferentemente nuclear y con actividad de unión al ADN, regulando numerosos procesos del ciclo vital del virus. Está implicada fundamentalmente en los procesos de replicación y encapsidación del genoma a través de su actividad de endonucleasa, ATPasa y helicasa (Xiao *et. al.*, 2013). Así mismo posee una gran capacidad citotóxica y es la principal responsable de la muerte celular en la infección con MVM. Además, la NS1 regula la transcripción del virus, activando los promotores virales como p4 y en

especial el p38. Lo anterior explica la elevada cantidad de VP expresada en fases finales del ciclo de infección. La proteína NS2 comparte con NS1 el dominio terminal y es la primera proteína viral en ser detectada en células infectadas, pero su concentración disminuye por tener una vida media de 90 minutos. Aunque es indispensable para la replicación viral en algunos tipos celulares, la NS2 participa en el ensamblaje de cápsides, en la traducción de ARN mensajero (ARNm) viral, en la replicación del DNA, en la producción de virus infecciosos de forma dependiente del tipo celular, y en la actividad citotóxica, cooperando con la NS1 (Xiao *et. al.*, 2013).

Por otro lado, las proteínas estructurales (VP) son generadas por el procesamiento alternativo del ARNm R3, generando las proteínas estructurales VP1 y VP2 mediante empalme (splicing) alternativo del mismo ARNm (Carrasco, 2006 y Murphy, *et. al.*, 1999). La secuencia completa de la VP2 está contenida en VP1. La proteína VP1 no tiene capacidad para formar la cápside por si sola, pero es necesaria para la infectividad de los viriones; Ambas proteínas (VP1 y VP2) son indispensables para la internalización del virus a la célula por endocitosis; Para la liberación del virus al citosol desde el endosoma tardío y para la entrada al núcleo. Esta propiedad permite la obtención de cantidades importantes de cápsides. Cuando se inicia la infección por el virus que entra a la célula, la VP2 produce a partir de del procesamiento proteolítico del extremo N-terminal a la proteína VP3 (Xiao *et. al.*, 2013; Carrasco, 2006)

Como la mayoría de los virus ADN, los parvovirus emplean para su replicación componentes de la transcripción y replicación de la célula confinados en el núcleo.

Esto determina que gran parte del ciclo vital del virus se desarrolle en el núcleo y que las proteínas virales posean dominios para translocarse a través de la membrana nuclear. La síntesis de DNA celular ocurre principalmente en la fase S del ciclo o cerca de la fase G2, fases en las que existe actividad de ADN polimerasa, y solo en esta etapa los virus disponen de altas concentraciones de enzimas y metabolitos para la biosíntesis a niveles elevados de copias de su propio genoma.

El ciclo viral de los parvovirus consta de:

1. Entrada. La infección productiva de los parvovirus se inicia con la interacción del virus con receptores específicos de la superficie celular que incluye generalmente una adsorción inicial a componentes de azúcares, y un posterior reconocimiento específico e irreversible de proteínas que actúan como receptores (Carrasco, 2006). Por ejemplo, el MVM usa una sialoglicoproteína como receptor que permite al virus su internalización en distintos tipos celulares por endocitosis (Carrasco, 2006). Posteriormente, el virus accede a vesículas recubiertas de clatrina y prosigue con la vía endocítica, en la que la baja de pH facilita el procesamiento de los extremos VP2 y VP3. Lo anterior permite el acceso del virus al citosol en un proceso donde el extremo hidrofóbico de VP3 podría ser esencial, así como la actividad de fosfolipasa de la VP1 localizada en un extremo N- terminal. Un mecanismo similar ocurre para el CPV, y estos virus interaccionan con componentes del citoesqueleto (dineínas y otras proteínas para su transporte a través del citoplasma hasta ganar la proximidad del poro nuclear para su transporte a través del citoplasma hasta ganar la proximidad del poro nuclear (Carrasco, 2006).

2. Translocación al núcleo. El genoma del parvovirus autónomo se transloca al interior del núcleo a través del complejo del poro nuclear (NPC) el cual tiene un tamaño similar a la cápside del virus (30nm.). Por tanto, se postula que la partícula viral podría ser transportada al interior del núcleo intacta. Este transporte activo requiere la contribución de la proteína mayor de la cápside (VP1) que contiene en un extremo secuencias homólogas a las secuencias lineales de localización nuclear (NLS) clásica, esenciales para iniciar la replicación génica (Carrasco, 2006). Una vez dentro de las células los viriones atraviesan las vías endosomales dentro del citoplasma, incluidos los endosomas tempranos, tardíos y, en algunos casos, endosomas de reciclaje (Maclachlan *et al.*, 2016).

Sin embargo, la proteína VP1 contiene una fosfolipasa A2 en su región única N-terminal que puede estar involucrada en la modificación de la membrana endosomal y facilita la liberación de la cápside. Los viriones que ingresan al citoplasma son llevados hacia el poro nuclear dando como inicio la replicación del ADN en la célula huésped (fase S del ciclo de división celular) (Maclachlan *et al.*, 2016).

Un requisito para la replicación del virus es que debe utilizar la maquinaria de replicación del hospedero para la replicación de su ADN viral, ya que el virus no puede codificar ni empaquetar su propia ADN polimerasa. En cambio, las ADN polimerasas celulares replican el ADN viral para formar un intermediario de ADN bicatenario, que posteriormente será usado como plantilla para la replicación del ARNm virales (Maclachlan *et al.*, 2016).

El ARNm más abundante es el que está codificado en la mitad derecha del genoma 5', el cual dirige la síntesis de las proteínas estructurales. La proteína NS1 cumple

con diferentes funciones, esta se une al extremo 5' del ADN viral y, que durante la replicación sirve como helicasa (Maclachlan *et al.*, 2016).

De este modo, el tropismo del virus está dado por la cápside viral ya que realiza las funciones esenciales en el ciclo vital de los parvovirus al intervenir en la entrada del virus al citoplasma, núcleo celular y la preservación de su viabilidad en el medio extracelular (Carrasco, 2006).

D) FAMILIA PARVOVIRIDAE Y SU ASOCIACIÓN CON ENFERMEDAD

Los parvovirus producen patologías importantes reconocidas en diversos mamíferos. Puesto que, su replicación requiere que la célula huésped atraviese la fase S del ciclo celular, los parvovirus en sus huéspedes naturales se replican preferentemente en tejidos con actividad proliferativa, lo que es el factor fundamental en su patogenia. La importancia clínica del parvovirus es ampliamente reconocida puesto que ocasiona signos clínicos severos (parvovirus porcino, parvovirus humano B19, parvovirus canino-2) o signos subclínicos (Shade *et al.*, 1986; Allander *et al.*, 2005; Sloots *et al.*, 2006; Decaro and Buonavoglia, 2012). Pero además los parvovirus requieren, en distintas etapas de su ciclo vital, factores particulares de ciertos estadios de diferenciación celular. Las patologías más importantes asociadas a los parvovirus con base en su desarrollo en el huésped se pueden clasificar del siguiente modo:

- Estadios fetales: Estos huéspedes son susceptibles debido a la capacidad que tienen los parvovirus de atravesar la placenta y multiplicarse en las células proliferativas, así como por su vulnerabilidad inmune. Por esto, los

parvovirus son conocidos como agentes teratogénicos y causantes de abortos en distintas especies, comúnmente en cerdos y gatos (Carrasco, 2006).

- Periodo perinatal: Al nacimiento, el epitelio intestinal y el sistema nervioso central todavía se encuentran en desarrollo en muchas especies por lo que son los principales blancos de infección por parvovirus (Carrasco, 2006). Algunas patologías características en estas etapas son la enteritis hemorrágica con diarrea asociada a la infección por el parvovirus canino (CPV) en perros, por el MEV (virus de la enteritis del visón) en visones, por el parvovirus del ganso (GPV) en gansos y otras especies cercanas (Carrasco, 2006). En esta etapa también pueden producirse cuadro de hepatitis y lesiones en el miocardio como en la denominada enfermedad de Derzsey (GPV). Por lo tanto, el miocardio se daña en cachorros y pichones mientras que el cerebelo se destruye selectivamente en fetos felinos o gatitos infectados en el período perinatal (Carrasco, 2006).
- En animales mayores y/o adultos: La infección por parvovirus se limita a determinados tipos celulares que conservan la capacidad proliferativa, fundamentalmente el sistema hematopoyético y el epitelio intestinal, conduciendo a la aparición común de leucopenia y enteritis. Un ejemplo de esto es eritrovirus B19 en humanos ya que este virus muestra un tropismo por célula del linaje eritroide (Carrasco, 2006).

1.2. Especies de la familia *Parvoviridae* que infectan al cerdo.

Durante la década pasada, nuevas especies de parvovirus porcinos (PPVs) han sido identificadas denominadas como PPV2 al PPV7. A diferencia del PPV1 que pertenece al género *Protoparvovirus*, estas especies emergentes de PPV pertenecen a los géneros *Tetraparvovirus* (PPV2, PPV3) y *Copiparvovirus* (PPV4, PPV6). Inicialmente, el PPV5 fue propuesto como miembro del género *Copiparvovirus* (Xiao *et. al.*,2013; Wu *et. al.*, 2014; Schirtzinger *et. al.*, 2015 Lau, S. K. *et. al.*, 2017;). La clasificación de especies de parvovirus porcinos se muestra en la tabla 1. Hasta el momento, no se ha demostrado que los parvovirus emergentes estén asociados con enfermedad (Xiao *et. al.*,2013).

PPV1. El PPV1 fue aislado en Alemania en 1965 como un contaminante del cultivo celular utilizado para la propagación del virus de la fiebre porcina clásica (Manhel, *et., al.* 1965). El PPV1 es un virus extremadamente duradero y altamente infeccioso. El *Ungulate protoparvovirus* (PPV1) es la única especie reconocida como un agente primario de enfermedad; la cual está frecuentemente asociado a la falla reproductiva en cerdas gestantes denominada SMEDI (Stillbirth, Mummification, Embryonic death and Infertility, por sus siglas en inglés) esta tiene una distribución mundial la cual cursa con abortos, falla reproductiva y momificaciones del producto (Antonis, *et al.*, 2006). (Fig. 1). Además de su participación en el SMEDI, el PPV1 está fuertemente asociado con el síndrome multisistémico de emaciación post-destete (PMWS [Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome] por sus siglas en inglés) (Antonis, *et al.*, 2006). Se menciona que desempeña un papel el complejo respiratorio porcino (Antonis, *et al.*, 2006).

La muerte embrionaria con retorno al estro y la momificación fetal son los signos más comunes de la infección por PPV1. Las lesiones graves en los fetos incluyen un grado variable de retraso en el crecimiento antes de que otros cambios externos sean evidentes. Ocasionalmente, los vasos sanguíneos en la superficie del cuerpo se vuelven prominentes debido a la congestión y la fuga de sangre en los tejidos conectivos. La congestión, el edema, la hemorragia con acumulación de fluidos serosos en las cavidades corporales y la decoloración hemorrágica, se vuelve progresivamente más oscura después de la muerte con deshidratación del producto (momificación). La placenta puede estar deshidratada y de color marrón a gris y el volumen de líquido extra fetal reducido. Posterior al desarrollo de la inmunocompetencia fetal (70 días de gestación/ddg), no se observan cambios macroscópicos después de la infección. En la necropsia de cerdas seronegativas inoculadas con PPV1 a los 70 ddg sacrificadas a los 12 y 21 días post-inoculación (dpi), se observó acumulación focal de células mononucleares en la lámina propia del endometrio. También se apreció marcada acumulación perivascular de células plasmáticas y linfocitos en el cerebro, la médula espinal y la coroides del ojo. En el feto, los cambios histopatológicos son diseminados con lesiones características de necrosis en la mayoría de los órganos en desarrollo y hemorragias en tejido subcutáneo y masas musculares. La necrosis con mineralización es particularmente extensa en el hígado y el corazón, comunes en los pulmones, los riñones y el músculo esquelético. Después de que los fetos se vuelven inmunocompetentes, las lesiones microscópicas son principalmente hipertrofia endometrial con infiltración de células mononucleares. Una combinación de cerdos normales y fetos momificados que murieron en diferentes etapas de desarrollo en la misma camada es indicativo

de infección por PPV1. La infección por PPV1 normalmente no causa signos clínicos en adultos (Zimmerman, *et al.*, 2019).



Figura 1. Infección por PPV1: Fetos muertos y momificados en cerda primeriza infectada (Suárez, *et. al.*, 2017).

Nombre común	Especie	Genero
Parvovirus porcino (1)	<i>Ungulate protoparvovirus 1</i>	<i>Protoparvovirus</i>
Parvovirus porcino 2	<i>Ungulate tetraparvovirus 3</i>	<i>Tetraparvovirus</i>
Parvovirus porcino 3 o hokovirus porcino o PARV4	<i>Ungulate tetraparvovirus 2</i>	<i>Tetraparvovirus</i>
Parvovirus porcino 4	<i>Ungulate copiparvovirus 2</i>	<i>Copiparvovirus</i>
Parvovirus porcino 5	?	<i>Copiparvovirus</i>
Parvovirus porcino 6	?	<i>Copiparvovirus</i>
Parvovirus porcino 7	?	<i>Chapparvovirus (propuesto)</i>
Bocavirus porcino 1,2 y A6	<i>Ungulate bocaparvovirus 2</i>	<i>Bocaparvovirus</i>
Bocavirus porcino SX	<i>Ungulate bocaparvovirus 3</i>	<i>Bocaparvovirus</i>
Bocavirus porcino H18	<i>Ungulate bocaparvovirus 4</i>	<i>Bocaparvovirus</i>
Bocavirus porcino 3, 4	<i>Ungulate bocaparvovirus 5</i>	<i>Bocaparvovirus</i>

Tabla 1. Parvovirus y bocavirus porcinos (Familia *Parvoviridae*, subfamilia *Parvovirinae*. Modificado de Streck *et. al.*, 2015)

PPV2. Es el primer parvovirus emergente descrito y el más prevalente (Saekhow & Ikeda, 2011; Xiao *et al.*, 2013a; Xiao *et. al.*, 2013b; Ni *et al.*, 2014; Saekhow *et. al.*, 2015; Cui *et. al.*, 2017a; Novosel, *et. al.*, 2018) pero en algunos estudios la prevalencia es relativamente baja, del 6.4% al 9.66% (Wang *et. al.*, 2010; Cságola *et. al.*, 2012). Fue descubierto en Myanmar, China en sueros porcinos obtenidos durante un muestreo de hepatitis E (Hijakata *et. al.*, 2001). Es designado como *Ungulate tetraparvovirus 3* (PPV2) y su genoma comparte cierta similitud con el *Anseriform dependovirus 1* (Muscovy duck parvovirus) *Bovine parvovirus 1* (parvovirus bovino) (BPV1).

PPV3. Fue descrito por primera vez en 2008 como hokovirus porcino (PHoV), proponiéndose un nuevo género *Partetravirus*. El análisis genómico demostró que el PHoV era muy cercano al parvovirus humano 4 (PARV4) y al hokovirus bovino

(BHoV) y de este modo se conformó un nuevo grupo dentro de la familia *Parvoviridae* (Lau *et. al.*, 2008, Cheung *et. al.*, 2010). Actualmente, corresponde al Ungulate *Tetraparvovirus 2*. En Europa, se describe una amplia distribución y prevalencia del PPV3 en cerdos domésticos y jabalís salvajes. La amplia presencia de PPV3 en adultos indica una infección persistente (Adlhoch *et. al.*, 2010; Szelei *et. al.*, 2010; Cadar *et. al.*, 2011b; Cságo la *et. al.*,2012,).

PPV4. Fue detectado en 2005 a partir de muestras de brotes de enfermedad asociada a circovirus porcino (Porcine Circovirus Associated Disease [PCVAD], por sus siglas en inglés) en Carolina del Norte (Cheung *et. al.*, 2010) y subsecuentemente fue identificado en China, Hungría y África (Chao-Ting Xiao *et. al.*, 2013). Está estrechamente relacionado con el *parvovirus bovino 2* (BVP2). Su genoma es único ya que contiene un componente adicional, el ORF3 (Chao-Ting Xiao *et. al.*, 2013). En un inicio, fue reconocido como *porcine bocavirus 2* (PoBoV2). Posteriormente, se demostró que era distante filogenéticamente con el bocavirus porcino basado en la deducción de aminoácidos de la secuencia del ORF2 por lo que se consideró apropiado conservar su denominación original (PPV4). Sin embargo, la nucleoproteína codificada por el ORF3 del PPV4 tienen cierta similitud con las del ORF 3 de los bocavirus (Cheung *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2010). Mundialmente, la prevalencia de PPV4 en la población porcina se mantiene baja (Cheung *et. al.*, 2010; Zhang *et. al.*, 2011; Cságola *et. al.*,2012).

PPV5. Fue descubierto en China y Norteamérica (Xiao *et. al.*,2013; Wu *et. al.*, 2014; Schirtzinger *et. al.*, 2015) e inicialmente fue reportada una estrecha relación con el PPV4 y PPV6 (Chao-Ting, *et. al.*, 2013, Schirtzinger *et. al.*, 2015)

dado que conformaron una rama distintiva en un estudio filogenético (Schirtzinger *et. al.*, 2015). El análisis genómico del PPV5 reveló que posee dos ORFs principales similares al del BPV2, pero diferentes al PPV4 (Fig.2). El PPV5 ha presentado mayor prevalencia que el PPV4 en EUA (Chao-Ting, *et. al.*, 2013).

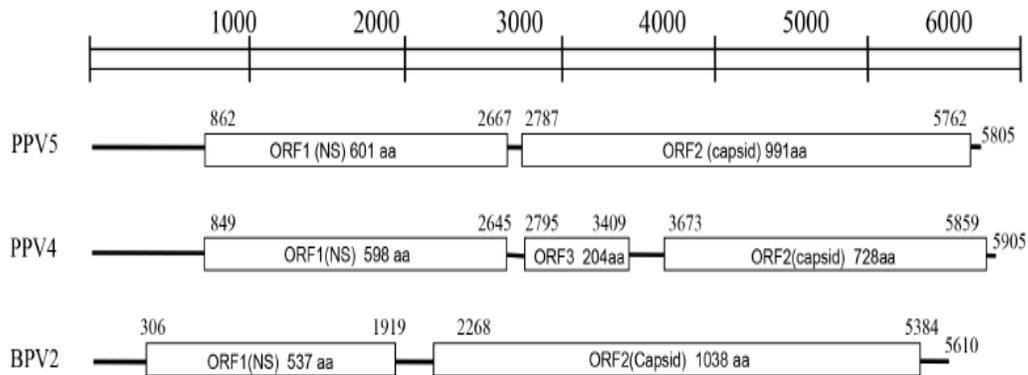


Figura 2. Representación esquemática del genoma del PPV5 comparado con los genomas del PPV4 y BPV2. en base a los ORFs que estos poseen. Tomado de (Chao-Ting, *et. al.*, 2013)

PPV6. Se identificó por primera vez en China a partir de fetos de cerdos abortados, reportándose una prevalencia similar en aquellos cerdos que se encuentra en una etapa de finalización, tanto en granjas afectadas por falla reproductiva como en las no afectadas (Schirtzinger, *et. al.*, 2015). En Polonia, se demostró que comparte una similitud de nucleótidos del 20.5% al 42.6 % con otros miembros de la subfamilia *Parvovirinae* y una relación más estrecha con el PPV4. Mundialmente, se desconoce la distribución de PPV6, así como su asociación con enfermedad (Cui, *et. al.*, 2017a).

PPV7. Es uno de los más recientemente identificado en muestras de hisopados rectales de cerdos adultos sanos en 2016. Se menciona que la infección puede ser asintomática, ya que no ha sido reportado en presencia de manifestaciones clínicas. Hasta el presente, no hay vacuna en contra de ningún PPV emergente (Palinski *et al.*, 2016).

PPV8. Es una especie de reciente descripción, identificada en la provincia de Guangdong, China en el 2022 a partir de muestras de pulmones de cerdos con signos respiratorios positivos a PRRS, se propone que esta especie pertenezca al género *Protoparvovirus* (Guo *et al.*, 2022).

1.3. Especies de parvovirus y su asociación con circovirus porcino tipo 2

El circovirus porcino tipo 2 (PCV2) es un virus ADN con un genoma circular reconocido como el agente causal del PMWS mismo que representa una enfermedad muy importante en cerdos a nivel mundial (Meehan, *et al.*, 1998; Allan *et al.*, 1998; Ellis *et al.*, 1998; Allan *et al.*, 1999; Ellis *et al.*, 1999; Rosell *et al.*, 1999, Kim *et al.*, 2003; Cibulski *et al.*, 2017). PCV2 es el principal agente causal de varios síndromes conocidos colectivamente como enfermedad asociada al circovirus porcino (PCVAD). Muchos de los síndromes asociados con PCVAD son el resultado de la infección con el virus PCV2 y otros agentes como *Mycoplasma*, (Gillespie *et al.*, 2009). El síndrome multisistémico de emaciación post-destete, se caracteriza por causar una emaciación marcada en cerdos destetados de 2 a 4 meses de edad con evidencia de agrandamiento de los linfonodos. Ocasionalmente,

se aprecia disnea e ictericia (Allan, *et. al.*, 1998; Harding *et. al.*, 1998; Allan and Ellis, 2000).

Por otro lado, la infección por PCV2 también promueve otras presentaciones clínicas tales como el síndrome de nefropatía y dermatitis porcina (Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome [PDNS], por sus siglas en inglés), la falla reproductiva asociada a PCV2 (FR-PCV2) en cerdas, la enteritis granulomatosa asociada a PCV2 (EG-PCV2), entre otros. En conjunto, las diferentes presentaciones clínicas se agrupan en lo que se define como PCVAD (Opriessnig *et. al.*, 2007, Opriessnig *et. al.*, 2013). La coinfección del PCV2 con otros agentes bacterianos o virales incrementa la severidad de la PCVAD (Opriessnig *et. al.*, 2012; Ellis *et. al.*, 2014; Darwich *et. al.*, 2012). En casos de PMWS, la coinfección del PCV2 con el *ungulate parvovirus 1* (PPV1) incrementa la severidad de la enfermedad (Adlhoch, *et. al.*, 2010).

Los estudios sobre los PPVs emergentes nos indican que están distribuidos alrededor de todo el mundo (China, EUA, principalmente) pero, aún queda incierto su colaboración con otros virus, y, como estos en conjunto puedan desarrollar un signo de enfermedad. Sin embargo, estudios recientes indica que estos parvovirus emergentes juegan un papel importante en la enfermedad de PCVDA producida por el Circovirus porcino tipo 2. Hoy en día es sabido que el PPV1, así como el PPV2 tienen una gran asociación con PCVAD (Ramammorthy *et. al.*, 2008; Gillespie *et. al.*, 2009). Mientras que para el PPV4 se ha encontrado más en cerdos con PMWS (animales jóvenes), lo cual sugiere una asociación con PCVAD (Cibulski, *et. al.*, 2017). Para el PPV6 y PPV7 se ha encontrado en mayor cantidad en casos de falla

reproductiva, por lo tanto, estos virus se han detectado más en fetos abortados, en especial el PPV6 el cual fue el primero en ser encontrado en tejidos de fetos abortados (Ouh IO, *et. al.*, 2012; Ni J, *et. al.*, 2014).

2. JUSTIFICACIÓN

Una de las principales causas de pérdidas económicas en la producción porcina nacional, es la falta de conocimiento sobre la detección, diagnóstico y tratamiento de enfermedades relacionadas con los cerdos, tales como PPV1, PCV2, mycoplasmosis etc. Así mismo, es prioritario estar a la vanguardia en la detección de agentes infecciosos emergentes que potencialmente puedan asociarse con los agentes etiológicos endémicos, generando presentaciones clínicas más severas. Por tanto, es fundamental establecer la prevalencia de nuevos agentes infecciosos con la finalidad de establecer su potencial patogénico y su impacto en el desarrollo de cuadros clínicos que impacten a la producción animal. Con relación en los PPVs emergentes, una línea de investigación importante consiste en la determinación de su prevalencia y asociación con la PCVAD misma que ha sido abordada en el Laboratorio de patología molecular. Sin embargo, a pesar de que ha sido detectada una potencial relación del PPV5 con la PCVAD, particularmente en su presentación de RF-PCV2, aún se desconocen muchos aspectos por lo que se anticipa que su detección en sangre de cerdas primerizas contribuirá al estudio de la posible participación del PPV5 en falla reproductiva en cerdas.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Estandarizar un protocolo de PCR anidado para la amplificación de secuencias parciales de VP1 del parvovirus porcino 5 (PPV5) y su implementación a partir de sangre de cerdas primerizas.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Diseñar iniciadores específicos para la amplificación de la VP1 parcial del parvovirus porcino 5 (PPV5).
- Determinar la temperatura óptima de alineación de los iniciadores para la amplificación de la VP1 parcial del parvovirus porcino 5 (PPV5) en una PCR anidada.
- Determinar la concentración óptima de MgCl₂ para la amplificación de la VP1 parcial del parvovirus porcino 5 (PPV5) en una PCR anidada.
- Determinar la concentración óptima de templado y la concentración mínima de detección para el protocolo de PCR anidado.
- Implementación de la PCR anidada para la amplificación de la VP1 parcial del parvovirus porcino 5 (PPV5) a partir de muestras de sangre de cerdas primerizas.
- Determinar la especificidad de los productos amplificados en la PCR anidada por secuenciación.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Selección de casos

Para la detección de PPV5 y la optimización de las condiciones de amplificación del protocolo de PCR anidada, se utilizaron linfonodos embebidos en parafina del archivo muestra del Laboratorio A: Patología Molecular Veterinaria, procedentes de cerdos afectados por PMWS con base en la presencia de signología compatible con la enfermedad (adelgazamiento progresivo, linfadenopatía generalizada), lesiones histopatológicas características (depleción linfoide e infiltrado de macrófagos y formación de sincitios) y un patrón de hibridación *in situ* positivo a PCV2. Posteriormente, se seleccionaron 30 muestras de ADN proveniente de sangre de cerdas primerizas de granjas del Estado de México del archivo de casos del laboratorio A de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria para la implementación de la técnica.

4.2 Diseño de iniciadores

Para el diseño de los iniciadores, se utilizó el programa bioinformático Primer3 input V.0.4.0 (Untergrasser *et. al.*, 2012). La edición y alineación se realizó con el programa informático BioEdit V7.2.5 (Hall *et. al.*, 1999). Se compararon 10 secuencias del parvovirus porcino 5 de distintos países: 4 de Polonia (KX273436, KX352455, KX352457, KX352455) 2 Chinas (KF661535, KU745628) y 4 de EUA (JX896318, JX896322, JX896319, JX896320) disponibles en el GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) para evaluar las regiones más conservadas

del ORF2 (VP1). Los iniciadores fueron sintetizados comercialmente (T4OLIGO, Irapuato, Gto.).

4.3 Extracción de ADN

Se realizaron cortes de veinte micras de cada tejido incluido en parafina, los cuales se colocaron en tubos Eppendorf estériles de 1.5 mililitros para la extracción de ADN del tejido parafinado, utilizando un juego de reactivos comercial (QIAamp DNA FFPE Tissue kit, Qiagen, Germany). A cada tubo Eppendorf con el tejido, se le agregó 1 ml. de xilol y se agitó vigorosamente con un vórtex (Scientific industries, New York, EUA) durante 10 segundos. Posteriormente, se centrifugó a una velocidad de 14,000 rpm durante dos minutos a temperatura ambiente, se removió cuidadosamente el exceso de xilol con una micropipeta para adicionar 1 ml de etanol al 99%, se mezcló con vortex durante 10 segundos y se centrifugó a 14,000 rpm durante dos minutos a temperatura ambiente. Una vez centrifugado, se retiró el exceso de etanol con una micropipeta y se incubó a 37 °C por 10 minutos para evaporar el etanol y posteriormente agregar 180 µL de buffer ATL Y 20 µL de proteinasa K. La muestra se mezcló con vórtex y se incubó a 56 °C en un thermomixer (Eppendorf Hamburg, Germany) durante una hora a 350 rpm e inmediatamente después se incubó a 90 °C por una hora a 350 rpm para inactivar la proteinasa K. Al finalizar la incubación, se adicionaron 200 µL de buffer AL y se mezcló con vórtex por 10 segundos para enseguida adicionar 200 µL de etanol al 99% y mezclar en vórtex por 10 segundos. Posteriormente, se centrifugó a 14,000 rpm durante un minuto y se transfirió el lisado entero a la columna MinElute con un tubo colector estéril, procurando de no mojar los bordes. La columna se centrifugó

a 8,000 rpm durante un minuto, se eliminó el tubo colector y se colocó otro tubo colector estéril nuevo para adicionar 500 µL de buffer AW1 justo en el centro de la membrana sin tocar los bordes y centrifugar a 8,000 rpm durante un minuto. Nuevamente, se eliminó el tubo colector y se usó un nuevo tubo para adicionar 500 µL de buffer AW2 y centrifugar a 8,000 rpm por un minuto, eliminar el tubo colector y colocar en uno nuevo. Acto seguido se eliminó el tubo recolector, colocando otro para centrifugar a 14,000 rpm por tres minutos para secar la membrana, y tras eliminar el tubo colector correspondiente y colocar en un tubo Eppendorf a la columna MinElute, se agregaron 100 µL de buffer ATE al centro de la membrana para incubar por 5 minutos a temperatura ambiente y centrifugar dos veces a 14,000 rpm, durante un minuto para la obtención del ADN en el tubo colector mismo que se almacenó a -20 °C hasta su uso.

4.4 PCR anidada

Se utilizó ADN genómico como templado para la amplificación de productos del PPV5, utilizando los iniciadores listados en la Tabla 1. La amplificación se realizó en termociclador Master Cycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) en reacciones de 50 µl en microtubos cónicos de 0.2 ml., conteniendo 25 µl de Master Mix (1x MyTaq Mix MgCl₂ 1.5 mM, 0.2 mM de cada dNTP, BioLine, USA), 50 pM de cada iniciador y 50 ng de templado. Para la optimización de las condiciones de amplificación se realizaron gradientes de temperatura, así como curvas de concentración de MgCl₂, iniciadores y de templado. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial (94 °C durante 5 minutos), se realizaron 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, alineación a 58

°C durante 1 minuto y elongación a 72 °C durante 1 minuto. Posteriormente, se realizó una elongación final de 10 minutos a 72 °C

Tabla 2. Iniciadores diseñados para la amplificación del ORF2 del parvovirus porcino 5

SECUENCIA	INICIADOR	NUCLEÓTIDO HIBRIDACION	PRODUCTO ESPERADO	
5'- TTTGGGCGCCATATATTGAT-3'	Fw	3363	521	Ciclo 1
5'- ATGCGGAAAAGAGCTAAGCA-3'	Rv	3883		
5'- TTAGGAGCCCCGATATATGAAA-3'	Fn	3488	193	Anidado
5'- TTGCTGGAGGCTCTTCATTC-3'	Rn	3680		

Adicionalmente, se realizó una PCR de un gen constitutivo Hipoxantina fosforibosiltransferasa (HPRT) de cada muestra para determinar la integridad del ADN y descartar la posibilidad de resultados falsos negativos. Las condiciones de PCR se realizaron en reacciones de 50 µl en termociclador Master Cycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) usando Master mix (BioLine, USA), utilizando los siguientes iniciadores: Forward 5'-TTGCTGACCTGCTGGATTAC-3' y Reverse 5'-CTGACCAGGGAAAGCAAAGT-3'. Posterior a la desnaturalización inicial (94 °C durante 5 minutos), se completaron 35 ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, alineación a 50 °C durante 30 segundos y elongación a 72 °C durante 30 segundos. La elongación final fue de 72 °C durante 5 minutos.

4.5 Visualización de los productos amplificados

La visualización de los productos amplificados se realizó por medio de electroforesis en un gel de agarosa, a una concentración de 1.5% con solución amortiguadora Tris 1M, ácido bórico anhidro 1M, Na₂ EDTA, 2H₂O (TBE, Promega Corp. Madison, WI, USA). teñido con 2.5 µl de bromuro de etidio (Promega Corp. Madison, WI, USA).

Para el llenado de los pozos se utilizaron 8 μ l del producto de la PCR con 4 μ l de Buffer de carga (Glycerol 50% v/v, Na₂ EDTA 2H₂O 100Mm, duodecil sulfato de sodio 1% w/v, azul de bromofenol 0.1% w/v). se utilizó un marcador de peso molecular (HyperLadder 1,000 bp, BIOLINE, EUA). La electroforesis se realizó a 90 volts durante 90 minutos, los productos obtenidos se observaron en un transiluminador de luz UV (Apollo, Instrumentation, Claremont CA, USA).

4.6 Purificación de productos amplificados

Se realizó la purificación de los productos amplificados, se recortaron las bandas del gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio, para dicha purificación se utilizó un kit comercial (EZ10 spin column Gel Extraction Minipreps, Bio Basic, EUA). Brevemente, en condiciones de esterilidad, se disecaron los productos del gel de agarosa del tamaño esperado con ayuda de una navaja de bisturí estéril, colocándose en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y fueron pesadas. Posteriormente, se le agregaron 400 μ l de Buffer II por cada 100 mg de peso para su incubación a 60 °C por 10 minutos, agitándose ocasionalmente hasta que la agarosa estuvo totalmente disuelta. Acto seguido, la mezcla anterior se depositó a la columna EZ-10, se dejó reposar 2 minutos y se centrifugó a 10,000 rpm durante 2 minutos. El filtrado resultante fue eliminado para añadir a la columna 750 μ l de solución de lavado para centrifugar nuevamente a 10,000 rpm por 1 minuto. Al finalizar la centrifugación, se eliminó la mayor cantidad de solución de lavado para volver a centrifugar a 10,000rpm durante 1 minuto con el fin de remover cualquier residuo de la solución de lavado. Después, la columna EZ-10 se colocó en un tubo estéril de 1.5 ml para adicionar 50 μ l de Buffer de elución directamente en la

membrana del tubo, incubando a temperatura ambiente por 2 minutos. Al finalizar, se centrifugó la columna a 10,000 rpm por 2 minutos y el purificado obtenido se almacenó a -20 °C hasta su uso.

4.7 Secuenciación

Se realizó la secuenciación de dos productos positivos amplificados de los casos de PMWS por medio de estuches que contienen enzimas de alta fidelidad, posesividad y especificidad requeridas en secuenciación y clonación molecular. La secuenciación se realizó en una dirección con el iniciador sentido anidado, utilizando un juego de reactivos comercial (Big Dye Terminator v3.1, Applied Biosystems, Foster City, CA). Las muestras se secuenciaron mediante el método de Sanger (Applied Biosystems, Foster City, CA.) en el Instituto de Fisiología Celular (UNAM, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México).

4.8 Análisis de datos

La alineación, edición y la determinación de la matriz de identidad de las secuencias de nucleótidos se realizaron con el programa Bioedit (Bioedit V7.2.5, Ibis Bioscience, Carlsbad, CA). Para conocer la especificidad de la secuencia del ADN viral se utilizó el programa informático BLAST ([National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA). Los árboles filogenéticos se generaron utilizando el programa MEGA (Tamura *et al.*, 2013), con el modelo de Kimura 2-parametro y para validar los árboles se utilizó Bootstrap (1000 repeticiones), valores mayores a 65 (650) fueron considerados altamente similares.

5. RESULTADOS

Los iniciadores diseñados mostraron ser específicos para una zona conservada del ORF2, el cual corresponde a la proteína viral VP1 (Figura 3). Los dos casos de PMWS seleccionados como controles positivos mostraron una banda del tamaño esperado (196 pb). Los productos secuenciados mostraron una similitud del 100% con secuencias ya establecidas en el GenBank correspondientes al PPV5. La secuencia obtenida mostró una identidad del 100% con las siguientes secuencias del GenBank: MK378349, MK378347, MK378346, MK378345, MK378344, MK378343, MK378342, MK378341, MK378338, MK378337, MK378336, MK378332, MK378331, MK378326, MK378309, MK378307, MK378306, MK378305, MK378295, MK378223, MK378291 (Fig. 4). La topología del árbol reveló que las secuencias se agruparon en 6 ramas bien definidas, correspondiente a cada uno de los PPVs (1-6), adicionalmente, las secuencias obtenidas en el presente trabajo (MH717883 y MH717884) comparten la misma rama que las secuencias correspondientes al PPV5 obtenidas en el Genbank, el cual es comprobado con un valor de 1000 repeticiones de bootstrap (Fig. 5).

Se amplificaron productos en el gradiente de temperatura utilizado (54°C, 56 °C, 58 °C, 60 °C). Sin embargo, la banda más definida e intensa se observó a una temperatura de 58 °C (Fig. 6). Con respecto al rango de concentración de MgCl₂, se amplificaron productos del tamaño esperado en todas las concentraciones empleadas (1.5 Mm, 1.75 Mm, 2.0 mM, 2.25 mM) (Fig. 7). La curva de iniciadores reveló que las bandas con mejor definición se obtuvieron en las concentraciones de

50 y 75 pmol (Fig. 8). La concentración mínima de detección fue de 12.5 ng con base en el rango de concentración de templado utilizado (Fig.9).

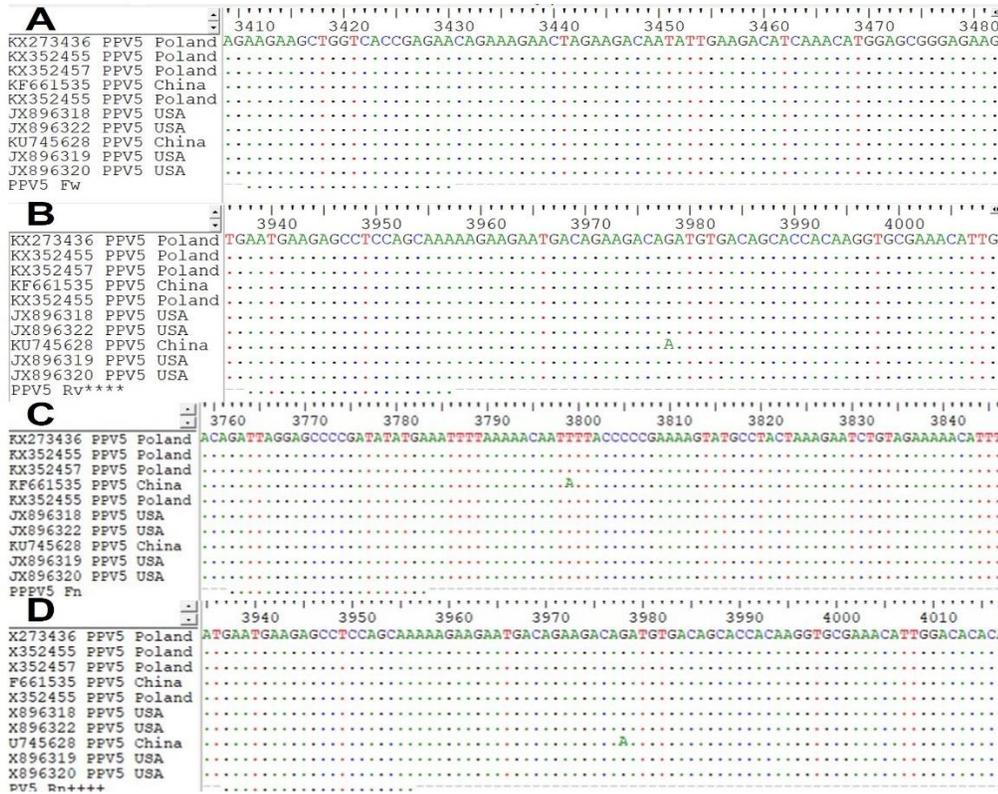


Figura 3. Alineación de iniciadores diseñados por Bioedit. Se muestran zonas conservadas en la alineación. A. Iniciador forward, B. Iniciador reverso, C. Iniciador forward anidado, D. Iniciador reverso anidado.

<input checked="" type="checkbox"/>	Porcine parvovirus 5 isolate PPV5_VIRES_C_ZJ01_C1 replicase and capsid protein genes, complete cds	333	333	100%	2e-87	100.00%	MK378349.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Porcine parvovirus 5 isolate PPV5_VIRES_YN01_C1 replicase gene, complete cds, and capsid protein gene, partial cds	333	333	100%	2e-87	100.00%	MK378347.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Porcine parvovirus 5 isolate PPV5_VIRES_TJ01_C1 replicase and capsid protein genes, complete cds	333	333	100%	2e-87	100.00%	MK378346.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Porcine parvovirus 5 isolate PPV5_VIRES_SX02_C1 replicase gene, partial cds, and capsid protein gene, complete cds	333	333	100%	2e-87	100.00%	MK378345.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Porcine parvovirus 5 isolate PPV5_VIRES_SX01_C1 replicase and capsid protein genes, complete cds	333	333	100%	2e-87	100.00%	MK378344.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Porcine parvovirus 5 isolate PPV5_VIRES_SH01_C1 replicase and capsid protein genes, partial cds	333	333	100%	2e-87	100.00%	MK378343.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Porcine parvovirus 5 isolate PPV5_VIRES_SD02_C1 replicase and capsid protein genes, complete cds	333	333	100%	2e-87	100.00%	MK378342.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Porcine parvovirus 5 isolate PPV5_VIRES_SD01_C1 replicase and capsid protein genes, complete cds	333	333	100%	2e-87	100.00%	MK378341.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Porcine parvovirus 5 isolate PPV5_VIRES_NX02_C1 replicase and capsid protein genes, complete cds	333	333	100%	2e-87	100.00%	MK378338.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Porcine parvovirus 5 isolate PPV5_VIRES_NX01_C1 replicase and capsid protein genes, complete cds	333	333	100%	2e-87	100.00%	MK378337.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Porcine parvovirus 5 isolate PPV5_VIRES_NM02_C1 replicase and capsid protein genes, complete cds	333	333	100%	2e-87	100.00%	MK378336.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Porcine parvovirus 5 isolate PPV5_VIRES_LN01_C1 replicase and capsid protein genes, complete cds	333	333	100%	2e-87	100.00%	MK378332.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Porcine parvovirus 5 isolate PPV5_VIRES_JX01_C2 replicase and capsid protein genes, partial cds	333	333	100%	2e-87	100.00%	MK378331.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Porcine parvovirus 5 isolate PPV5_VIRES_HuN02_C1 replicase gene, partial cds, and capsid protein gene, complete cds	333	333	100%	2e-87	100.00%	MK378326.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Porcine parvovirus 5 isolate PPV5_VIRES_HeB01_C1 replicase and capsid protein genes, complete cds	333	333	100%	2e-87	100.00%	MK378309.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Porcine parvovirus 5 isolate PPV5_VIRES_GZ03_C1 replicase gene, complete cds, and capsid protein gene, partial cds	333	333	100%	2e-87	100.00%	MK378307.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Porcine parvovirus 5 isolate PPV5_VIRES_GZ02_C1 replicase and capsid protein genes, partial cds	333	333	100%	2e-87	100.00%	MK378306.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Porcine parvovirus 5 isolate PPV5_VIRES_GZ01_C1 replicase and capsid protein genes, complete cds	333	333	100%	2e-87	100.00%	MK378305.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Porcine parvovirus 5 isolate PPV5_VIRES_FJ01_C1 replicase and capsid protein genes, complete cds	333	333	100%	2e-87	100.00%	MK378295.1

Figura 4. Homología de la secuencia obtenida con secuencias del gen bank. Las secuencias obtenidas en el trabajo mostraron 100% de homología con diversas secuencias del gen bank descritas como PPV5. Captura de pantalla BLAST.

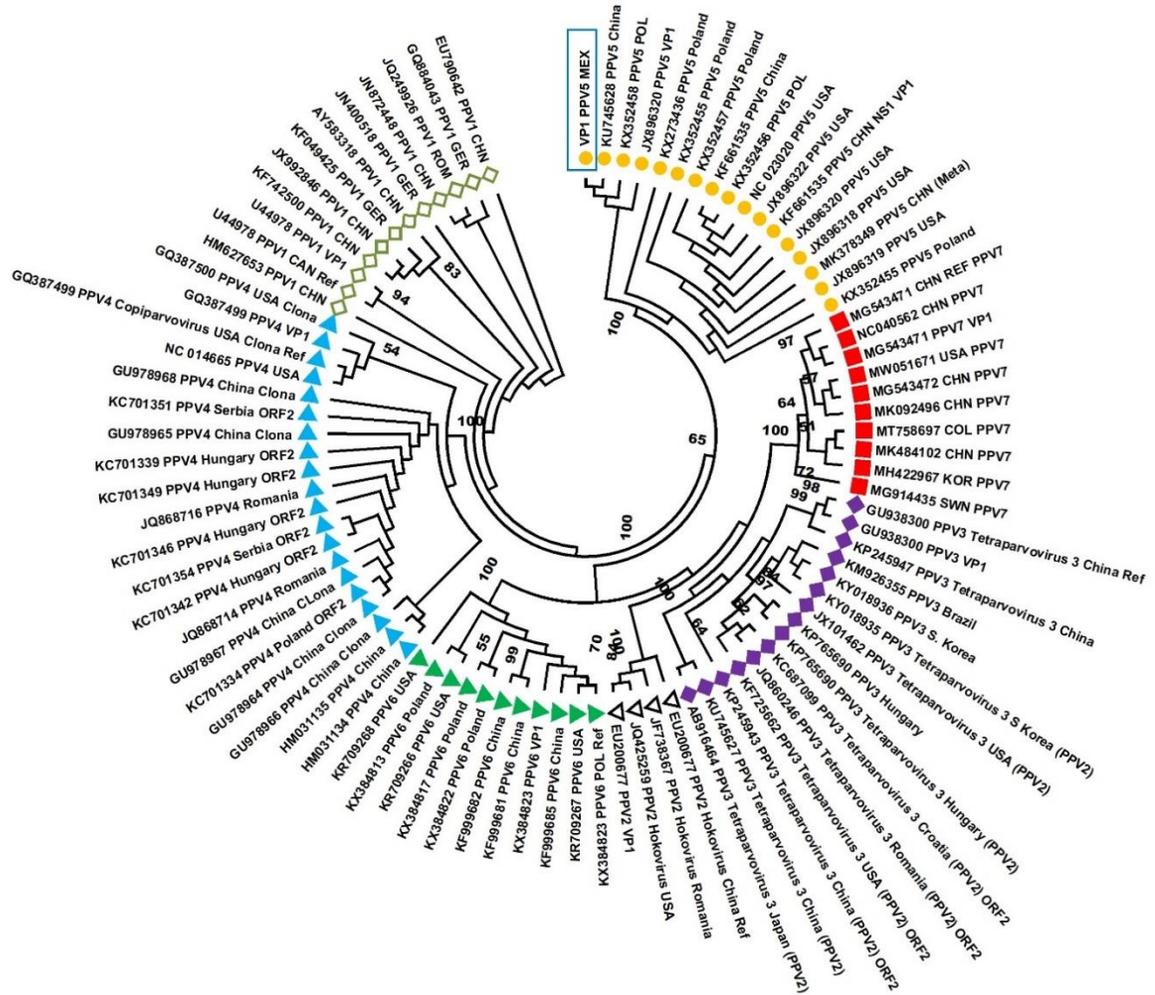


Figura 5. Árbol filogenético de las distintas especies de Parvovirus. El árbol muestra 7 ramas bien definidas para cada una de las especies de Parvovirus porcino, las cuales provienen de diferentes países, dichas secuencias están identificadas con el número de acceso del GenBank; con 1000 repeticiones de bootstrap. Valores arriba de 70 fueron considerados significativos. Recuadro azul corresponde a la secuencia obtenida en el presente trabajo.

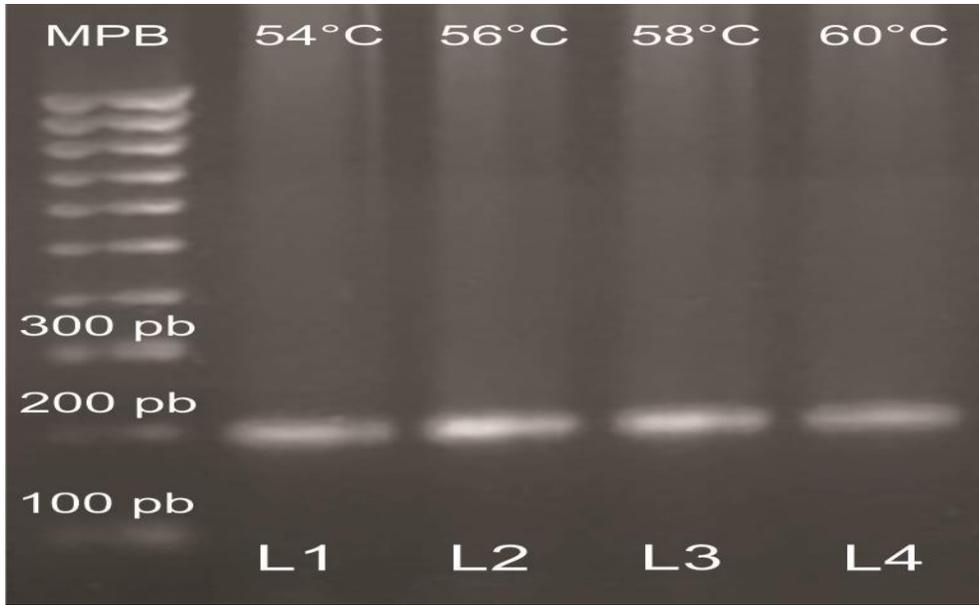


Figura 6. Gradiente de temperatura para la amplificación de PPV5. Marcador de pares de bases (Mpb). Líneas 1-4 productos positivos. Gel de agarosa al 1.5%.

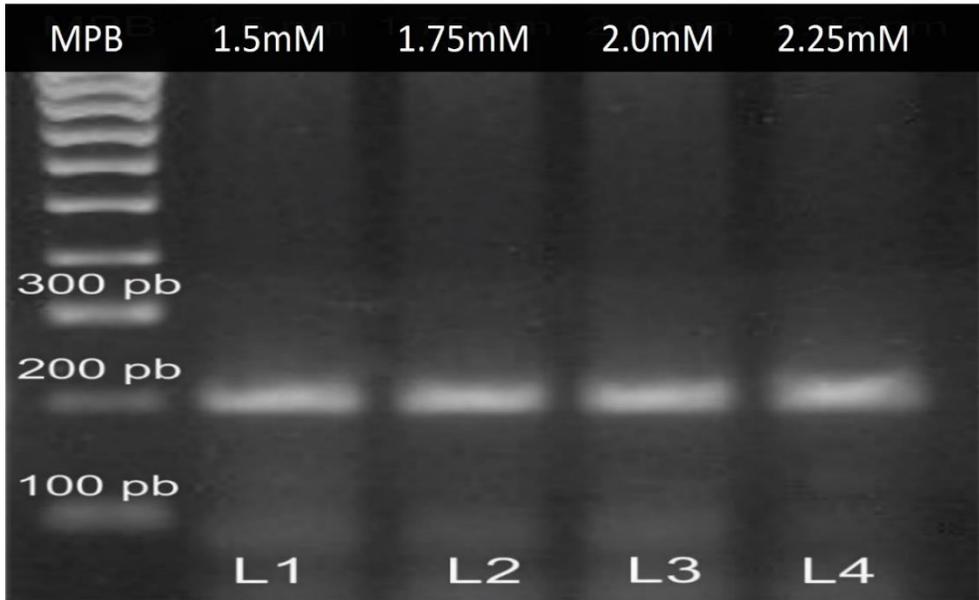


Figura 7. Curva de concentración de $MgCl_2$ para la amplificación de PPV5. Marcador de pares de bases (Mpb). Líneas 1-4, productos positivos. Gel de agarosa al 1.5%.

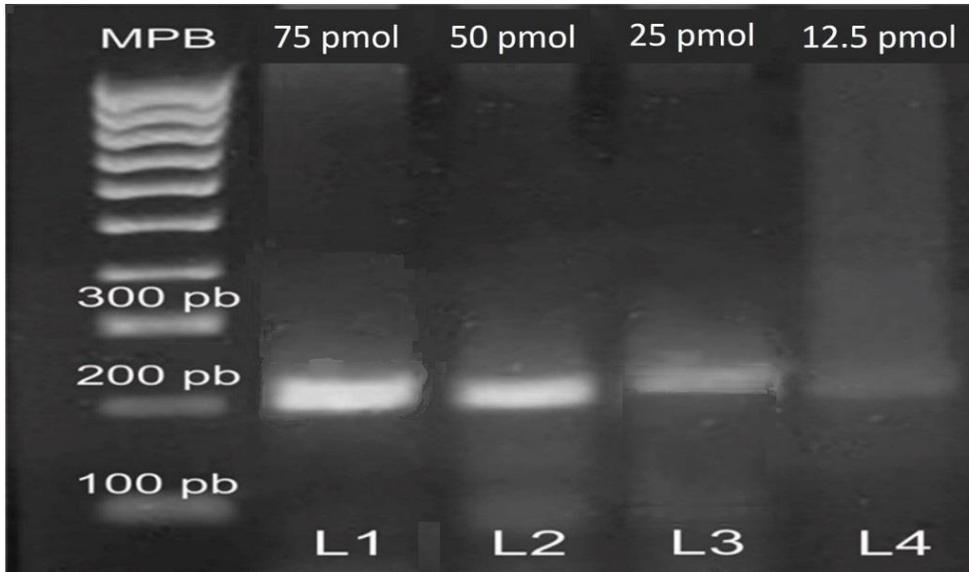


Figura 8. Curva de concentración de iniciadores para la amplificación de PPV5. Marcador de pares de bases (Mpb). Líneas 1-4 productos positivos. Gel de agarosa al 1.5%.

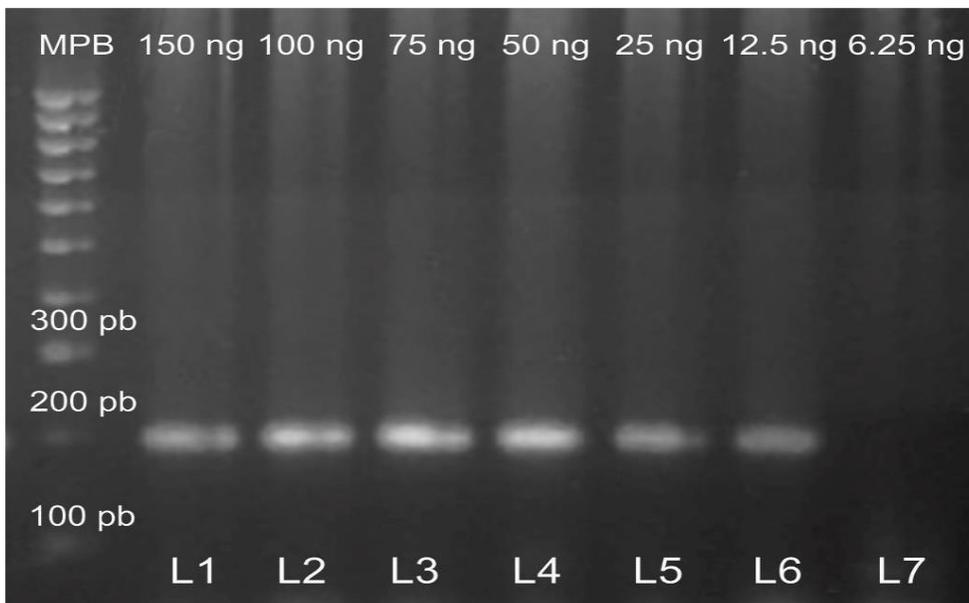


Figura 9. Curva de concentración de templado para la amplificación de PPV5. Marcador de pares de bases (Mpb). Líneas 1-6 productos positivos. Gel de agarosa al 1.5%.

La implementación de la técnica de PCR anidado-estandarizada utilizando el ADN obtenido de sangre de la población experimental cerdas mostró que 15/30 de las muestras fueron positivas al PPV5, revelando una prevalencia de 50%. En la

figura 10 se muestran casos representativos de la amplificación de PPV5 mediante el uso de templado de cerdas primerizas. Sin embargo, la estandarización se realizó con linfonodos embebidos en parafina y al utilizar sangre completa, la amplificación no fue la deseada por lo que se optó por modificar el iniciador Forward anidado, el cual se recorrió dos nucleótidos hacía el extremo 5´ (posición 3486) de la secuencia, amplificando un producto de 195 pb (5´-GATTAGGAGCCCCGATATATGA-3´)

Todas las muestras amplificaron productos del tamaño estimado (229 pb) para HPRT, incluyendo las negativas a PPV5 (Fig. 11).

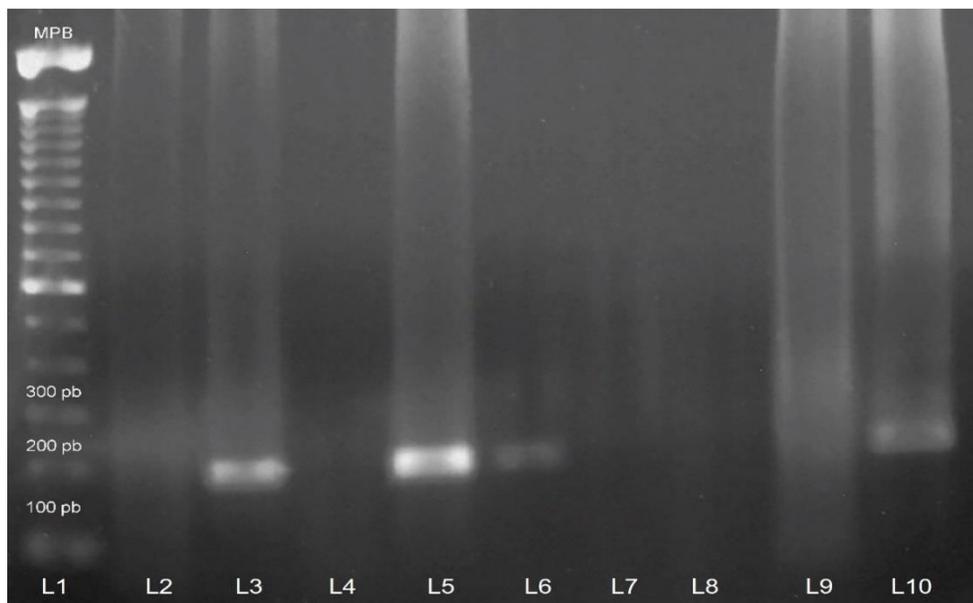


Figura 10 . PCR anidada para la amplificación de PPV5 a partir de ADN de sangre de cerdas primerizas. Marcador de pares de bases (L1), control positivo (L10), casos positivos al PPV5 (L3, L5, L6). Gel de agarosa al 1.5%.

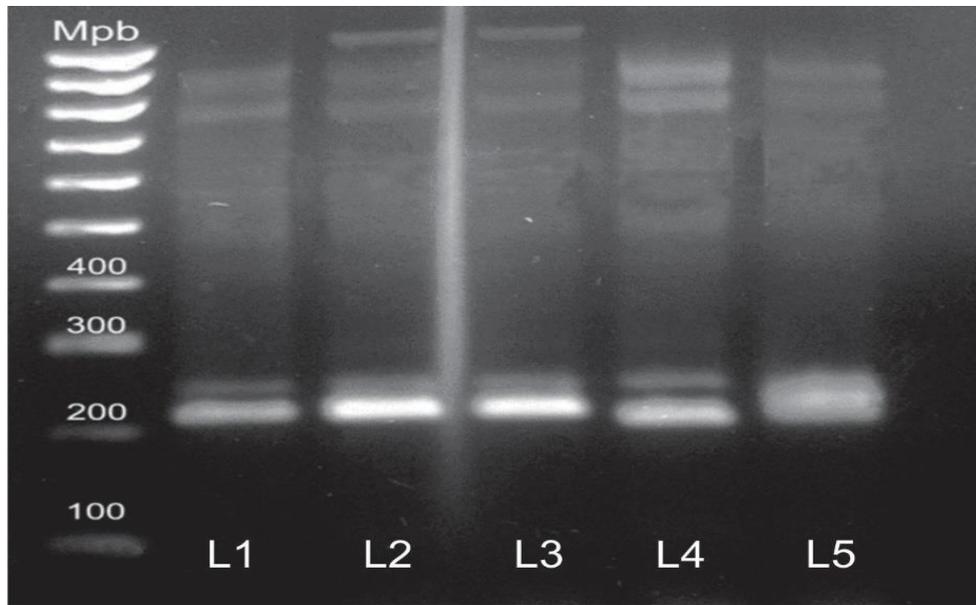


Figura 11. PCR para la amplificación del gen constitutivo Hipoxantina-guanina-fosforibosil transferasa 1 (HPRT1) a partir de ADN de sangre de cerdas primerizas. Línea 1 marcador de pares de bases (Mpb). Líneas 2-6, productos positivos de 229 pb. Se muestran los casos negativos a PPV5 Gel de agarosa al 1.5%.

6. DISCUSIÓN

Los PPVs emergentes están ampliamente distribuidos a lo largo de todo el mundo. Sin embargo, hasta el momento no se tiene certeza sobre su participación en el desarrollo de enfermedad. En diversos estudios, se ha evaluado la posibilidad de que estos virus presenten relación con las diferentes presentaciones de la PCVAD debido a que se ha observado una considerable coinfección de PPVs con el PCV2 (Saekhow, 2011; Cui, *et. al.*, 2017b). En el presente estudio, se optimizaron las condiciones para la amplificación de secuencias de PPV5 por PCR para su implementación en muestras de sangre de cerdas primerizas.

Los iniciadores diseñados exhibieron especificidad para la amplificación de PPV5 dado que se obtuvieron productos de tamaño esperado que presentaron una similitud del 100% con relación en las secuencias publicadas y el análisis filogenético mostró que se agruparon con secuencias de PPV5, así mismo, comparte rama con una secuencia proveniente de China (KU745628).

Con base en dichos elementos, se utilizó el ADN de muestras parafinizadas de linfonodo como controles positivos para la optimización de las condiciones de amplificación. Debido a que uno de los parámetros en la validación de protocolos de PCR es la determinación de la temperatura de alineación, se realizó un gradiente de temperatura, considerando la temperatura de desnaturalización (melting temperature [T_m] por sus siglas en inglés) de los iniciadores misma que representa la temperatura en la cual la mitad del ADN se encuentra en su forma desnaturalizada (cadena sencilla) (Boehringer Mannheim, 1996). En el presente trabajo, se tomó como referencia la T_m indicada por el proveedor de los iniciadores (64°C) y se realizó

el gradiente 2, 4 y 6 grados por debajo de la T_m . De este modo, los iniciadores demostraron amplificación de los productos validados por secuenciación en todas las temperaturas del gradiente. Se eligió la temperatura de 58°C para proseguir con la optimización de los siguientes parámetros dado que la banda era más definida.

Otro componente relevante para la amplificación es la elección de una correcta concentración de magnesio ya que la enzima ADN polimerasa es dependiente de magnesio y determina la fidelidad de ésta (Cateses *et al.*, 1997). Sin embargo, altas concentraciones de magnesio pueden ir en detrimento de la PCR debido a que los cationes divalentes libres estabilizan fuertemente las uniones de ADN de doble cadena, lo cual interfiere con la hibridación de los iniciadores (Boehringer Mannheim, 1996). No obstante, se observó amplificación en todas las concentraciones de $MgCl_2$ probadas. Adicionalmente, se pudo obtener amplificación utilizando bajas concentraciones de los iniciadores (12.5 pM) pero las bandas fueron muy tenues (Figura 8, línea 4). Lo anterior aunado a la baja concentración mínima de detección (12.5 ng) son compatibles con alta eficiencia y sensibilidad de los iniciadores diseñados. En todos los casos no hubo evidencia de amplificación de productos inespecíficos (Figuras 6–9). En conclusión, los iniciadores validados mostraron ser específicos y sensibles para la detección de secuencias de PPV5 mediante la utilización de los controles positivos. Así mismo, en la composición de la mezcla de PCR, se determinó utilizar 1.5 ng de $MgCl_2$ dado que es la concentración estándar en las mezclas comerciales, así como 50 ng de templado y 50 pM de iniciadores como concentraciones óptimas con la finalidad de ubicarse por encima de la concentración mínima de detección.

Sin embargo, la implementación del protocolo optimizado en las muestras de sangre de cerdas primerizas reveló que las bandas obtenidas eran demasiado tenues para ser visualizadas en el gel a pesar de que el producto del control positivo si mostró una intensidad similar a la observada en la estandarización. Lo anterior es sugestivo de una baja carga viral en las muestras de sangre. Sin embargo, esta aseveración requiere ser corroborada mediante PCR cuantitativa (qPCR). Por tal motivo, se resolvió evaluar y editar las parejas de iniciadores con la finalidad de incrementar la sensibilidad de la detección en muestras de sangre. Con dichos ajustes que se generaron para los iniciadores se logró mejorar la amplificación (Figura 10).

De este modo, se observó una frecuencia del 50% del ADN de PPV5 en la sangre de cerdas primerizas aportando información adicional sobre la presencia de esta especie emergente en México y su potencial participación en la falla reproductiva en cerdas.

Históricamente, varios agentes virales han sido asociados con el desarrollo de PMWS. Entre éstos destacan el Ungulate *protoparvovirus 1* (PPV1) y *el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino* (PRRSv, por sus siglas en inglés) dado que se describe que ambos agentes infecciosos en coinfección con PCV2, incrementan la severidad de los cuadros clínicos de PCVAD (Fenaux *et. al.*, 2000 Blomström *et. al.*, 2009; Gillespie *et. al.*, 2009; Adlhoch *et. al.*, 2010; Opriessnig *et. al.*, 2012; Ellis *et. al.*, 2014). Por tal motivo, se postula que los PPVs emergentes podrían participar en el desarrollo de PCVAD, e incluso incrementar los signos clínicos de la enfermedad teniendo una marcada coinfección tal y como se ha

descrito para el PPV1 (Gillespie *et. al.*, 2009; Blomström *et. al.*, 2009). Sin embargo, existe poca información sobre la posible participación de los PPVs en el desarrollo de enfermedad, por lo tanto, no se tiene conocimiento sobre las células blanco que estos afectan, ni su distribución en los diferentes órganos o tejidos (Novosel, *et. al.*, 2018). Se describe que el PPV2 es la especie emergente más prevalente y por tanto, de la que existen más estudios sobre su relación con la PCVAD (Saekhow *et. al.*, 2011, Xiao *et. al.*, 2013, Opriessnig, *et. al.*, 2014, Saekhow *et. al.*, 2015, Cui *et. al.*, 2017a, Novosel, *et. al.*, 2018).

La aplicación de nuevas técnicas de biología molecular ha acelerado la identificación de nuevas especies de parvovirus porcino en una gran variedad de tejidos y muestras. Para fines prácticos, es fundamental la elección de la muestra ideal para el diagnóstico de los PPVs emergentes. Las muestras más utilizadas para la detección de PPVs son lavados bronquiales, tejido pulmonar y fetos abortados (Palinskii *et. al.*, 2016) así como suero o sangre para la detección de viremia (Cui *et. al.*, 2017a). En cerdos en crecimiento se ha reportado una prevalencia de viremia del PPV5 del 30% al 50% (2/5) en la doceava semana de edad mientras que en cerdos con 18 semanas de edad hay una prevalencia menor al 30% (1/10) (Cui *et. al.*, 2017a). En el presente estudio, se obtuvo una prevalencia de 50% (15/30) en sangre de cerdas primerizas con más de 18 semanas. Es posible que una alta prevalencia de viremia en cerdas reproductoras promueva transmisión transplacentaria que a su vez conduce a mayor prevalencia en cerdos de menor edad misma que con el tiempo declina como se observó en el estudio referido.

Como se ha mencionado, estas especies emergentes de parvovirus porcino han sido detectados en diversos tejidos de cerdos, estos tejidos provienen de animales sanos o enfermos, particularmente en casos asociados a PCV2. En México, el PPV5 fue detectado en linfonodos embebidos en parafina proveniente de lechones destetados afectados por el PMWS (52% 26/50), demostrando una co infección entre estos dos agentes virales, cabe mencionar, que las otras especies también fueron detectados en estos tejidos (PPV2 74% (37/50) PPV3 84.0% (42/50) PPV6 100% (50/50), así mismo, el PPV5 fue detectado en 32.1% de las muestras de corazones de fetos abortados provenientes de casos de falla reproductiva asociada a PCV2, confirmando así la relación que tiene la falla reproductiva asociada a PCV2 con el PPV5 (Garcia-Camacho *et. al.*, 2020). En contraste, este estudio pone en manifiesto la detección del PPV5 en la sangre de cerdas primerizas encontrando una frecuencia más elevada en progenitoras asociadas con PCV2(50% (15/30).

Como ya se ha propuesto, el tipo de muestra es de gran ayuda para hacer un diagnóstico oportuno en las granjas de cerdos, por ello en Estados Unidos (USA) se dieron a la tarea de detectar al PPV4 Y PPV5 en diferentes muestras como en tejido pulmonar, encontrando un 1.7% (3/178) (Chao-Ting *et. al.*,2013) se puede suponer que este órgano no es importante para la replicación de estas nuevas especies de parvovirus /emergentes. Mientras que en sangre de cerdas primerizas fue de un 83% (25/30). Por lo tanto, se puede confirmar que estos parvovirus emergentes (PPV5) tienen una gran asociación con las enfermedades asociadas al PCVD2.

Mientras que las frecuencias globales con respecto al PPV5 son reportados en Polonia 6.1% siendo más frecuente en cerdos con 12 semanas de edad y en cerdos de finalización (30%-50% de encontrarlo en muestras de suero sanguíneo) (Cui *et. al.*, 2017a). Por otro lado, en EUA comparte un rango de 9.3% en donde podemos encontrar con mayor frecuencia este virus en cerdos de finalización (7.4% en muestras de tejido pulmonar), también lo podemos encontrar en suero sanguíneo y fluidos torácicos en un 0.5% (Xiao *et. al.*, 2013), contrastando con el resultado obtenido en Polonia. También contrastando estos resultados con el presente estudio, en el cual se obtuvo un 50% de muestras positivas al PPV5, las cuales fueron obtenidas de sangre de cerdas primerizas. Por lo tanto, se demuestra que en nuestro país existe con mayor prevalencia esta enfermedad, la cual se relaciona con los otros países en la edad reportada, es decir en la etapa adulta del cerdo.

Hoy en día se usan varias técnicas de biología molecular para poder detectar y diagnosticar estas enfermedades virales y otras más, entre ellas se encuentran: PCR anidada, PCR multiplex, PCR en tiempo real, ELISA, Inhibición de la Hemoaglutinina, Hibridación *in situ*, etc. Siendo más utilizada la PCR y sus variantes, pero en especial la PCR anidada, ya que esta puede detectar pequeñas cantidades de ADN viral, lo que quiere decir que aumenta la sensibilidad de la prueba, por lo que en el presente trabajo se usó dicha prueba, obteniéndose una concentración mínima de detección de 6.25 ng lo cual es indicativo de que la PCR anidada optimizada además de ser específica presenta alta sensibilidad.

7. CONCLUSIONES

- El parvovirus porcino 5 se encuentra presente en nuestro país.
- La técnica de PCR anidado-estandarizada en este trabajo demostró ser altamente sensible y específico para la detección del PPV5.
- El parvovirus porcino 5 circula en sangre de cerdas primerizas, por lo tanto, esta muestra es muy factible para su detección.
- La prevalencia del parvovirus porcino 5 en México es más alta que la reportada en otros países como EUA y Polonia.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Adlhoch, C., Kaiser, M., Ellerbrok, H., Pauli, G., (2010). High prevalence of porcine Hokovirus in German wild boar populations. *Virology* 7, 171.
2. Allan, G. M., Kennedy, S., McNeilly, F., Foster, J. C., Ellis, J. A., Krakowka, S. J., Meehan, B. M. and Adair, B. M. (1999). Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J. Comp. Pathol.* 121: 1–11. [\[Medline\]](#) [\[CrossRef\]](#) Allan, G.M., Ellis, J.A., 2000. Porcine circoviruses: a review. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12, 3–14.
3. Allan, M.G., McNeilly, F., Kennedy, S., Daft, B., Clark, E.G., Ellis, A.J., Haines, M.D., Meehan, B., Adair, B., (1998). Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting syndrome in the USA and Europe. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10, 3–10.
4. Allander, T., Tammi, M. T., Eriksson, M., Bjerkner, A., Tiveljung-Lindell, A., & Andersson, B. (2005). Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(36), 12891-12896.
5. Antonis, A. F., Brusckhe, C. J., Rueda, P., Maranga, L., Casal, J. I., Vela, C., & Langeveld, J. P. (2006). A novel recombinant virus-like particle vaccine for prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure. *Vaccine*, 24(26), 5481-5490.
6. Blomström, A. L., Belák, S., Fossum, C., McKillen, J., Allan, G., Wallgren, P., & Berg, M. (2009). Detection of a novel porcine bocavirus-like virus in the background

- of porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome. *Virus research*, 146(1-2), 125-129.
7. C.-T. Xiao, P.G. Halbur, T (2013). Opriessnig, *Genome Announc.* (2013). doi:10.1128/genomeA.00021-12.
 8. Cadar, D., Cságola, A., Lorincz, M., Tombácz, K., Spînu, M., Tuboly, T., (2011b). Distribution and genetic diversity of porcine hokovirus in wild boars. *Arch. Virol.* 156, 2233–2239.
 9. Cadar, D., Dán, A., Tombácz, K., Lorincz, M., Kiss, T., Becskei, Z., Spînu, M., Tuboly, T., Cságola, A., (2012). Phylogeny and evolutionary genetics of porcine parvovirus in wild boars. *Infect Genet Evol.* 12, 1163–1171.
 10. Carrasco, L., & Almendral del Río, J. M. (2006). *Virus patógenos.*
 11. Cartwright, S.F., Huck, R.A., (1967). Viruses isolated in association with herd infertility, abortions and stillbirths in pigs. *Vet. Rec.* 81, 196–197.
 12. Cheung, A.K., Wu, G., Wang, D., Bayles, D.O., Lager, K.M., Vincent, A.L., (2010). Identification and molecular cloning of a novel porcine parvovirus. *Arch. Virol.* 155, 801–880.
 13. Cibulski P, Teixeira F, Varela M, Ungulate copiparvovirus 2 in healthy and postweaning multisystemic wasting syndrome -affected pigs. *Trop Anim Health Prod.* (2017);49:945-9.
 14. Csagola A, Lorincz M, Cadar D, Tombacz K, Biksi I, Tuboly T (2012) Detection, prevalence and analysis of emerging porcine parvovirus infections. *Arch Virol.* ;157(6):1003–10.
 15. Cui, J., Biernacka, K., Fan, J., Gerber, P. F., Stadejek, T., & Opriessnig, T. (2017a). Circulation of porcine parvovirus types 1 through 6 in serum samples

obtained from six commercial polish pig farms. *Transboundary and emerging diseases*, 64(6), 1945-1952.

16. Cui, J., Fan, J., Gerber, P. F., Biernacka, K., Stadejek, T., Xiao, C. T., & Opriessnig, T. (2017b). First identification of porcine parvovirus 6 in Poland. *Virus genes*, 53(1), 100-104.
17. Darwich, L. and Mateu, E. (2012). Immunology of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res.* 164: 61–67.
18. Decaro, N., & Buonavoglia, C. (2012). Canine parvovirus—a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Veterinary microbiology*, 155(1), 1-12.
19. Ellis, J. 2014. Porcine circovirus: a historical perspective. *Vet. Pathol.* 51: 315–327. Decaro, N., Buonavoglia, C., (2012). Canine parvovirus – a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet. Microbiol.* 155, 1–12.
20. Ellis, J., Hassard, L., Clark, E., Harding, J., Allan, G., Willson, P., Strokappe, J., Martin, K., McNeilly, F., Meehan, B., Todd, D., Haines, D. (1998). Isolation of circovirus from lesions of pigs with multisystemic wasting syndrome. *Can. J. Vet. Res.* 39, 44–51.
21. Ellis, J., Krakowka, S., Lairmore, M., Haines, D., Bratanich, A., Clark, E., Allan, G., Konoby, C., Hassard, L., Meehan, B., Martin, K., Harding, J., Kennedy, S. and McNeilly, F. (1999). Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11: 3–14.
22. Fenaux, M., Halbur P, G., Gill, Mike., Toth, T, E y Meng, X-J (2000) Genetic Characterization of Type 2 Porcine Circovirus (PCV-2) from Pigs with

Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in Different Geographic Regions of North America and Development of a Differential PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay to Detect and Differentiate between Infections with PCV-1 and PCV-2 J Clin Microbiol. 2000 Jul; 38(7): 2494–2503.

23. Gillespie J, Opriessnig T, Meng J, Pelzer K, Buechner- Maxwell V. (2009). Porcine circovirus tipo 2 y porcine circovirus -associated disease, J Vet Inter Med ;23:1151-63.
24. Guo, Y., Yan, G., Chen, S., Han, H., Li, J., Zhang, H., Luo, S., Liu, M., Wu, Q., Li, Q., Tu, C., Huang, L. & Gong, W. (2022). Identification and genomic characterization of a novel porcine parvovirus in China. Front Vet Sci, 20;9:1009103. DOI: 10.3389/fvets.2022.1009103.
25. Harding, C.S., Clark, G.E., (1998). Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Swine Health Product. 5 (5), 201–203.
26. Harding, C.S., Clark, G.E., Strokappe, H.J., Willson, I.P., Ellis, A.J., (1998). Postweaning multisystemic wasting syndrome: epidemiology and clinical presentation. Swine Health Product. 6 (6), 249–254.
27. Hijikata M, Abe K, Win KM, Shimizu YK, Keicho N, Yoshikura H (2001) Identification of new parvovirus DNA sequence in swine sera from Myanmar. Jpn J Infect Dis 54(6):244–245 9. Huang L, Zhai SL, Cheung AK, Zhang HB, Long JX, Yuan SS (2010) Detection of a novel porcine parvovirus, PPV4, in Chinese swine herds. Virol J 7:333.
28. Huang, L., Zhai, S.L., Cheung, A.K., Zhang, H.B., Long, J.X., Yuan, S.S., (2010). Detection of a novel porcine parvovirus, PPV4, in Chinese swine herds. Virol J. 7, 333.

- 29.** Hueffer, K., & Parrish, C. R. (2003). Parvovirus host range, cell tropism and evolution. *Current opinion in microbiology*, 6(4), 392-398.
- 30.** J. Ni, C. Qiao, X. Han, T. Han, W. Kang, Z. Zi, Z. Cao, X. Zhai, X. Cai, *Viol. J.* 11, 1 (2014)52.
- 31.** Keffaber, K.K., (1989). Reproductive failure of unknown etiology. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.* 1, 1–10.
- 32.** Kilham, L., & Olivier, L. J. (1959). *A latent virus of rats isolated in tissue culture. Virology*, 7(4), 428–437. doi:10.1016/0042-6822(59)90071-6 .
- 33.** Kim, J., Choi, C. and Chae, C. (2003). Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome reproduced by co-infection with Korean isolates of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *J. Comp. Pathol.* 128: 52–59. [\[Medline\]](#) [\[CrossRef\]](#).
- 34.** Lau, S.K., Woo, P.C., Tse, H., Fu, C.T., Au, W.K., Chen, X.C., Tsoi, H.W., Tsang, T.H., Chan, J.S., Tsang, D.N., Li, K.S., Tse, C.W., Ng, T.K., Tsang, O.T., Zheng, B.J., Tam, S., Chan, K.H., Zhou, B., Yuen, K.Y., 2008. Identification of novel porcine and bovine parvoviruses closely related to human parvovirus 4. *J. Gen. Virol.* 89, 1840–1848.
- 35.** Lukashov, V.V., Goudsmit, J., (2001). Evolutionary relationships among parvoviruses: virus-host coevolution among autonomous primate parvoviruses and links between adeno-associated and avian parvoviruses. *J. Virol.* 75, 2729–2740.
- 36.** Maclachlan, N. J., & Dubovi, E. J. (Eds.). (2010). *Fenner's Veterinary Virology.* Academic press.

- 37.** Maclachlan, N. J., B.V.S.M.S., & Dubovi, E. J. (2016). Fenner's Veterinary Virology (5^a ed.). San Diego, United States: Elsevier Science.
- 38.** Mahnel H. Mayr, (1965). Virus-like particles from hog cholera-infected tissue cultures and demonstrated in the electron microscope. In Proceeding of the FAO/OIE International Meeting on Hog Cholera and African Swine Fever, Rome, Italy.
- 39.** Meehan BM, McNeilly F, Todd D, Kennedy S, Jewhurst VA, Ellis JA, Hassard LE, Clark EG, Haines DM, Allan GM (1998) Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. J Gen Virol 79:2171–2179
- 40.** Murphy, F. A., Gibbs, E. P. J., Horzinek, M. C., & Studdert, M. J. (1999). Veterinary virology. Elsevier.
- 41.** Ni J, Qiao C, Han X, Han T, Kang W, Zi Z. Identification and genomic characterization of a novel porcine parvovirus (PPV6) in China. Virol J. (2014); 11:211.
- 42.** Norkin, L. C. (2010). Virology: molecular biology and pathogenesis.
- 43.** Novosel D, Cadar D, Tubol T, et al. Investigating porcine parvoviruses genogroup 2 infection using in situ polymerase chain reaction. BMC Vet Res. 2018; 14:163.
- 44.** Opriessnig T, Xiao T, Gerber F, Halbur G. Identification of recently described porcine parvoviruses in archived North American samples from 1996 and association with porcine circovirus associated disease. Vet Microbiol. (2014); 173:9-16.
- 45.** Opriessnig, T. and Halbur, P. G. (2012). Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease. Virus Res. 164: 20–32.

46. Opriessnig, T., O'Neill, K., Gerber, P. F., de Castro, A. M., Giménez-Lirola, L. G., Beach, N. M., ... & Halbur, P. G. (2013). A PCV2 vaccine based on genotype 2b is more effective than a 2a-based vaccine to protect against PCV2b or combined PCV2a/2b viremia in pigs with concurrent PCV2, PRRSV and PPV infection. *Vaccine*, 31(3), 487-494.
47. Ouh IO, Park S, Lee JY, First detection and genetic characterization of porcine parvovirus 7 from Korean domestic pig farms. *J Vet Sci*. 2018;19:855 - 7.
48. Palinski RM, Mitra N, Hause BM (2016) Discovery of a novel Parvovirinae virus, porcine parvovirus 7, by metagenomic sequencing of porcine rectal swabs. *Virus Genes* 52:564–567.
49. Prieto, C., & Martinez F., & Segalés J., & Carvajal A. (2017). *Enfermedades infecciosas del ganado porcino*. Zaragoza- España: Servet.
50. Ramamoorthy S, Meng J. Porcine circoviruses; a minuscule yet mammoth paradox. *Anim Health Res Rev*.2008;10;1-20.
51. Rosell, C., Segales, J., Plana-Duran, J., Balasch, M., Rodriguez-Arriola, G.M., Kennedy, S., Allan, G.M., McNeilly, F., Latimer, K.S., Domingo, M., 1999. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J. Comp. Pathol.* 120 (1), 59–78.
52. Rui, W., Yiping, W., Xiaobo, H., Xintian, W., Qiguai, Y., Yong, H., Xiaoping, M., y Sanjie, C., (2013) First complete genomic characterization of a porcine parvovirus 5 isolate from china.

- 53.** Saekhow P, Ikeda H. (2015) Prevalence and genomic characterization of porcine parvoviruses detected in Chiangmai area of Thailand in 2011. *Microbiol Immunol* ;59:82-8.
- 54.** Saekhow P, Kishizuka S, Sano N, Coincidental detection of genomes of porcine parvoviruses and porcine circovirus type 2 infecting pigs in Japan. *J Vet Med Sci.* 2015;77:1581-6.
- 55.** Schirtzinger, E. E., Suddith, A. W., Hause, B. M., & Hesse, R. A. (2015). First identification of porcine parvovirus 6 in North America by viral metagenomic sequencing of serum from pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology journal*, 12(1), 170.
- 56.** Shackelton, L.A., Hoelzer, K., Parrish, C.R., Holmes, E.C., (2007). Comparative análisis reveals frequent recombination in the parvoviruses. *J. Gen. Virol.* 88, 3294–3301.
- 57.** Shackelton, L.A., Parrish, C.R., Truyen, U., Holmes, E.C., (2005). High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 102, 379–384.
- 58.** Shade, R.O., Blundell, M.C., Cotmore, S.F., Tattersall, P., Astell, C.R., (1986). Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of a child during aplastic crisis. *J. Virol.* 1986 (58), 921–936.
- 59.** Sloots, T.P., McErlean, P., Speicher, D.J., Arden, K.E., Nissen, M.D., Mackay, I.M. (2006). Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. *J. Clin. Virol.* 35, 99–102.

- 60.** Streck AF, Homeier T, Foerster T, Fischer S, Truyen U (2013) Analysis of porcine parvoviruses in tonsils and hearts from healthy pigs reveals high prevalence and genetic diversity in Germany. *Arch Virol* 158(8):1173–1180.
- 61.** Streck, A.F., Bonatto, S.L., Homeier, T., Souza, C.K., Gonçalves, K.R., Gava, D., Canal, C.W., Truyen, U. (2011). High rate of viral evolution in the capsid protein of porcine parvovirus. *J. Gen. Virol.* 92, 2628–2636.
- 62.** Szelei, J., Liu, K., Li, Y., Fernandes, S., Tijssen, P., 2010. Parvovirus 4-like virus in blood products. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 561–564.
- 63.** Walker, P. J., Siddell, S. G., Lefkowitz, E. J., Mushegian, A. R., Adriaenssens, E. M., Alfenas-Zerbini, P., Dempsey, D. M., Dutilh, B. E., García, M. L., Curtis, H. R., Junglen, S., Krupovic, M., Kuhn, J. H., Lambert, A. J., Łobocka, M., Oksanen, H. M., Orton, R. J., Robertson, D. L., Rubino, L., Sabanadzovic, S., Simmonds, P., Smith, D. B., Suzuki, N., Van Doorslaer, K., Vandamme, A. M., Varsani, A. & Zerbini, F. M. (2022) Recent changes to virus taxonomy ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol.* 2022 Aug 23. doi: 10.1007/s00705-022-05516-5.
- 64.** Wang F, Wei Y, Zhu C, Huang X, Xu Y, Yu L, Yu X (2010) Novel parvovirus sublineage in the family of Parvoviridae. *Virus Genes* 41(2):305–308.
- 65.** Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J.M.A., ter Laak, E.A., Bloemraad, M., de Kluyver, E.P., Kragten, C., van Buiten, L., den Besten, A., Wagenaar, F., Broekhuijsen, J.M., Moonen, P.L.J.M., Zestra, T., de Boer, E.A., Tibben, H.J., de Jong, M.F., van't Veld, P., Groenland, G.J.R., van Genneep, J.A., Voets, M.Th., Verheijden, J.H.M., Braamskamp, J., 1991. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet. Q.* 13, 121–130.

- 66.** Wu, R., Wen, Y., Huang, X., Wen, X., Yan, Q., Huang, Y., ... & Cao, S. (2014). First complete genomic characterization of a porcine parvovirus 5 isolate from China. *Archives of virology*, 159, 1533-1536.
- 67.** Xiao, C. T., Gimenez-Lirola, L. G., Jiang, Y. H., Halbur, P. G., & Opriessnig, T. (2013). Characterization of a novel porcine parvovirus tentatively designated PPV5. *PLoS One*, 8(6), e65312.
- 68.** Zhang, H.B., Huang, L., Liu, Y.J., Lin, T., Sun, C.Q., Deng, Y., Wei, Z.Z., Cheung, A.K., Long, J.X., Yuan, S.S., 2011. Porcine bocaviruses: genetic analysis and prevalence in Chinese swine population. *Epidemiol. Infect.* 19, 1–6.
- 69.** Zimmerman, J. J., Karriker, L. A., Ramirez, A., Schwartz, K. J., Stevenson, G. W., & Zhang, J. (Eds.). (2019). *Diseases of swine*. John Wiley & Sons.