

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS**

**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE BOCAVIRUS (SwBoV),
TORQUETENOVIRUS 1-2 (TTV1-2) Y PARVOVIRUS PORCINOS (PPV)
RELACIONADOS CON EL SINDROME DE EMACIACIÓN POST-DESTETE
EN CERDOS PROVENIENTES DE DIFERENTES REGIONES DE
COLOMBIA.**

Adriana Patricia Corredor Figueroa

Trabajo de grado presentado para obtener el título de Magíster en Ciencias
Básicas Biomédicas

Bogotá, 2012

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus estudiantes en sus trabajos de tesis. Solo velará por qué no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

AGRADECIMIENTOS

A mi padre Dios, a Jesús y al Espíritu Santo, por amarme sin límites, porque todo lo que tengo se lo debo a Él, a mi esposo Víctor Chacín, quien ha vivido de primera mano todo este proceso. A mis padres Jorge Corredor y Gloria Figueroa y a mis hermanas Laura y Andrea, a quienes les debo su constante apoyo en todos los proyectos de mi vida.

A la Dra. Gloria Ramírez, por haberme dado la oportunidad de aprender y formarme a su lado, a los doctores Víctor Vera, Jairo Jaime y Darío Mogollón quienes también participaron en mi formación por más de 3 años, en el grupo de investigación de Microbiología y Epidemiología Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia.

Al Dr. Cesar Díaz de la Universidad de la Salle, por su valioso aporte no solo en la fase estadística de este trabajo si no en todas las etapas del mismo.

A la Dra. María Fernanda Gutiérrez de la PUJ, por guiarme y apoyarme en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. María Antonia Rincón del ICA, con quien tuve la oportunidad de aprender de porcinos.

Finalmente, al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia, a la Asociación Colombiana de Porcicultores y a la Universidad Nacional de Colombia por financiar el desarrollo de este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	6
2. MARCO TEÓRICO	8
2.1 El síndrome de emaciación post-destete, PMWS	11
2.2 Virus implicados en la presentación del PMWS	11
2.2.1 Circovirus porcino tipo 2 (PCV2)	11
2.2.2 Parvovirus porcino (PPV)	12
2.2.3 Torquetenovirus porcino (TTV)	13
2.2.4 Bocavirus porcino (SwBov)	16
2.3 La porcicultura en Colombia	17
3. OBJETIVO	19
3.1 Objetivo general	19
3.2 Objetivos específicos	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS	20
4.1 Toma de muestra	20
4.1.2 Preparación de las muestras	22
4.2 Extracción de ADN	23
4.3 Diseño de primers y amplificación por PCR	24
4.3.1 PCR PPV	24
4.3.2 PCR SwBov	26
4.3.3 PCR TTV1-2	28
4.3.4 PCR PCV2	31
4.4 ADN empleados como controles	33
4.5 Secuenciación de algunos productos de PCR para los diferentes agentes	33
4.6 Análisis de inmunoperoxidasa (IPx)	34
4.7 Análisis estadístico	34

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
5.1 Pruebas de especificidad intrínseca	36
5.2 Pruebas de sensibilidad intrínseca	36
5.3 Detección molecular de agentes virales en las muestras evaluadas	37
5.4 Comportamiento de presentación viral por departamento	40
5.5 Análisis de coinfecciones	42
5.6 Análisis del estatus clínico del animal versus virus encontrado	47
5.7 Análisis en las muestras de suero	48
5.8 Tendencia de presentación de los virus PCV2, PPV, SwBoV, TTV 1 y 2 con respecto a la edad al momento del muestreo	49
5.9 Análisis en las muestras de tejido, PCR versus enfermedad	50
5.10 Análisis de coinfecciones	54
5.10.1 Relación de la coinfección PCV2 + TTV 1 y 2 vs. la presencia o ausencia de PMWS sistémico	55
5.10.2 Relación de la coinfección TTV 1 y 2 + SwBov vs. la presencia o ausencia de PMWS sistémico	55
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES FINALES	56
7. ANEXOS	58
8. REFERENCIAS	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sacrificio de ganado y peso en canal, según especies, segundo trimestre 2010- 2011	17
Tabla 2 Secuencias de los primers empleados para el desarrollo de las PCR	32
Tabla 3 Porcentaje de positividad/ totales encontrado frente a cada uno de los virus en muestras de suero y tejido	38
Tabla 4 Porcentajes de positividad de ADN viral en muestras de suero y tejido	40
Tabla 5 Tabla de Contingencia, Variable presencia, ausencia PCV2 vs. enfermedad	51
Tabla 6 Descripción coinfecciones encontradas en las muestras analizadas	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Signos clínicos y lesiones observadas en animales con PMWS	10
Figura 2	Resumen protocolo de extracción empleado	24
Figura 3	Amplificación por PCR del fragmento NS-1 de PPV	26
Figura 4	Amplificación por PCR del fragmento VP1-2 de SwBov	28
Figura 5	Amplificación por PCR del fragmento 5'UTR de TTV-1	30
Figura 6	Amplificación por PCR del fragmento 5'UTR de TTV-2	31
Figura 7	Resumen purificación del ADN a partir de gel	33
Figura 8	Porcentaje de positividad de ADN viral	39
Figura 9	Porcentaje de positividad de ADN viral por departamento	42
Figura 10	Número de animales que presentaban coinfecciones	44
Figura 11	Relación variable de exposición bocavirus versus presencia ausencia PCV2	48
Figura 12	Análisis de presentación de cada uno de los virus con respecto a la edad	50
Figura 13	Relación variable de exposición PCV2 versus presencia ausencia PMWS	52
Figura 14	Relación variable de exposición PCV2 versus presencia ausencia PNDs	52
Figura 15	Relación variable de exposición SwBov versus presencia ausencia PMWS	53
Figura 16	Relación variable de exposición PCV2 + TTV1/2 versus presencia ausencia PMWS	55
Figura 17	Relación variable de exposición TTV1/2 y SwBov versus presencia ausencia PMWS	56

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Análisis bioinformático PPV	59
Anexo 2 Análisis bioinformático SwBov	62
Anexo 3 Análisis bioinformático TTVs	67

RESUMEN

Las enfermedades virales en los cerdos constituyen una causa importante de problemas sanitarios asociados con pérdidas económicas a nivel mundial en la industria porcina. A pesar de lo anterior se desconocen varios aspectos relacionados con los diferentes agentes en general y con las cepas actuantes en nuestro medio en particular. En éste contexto, el síndrome de emaciación post-destete (PMWS) ha sido estudiado en los últimos años, conociéndose hasta el momento la participación de agentes virales tales como el circovirus porcino tipo 2 (PCV2), el virus causante del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), el parvovirus porcino (PPV) y el virus de la enfermedad de Aujeszky, además de agentes bacterianos asociados. Sumado a lo anterior, recientemente se ha sugerido la participación de nuevos agentes virales asociados al PMWS tales como el bocavirus porcino (SwBoV) y los torquetenovirus tipo I y II (TTV1 y 2). Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo principal de éste trabajo fue el de establecer la presencia de dichos agentes virales no convencionales en explotaciones porcinas con antecedentes de presentación del PMWS.

Para este estudio se seleccionaron 152 muestras de suero de animales sanos pertenecientes a 32 granjas y 48 muestras de tejidos provenientes de animales que presentaban sintomatología compatible con PMWS correspondientes a 16 granjas. Todas las muestras, tanto de sueros como tejidos provenían de animales de 8 a 15 semanas de edad, de explotaciones ubicadas en los departamentos de Antioquia, Cundinamarca, Valle, Cauca, Caldas y Risaralda, correspondientes a las áreas de mayor producción porcícola en Colombia. Se analizó el ADN extraído a partir de las muestras seleccionadas, con el fin de determinar la presencia del material genético para cada uno de los 4 virus a estudiar (parvovirus porcino, bocavirus porcino, torquetenovirus tipo I y II), por medio de PCR convencional.

Con el fin de establecer la posible relación entre la presencia viral y el estado clínico del animal para el caso de las muestras de tejido, se analizaron los resultados obtenidos por PCR junto con los datos de signos clínicos y de necropsia, con una prueba de χ^2 usando el paquete estadístico SPSS v.19, de tal forma se logró establecer la relación entre las variables analizadas como presencia viral versus el estatus clínico del animal.

Resultados: Los resultados de PCR demostraron la presencia de virus porcinos de tipo PPV, SwBoV, TTV 1 y 2 en las muestras seleccionadas para éste estudio, encontrándose un menor porcentaje de presentación para SwBov (8%) y PPV (3%) en las muestras de suero. Al analizar las muestras de tejido, se observó un aumento en el porcentaje de presentación de SwBov (58%). Por otro lado, se encontró significancia estadística ($p=0.03$) al determinar que solo la presencia de PCV2 era una condición suficiente para producir PMWS sistémico, caso similar se encontró con SwBov ($p=0.06$).

Al analizar la presencia de co-infecciones en las muestras estudiadas, se observó un alto porcentaje de co-infecciones en las muestras de tejido para PCV2 y TTV 1-2 (16.6%) por un lado y de SwBoV y TTV 1-2 (20.8%) por el otro. Lo anterior permite sugerir que dichos virus podrían estar jugando un papel importante en el desarrollo del PMWS bien sea solos o en asocio con PCV2, agente viral considerado como uno de los principales causantes del PMWS en cerdos. El análisis estadístico, mostró que cuando estaba presente la coinfección PCV2 y TTV1-2, aumentaba el riesgo de presentación de PMWS sistémico en 6.25 ($p=0.017$), así mismo se encontró que la coinfección de SwBov y TTV1-2 no era suficiente para explicar la presentación de PMWS sistémico, posiblemente debido a la participación de otros agentes no evaluados en este estudio ($p=0.026$).

Conclusiones: Los resultados de éste estudio muestran que PPV, SwBoV y TTV 1 y 2, están circulando en la población porcina colombiana en animales en crecimiento de 8-15 semanas de edad y que aparentemente estos virus podrían estar relacionados con la presentación del PMWS. Al analizar de forma independiente cada uno de los virus frente a la presencia o ausencia de PCV2, no se encontró diferencia estadística significativa. Por otro lado de las 13 coinfecciones analizadas frente a PMWS, solamente PCV2 y TTV1-2, parecen tener una participación importante en el desarrollo del PMWS sistémico.

Este estudio constituye la primera aproximación al establecimiento de la presencia de agentes virales no convencionales tipo parvovirus, bocavirus y torquetenovirus porcinos, los cuales pueden tener relación con la presencia de PMWS en Colombia, tal como ha sido sugerido en otros países.

ABSTRACT

Introduction: Viral diseases in pigs are a major cause of health problems associated with global economic losses in the swine industry. In this context, the post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) has been studied in recent years, establishing the role of viral agents such as the porcine circovirus type 2 (PCV2) and the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), porcine parvovirus (PPV) and the Aujeszky's disease viruses, as well as associated bacterial infections. In addition, it has been suggested the involvement of other non-conventional viral agents such as pig bocavirus (SwBoV) and type I and II torquetenovirus (TTV1 and 2) associated with PMWS recently. Despite of the above, general aspects of different actors and the specific strains acting on the field in Colombia are still unknown. The main purpose of this study was to determine the presence of those novel viruses along with PCV2 in clinically normal and PMWS affected pigs.

Materials and Methods: 152 serum samples from 32 farms and 48 tissue samples from 16 farms (from clinically healthy and from PMWS suspected animals) were selected. The samples belonged to animals from 8 to 15 weeks of age, from the major pig producing regions in Colombia. DNA extraction was performed using a commercial DNA minikit (Quiamp®), subsequently the presence of genetic material for each of the four viruses (PPV, TTV1, TTV2, SwBoV) object of this study was conducted by PCR using primers previously described, except for PPV. Results from PCR along with clinical signs and necropsy findings were analyzed on the group of tissue samples using Chi² test and the statistical package SPSS v.19.

Results: PCR results showed the presence of PPV-like swine viruses, SwBoV, TTV 1 and 2 in the samples selected for this study. The lowest percentage was for SwBoV and PPV in serum samples. In contrast, when analyzing tissue

samples, the percentage of SwBov detection by PCR was surprisingly increased. When analyzing individual results for PCV2 on the same samples, the Chi² test, showed with statistical significance ($p = 0.03$), that PCV2 alone was enough to cause systemic PMWS. A similar conclusion was determined for the SwBoV ($p = 0.06$). Interestingly, analysis of the presence of co-infections, particularly in the tissue samples, showed a high percentage of co-presentation of PCV2 with TTV1 and TTV-2. It was also found an association between SwBoV and TTV1-2, in the absence of PCV-2. These findings suggest that those viruses may play a role in the development of PMWS alone or in association with PCV2. Statistical analysis showed that the presence of PCV2 and TTV1-2 together increased the risk of systemic PMWS by 6.25 ($p = 0.017$). On the other hand, apparently co-infection with SwBoV and TTV1-2 was not enough to explain the presentation of systemic PMWS ($p = 0.026$), therefore, in this case other agents might be involved.

Conclusions: Results from this study demonstrate that PPV, SwBoV and TTV1 and 2, are circulating in the swine population in Colombia and that apparently these viruses might play a role in the presentation of the PMWS. The independent analysis for each of the viruses against the presence or absence of PCV2 showed no statistical significance. Remarkably, from the analysis of 13 co-infections associated to PMWS, only PCV2 and TTV1-2, seem to have a role in the development of systemic PMWS.

This study is the first approach trying to understand the agents, apart from PCV2, involved in the occurrence of PMWS in Colombia.

1. INTRODUCCIÓN

Este trabajo nace de un macro proyecto realizado por el grupo de investigación en Microbiología y Epidemiología Veterinaria, de La FMVZ de la Universidad Nacional de Colombia, clasificado como grupo A1, con gran reconocimiento en el área, titulado “Circovirus porcino tipo 2: epidemiología, diagnóstico, caracterización y estrategias para el control de la enfermedad en Colombia”, cuyo principal objetivo fue estudiar PCV2 asociado a PMWS en Colombia, aunque se han resuelto interrogantes iniciales han quedado preguntas sin resolver frente a la presencia de otros agentes virales en el síndrome.

Estudios realizados en infecciones experimentales de cerdos gnotobióticos en donde no se ha logrado replicar el PMWS, e infecciones en donde han potenciado al PCV2 con la adición de otros agentes virales, sugieren que hasta el momento el PCV2 es un factor importante, pero no suficiente, para el desarrollo del PMWS.

Con el fin de entender mejor el comportamiento del síndrome de emaciación postdestete, el objetivo principal de este trabajo es conocer desde un panorama global otros agentes virales no convencionales que puedan estar asociados con el PCV2 en animales con PMWS ya sea de tipo clínico o subclínico. Teniendo en cuenta que en el país no se conoce la situación en cuanto a la presencia de dichos agentes, se tomó como base la presencia de PCV2 como factor desencadenante del PMWS para analizar a partir de éste los resultados obtenidos.

El reconocimiento de la presencia de estos agentes en la población porcícola colombiana es de gran importancia ya que da las bases para estudios

posteriores que permitan aclarar la etiología del PMWS en nuestro país, con el fin de desarrollar metodologías de control tendientes a reducir las pérdidas económicas ocasionadas por éste síndrome.

Los procedimientos desarrollados en este estudio ofrecen alternativas importantes para la detección de los agentes virales estudiados dado a que no existían previamente en el país y sugiere la necesidad de realizar estudios complementarios que permitan caracterizar los agentes actuantes en la presentación del PMWS en nuestro medio.

2. MARCO TEÓRICO

Las enfermedades virales en los cerdos constituyen una causa importante de problemas sanitarios asociados con pérdidas económicas a nivel mundial en la industria porcina (Allan G et al, 2006).

A pesar de lo anterior se desconocen varios aspectos relacionados con los diferentes agentes en general y con las cepas actuantes en nuestro medio en particular. En éste contexto, el síndrome de emaciación post-destete (PMWS) ha sido estudiado en los últimos años, conociéndose hasta el momento la participación del circovirus porcino tipo 2 (PCV2) (Harding J et al, 2004, Nauwynck H et al, 2007 y Segalés J et al, 2004) y otros agentes tales como el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), el parvovirus porcino (PPV) y el virus de la enfermedad de Aujeszky, además de agentes bacterianos asociados (Opriessnig et al, 2012).

Sumado a lo anterior, recientemente se ha sugerido la participación de otros agentes virales tales como el bocavirus porcino (SwBoV) y los torquetenovirus tipo I y II (TTV1 y 2) asociados al PMWS (Kekarainen et al, 2006 y Blomström et al, 2009).

Este trabajo presenta un avance de los hallazgos con respecto a la presencia de estos nuevos virus en la población porcina colombiana desde una perspectiva para establecer otros posibles agentes involucrados en la presentación de PMWS en nuestro país, siendo el primer estudio realizado en Colombia.

2.1 El síndrome de emaciación post-destete, PMWS

El PCV2 está asociado a diferentes patologías del cerdo, tales como la circovirus porcina, falla reproductiva, síndrome de dermatitis y nefropatía porcino (PNDS), neumonía proliferativa necrotizante (NPN) y complejo respiratorio porcino (Segalés et al., 2005; Opriessnig et al., 2007). De tal forma que el PMWS (Postweaning Multisystemic Wasting syndrome) causa importantes pérdidas económicas en el sector porcino.

Se ha asociado principalmente con la presencia del circovirus porcino tipo 2 (PCV2) (Segalés J, et al, 2005, Shulze C et al, 2004) y otros agentes tales como *Mycoplasma hyoneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasterella multocida*, *Lawsonia intracellularis*, *Salmonella spp*, parvovirus porcino, el virus causante del PRRS y de la enfermedad de Aujeszky (Allan GM et al, 1999, Harms PA et al, 2002, Pallares FJ et al, 2002, Kim J. et al, 2003).

El primer reporte del PMWS se realizó en Canadá en el año 1997 en granjas tecnificadas (Harding et al 1997, Pogranichnyy R. et al. 2001, Vigre et al. 2005). Desde entonces ha sido catalogado como una enfermedad epizootica de distribución mundial, cuya importancia se relaciona con pérdidas económicas en la industria porcina (Opriessnig T et al, 2007).

El impacto productivo asociado al síndrome se ha relacionado con un aumento de días de retorno al celo post destete, baja de la tasa de parición, baja en la ganancia de peso diario y aumento en la mortalidad (Nielsen E. et al. 2006).

El rango de edad en que aparecen los síntomas oscila entre 7 y 14 semanas de edad, encontrándose retraso en el crecimiento seguido del deterioro de la condición corporal del animal (Figura 1A), además de sintomatología

respiratoria y gastrointestinal en la mayoría de los casos (Harding, et al 2004 y Segalés, et al 2004).

Dentro de las lesiones macroscópicas observadas en la necropsia se encuentran en su mayoría una canal de apariencia caquéctica, pálida y abdomen distendido; en algunos casos se observan signos de diarrea en la zona perineal, los ganglios linfáticos periféricos, principalmente los inguinales y mesentéricos, se encuentran pálidos y aumentados de tamaño (Figura 1B, 1C). En la cavidad abdominal se observa ascitis, congestión hepática, en algunos casos edemas en el mesenterio y úlceras gástricas (Segalés et al, 2004).

No hay tratamiento para PMWS, sin embargo, se usa terapia con antibióticos para controlar otros agentes infecciosos relacionados con el síndrome. El control de PMWS se logra con el uso de la bioseguridad y medidas sanitarias, como el aislamiento de los cerdos afectados y la desinfección de corrales después de su uso, la disminución de los factores de estrés (la densidad de población alta, ventilación inadecuada, insuficiente control de la temperatura) y la vacunación contra patógenos comunes. (Enoe C et al, 2006).

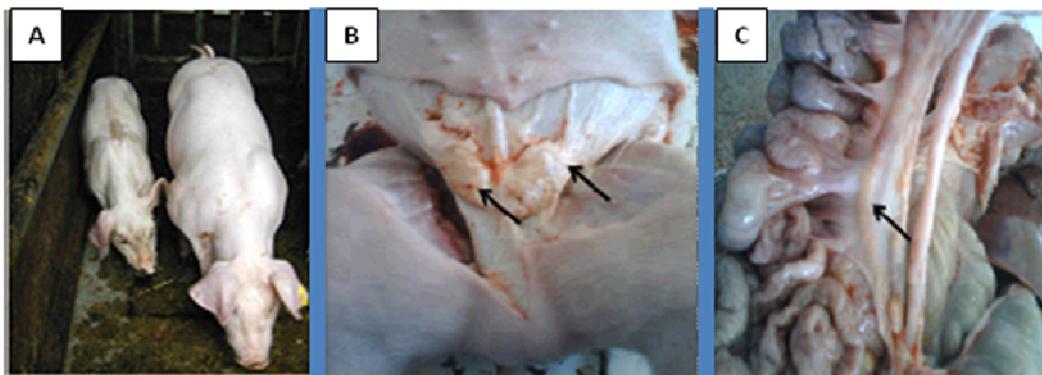


Figura 1. Signos clínicos y lesiones observadas en animales con PMWS. A. La foto muestra dos animales de la misma edad donde se observa en el animal de la izquierda pérdida de peso progresiva hasta alcanzar un estado de total emaciación, fuente

<http://www.saecoop.com/boll+D+l/febrero09.htm>. B. Las flechas señalan ganglios inguinales aumentados de tamaño. C. Ganglios mesentéricos aumentados de tamaño, Fuente B y C: Rincón María Antonia.

En el año 2008, el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) diagnosticó por primera vez el síndrome de emaciación postdestete en el país (PMWS), empleando técnicas de inmunohistoquímica. Actualmente se conoce que está ampliamente distribuido en el territorio nacional (Clavijo JA et al, 2007).

2.2 Virus implicados en la presentación del PMWS.

2.2.1 Circovirus porcino tipo 2 (PCV2)

El Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2), perteneciente a la familia *Circoviridae* es un virus de tipo ADN de cadena sencilla, de un tamaño pequeño entre 16 y 18nm, altamente resistente al medio y a los desinfectantes comunes (Nauwynck et al, 2007 y Royer R et al, 2001). Este virus se ha asociado como el principal causante de PMWS (Nauwynck H., et al 2007, Mateusen B. et al, 2007).

El diagnóstico de PCV2 como causante de PMWS se basa en la presentación de los signos clínicos, la presencia de las lesiones histopatológicas características y la identificación del PCV2 por aislamiento viral o por técnicas de PCR (Allan et al, 2006). Sin embargo, estudios epidemiológicos han determinado la presencia del PCV2 en granjas con y sin PMWS, lo que sugiere que factores de riesgo adicionales u otros agentes pueden estar asociados al síndrome o incluso potenciarlo (Welsh et al. 2006, C. Chae. et al, 2005).

En España un estudio retrospectivo de PCV2, encontró que el 84.4% de las muestras eran positivas a PCV2 (Rodríguez et al, 2003), en USA 54% (Opriessnig et al, 2005), en Taiwan 49.6% (Wang C et al, 2004).

Un estudio realizado por Opriessniget al, publicado en el 2012, sugiere que el PCV2 no se presenta solo como causa de la enfermedad, encontrando que sólo en el 1.9% de los animales la enfermedad se debía a el PCV2 en comparación con otros agentes como el virus del PRRS en combinación con PCV2 (35.5%) y el *Mycoplasma* con el PCV2 (15.5%).

2.2.2 Parvovirus porcino (PPV)

El Parvovirus porcino (PVP) pertenece a la familia *Parvoviridae*, tiene ADN de cadena sencilla, con un tamaño de 18 a 26 nm. Este virus está ampliamente distribuido en todo el mundo (Falcon et al, 1988, Mengeling et al, 1992, Ovaldia et al, 1991), y se asocia principalmente con fallas de tipo reproductivo (Kim J et al, 2003, Cutler RS et al, 1983, Mengeling WL et al, 1986).

Con respecto a la relación entre PPV y PMWS, un estudio realizado en la República de Corea demostró su presencia en un 25.6% de casos de PMWS y en un 18% en Canadá (Ellis JA et al, 2000, Kim J et al, 2002). En Colombia no se ha estudiado su papel en el PMWS.

De manera experimental, el parvovirus porcino ha sido usado junto con el PCV2 para inducir PMWS con el fin de estudiar los mecanismos por los cuales la infección con PPV potencia el efecto del PCV2 para el desarrollo del PMWS, (Allan GM et al, 1999, Kennedy S et al, 2000, Krakowka S et al, 2000) los cuales no son bien conocidos. El estudio realizado en Corea por J. KIM en el 2006 sugiere que el PPV está asociado con el aumento de TNF-alfa, desencadenando mayores manifestaciones clínicas de la enfermedad generando posiblemente una respuesta inmune exacerbada. Hallazgos similares son reportados por otros estudios que sugieren que la coinfección de PPV y del PCV2 en los macrófagos alveolares, induce altos niveles de replicación de PCV2, y del mismo modo se desencadena el TNFalfa, por

ejemplo, a cerdos inoculados con los dos virus, se les midió los niveles de IL-10 a través del tiempo encontrando incremento, de la misma forma un aumento en la replicación del PCV2 (Ellis JA et al, 2000, J. Kim et al, 2003, Hui-Wen Chang et al 2006).

2.2.3 Torquetenovirus porcino (TTV)

Los Torquetenovirus (TTV) pertenecen a la familia de los *circoviridae* y al género *anellovirus*, son virus ADN de cadena sencilla con tamaños variables de acuerdo a la especie, siendo los más grandes los de tipo humano con 3.6 a 3.9 kb, 30-32 nm, hasta el momento se han descrito 40 genotipos (Leonor Jofré M, ISSN 0718-3321).

El torquetenovirus fue conocido inicialmente en la especie humana en el año 1997, cuando se halló en un paciente con hepatitis post transfusional (Nishizawa, T et al, 1997); desde entonces se ha estudiado en humanos con el fin de determinar cuál podría ser su papel como patógeno, sin embargo hasta el momento no se ha establecido si tiene relación específica en alguna patología. (Niel et al, 2000, Peng et al, 2002, Jelcic et al., 2004).

Posteriores estudios revelaron la presencia de estos virus en otras especies incluyendo animales domésticos como el pollo, la vaca, la oveja, el perro, el gato y el cerdo y en animales no domésticos como la Tupaia tana, los primates (Cong et al, 2000, Inami et al 2000) y el jabalí (Hiroaki et al, 2002).

Un estudio reportado por Okamoto et al, 2002, demostró con análisis filogenéticos que el TTV porcino y TTV canino, están más cerca de TTVs de primates de orden inferior, en contraste con el TTV de tupaia más cercano a los TTV de primates superiores. Con esto podría concluirse que los TTVs son especie específicos pues la homología nucleotídica es realmente baja entre los virus de las diferentes especies.

Con respecto a los torquetenovirus porcinos, se han descrito dos tipos el I y II. Estudios retrospectivos revelan que estos virus están circulando desde 1985 en España y se ha encontrado asociación con otros patógenos, potenciando el PMWS (Kekarainen et al, 2006, Ellis, J et al, 2008). Estudios realizados en cerdos provenientes de diferentes países reportan las siguientes prevalencias para TTV: Canadá 46%, China 80%, Corea 85%, España 90% (Kekarainen et al, 2006), Italia 24% (Martelli et al, 2006), Francia 73% (Bigarre' et al, 2005), Tailandia 40%, Estados Unidos 36%, Japón y Hungría (McKeown N.E et al, 2004), lo que sugiere que el torquetenovirus está diseminado mundialmente en la población porcina.

Las coinfecciones con los dos tipos de TTVs se han encontrado tanto en humanos como en jabalís, donde se reportan prevalencias de más del 50% para los dos genotipos, siendo la de TTV2 mayor entre un 10 a 20% (Martínez et al, 2006). Así mismo, en cerdos domésticos se han reportado coinfecciones similares (Niel et al, 2000). La prevalencia entre granjas puede ser muy variable tal como lo reportó un estudio italiano con 40% de positividad a TTVs para granjas de engorde, sin embargo no se ha establecido si hay alguna relación de la infección con respecto a la explotación (Martelli et al. 2006). En los cerdos, al igual que en los humanos, se ha observado una susceptibilidad a TTV1 en los lechones o animales jóvenes; para el caso de TTV2, otros estudios han reportado que la tasa de infección es proporcional con la edad en cerdos hasta de 15 semanas (D. Nieto, et al 2011).

El TTV al igual que el PCV2 es excretado por vía nasal, rectal, semen y calostro (Martínez- Guinó et al, 2009, Kekarainen et al, 2007), lo que sugiere que éstas podrían ser sus vías de trasmisión, lo cual es comparable con lo que ocurre en la especie humana (Okamoto et al, 1998, Maggi et al, 2001, Matsubara et al, 2001, Komatsu et al, 2004).

Estudios adicionales han demostrado la presencia de TTV en productos derivados del cerdo de uso humano o porcino, tales como vacunas o enzimas (Kekarainen et al, 2009) lo que implicaría que estos virus podrían ser contaminantes habituales de este tipo de productos de origen porcino.

Los TTVs se han encontrado en diferentes tejidos de origen porcino y humano como hígado, médula ósea, pulmón, bazo, páncreas, riñón, órganos linfáticos y glándula tiroides (Okamoto et al, 2000a, Okamoto et al, 2000b, Okamoto et al, 2001a), lo que sugiere una infección multisistémica que aparentemente se puede diseminar por vía sanguínea y una adaptación de los virus a ciertos tipos de células (Okamoto et al, 2001a, Bigarré, L et al, 2005). No obstante, actualmente no se cuenta con un método de aislamiento viral, solamente con el uso de técnicas moleculares, lo cual ha limitado la búsqueda para resolver si estos virus se replican en diferentes tejidos o si su aparente diseminación sistémica se debe a la presencia en el torrente sanguíneo.

Hasta el momento existe una gran brecha para esclarecer si existe una directa causalidad entre los TTVs humanos y porcinos con el desarrollo de patologías, esto en gran parte debido a la falta de recursos diagnósticos, ya que como se mencionó anteriormente, sólo se cuenta hasta el momento con técnicas de PCR, sin poder replicar la infección en modelos experimentales con el fin de conocer mecanismos de infección, respuesta inmune, entre otros.

Con respecto al papel de los TTVs en el PMWS, en un estudio realizado en España por Kekarainen y cols, se determinó la presencia de TTV por PCR en un mayor porcentaje de cerdos que tenían PCV2 (97%) que en animales que no lo tenían (78%) encontrando mayoritariamente TTV2, pero sin significancia estadística (Kekarainen et al, 2006). Por otro lado, un estudio realizado en cerdos gnotobióticos inoculados con TTV1 previamente a la

infección por PCV2, se encontró que el TTV1 facilitó el desarrollo del PCV2 (Ellis, et al, 2008).

Basados en la evidencia hasta el momento conocida con respecto a los TTV en humanos y en porcinos, se ha sugerido que el virus no es un factor suficiente para desarrollar enfermedad, pero que probablemente en asociación con otros agentes sí podría serlo (M. Aramouni, et al 2011).

Teniendo en cuenta el total desconocimiento de la situación con respecto a éstos virus en Colombia, el primer paso es determinar la presencia en la población porcícola en términos de prevalencia, seguido de estudios que lleven a esclarecer la posible asociación de los mismos con el PMWS, la dinámica de la infección, su relación con la carga viral y la posible implicación en cuadros clínicos que afectan la salud y productividad de la especie porcina en nuestro país.

2.2.4 Bocavirus porcino (SwBoV)

El primer reporte de Bocavirus en la especie humana se realizó por Allander T en el 2008, en secreciones respiratorias de niños, hoy en día es reconocido como un virus emergente asociado a síndromes respiratorios (Foulongne V et al, 2006), aunque también ha sido detectado en pacientes adultos con sintomatología respiratoria y/o digestiva (Bastien N, et al, 2006). Desde el 2006, fue clasificado dentro de la familia *Parvoviridae*, género Bocavirus.

En el 2005 se reporta el Bocavirus en caninos y bovinos (Allander T et al, 2005). En el 2009, basados en el análisis de secuenciación a gran escala de muestras provenientes de animales con historial de PMWS (Blomström Anne-Lie et al, 2009), se reporta en la especie porcina, por lo que se busca la posible asociación de este virus con dicha patología. En Suecia se reportó

por primera vez la asociación de éste virus y PMWS encontrando positividad para TTV1/2 y SwBoV entre el 70 y 90% de las muestras analizadas (Fossum et al, 2010). Resultados similares reportados en China sugieren que el Bocavirus porcino podría tener una participación en el desarrollo de PMWS (Zhai et al, 2010).

Aparentemente los Bocavirus de las diferentes especies tienen un patrón similar en la presentación de signos clínicos de tipo respiratorio y digestivo, lo que permitiría comparar y de alguna manera inferir frente a la situación de bocavirus porcino, pero una de las preguntas que está sin resolver, es si la infección multiviral podría estar asociada con la presentación del PMWS o con otros agentes asociados a circovirosis porcina.

2.3 Porcicultura en Colombia

La reciente apertura del tratado de libre comercio, afecta a la industria porcina, obligándola a buscar constantemente mejorar sus parámetros productivos, con el fin de ser más competitiva en el mercado nacional e internacional. Como consecuencia de lo anterior, la porcicultura colombiana tiene tendencia al aumento de cabezas sacrificadas, por ejemplo de acuerdo al boletín publicado por el DANE del 31 de agosto del 2011, el sacrificio de ganado porcino presentó una variación positiva de 10,4% respecto al mismo período del año 2010 (Tabla N°1).

ESPECIE	PERIODO				VARIACION %	
	2010		2011		2010-2011	
	CABEZAS	PESO EN CANAL (TON)	CABEZAS	PESO EN CANAL (TON)	CABEZAS	PESO EN CANAL (TON)
VACUNOS *	884,374	187,376	938,931	197,356	6,2	5,3
Cve (%)	3,2	3,1	3,3	3,1		
PORCINOS	597,127	47,120	658,969	52,306	10,4	11
Cve (%)	1,9	1,6	1,4	1,3		
OVINOS	4,582	84	6,382	114	39,3	35,6
Cve (%)	2,9	3,1	1,5	2		
CAPRINOS	2,108	31	3,972	66	88,5	115,5
Cve (%)	6	6,1	1,6	1,6		
BUFALINOS	1,323	362	2,251	541	70,1	49,6
Cve (%)	0	0	0	0		

Tabla N°1. Sacrificio de ganado y peso en canal, según especies, segundo trimestre 2010-2011. Fuente: DANE-ESAG * Incluye sacrificio para exportación. Los coeficientes de variación estimados iguales a cero (0), se presentan debido a que para este dominio las fuentes que reportaron sacrificio pertenecen al estrato de inclusión forzosa.

En un informe realizado por la Asociación Colombiana de Porcicultores en el 2010, se consideró las siguientes regiones con una mayor concentración de predios porcícolas tecnificados: Antioquia con el 35.51%, región Occidental; constituida por los departamentos de Caldas, Quindío, Risaralda y Valle del Cauca con el 27.93%, región Central; constituida por los departamentos de Boyacá, Cundinamarca, Meta y Tolima con el 22.92%, costa Atlántica; constituida por los departamentos de Atlántico, Bolívar, Cesar, Córdoba, Guajira, Magdalena y Sucre con el 6.72%, región Sur; constituida por los departamentos de Cauca, Caquetá, Huila y Nariño con el 4.82%; y, región Oriental; constituida por los departamentos de Arauca, Casanare, Norte de Santander y Santander con el restante 2.64% (Asociación Colombiana de Porcicultores, 2010).

En Colombia no se conoce que impacto tendría el PMWS en el número de cabezas sacrificadas, sin embargo podría disminuir las expectativas de producción o la oferta de productos de origen porcino, reflejándose en

pérdidas económicas al productor y disminución de la competitividad en la porcicultura colombiana.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar la presencia de virus porcinos de tipo Bocavirus, parvovirus y torquetenovirus I y II en cerdos provenientes de diferentes regiones de Colombia y establecer su posible relación con el PMWS.

3.2 Objetivos específicos

- Establecer molecularmente la presencia de los siguientes agentes virales: bocavirus, parvovirus y torquetenovirus porcino I y II en muestras de suero de animales sanos y en tejidos de animales con signos clínicos de PMWS.
- Determinar la relación entre la presencia o ausencia de bocavirus porcino, parvovirus porcino y torquetenovirus porcino I y II con circovirus porcino, como posibles causantes del PMWS.
- Analizar la presencia de posibles co-infecciones y su relación con la presentación de PCV2 en animales clínicamente sanos y con PMWS.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Toma de muestras:

La toma de muestras de sangre y de tejidos provenientes de cerdos para llevar a cabo el presente estudio se realizó en explotaciones comerciales intensivas de ciclo completo de las tres principales regiones productoras de porcinos del país. Se conformó un banco de sueros y de tejidos del laboratorio del grupo de Microbiología y Epidemiología Veterinaria de la Universidad Nacional, conformado por 3153 sueros y 51 tejidos. Con base en las anteriores muestras, para este estudio se realizó un muestreo aleatorio simple de la siguiente manera:

Muestras de suero (animales clínicamente sanos):

Unidad de muestreo: Con base en las granjas tecnificadas del país, la unidad de muestreo correspondió a la granja de producción porcícola, las cuales fueron seleccionadas teniendo en cuenta los siguientes criterios de inclusión:

- Ser explotaciones de ciclo completo, con control sobre cría, levante y ceba.
- Poseer registros productivos y sanitarios, mínimo de los dos últimos años.
- Con más de 300 madres.
- Consentimiento informado.

Las muestras de sangre se recolectaron por punción de la vena cava anterior, recuperando aproximadamente 4ml de sangre total.

Población de estudio: Con los datos del número de explotaciones porcícolas en el país obtenidos en colaboración con la Asociación Colombiana de Porcicultores, se realizó un muestreo simple aleatorio (MSA).

Durante el año 2008 a 2010, se recolectaron 3153 muestras de suero, de 77 granjas del territorio nacional, dichas muestras provenían de cerdas de reemplazo y cerdos en crecimiento (precebo y ceba).

Para el caso puntual del objetivo de este estudio, la población tomada en cuenta correspondía a 1087 muestras de suero, por corresponder a los animales en crecimiento (de 8 a 15 semanas de edad), puesto que se ha reportado previamente que esta es la edad más predominante para la presentación del PMWS (Opriessnig et al, 2012).

Con base en 1087 muestras de suero los parámetros estadísticos calculados fueron:

- Prevalencia esperada: 70%, debido al desconocimiento de la prevalencia de los agentes a evaluar.
- Nivel de confianza: 95%.
- Error estimado: 6.75%.

Para un total de 152 animales a evaluar. Los datos anteriores se obtuvieron con la ayuda del paquete estadístico Epi Info™ 2000 diseñado por el Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta (CDC).

Las muestras analizadas correspondían a 32 granjas de diferentes regiones del país tales como Valle, Cundinamarca, Antioquia, Caldas, Risaralda y Cauca por ser las que más aportan a la porcicultura colombiana.

Muestras de tejido (animales con síntomas compatibles con PMWS):

Las muestras de tejido provenían de animales que fueron sacrificados por presentar alguna sintomatología compatible con PMWS, los cuales pertenecían a 16 granjas del territorio nacional. En el momento de la toma de muestra se registraron datos del animal, como edad, sexo, signos y

síntomas y hallazgos de la necropsia. Los tejidos recuperados correspondieron a pulmón, ganglios linfáticos, tonsila, corazón, hígado, riñón entre otros.

Todas las muestras de tejido recolectadas fueron analizadas en este estudio, dado que la naturaleza de las muestras, ayudaría a responder la hipótesis sobre si PPV, SwBov y TTVs se encontraban o no en animales presuntamente enfermos.

Las muestras de suero y de tejido recolectadas para este estudio no correspondían al mismo animal, ya que para el caso de las muestras de tejido (animales presuntamente enfermos) solo se tuvo acceso en el momento en que la granja reportó que tenía animales con dichas características; para el caso de las muestras de suero (animales sin sintomatología aparente) no existía la posibilidad de sacrificarlos para obtener las muestras de tejido, pues ésto hubiese requerido esperar a que eventualmente los animales se enfermaran, lo cual no era el propósito de éste trabajo.

4.1.2 Preparación de las muestras.

La sangre total se tomó de la vena cava anterior en tubo sin anticoagulante y con gel separador, seguidamente se centrifugó a 3500rpm por 10 minutos para separar el suero de las células sanguíneas y se envió al laboratorio en condiciones de refrigeración. Una vez en el laboratorio, se separó el suero en alícuotas de 1ml recuperando mínimo dos alícuotas por suero del animal. La muestra se almacenó a -20°C hasta su procesamiento.

Las muestras de tejido se transportaron en condiciones de refrigeración a la mayor brevedad posible al laboratorio. Se almacenaron a -70°C hasta su

procesamiento. Para realizar extracción del ADN de las muestras, se tomó un pool de tejidos por animal (que incluía bazo, riñón, hígado, ganglios, pulmón) empleando 25 mg de cada tejido, a partir de éste se realizó un macerado y se sometió a sonicación a 30Kz/30 segundos una sola vez (este procedimiento se realizó para cada pool de tejidos de cada uno de los animales). La concentración final de la suspensión de tejido fue de 10mg/1ml de PBS. El macerado de los tejidos correspondientes a cada una de las muestras se dividió en alícuotas de 200ul que fueron empleadas para realizar extracción del ADN, intento de aislamiento viral y una contramuestra. Estas alícuotas fueron almacenadas a -70°C hasta su procesamiento.

4.2 Extracción de ADN

Para realizar la extracción de ADN, tanto a partir de muestras de suero como para el pool de macerado de los tejidos, se empleó un volumen de 200ul y el kit Qiamp DNA mini kit, de Qiagen®. El procedimiento se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante, en resumen de la siguiente manera (Figura 2):

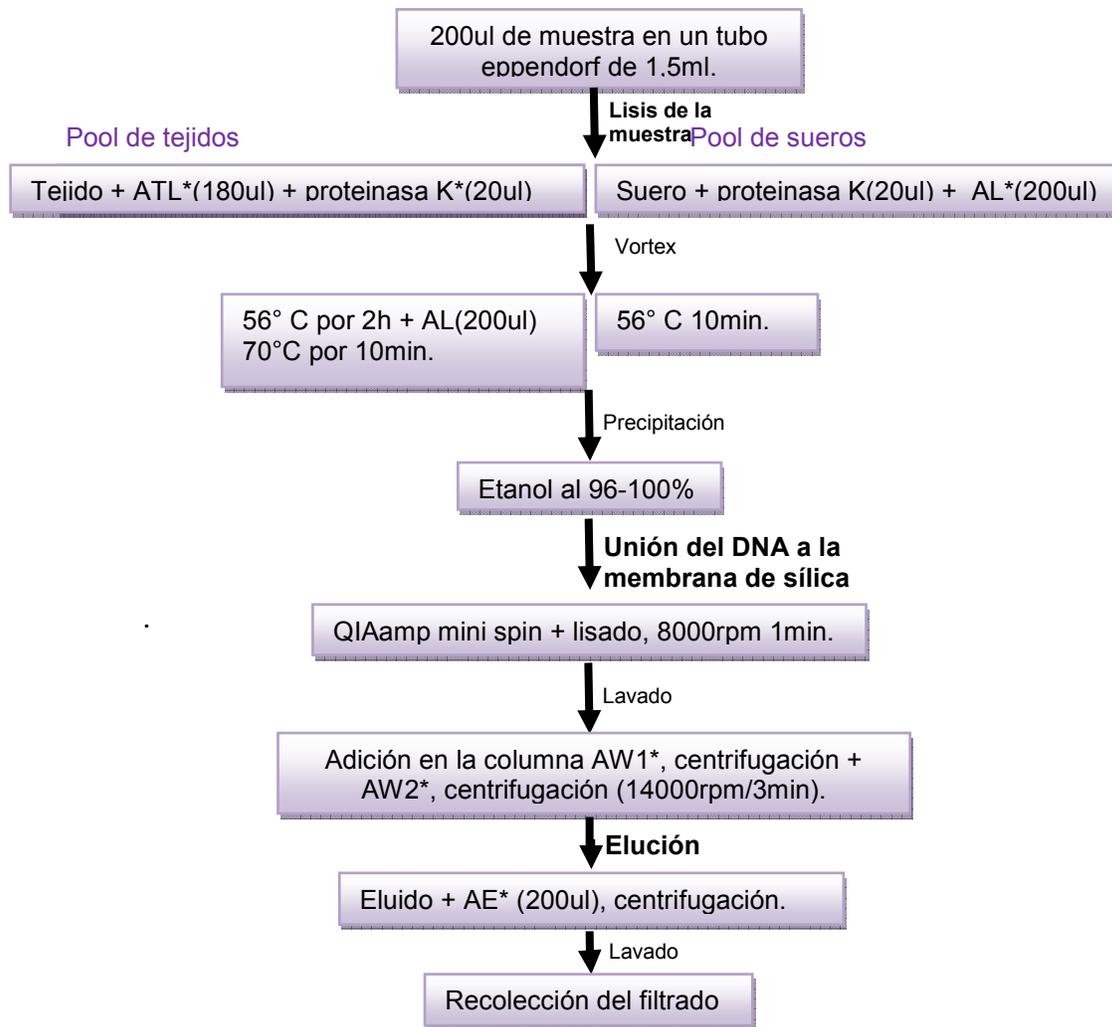


Figura 2. Protocolo de extracción empleado. Resumen. *Buffer asignado en el kit Qiampp DNA mini kit, de Qiagen®.

4.3 Diseño de primers y amplificación por PCR

4.3.1 PCR para PPV

El gen seleccionado para dirigir la amplificación fue el que codifica para la proteína no estructural NS1, dado que se conoce que es altamente conservada entre los parvovirus (J.M. Soucie, et al 2000). Se realizó una búsqueda en la base de datos del NCBI con base en una secuencia genómica completa de NS1 (gene identifier: 194277770) de PPV,

identificándose más de 50 secuencias con el 100% de identidad, y se empleó un mínimo de 10 secuencias (de distintos orígenes geográficos) con el fin de escoger la región a amplificar, para lo que se empleó Clustal W desarrollado por el EMBL (European Bioinformatics Institute). Posteriormente los primers fueron chequeados con las secuencias reportadas en las bases de datos para establecer su posible homología, adicionalmente se empleó el programa Oligo analyzer, v.3.1 desarrollado por Integrated DNA Technologies, Inc, con el que se verificó que tuvieran un porcentaje de identidad mayor al 99% en secuencias de PPV reportadas de distintos orígenes geográficos, lo anterior se realizó sometiendo los primers al programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool, www.ncbi.nlm.nih.gov). El análisis bioinformático de estos primers aparece en el anexo 1. El amplicón resultante fue una región de 389pb dentro del gen NS.

La amplificación por PCR se llevó a cabo con un volumen final de 26ul, empleando 24ul de la mezcla de reacción (Platinum ready mix, Invitrogen®) y 2ul de ADN. La amplificación del fragmento se realizó aplicando el siguiente programa: 1 ciclo de denaturación inicial (94°C por 5 min), 35 ciclos de denaturación (94°C por 30 seg), anillaje (58,8°C por 30 seg) y extensión (72°C 30 seg) y finalmente 1 ciclo de extensión a 72°C durante 5 minutos. Tabla 4.

Para evaluar la sensibilidad intrínseca de la prueba en términos del límite de dilución que podía ser detectada con esta PCR, se realizaron diluciones seriadas partiendo de 10^{-1} hasta 10^{-10} con agua libre de nucleasas del ADN extraído y seleccionado como control (ADN total proveniente de una muestra positiva identificada por PCR y secuenciada, donada por el ICA, procedente de un animal asintomático).

Para verificar la especificidad intrínseca, las secuencias de los primers fueron comparados con las secuencias reportadas hasta ese momento y se validó con muestras negativas para PPV. Con el fin de determinar una potencial reacción cruzada, la PCR se evaluó con un grupo de ADN control (PCV2a, PCV2b, PCV1, virus de la enfermedad de Aujeszky, APP, *M. hyoneumoniae*, *H. parauis*, TTV1-2 y SwBov), por ser diferentes agentes que podrían estar presentes en las muestras provenientes de animales de campo. Se determinó que la PCR bajo las condiciones empleadas en el presente estudio, resultó negativa para todos los ADN. (Figura 3).

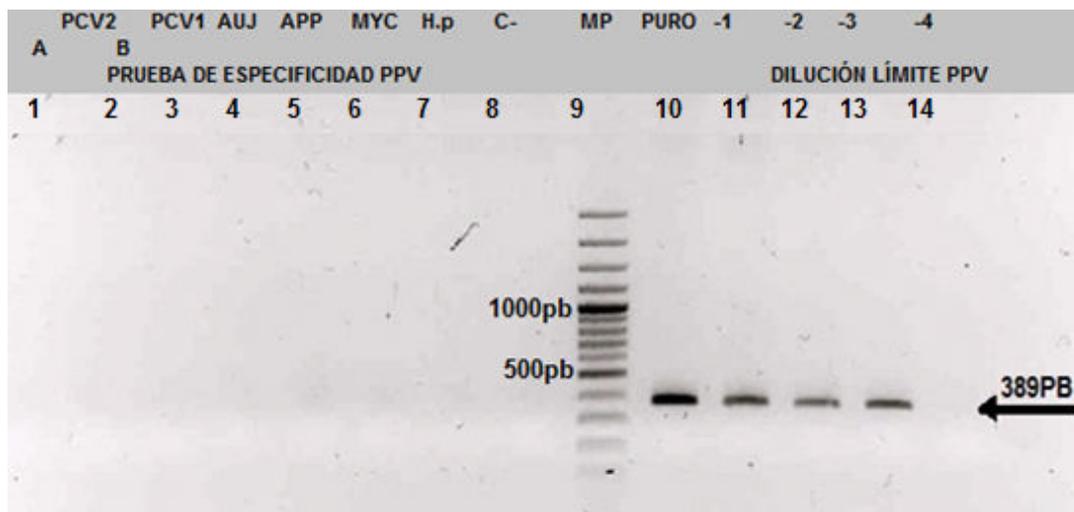


Figura 3. Amplificación por PCR del fragmento NS-1 de PPV. A) Prueba de especificidad, Carril 1: PCV2 A, Carril 2: PCV2B, Carril 3: PCV1, Carril 4: Aujeszky, Carril 5: APP, Carril 6: Mycoplasma hyoneumoniae, Carril 7: Haemophilus parasuis, Carril 8: Control negativo, Carril 9: Marcador de peso 100 pb “DNA Ladder” Fermentas®; **B) Concentración límite**, Carril 10: ADN sin diluir, Carril 11: DNA diluido 10^{-1} , Carril 12: DNA diluido 10^{-2} , Carril 13: DNA diluido 10^{-3} , Carril 14: DNA diluido 10^{-4} .

4.3.2 PCR para SwBov

Para la realización de esta PCR, se emplearon los primers reportados previamente por Shaolum *et al* 2010, dirigidos a amplificar la región que codifica para la proteína VP1-2, dado que este gen es altamente conservado (99-100%) entre los bocavirus porcinos. El análisis bioinformático de estos

primers aparece en el anexo 2. El amplicón resultante es una región de 496pb dentro del gen VP1-2.

La amplificación por PCR se llevó a cabo con un volumen final de 26ul, empleando 24ul de la mezcla de reacción (Platinum ready mix, Invitrogen®) y 2ul de ADN. La amplificación del fragmento se realizó aplicando el siguiente programa: 1 ciclo de denaturación inicial (94°C por 5 min), 35 ciclos de denaturación (94°C por 30 seg), anillaje (57,2°C por 30 seg) y extensión (72°C 30 seg) y finalmente 1 ciclo de extensión a 72°C durante 5 minutos.

Para evaluar la sensibilidad intrínseca, en términos del límite de detección de la PCR, se realizaron diluciones seriadas del ADN plasmídico seleccionado como control (donado por el Department of Swine Infectious Diseases, Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences) partiendo de 10^{-1} hasta 10^{-10} con agua libre de nucleasas.

Para verificar la especificidad intrínseca, las secuencias de los primers fueron comparados con las secuencias reportadas hasta ese momento para establecer posible homología, validado con muestras negativas para SwBov y la potencial reacción cruzada se evaluó con un grupo de ADN control (PCV2a, PCV2b, PCV1, virus de la enfermedad de Aujeszky, APP, *M. hyoneumoniae*, *H. paravis*, TTV1-2 y PPV), por ser diferentes agentes que podrían estar presentes en las muestras de animales de campo. Se determinó que la PCR de SwBov bajo las condiciones empleadas en el presente estudio resultó negativa para todos los ADN (Figura 4).

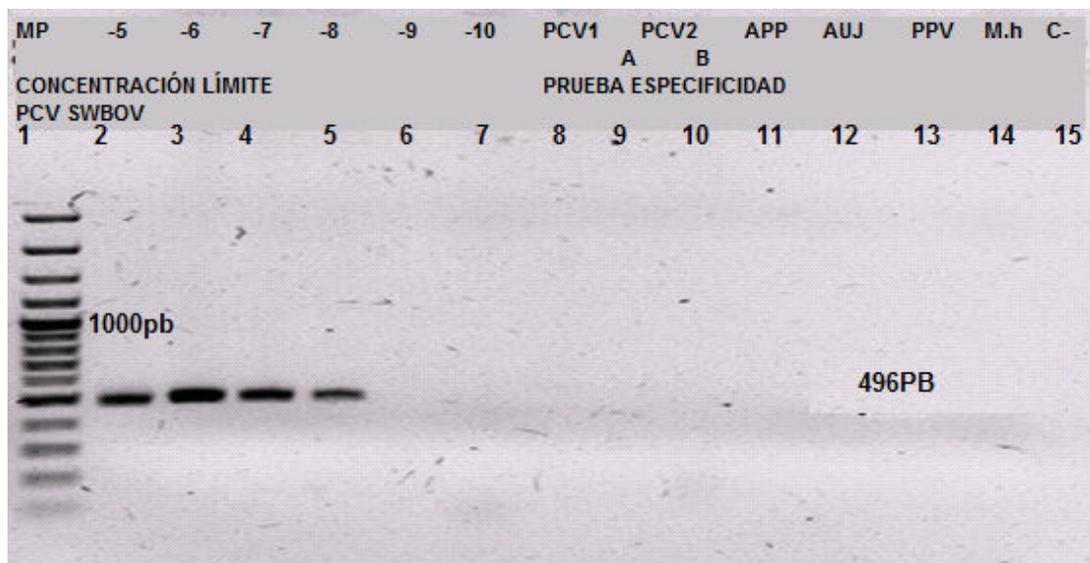


Figura 4. Amplificación por PCR del fragmento VP1-2 de SwBov. A) **Concentración límite**, Carril 1: Marcador de peso 100 pb “DNA Ladder” Fermentas®, Carril 2: DNA diluido 10^{-5} , Carril 3: DNA diluido 10^{-6} , Carril 3: DNA diluido 10^{-7} , Carril 4: DNA diluido 10^{-8} , Carril 5: DNA diluido 10^{-9} , Carril 6: DNA diluido 10^{-10} . B) **Prueba de especificidad**, Carril 7: PCV1, Carril 8: PCV2A, Carril 9: PCV2B, Carril 10: APP, Carril 11: Aujesky, Carril 12: Mycoplasma hyoneumoniae, Carril 13: Control negativo.

4.3.3 PCR para TTV 1-2

Para la realización de esta PCR, se emplearon los primers reportados previamente por Kekarainen T, *et al* 2009, dirigidos a amplificar la región 5'UTR por ser la más conservada del virus (Carrillo, et al 2006). El análisis bioinformático de estos primers aparece en el anexo 3. El amplicón resultante es una región de 304pb para TTV-1 y 252pb para TTV-2 dentro del gen 5'UTR.

La amplificación por PCR se llevó a cabo con un volumen final de 26ul, empleando 24ul de la mezcla de reacción (Platinum ready mix, Invitrogen®) y 2ul de ADN en tubos independientes para los dos agentes. La amplificación del fragmento se realizó aplicando el siguiente programa: 1 ciclo de

denaturación inicial (94°C por 5 min), 35 ciclos de denaturación (94°C por 45 seg), anillaje (57°C por 30 seg) y extensión (72°C 45 seg) y finalmente 1 ciclo de extensión a 72°C durante 5 minutos.

Para el caso de la PCR de TTV1, la sensibilidad intrínseca se determinó con base al límite de detección, el cual se realizó con diluciones seriadas del ADN plasmídico de TTV1 (donado por el Department of Swine Infectious Diseases, Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences) con agua libre de nucleasas.

Para la PCR de TTV2, la sensibilidad intrínseca, en términos del límite de dilución, se realizó con ADN total extraído de una muestra proveniente de un animal clínicamente sano (ADN proveniente de una muestra positiva, donada por el CRESA, Universidad Autónoma de Barcelona). Se realizaron diluciones seriadas del ADN con agua libre de DNAsas y RNAsas.

Para verificar la especificidad intrínseca de la PCR de TTV1 y TTV2, las secuencias de los primers fueron comparadas con las secuencias reportadas hasta ese momento en las bases de datos, con el fin de establecer posible homología, adicionalmente se validó con muestras negativas para TTV1 y TTV2 y la potencial reacción cruzada se evaluó con un grupo de ADN control (PCV2a, PCV2b, PCV1, virus de la enfermedad de Aujeszky, SwBov, APP, *M. hyoneumoniae*, *H. paravis* y PPV), por ser diferentes agentes que podrían estar presentes en las muestras de animales de campo.

Se determinó que la PCR de TTV-1y 2 bajo las condiciones empleadas en el presente estudio resultó negativa para todos los ADN evaluados (Figura 5 y 6, datos no mostrados para TTV-2).

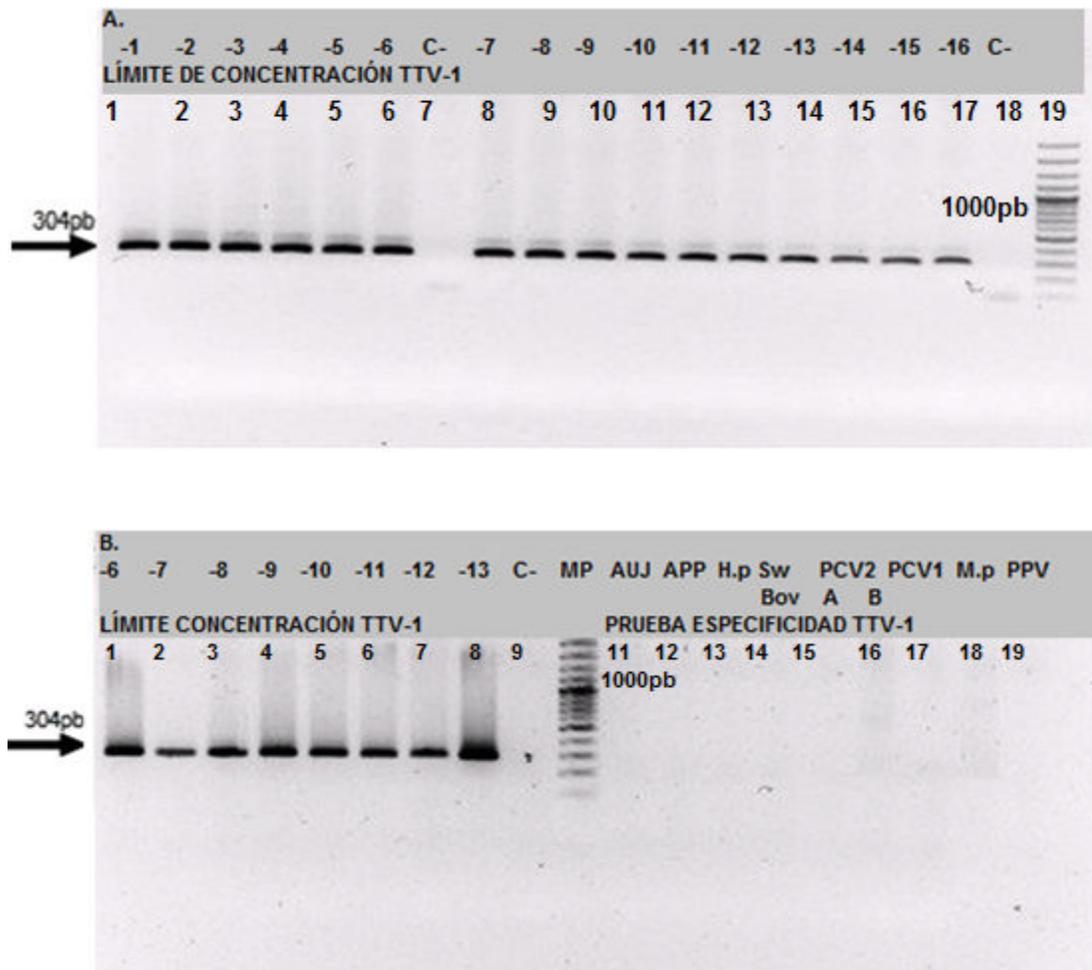


Figura 5. Amplificación por PCR del fragmento 5'UTR de TTV-1.A) Concentración límite, Diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-26} con intermedio un control negativo y marcador de peso 100 pb "DNA Ladder" Fermentas. B) Los primeros carriles corresponden a un segundo montaje de algunas de las diluciones de la prueba de especificidad, en la mitad el marcador de peso 100 pb "DNA Ladder" Fermentas® y la Prueba de especificidad para cada uno de los agentes evaluados.

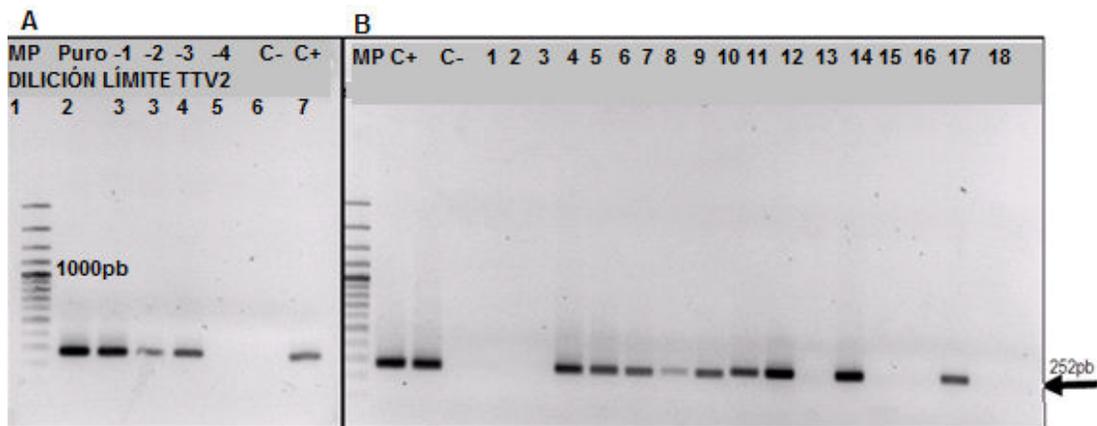


Figura 6. Amplificación por PCR del fragmento 5'UTR de TTV-2. **A. Dilución límite**, Carril 1: Marcador de peso 100 pb "DNA Ladder" Fermentas, Carril 2: ADN sin diluir, Carril 3: DNA diluido 10⁻¹, Carril 4: DNA diluido 10⁻², Carril 5: DNA diluido 10⁻³, Carril 6: DNA diluido 10⁻⁴, Carril 7: Control negativo, Carril 8: Control positivo. **B) Muestras de campo.**

En todos los casos, la concentración de los componentes de la mezcla maestra fue la siguiente: 22 U/ml Taq DNA polymerase con el anticuerpo Platinum® Taq, 22 mM Tris-HCl (pH 8.4), 55 mM KCl, 1.65 mM MgCl₂, 220 μM dGTP, 220 μM dATP, 220 μM dTTP, 220 μM dCTP y 0.6 μM de cada primer.

Todos los productos de PCR se sometieron a electroforesis horizontal, empleando un gel de agarosa al 1,5% en buffer TBE 0,5X¹ y EZvision® con el fin de verificar el tamaño del amplicón esperado. Las imágenes se visualizaron empleando el analizador de imágenes UV Gel Doc 1000® y se adquirieron con el programa "Molecular Analysis" versión 1,5 de BIO-RAD.

Todas las secuencias de los primers empleados para el desarrollo de las PCR, se encuentran descritas en la Tabla 2.

¹ Buffer TBE 0,5X: Tris-borato 45mM y 1mM EDTA. pH 8,3.

4.3.4 PCR para PCV2

Para el caso de PCV2, se emplearon los datos generados como resultado del proyecto realizado previamente mencionado en la introducción (Grupo de microbiología y epidemiología veterinaria), usando la PCR descrita por Calsamiglia M et al, 2002. La amplificación por PCR se llevó a cabo con un volumen final de 25ul con 22.5ul de la mezcla de reacción (GoTaq DNA polimerasa 0.05U/ul, primers 0.5uM, buffer 1X, Mg 3mM y dNTPs 0.2mM) y 2,5ul de ADN. La amplificación del fragmento se realizó aplicando el siguiente programa: 1 ciclo de denaturación inicial (94°C por 30 seg), 35 ciclos de denaturación (94°C por 30 seg), anillaje (64°C por 12 seg) y extensión (72°C por 30seg) y finalmente 1 ciclo de extensión a 72°C durante 7 minutos.

Virus y región amplificada	Secuencia de oligonucleótidos 5'-3'	Tamaño esperado (pb)	Referencia
PPV (NS1)	PPVF: GGTTGCTACAATGCAGCCAATG PPVR: GCTAGCCATTGTTGCTTGG	389	Corredor et al, 2012.
TTV1 (5UTR)	TTV1F: CGGGTTCAGGAGGCTCAAT TTV1R: GCCATTCGGAAGTGCCTTACT	204	Segalés, et al 2009
TTV2 (5UTR)	TTV2F: TCATGACAGGGTTCACCGGAA TTV2R: GTCTGCGCACTTACTTATATACTCTA	252	
SwBoV (VP1-2)	SBoV-F: GGGCGAGAACATTGAAGAGGT SBoV-R: TTGTGAGTATGGGTATTGGTG	496	Shaolum et al 2010

Tabla 2. Secuencias de los primers empleados para el desarrollo de las PCR. Se describe para cada uno de los casos el virus y la región seleccionada de amplificación, la secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos, el tamaño en pares de bases esperado y la referencia de los mismos.

4.4 ADN empleados como controles

Para realizar las pruebas de especificidad para cada una de las anteriores reacciones de PCR, se emplearon ADN donados por el laboratorio de biología molecular del Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. Dichos ADN, correspondían a aislamientos de campo realizados por el laboratorio.

Como controles de corrida para todos los casos se emplearon los respectivos controles positivos señalados en los numerales 4.3 y negativos (agua y células de riñón de cerdo, PK15).

4.5 Secuenciación de productos de PCR para los diferentes agentes

Para cada agente se seleccionaron cinco de los productos de PCR positivos al azar, se purificaron para posteriormente ser secuenciados con el fin de verificar si el amplificado correspondía al ADN evaluado. Figura 7. El procedimiento aquí descrito fue realizado con vacuum manifold y el kit – QIAquick Gel Extraction kit ® - de Qiagen.

Posteriormente las secuencias fueron analizadas con la ayuda de los programas Bioedit v.7 y Mega 4. Adicionalmente sometidas a BLASTn, con el fin de confirmar la identidad de las mismas.

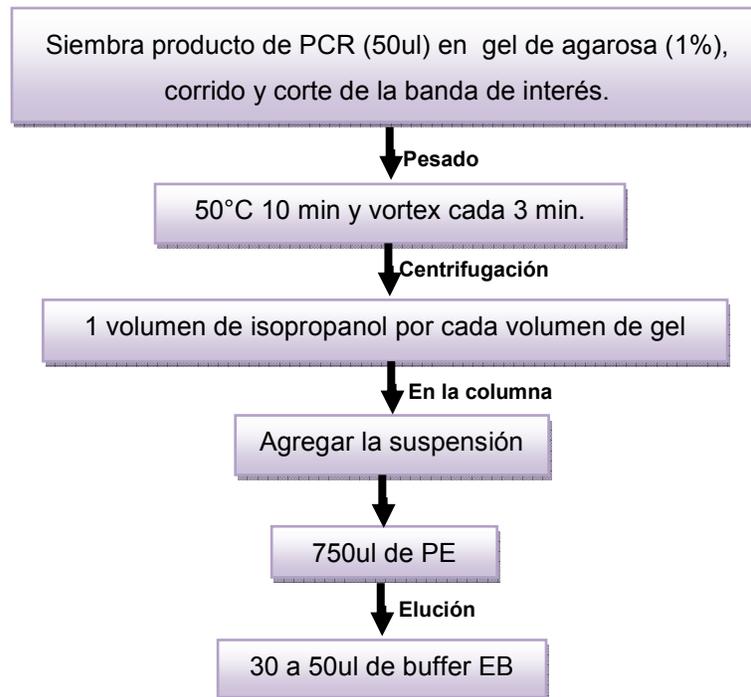


Figura 7. Resumen purificación del ADN a partir de gel. Los productos de PCR fueron purificados a partir de gel , empleando el kit QIAquick Gel Extraction kit ® - de Qiagen

Una vez purificado el ADN, se envió a secuenciar a Macrogen® USA.

4.6 Análisis de inmunoperoxidasa (IPX)

Se analizaron las muestras de tejido provenientes de 48 animales con sintomatología compatible con PMWS, incluyendo ganglio linfático, bazo, pulmón hígado y riñón. Las muestras de tejidos se fijaron en formalina tamponada al 10% y posteriormente fueron procesados con la técnica de inclusión en parafina y coloreados con hematoxilina y eosina descrita por la Universidad de Iowa (esta técnica fue desarrollada en el laboratorio de patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá). La clasificación de las lesiones asociadas a PMWS fueron analizadas por un patólogo quien

desconocía los antecedentes clínicos relacionados con cada muestra en particular y se asignó un valor para calificar las lesiones donde 0 corresponde a leve, 2 corresponde a moderado y 3 corresponde a severo, de acuerdo con la clasificación dada por Segalés et al, 2010.

4.7 Análisis estadístico

Los siguientes análisis estadísticos se realizaron con el fin de responder a los siguientes interrogantes:

- ¿Cual es la prevalencia para cada uno de los virus en las explotaciones porcícolas colombianas evaluadas?
- ¿Hay relación entre la presentación de PCV2 vs. los nuevos agentes virales?
- ¿Hay relación entre la presentación de los agentes virales vs. enfermedad?

Con los datos obtenidos de los resultados de las PCR y aquellos recolectados al momento de la toma de la muestra para el caso de los tejidos, se realizaron diferentes fases del análisis estadístico empleando el paquete SPSS v.19, de la siguiente manera.

- ✓ Variables del estudio dicotómicas: exposición *versus* respuesta:
- ✓ Variable exposición: la cual evalúa la presencia o ausencia del agente determinado por PCR (positivo o negativo) vs. la variable respuesta: presencia o ausencia de enfermedad (para el caso de los tejidos).
- ✓ La asociación causal se determinó por tablas de contingencia de Chi² de 2x2, con un nivel de confiabilidad de $P < 0,05$.
- ✓ La asociación de riesgo se determinó por el ODS ratio (Razón cruzada) con sus respectivos límites de confianza al 95%.

El primer análisis estadístico se realizó con los datos de las muestras de suero, que constituyen las muestras provenientes de animales sanos y el segundo análisis se realizó con las muestras de tejidos provenientes de animales que aparentemente podían tener PMWS.

Para evaluar la significancia del χ^2 se tuvo en cuenta la prueba de Pearson (Chernoff et al, 1954) y la de Fisher (Fisher, R.A et al, 1942) dependiendo de si en la tabla de contingencia se tenían valores mayores o menores de 5 respectivamente. Seguidamente si el valor de p era significativo se calculó el Odds Ratio manualmente ya que el paquete estadístico no arrojaba ese resultado.

$$OR = \frac{a/b}{c/d}$$

Adicionalmente se empleó gráficas comparativas entre la variable de exposición Vs. la presentación de la variable de respuesta.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Pruebas de especificidad intrínseca:

Se verificó la especificidad de los primers empleados para la amplificación de cada uno de los agentes como se evidencia por el resultado negativo cuando las muestras fueron sometidas a los diferentes procedimientos de amplificación dado que no hubo amplificación inespecífica de los productos para cada caso (Figuras 3, 4, 5). Teniendo en cuenta lo anterior se ratifica la detección por PCR de los agentes virales motivo de estudio (PPV, SwBov, TTV 1 y 2).

Adicionalmente se tuvo en cuenta el ADN aislado de células de origen porcino (PK15) que resultó negativo para todos los agentes mencionados anteriormente, lo cual comprobó que no había amplificación inespecífica con alguna secuencia de cerdo. El anterior control junto con el agua libre de DNAsas y RNAasas, constituyeron los controles negativos de corridas.

5.2 Pruebas de sensibilidad intrínseca (límite de detección y límite de dilución):

Para cada caso, como se muestra en los materiales y métodos se realizaron diluciones seriadas del ADN y se demuestra que los límites de detección y/o dilución son los siguientes: para el caso de PPV hasta 10^{-3} (Figura N°3) equivalente a $6,96 \times 10^{-2}$ ng de ADN total, para SwBov $5,7 \times 10^{-7}$ ng de ADN de SwBov (Figura N°4), para TTV-1 $1,6 \times 10^{-15}$ ng de ADN de TTV1 (Figura N°5) y para TTV-2 hasta 10^{-3} equivalente a 2ng de ADN total (Figura N°6).

No se obtuvo el ADN puro para el agente en todos los casos, lo que no permitió conocer exactamente la concentración límite para dos de ellos, sin

embargo para el caso del límite de dilución de la PCR de PPV y de TTV2, los ADN procedían de una muestra de suero de un animal clínicamente sano en edad de crecimiento.

5.3 Detección molecular de agentes virales en las muestras evaluadas:

Los resultados arrojados por la PCR bajo las condiciones empleadas en este estudio, demostraron por primera vez en Colombia la presencia de virus porcinos de tipo PPV, SwBoV, TTV 1 y 2 en las muestras de suero seleccionadas para éste estudio, los resultados obtenidos fueron del 3% (4/152) para PPV; 8% (12/152) para SwBoV, 70% (106/152) para TTV1, 71% (108/152) para TTV2 y 24% (36/152) para PCV2. En las muestras de tejido se encontró 4% (2/48) para PPV; 58% (28/48) para SwBoV, 67% (32/48) para TTV1, 81% (39/48) para TTV2 y 52% (25/48) para PCV2 (Tabla 3).

Encontrando en las muestras de suero, correspondientes a animales sanos, un menor porcentaje de presentación de SwBov y PPV (8 y 3% respectivamente) en contraste a la presentación de TTV (alrededor del 70%) (Figura 8).

Al analizar las 48 muestras de tejido provenientes de animales con sintomatología compatible a PMWS, se encontró que 58% eran positivas para SwBov en comparación al 8% encontrado al analizar las 152 muestras de suero provenientes de animales sin sintomatología aparente.

Con respecto a PCV2, se encontró 52% de positividad en las muestras de tejido frente al 24% de las muestras de suero, resultados que son perfectamente esperados por la conocida relación entre PCV2 y la patogenia del PMWS (Laila Darwicha et al 2012).

PPV	SwBov	TTV1	TTV2	PCV2
% (x/n) en muestras de suero				
3(4/152)	8 (12/152)	70(106/152)	71(108/152)	24 (36/152)
% (x/n) en muestras de tejido				
4(2/48)	58(28/48)	67(32/48)	81(39/48)	52(25/48)

Tabla 3. Porcentaje de positividad/ totales encontrado frente a cada uno de los virus en muestras de suero y tejido.

Los resultados de TTV-1 aparentemente no evidenciaron diferencia en el porcentaje de presentación con respecto a las muestras provenientes de animales sanos (sueros) *versus* las muestras provenientes de animales enfermos (tejidos), lo que podría sugerir que no están implicados hasta el momento con la presentación de enfermedad clínica, lo cual concuerda con lo demostrado hasta ahora en la especie humana (Nishizawa et al, 1997).

Paralelamente se encontró 81% de positividad a TTV-2 en las muestras de tejido frente al 71% en las muestras de suero (Figura 8B), lo cual sugiere que aparentemente el TTV-2 tiene relación con la presentación del cuadro clínico en comparación con el TTV-1, y concuerda con lo reportado en el estudio realizado por D. Nieto et al, 2011, donde se encontró mayor prevalencia de TTV2 en animales con PMWS, sin embargo la razón de esta diferencia no ha podido ser aclarada.

Los porcentajes de presentación del ADN viral en las muestras de suero y tejido analizadas se describen en la tabla N°4.

Aunque PPV en términos generales se asocia más con problemas reproductivos en cerdas (Mengeling WL et al, 2006, Clark LK et al, 1996, Cutler RS et al, 1983 y Mengeling WL et al, 1986) y no en PMWS, se incluyó en este estudio debido a que se ha reportado que está en asocio con PCV2 y podría estar involucrado en el desarrollo del PMWS (Ellis JA et al 2000, Choi C et al, 2000 y Kennedy S et al, 2000).

El contagio del PPV es por vía oro-nasal y en ocasiones, por vía venérea, de tal forma que el macho juega un papel importante en la transmisión, por ser portador del virus en el semen o diseminador mecánico entre las hembras susceptibles (L. A. van Leengoed, et al 1983). A éste respecto se encontró 3 y 4% de positividad de PPV, en muestras de suero y tejido respectivamente, es posible, dado el mecanismo de transmisión de PPV, que los animales que dieron positivos se comporten como diseminadores del virus y que en asocio con PCV2 y/o otros factores, contribuyan al desarrollo de enfermedad, sin embargo en este estudio no se encontró dicha relación.

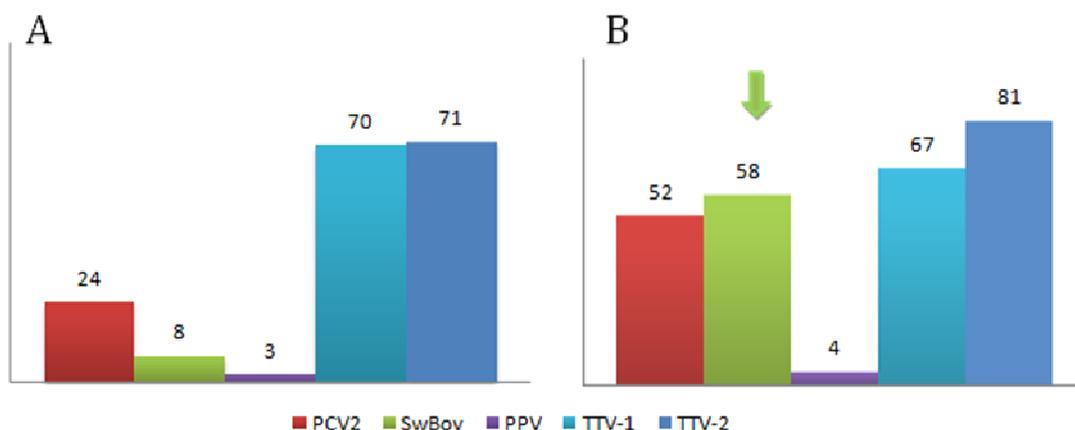


Figura 8. Porcentaje de positividad de ADN viral. A) Resultados obtenidos en las muestras de suero, provenientes de animales sin sintomatología aparente de PMWS, B) Resultados obtenidos en las muestras de tejido, provenientes de animales con sintomatología aparente de PMWS. Se puede observar un aumento en la presentación de SwBov en las muestras de tejido vs. el que se encontró en las de suero (flecha verde). *En ambos casos, el eje de las Y corresponde al virus analizado vs. el eje de las X que corresponde al porcentaje de positividad encontrado.

Tipo de muestra	Porcentaje de positividad				
	PCV2	SwBov	PPV	TTV-1	TTV-2
Suero	24	8	3	70	71
Tejido	52	58	4	67	81

Tabla 4. Porcentajes de positividad de ADN viral en muestras de suero y tejido. Basados en los resultados de PCR, se presentan los porcentajes de muestras positivas para cada uno de los virus evaluados, en muestras de suero provenientes de animales sin sintomatología aparente de PMWS y de tejidos de animales con sintomatología compatible a PMWS.

5.4 Comportamiento de presentación viral por departamento

Al realizar el análisis de distribución por departamento se encontró para el caso de SwBov un mayor porcentaje de presencia en el departamento del Cauca (20%) en el caso de animales clínicamente sanos (muestras de sueros), para el caso de los tejidos no fue posible analizar ninguno de los virus debido a que durante el tiempo del muestreo ningún caso con sintomatología compatible a PMWS fue reportado por estas granjas a

nuestro laboratorio o no cumplieron con las condiciones requeridas para la toma y el envío de las muestras.

En el departamento del Valle SwBov presentó 12% de positividad en sueros y para el caso de los tejidos correspondientes a animales con sintomatología compatible con PMWS una positividad del 50%. Los porcentajes de positividad para SwBov en el departamento de Cundinamarca fueron del 7% en sueros y el 41% en tejidos y en Risaralda del 10% en sueros y del 100% en tejidos. El departamento de Caldas presentó 10% de presentación de SwBov, pero no fue posible analizar los tejidos por la misma situación anteriormente expuesta. Figura 9.

El departamento de Antioquia, el cual es el que más aporta a la porcicultura colombiana, tuvo 6% de presentación de SwBov en muestras de suero provenientes de animales clínicamente sanos, en contraste a las muestras de tejido provenientes de animales que presentaron sintomatología compatible con PMWS donde se encontró un 100% de positividad para este virus.

Aunque el objeto de este estudio no era evaluar PCV2, es necesario tener en cuenta su presencia dada la importancia de este agente en el desarrollo del PMWS. Para el caso del PCV2 se encontró una positividad distribuida en la población porcícola colombiana de la siguiente manera: en el departamento del Valle (70%), Cundinamarca (55%) y Risaralda (50%) en las muestras de tejido provenientes de animales con sintomatología compatible con PMWS, encontrando porcentaje de presentación más altos vs. los encontrados en las muestras de suero, provenientes de animales sin sintomatología aparente de PMWS (32%, 14% y 10% respectivamente en el Valle, Cundinamarca y Risaralda) Figura 9. Lo anterior concuerda con lo reportado previamente, sugiriendo que aunque PCV2 no es el único factor determinante para la

presentación de PWMS sí se encuentra presente en dichos eventos (Opriessnig et al 2012).

Virus	Porcentaje de positividad											
	ANTIOQUIA		VALLE		CAUCA		CUNDINAMARCA		RISARALDA		CALDAS	
	Sueros	Tejidos	Sueros	Tejidos	Sueros	Tejidos	Sueros	Tejidos	Sueros	Tejidos	Sueros	Tejidos
SwBov	6	80	12	50	20	NA	7	41	10	100	10	NA
TTV1	80	100	48	70	40	NA	63	55	85	50	70	NA
TTV2	61	100	80	90	100	NA	72	64	80	100	30	NA
PCV2	35	30	32	70	0	NA	14	55	10	50	10	NA
PPV	6	0	0	0	0	NA	0	0	5	0	0	NA

Figura 9. A. Departamentos analizados en el estudio. Azul claro: Antioquia, Rojo: Valle del Cauca, Café: Cauca, Naranja: Cundinamarca, Morado: Risaralda, Azul oscuro: Caldas. **B. Porcentaje de positividad** en cada departamento analizado para cada uno de los virus en muestras de suero y tejidos. NA (No analizada).

5.5 Análisis de confecciones

Estudios realizados del genoma completo de los torquetenovirus porcinos 1 y 2, han revelado la distribución ubicua en cerdos provenientes de distintos lugares del mundo (Okamoto et al; 2002; McKeown et al; 2004, Bigarre et al, 2005; Martelli et al, 2006), adicionalmente sugieren que la naturaleza de infección por estos virus no se da por sí solos sino en asocio, y aparentemente no tienen significancia clínica o por lo menos no se conoce hasta el momento como lo propuesto por Opriessnig et al 2012, D. Nieto et al 2011 y Ritterbusch et al 2011. En el primer estudio Opriessnig et al 2012, analizaron muestras de animales con y sin PMWS, involucrando la detección por PCR de PPV, SwBov, TTVs y PCV2 entre otros, encontrando que la infección poliviral estaba más aumentada en animales con PMWS. En el segundo estudio D. Nieto et al 2011, de la misma forma evaluaron la carga viral de TTVs en diferentes etapas de crecimiento en animales sanos versus animales, encontrando un aumento de la carga viral en animales con PMWS, sugiriendo una participación importante en el desarrollo del síndrome. Finalmente, en el tercer estudio Ritterbusch et al, 2011, al evaluar la

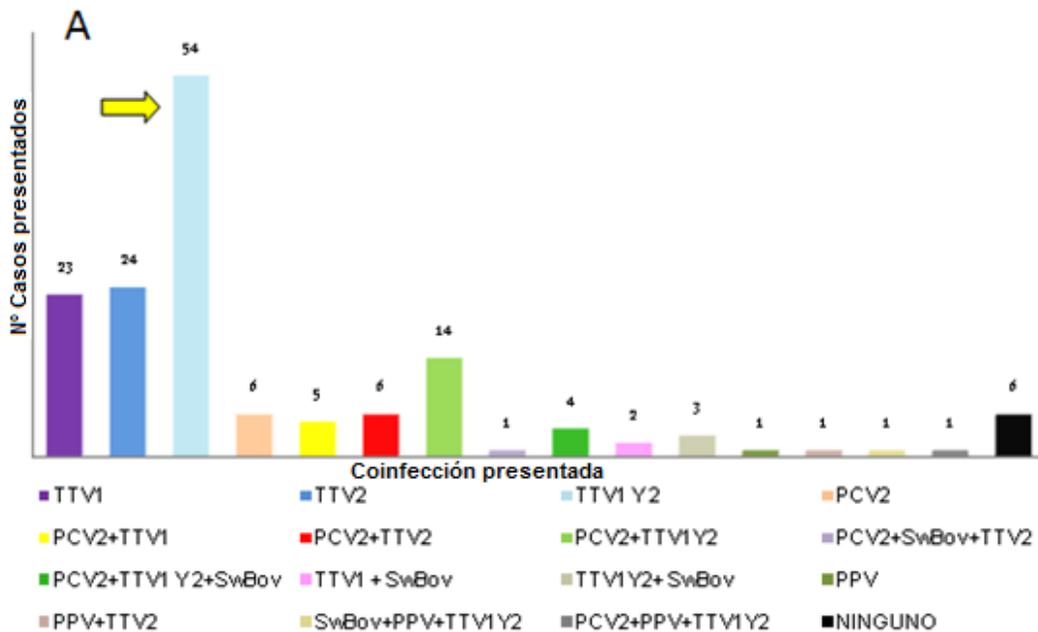
coinfección de TTVs y PCV2 en órganos reproductivos encontraron una alta prevalencia de TTVs, sugiriendo que TTVs es importante en la coinfección del PCV2.

Teniendo en cuenta la importancia del PMWS en el país y debido a que no se conoce la situación en cuanto a la presencia de agentes como TTVs y SwBov y su posible relación con la presentación del síndrome, la primera aproximación realizada en este estudio, constituye un eslabón importante en la comprensión de dicha situación.

Al analizar las muestras de suero, la coinfección más evidente fue por los torquetenovirus con un 35.5%, frente al 7.3% encontrado en las muestras de tejido correspondientes a animales enfermos. Al parecer estos virus son ubicuos en la población porcícola colombiana analizada en este estudio, sin embargo su papel en el desarrollo de enfermedad requiere de estudios adicionales (Figura 10).

Lo anterior teniendo en cuenta los resultados obtenidos de experimentos realizados por el CRESA en España, en los que se midió la carga viral de los TTVs en sueros de animales sanos y en animales con PMWS y aunque si bien aún no existen evidencias que soporten que estos virus están involucrados en enfermedad, si se mostró que el TTV2 se encuentra más aumentado con relación al TTV1 en animales enfermos vs sanos y adicionalmente el pico de carga viral de TTV2, coincidió con la presentación clínica de la enfermedad (D. Nieto, et al 2011). Los resultados del estudio de D. Nieto, concuerdan con lo reportado en nuestro estudio con respecto a que el mayor porcentaje de presentación correspondía a TTV2 en las muestras provenientes de animales con sintomatología compatible con PMWS y aunque la muestra evaluada no fue la misma para animales sanos y enfermos, la positividad de los TTVs en las muestras de tejido

correspondientes a animales con sintomatología compatible con PMWS fue mayor para el caso de TTV2 con un 81% vs. 67% del TTV1. De tal manera que la coinfección entre PCV2 y TTV2 pudiera estar conllevando a una manifestación clínica aumentada, lo anterior soportado igualmente por resultados en el estudio de D. Nieto et al, 2001, en donde se reportó que el pico de carga viral de TTV2, coincidió con la fase aguda de la enfermedad, quizás la capacidad del sistema inmune en esta fase se vea más comprometida, impidiendo así controlar la viremia de TTV2 e impulsando la replicación del PCV2, que en adición con otros factores microbiológicos del animal y otros factores ambientales favorecerían la presentación del PMWS.



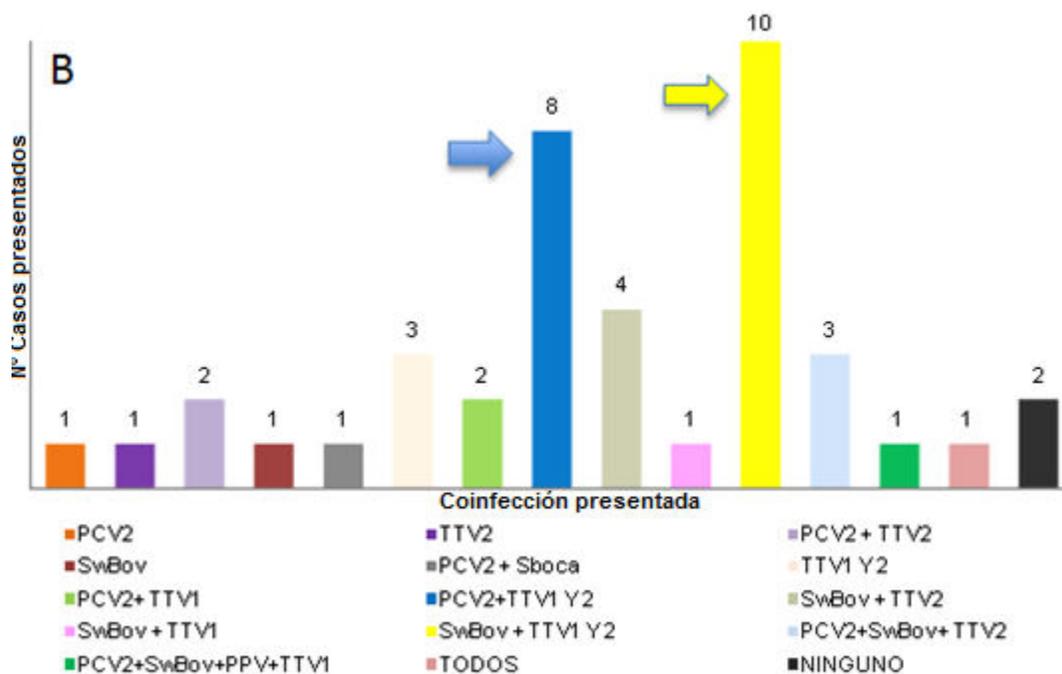


Figura 10. Número de animales que presentaban coinfecciones. A. Coinfecciones en muestras provenientes de animales clínicamente sanos. La coinfección más alta presentada corresponde a TTVs (flecha amarilla). **B. Coinfecciones en muestras provenientes de animales con sintomatología compatible con PMWS.** La coinfección más alta presentada corresponde a SwBov y TTVs (flecha amarilla) seguida de PCV2 y TTVs (flecha azul). En ambos casos el eje de las X, corresponde a la coinfección presentada y el eje de las Y al número de animales positivos.

La segunda mayor co-infección encontrada en las muestras de animales sanos fue PCV2 y TTVs con 9.2% frente al 19.9% en animales enfermos (Figura 10A/B), lo que sugiere que el PCV2 en asocio con los TTVs podría estar potenciando la presentación de enfermedad, dado que PCV2 en muestras de animales sanos y enfermos se encontró en 3.9% y 2.4% respectivamente.

En el estudio reportado por Tanja Opriessnig et al, 2012, se describe la evidencia experimental que sugiere que PCV2 no se presenta solo para desarrollar enfermedad (encontraron que el PCV2 se presentó como única infección en 1.9%, lo cual no era significativo), en comparación con otros agentes tales como PRRS y *Mycoplasma*. Se puede sugerir que el TTV y el

PCV2 comparten tropismo por los macrófagos, de tal forma que el TTV potencia el PCV2, lo anterior sugerido por el grupo de Tanja, en donde infectaron experimentalmente a cerdos en crecimiento con TTV previamente a PCV2, logrando potenciar la enfermedad.

Al analizar SwBov, se encontró que en las muestras de animales sanos en todos los casos estaba asociado con otros virus y en un bajo porcentaje, no mayor al 2.6%. Sin embargo en las muestras de animales enfermos, se encontró 24.4% de positividad de la coinfección TTVs y SwBov como la más alta (Figura 10). Posiblemente en estas circunstancias SwBov en asocio con otros agentes sea capaz de desencadenar enfermedad, tal como fue planteado en el estudio de Blomstrom AL y colaboradores en el 2009, donde por primera vez se reconoce la eventual participación de SwBov en el PMWS, posterior a este hallazgo en un estudio realizado por Zhai SL. y col. en China, en el 2010, donde se encontró que SwBov estaba presente en un alto porcentaje de muestras de animales con sintomatología respiratoria. De tal manera que la situación en nuestro país parece tener un patrón similar al previamente reportado, sin embargo como ya se ha mencionado antes dada la naturaleza sesgada del muestreo de este estudio, no es posible realizar otro tipo de aseveraciones.

5.6 Análisis del estatus clínico del animal vs. Virus encontrados

Aspectos generales:

Para esta fase solamente fueron consideradas las muestras provenientes de animales enfermos, dadas las características clínicas del animal y la facilidad de obtención de las mismas. Como requisito de sacrificio los animales debían mostrar signos compatibles con PMWS, tales como baja de peso, decaimiento, retraso en el crecimiento, con sintomatología respiratoria entre otras. Todos los animales sacrificados correspondían a la etapa de precebo y ceba, oscilando entre las 8 y 15 semanas de edad, en su mayoría eran

machos aunque este no fue un parámetro contemplado. Los datos que se recolectaron al momento del muestreo básicamente pretendían clasificar el estado clínico que en ese momento presentaba el animal, tal como sintomatología respiratoria, digestiva, PMWS sistémico o relacionados con PNDS (síndrome de dermatitis y nefropatía porcina) y de la misma forma los hallazgos de la necropsia realizada en dicho momento. Se tomaron tejidos tanto para el aislamiento viral como para el análisis por Inmunohistoquímica.

De acuerdo a los resultados encontrados en el diagnóstico histopatológico reportado en Colombia por Andrés Díaz, 2010, los cuales concuerdan con los hallazgos de Segalés et al, 2004, en todos los casos evaluados por lo menos 1 órgano presentó lesiones compatibles con las descritas para PMWS. De tal forma que para cumplir con el objetivo planteado con respecto a determinar la relación de dichos virus con la presencia del PMWS, se emplearon los datos clínicos del animal y los resultados de Inmunohistoquímica versus los resultados de PCR de los agentes evaluados, analizados con la prueba de χ^2 .

Se realizaron todos los análisis posibles dados por los cruces de ambas condiciones (resultados de PCR solos o en coinfección y enfermedad).

5.7 Análisis en las muestras de suero:

La siguiente gráfica se pone como ejemplo de los análisis realizados la cual corresponde a la relación variable de exposición bocavirus versus presencia o ausencia PCV2. χ^2 no significativa ($p=0,127$). OR: 2,51 (Figura 11).

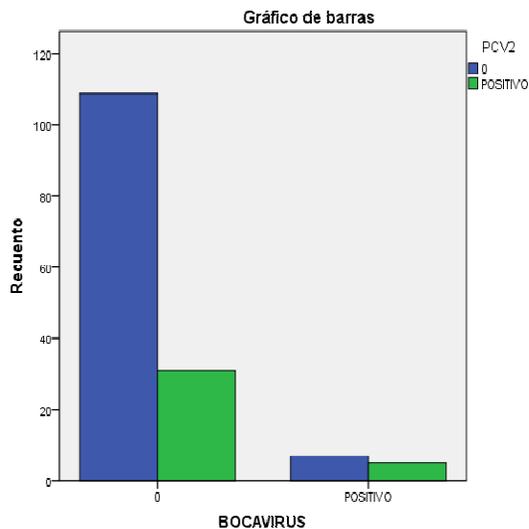


Figura 11. Relación variable de exposición bocavirus versus presencia o ausencia PCV2. La gráfica muestra en el eje de las X's a Bocavirus, con el 0 indicando la ausencia del virus y positivo indicando la presencia (variable de exposición). El eje Y indica la presencia de PCV2. Para este caso, la presencia de Bocavirus no está asociada con la presencia de PCV2. Adicionalmente se puede observar que en ausencia de Bocavirus hay una mayor presencia de PCV2.

No obstante el procedimiento anterior también se realizó para todas las combinaciones de PCV2 con el resto de virus de las muestras de suero, no encontrando significancia estadística (datos no mostrados).

- Relación variable de exposición TTV1 versus presencia o ausencia PCV2. Chi² no significativa (p=0,382). OR: 0,10
- Relación variable de exposición TTV2 versus presencia o ausencia PCV2. Chi² no significativa (p=0,808). OR: 0,90
- Relación variable de exposición PPV versus presencia o ausencia PCV2. Chi² no significativa (p=0,665). OR: 1,076

Para el análisis de asociación de cada uno de los virus vs. PCV2 en las muestras de suero, se observa que no hay significancia estadística con la prueba de Chi². Todos los valores tienen $P \geq 0.05$, lo que pudiera sugerir que estos virus no representan un factor de riesgo para la presencia de PCV2 en

las muestras analizadas, comparados con los valores de los OR en donde se obtuvo un valor inferior o cercano a 1. El OR correspondiente al bocavirus y al PCV2 tiene un valor de 2.51 lo cual reflejaría que existe 2.51 más probabilidad de que los sueros expuestos a bocavirus tengan PCV2 que los que no tienen Bocavirus, pero dado que el χ^2 no es significativo esta asociación no es concluyente.

5.8 Tendencia de presencia de los virus PCV2, PPV, SwBoV, TTV 1 y 2 con respecto a la edad (semanas de vida) en que se encontraban los cerdos al momento del muestreo.

Aunque el rango de edad analizado en este estudio correspondía en su totalidad a animales en crecimiento, se realizó el ejercicio estadístico para cada caso.

La mayor frecuencia de presentación de cada uno de los virus entre el rango de 8 a 15 semanas de edad se observó en las semanas 10 y 15, TTV1 tuvo mayor porcentaje de presentación en la semana 10 en contraste con los virus PCV2, SwBoV, PPV y TTV2 (Figura 12). Estos hallazgos podrían sugerir que el hecho que TTV1 aumente, podría potenciar el PCV2 aprovechando la inmunosupresión del animal (Laila et al, 2010), que sumado a otros factores se desencadene el PMWS.

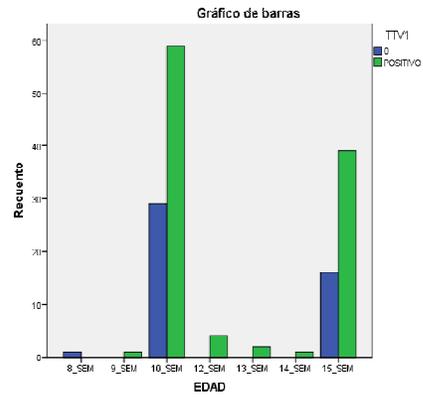
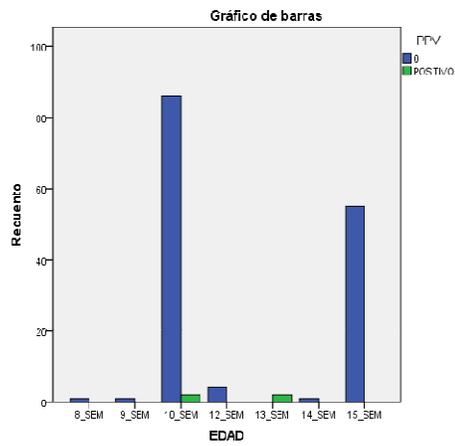
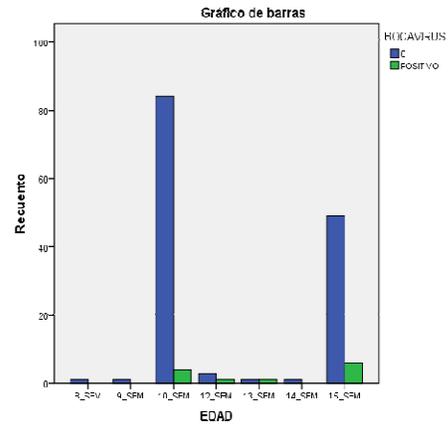
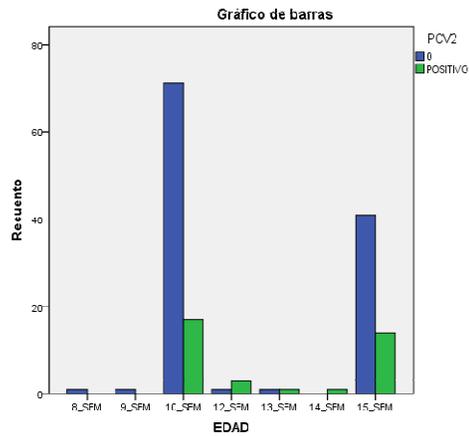


Figura 12. Análisis de presentación de cada uno de los virus con respecto a la edad. A. PCV2, B. SwBov, C. PPV, D. TTV1. En todos los casos las barras azules corresponden a resultados negativos y las verdes a positivos, el eje de las X a la edad vs. el eje de las Y de porcentaje. Para el caso de PCV2, SwBov y TTV1, los animales de semana 10 y semana 15 fueron predominantes en la infección de este virus.

5.9 Análisis de las muestras de tejido, resultados de PCR versus enfermedad

Se realizaron tablas de contingencia de 2 X 2 para comparar las diferentes presentaciones de PCV2 y cada uno de los otros virus encontrados (Tabla 5), con lo que se calculó el Odds ratio. El siguiente ejemplo constituye la evaluación de la variable PCV2 vs. PMWS.

PCV2*PMWS

		PMWS	PMWS
		POSITIVO	NEGATIVO
PCV2	POSITIVO	12	12
PCV2	NEGATIVO	2	20

Tabla 5. Tabla de Contingencia, Variable presencia, ausencia PCV2 vs. enfermedad.

$$OR = 12/12/2/*20 =$$

$$OR = 1/0.1 = 10$$

Para evaluar la significancia del χ^2 se tuvo en cuenta la prueba de Pearson y la de Fisher dependiendo si en la tabla de contingencia se tenían valores mayores o menores de 5 respectivamente. Seguidamente si el valor de p era significativo se calculó el Odds Ratio manualmente.

$$OR = \frac{a/b}{c/d}$$

Otra herramienta evaluada fueron las gráficas comparativas entre la variable de exposición Vs. la presentación de la variable de respuesta.

Para establecer la asociación de enfermedad (clasificación previamente descrita) frente a cada uno de los virus SwBo, PPV, PCV2, TTVI y II se encontró que la única asociación significativa fue PCV2 vs PMWS con un ($p=0,03$) y un OR: 10, este valor representa que las muestras expuestas a

PCV2 tienen 10 veces mayor probabilidad de presentar PMWS sistémico que las que no lo tienen (Figura 13). La comparación de los demás virus y formas de presentación no fueron significativas, sugiriendo que los virus de forma individual no son factores de riesgo para las diferentes formas de presentación de enfermedades asociadas a PCV2.

El procedimiento anterior se realizó para los diferentes virus con las distintas presentaciones de enfermedad en las muestras de tejido, no encontrando significancia en el resto de evaluaciones (datos no mostrados).

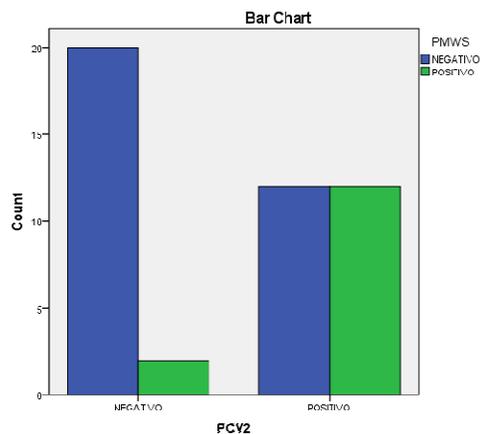


Figura 13. Relación variable de exposición PCV2 versus presencia o ausencia PMWS. χ^2 significativa ($p=0,03$). OR: 10. Se observa que el PCV2 es aparentemente es un factor determinante para la presentación del PMWS.

Relación variable de exposición PCV2 versus presencia o ausencia PNDS. χ^2 significativa ($p=0,045$). OR: 0. El PCV2 por sí solo no es un factor suficiente para desencadenar PNDS en la muestra evaluada, quizás bajo otras condiciones se pueda determinar la relación (Figura 14).

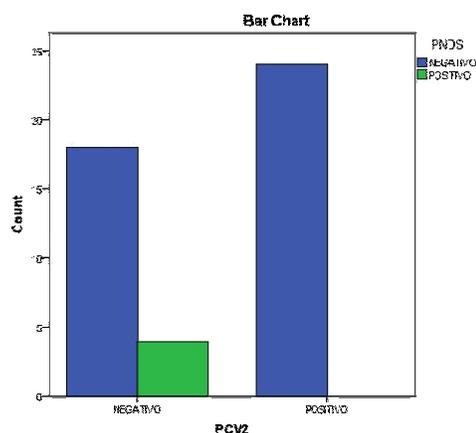


Figura 14. Relación variable de exposición PCV2 versus presencia o ausencia PND. χ^2 significativa ($p=0,045$). OR: 0. Aparentemente PCV2 aunque está asociado a la presentación de PND, no es un factor determinante, posiblemente están involucrados otros agentes no analizados en este estudio.

Relación variable de exposición Bocavirus versus presencia o ausencia PMWS presentación sistémica. χ^2 ($p=0,06$). OR: 0.61 (Figura 15). El hecho de que Bocavirus esté presente podría estar implicado en la presentación del PMWS, sin embargo por sí solo no parece ser determinante dado a que en ausencia del mismo también se encontró PMWS, quizás sea importante la participación asociada de otros agentes de tipo viral o bacteriano.

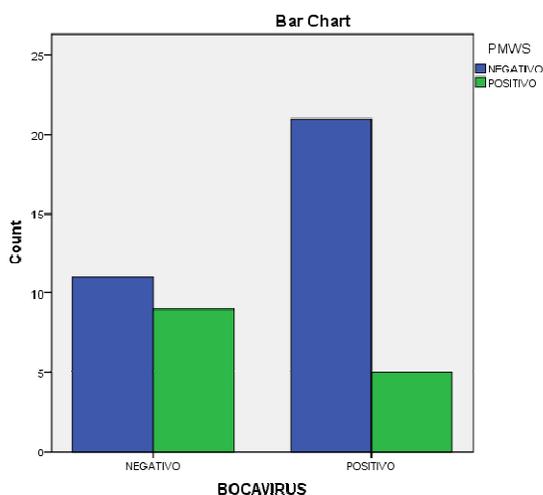


Figura 15. Relación variable de exposición SwBov versus presencia o ausencia PMWS. χ^2 ($p=0,06$). OR: 0.61. El SwBov, parece estar implicado en la presentación del síndrome, sin

embargo no es un factor determinante por sí solo, posiblemente es importante la asociación con otros microorganismos no contemplados en este estudio.

5.10 Análisis en coinfecciones

Para este análisis se empleó la metodología ya mencionada, de tal forma que se buscó establecer la relación de las 13 coinfecciones que se presentaron:

Identificación de la coinfección	Agente					
	TTV1	TTV2	PCV2	SwBov	PPV	Ninguno
1	x	x				
2	x		x			
3		x	x			
4	x	x	x			
5		x	x	x		
6	x	x	x	x		
7	x			x		
8	x	x		x		
9	x		x	x	x	
10			x	x		
11		x		x		
12	x	x	x	x	x	
13						x

Tabla 6 Descripción coinfecciones encontradas en las muestras analizadas. Se encontraron un total de 12 coinfecciones más las muestras que no presentaron positividad por PCR a ninguno de los virus evaluados.

De acuerdo a los hallazgos clínicos registrados en el momento del sacrificio del animal y los hallazgos de la necropsia, se clasificaron las muestras dentro de los siguientes grupos: compatibles con enfermedad respiratoria, entérica, PNDS y PMWS. Con dicha herramienta y los resultados de PCR se realizaron tablas de contingencia con la respectiva prueba de Chi² hallando los siguientes valores significativos.

5.10.1 Relación de la coinfección PCV2+TTV1 y 2 versus presencia o ausencia de PMWS sistémico

Chi² significativa (p=0,017). OR: 6.25. Este valor quiere decir que los animales que presentan esta coinfección presentan 6,25 más veces de tener PMWS que los que no tienen la coinfección (Figura 16).

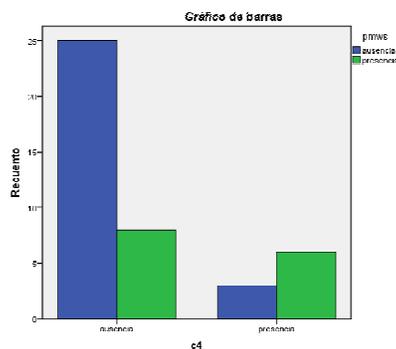


Figura 16. Relación variable de exposición PCV2+TTV1/2 versus presencia o ausencia PMWS. Chi² (p=0,017). OR: 6.25. PCV en asocio con TTVs al parecer constituye un factor importante para la presentación del PMWS.

5.10.2 Relación de la coinfección TTV1Y2+ SwBov, versus presencia o ausencia de PMWS sistémico.

Chi² significativa (p=0,026) OR=0. Si dicha coinfección está ausente, la probabilidad de presentar PMWS existe, posiblemente explicado por la participación de otros agentes no contemplados en este análisis, en contraste cuando la coinfección está presente, no fue una condición suficiente para desarrollar PMWS (Figura 17).

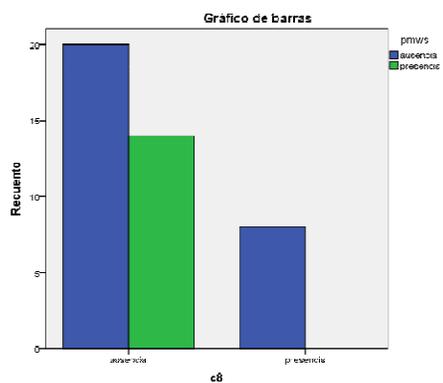


Figura 17. Relación variable de exposición TTV1/2 + SwBov versus presencia o ausencia PMWS. χ^2 ($p=0,026$). Cuando esta coinfección está presente, no fue suficiente para el desarrollo de PMWS.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES FINALES

- Este estudio demuestra por primera vez la existencia de agentes virales no convencionales del tipo SwBoV y TTV 1 y 2, circulando en la población porcina colombiana.
- Los resultados indican que TTV1/2 y SwBov podrían estar relacionados con la presentación del PMWS en nuestro país.
- Al analizar de forma independiente la presencia de cada uno de los virus frente a la presencia o ausencia de PCV2 no se encontró significancia estadística, sin embargo los resultados de co-infección revelan la participación de otros agentes evaluados en éste estudio, lo que podría sugerir la importancia de infección poliviral como desencadenante del PMWS.
- En las muestras en que solo se evidenció la presencia de PCV2 esta fue una condición suficiente para producir PMWS sistémico ($p=0.03$) $OR=10$.
- Para el caso de SwBov versus PMWS se encontró, que el hecho de que Bocavirus esté presente podría estar implicado en la presencia del PMWS ($P=0.06$).
- El análisis de la presencia de co-infecciones, arrojó resultados importantes, en las muestras de tejido analizadas, en particular cuando está presente la coinfección PCV2 y TTV1-2, aumenta el riesgo de presentación de PMWS sistémico en 6.25 ($p=0.017$), lo que permite sugerir que los torquetenovirus juegan un papel importante en el desarrollo del PMWS en asocio con PCV2.

- Con relación a la coinfección TTV1y2+ SwBov, versus presencia o ausencia PMWS sistémico, esta no fue una condición suficiente para desarrollar PMWS ($p=0,026$).
- Las herramientas diagnósticas desarrolladas en este estudio quedan disponibles para ser usadas en el campo, pues hasta el momento solo se evalúa PCV2. Ahora es importante reconocer la existencia de otros agentes involucrados en el PMWS, los cuales deben ser incluidos en el panel diagnóstico.
- Con el fin de determinar el papel de éstos agentes en la enfermedad es necesario realizar estudios adicionales que contemplen el análisis de carga viral y dinámica de la infección solos y en asocio con otros agentes.

7. ANEXOS

Anexo 1. Análisis Bioinformático de PPV

FORMATOS DE INFORMACIÓN
REGISTRO ESTUDIO DE FACTIBILIDAD DE LA PRUEBA

Diciembre de 2010

Prueba: Amplificación por PCR del gen NS1
Clasificación de uso de la Prueba: Confirmación presencia o ausencia del parvovirus porcino

ANALISIS BIOINFORMÁTICO

1. Secuencias de los Primers usados:

Nombre del primer	Secuencia 5' - 3'	pb	T m calculada	% GC	Blanco a amplificar	Referencia	Tipo de PCR
PRIMERA PCR							
PPV-F	GGTTGCTACAATGCAGCCAATG	22	65	50	NS1	Corredor, et al	convencional
PPV-R	GCTAGCCATTGTTGCTTGG CCAAGCAACAATGGCTAGC	19	59	53			

2. Alineamiento pareado de los Primers para identificar secuencias reportadas en las bases de datos, con las que

anillan:

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
HM989009.1	Porcine parvovirus strain N, complete genome	<u>41.0</u>	76.5	44%	0.93	100%
GQ884047.1	Porcine parvovirus isolate 40570005_4e, partial genome	<u>41.0</u>	76.5	44%	0.93	100%
GQ884046.1	Porcine parvovirus isolate 40560005_4c, partial genome	<u>41.0</u>	76.5	44%	0.93	100%
GQ884045.1	Porcine parvovirus isolate 40090005_1h, partial genome	<u>41.0</u>	76.5	44%	0.93	100%
GQ884044.1	Porcine parvovirus isolate 33800005_1g, partial genome	<u>41.0</u>	76.5	44%	0.93	100%
GQ884043.1	Porcine parvovirus isolate 33790005_6a, partial genome	<u>41.0</u>	76.5	44%	0.93	100%
GQ884042.1	Porcine parvovirus isolate 33780005_2g, partial genome	<u>41.0</u>	76.5	44%	0.93	100%
GQ884041.1	Porcine parvovirus isolate 33760005_3a, partial genome	<u>41.0</u>	76.5	44%	0.93	100%
GQ884040.1	Porcine parvovirus isolate 32360005_1f, partial genome	<u>41.0</u>	76.5	44%	0.93	100%
GQ884039.1	Porcine parvovirus isolate 32350005_3h, partial genome	<u>41.0</u>	76.5	44%	0.93	100%

ANALISIS MULTIPLE CLUSTALW2

```

gi|298501351_1200-1700 ATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTCAACACATTGCAAACCTTAGTTGGTA 50
gi|226934561_1200-1700 ATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTCAACACATTGCAAACCTTAGTTGGTA 50
gi|307827231_1250-1700 -----ACATTGCAAACCTTAGTTGGTA 21
gi|194277770_1500-2000 -----AAAAAGTATAATTGCTCAACACATTGCAAACCTTAGTTGGTA 41
gi|226424287_1250-1700 -----AAAAAGTATAATTGCTCAACACATTGCAAACCTTAGTTGGTA 41
gi|308220207_1500-2000 -----GGAAAAAGTATAATTGCTCAACACATTGCAAACCTTAGTTGGTA 43
*****.*****

```

PPV-F -----GGTTGCTACAATGCAGCCAATG----- 22

```

gi|298501351_1200-1700 ATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGTGAACCTTCCATTTAATGACTGT 100
gi|226934561_1200-1700 ATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGTGAACCTTCCATTTAATGACTGT 100
gi|307827231_1250-1700 ATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGTGAACCTTCCATTTAATGACTGT 71
gi|194277770_1500-2000 ATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGTGAACCTTCCATTTAATGACTGT 91
gi|226424287_1250-1700 ATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGTGAACCTTCCATTTAATGACTGT 91
gi|308220207_1500-2000 ATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGTGAACCTTCCATTTAATGACTGT 93
*****

```

```

gi|298501351_1200-1700 ACAAAATAAAAACCTTAATATGGATTGAAGAAGCAGGAAACCTTCTCTAACCA 150
gi|226934561_1200-1700 ACAAAATAAAAACCTTAATATGGATTGAAGAAGCAGGAAACCTTCTCTAACCA 150
gi|307827231_1250-1700 ACAAAATAAAAACCTTAATATGGATTGAAGAAGCAGGAAACCTTCTCTAACCA 121
gi|194277770_1500-2000 ACAAAATAAAAACCTTAATATGGATTGAAGAAGCAGGAAACCTTCTCTAACCA 141
gi|226424287_1250-1700 ACAAAATAAAAACCTTAATATGGATTGAAGAAGCAGGAAACCTTCTCTAACCA 141
gi|308220207_1500-2000 ACAAAATAAAAACCTTAATATGGATTGAAGAAGCAGGAAACCTTCTCTAACCA 143
*****

```

```

gi|298501351_1200-1700 AACTGCCAGGTGATTTTGGACTTTTAGAAGAAACTGAATGGCCACTAATA 400
gi|226934561_1200-1700 AACTGCCAGGTGACTTTTGGACTTTTAGAAGAAACTGAATGGCCACTAATA 400
gi|307827231_1250-1700 AACTACCAGTGATTTTGGACTTTTAGAAGAAACTGAATGGCCACTAATA 371
gi|194277770_1500-2000 AACTGCCAGGTGATTTTGGACTTTTAGAAGAAACTGAATGGCCACTAATA 391
gi|226424287_1250-1700 AACTGCCAGGTGATTTTGGACTTTTAGAAGAAACTGAATGGCCACTAATA 391
gi|308220207_1500-2000 AACTGCCAGGTGATTTTGGACTTTTAGAAGAAACTGAATGGCCACTAATA 393
****.*****

```

PPV-R -----CCAAGCAACAATGGCTAGC----- 19

```

gi|298501351_1200-1700 TGTGCTTGGTTGGTAAAGAAAGGTTACCAAGCAACAATGGCTAGCTATAT 450
gi|226934561_1200-1700 TGTGCTTGGTTGGTAAAGAAAGGTTACCAAGCAACAATGGCTAGCTATAT 450
gi|307827231_1250-1700 TGTGCTTGGTTGGTAAAGAAAGGTTACCAAGCAACAATGGCTAGCTATAT 421
gi|194277770_1500-2000 TGTGCTTGGTTGGTAAAGAAAGGTTACCAAGCAACAATGGCTAGCTATAT 441
gi|226424287_1250-1700 TGTGCTTGGTTGGTAAAGAAAGGTTACCAATCAACAATGGCTAGCTATAT 441
gi|308220207_1500-2000 TGTGCTTGGTTGGTAAAGAAAGGTTACCAAGCAACAATGGCTAGCTATAT 443
*****

```

```

gi|298501351_1200-1700 GCATCATTGGGGAAATGTACCTGATTGGTCAGAAAAAGTGGGAGGAGCCAA 500
gi|226934561_1200-1700 GCATCATTGGGGAAATGTACCTGATTGGTCAGAAAAATGGGAGGAGCCAA 500
gi|307827231_1250-1700 GCATCATTGGGGAAATGTACCTGATTGGTC----- 451
gi|194277770_1500-2000 GCATCATTGGGGAAATGTACCTGATTGGTCAGAAAAATGGGAGGAGCCAA 491
gi|226424287_1250-1700 GCATCATTGG----- 451
gi|308220207_1500-2000 GCATCATTGGGGAAATGTACCTGATTGGTCAGAAAAAGTGGGAGGAGCCAA 493
*****

```

```

gi|298501351_1200-1700 A----- 501
gi|226934561_1200-1700 A----- 501
gi|307827231_1250-1700 -----
gi|194277770_1500-2000 AAATGCAAAC 501
gi|226424287_1250-1700 -----
gi|308220207_1500-2000 AAATGCAA-- 501

```

TAMAÑO APROXIMADO PCR: 389PB

ANALISIS CON LAS SECUENCIAS COMPLETAS DE NS1 Y LOS PRIMERS PROPUESTOS

```

PPV-F -----GGT 3
gi|298501351|gb|HM355808.1| GAAAAAGTATAATTGCTCAACACATTGCAAACCTAGTTGGTAATGTTGGT 1257
gi|308220207|gb|HM989009.1| GAAAAAGTATAATTGCTCAACACATTGCAAACCTAGTTGGTAATGTTGGT 1550
***

PPV-F TGCTACAATGCAGCCAATG----- 22
gi|298501351|gb|HM355808.1| TGCTACAATGCAGCCAATGTGAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAA 1307
gi|308220207|gb|HM989009.1| TGCTACAATGCAGCCAATGTGAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAA 1600
*****

PPV-R -----CCAAGCAACAATGGCTAGC----- 19
gi|298501351|gb|HM355808.1| GTTGGTAAAGAAAGGTTACCAAGCAACAATGGCTAGCTATATGCATCATT 1657
gi|308220207|gb|HM989009.1| GTTGGTAAAGAAAGGTTACCAAGCAACAATGGCTAGCTATATGCATCATT 1950

```

Anexo 2. Análisis bioinformático SwBov

FORMATOS DE INFORMACIÓN

REGISTRO ESTUDIO DE FACTIBILIDAD DE LA PRUEBA

Diciembre de 2010

Prueba: Amplificación por PCR del gen VP1-2 o NS1 De Bocavirus porcino (PBoV)

Clasificación de uso de la Prueba: Confirmación presencia o ausencia de Bocavirus porcino

ANALISIS BIOINFORMÁTICO

4. Secuencias de los Primers usados:

Nombre del primer	Secuencia 5' - 3'	pb	T m calculada	% GC	Blanco a amplificar	Referencia	Tipo de PCR
PRIMERA PCR							
Sboca-F	GGG CGA GAA CAT TGA AGA GGT	21	57.3	52.4	VP1-2 496	Shaolum et al 2010	convencional
Sboca-R	TTGTGAGTATGGGTATTGGTG	21	52.2	42.9			
Boca-F	AAACTGGTTCCTGAGC	16	48.8	50	NS1 208	Wei-xia Cheng	
Boca-R	CAGTGAACAGCGTCT	16	49.1	50			

Alineamiento pareado de los Primers para identificar secuencias reportadas en las bases de datos, con las que

anillan: Primer juego de primers de 496 pb

Accession	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>	Links
HQ223038.1	Bocavirus pig/SX/China/2010 NS1 (NS1), NP1 (NP1), VP1 (VP1), and VP2 (VP2) genes, complete cds	39.2	71.1	50%	2.9	100%	
GU902971.1	Bocavirus pig/sw-A1/SWE/2010 NP-1 gene, complete cds; and putative VP1/2 gene, partial cds	39.2	71.1	50%	2.9	100%	
GU902970.1	Bocavirus pig/sw-107/SWE/2010 NP-1 gene, complete cds; and putative VP1/2 gene, partial cds	39.2	71.1	50%	2.9	100%	
GU902969.1	Bocavirus pig/sw-92_2/SWE/2010 NP-1 gene, complete cds; and putative VP1/2 gene, partial cds	39.2	71.1	50%	2.9	100%	
GU902968.1	Bocavirus pig/sw-90_1/SWE/2010 NP-1 gene, complete cds; and putative VP1/2 gene, partial cds	39.2	67.5	50%	2.9	100%	
GU902967.1	Bocavirus pig/sw-18/SWE/2010 NP-1 gene, complete cds; and putative VP1/2 gene, partial cds	39.2	71.1	50%	2.9	100%	
GU556591.1	Bocavirus pig/China/2009 strain PBoVZJHP2 VP1/VP2 protein gene, partial cds	39.2	71.1	50%	2.9	100%	
GU556590.1	Bocavirus pig/China/2009 strain PBoVZJHP1 VP1/VP2 protein gene, partial cds	39.2	71.1	50%	2.9	100%	
GU556589.1	Bocavirus pig/China/2009 strain	39.2	71.1	50%	2.9	100%	

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>	<u>Links</u>
	PBoVZJ0936 VP1/VP2 protein gene, partial cds						
GU556588.1	Bocavirus pig/China/2009 strain PBoVZJ0919 VP1/VP2 protein gene, partial cds	39.2	71.1	50%	2.9	100%	
GU556587.1	Bocavirus pig/China/2009 strain PBoVZJ0901 VP1/VP2 protein gene, partial cds	39.2	71.1	50%	2.9	100%	
GU556586.1	Bocavirus pig/China/2009 strain PBoVXJ0904 VP1/VP2 protein gene, partial cds	39.2	71.1	50%	2.9	100%	
GU556585.1	Bocavirus pig/China/2009 strain PBoVXJ0901 VP1/VP2 protein gene, partial cds	39.2	71.1	50%	2.9	100%	
GU556584.1	Bocavirus pig/China/2009 strain PBoVSH0958 VP1/VP2 protein gene, partial cds	39.2	71.1	50%	2.9	100%	
GU556583.1	Bocavirus pig/China/2009 strain PBoVSH0901 VP1/VP2 protein gene, partial cds	39.2	71.1	50%	2.9	100%	
GU556582.1	Bocavirus pig/China/2009 strain PBoVJX0927 VP1/VP2 protein gene, partial cds	39.2	71.1	50%	2.9	100%	
GU556581.1	Bocavirus pig/China/2009 strain PBoVJS0921 VP1/VP2 protein gene, partial cds	39.2	71.1	50%	2.9	100%	
GU556580.1	Bocavirus pig/China/2009 strain PBoVHEN0916 VP1/VP2 protein gene, partial cds	39.2	71.1	50%	2.9	100%	
GU556579.1	Bocavirus pig/China/2009 strain PBoVHEB0904 VP1/VP2 protein gene, partial cds	39.2	71.1	50%	2.9	100%	
GU556578.1	Bocavirus pig/China/2009 strain PBoVHEB0901 VP1/VP2 protein gene, partial cds	39.2	71.1	50%	2.9	100%	
GU556577.1	Bocavirus pig/China/2009 strain PBoVBJ0907 VP1/VP2 protein gene, partial cds	39.2	71.1	50%	2.9	100%	
GU556576.1	Bocavirus pig/China/2009 strain PBoVBJ0903 VP1/VP2 protein gene, partial cds	39.2	71.1	50%	2.9	100%	
GU556575.1	Bocavirus pig/China/2009 strain PBoVAH0921 VP1/VP2 protein gene, partial cds	39.2	71.1	50%	2.9	100%	
GU556574.1	Bocavirus pig/China/2009 strain PBoVAH0914 VP1/VP2 protein gene, partial cds	39.2	71.1	50%	2.9	100%	
GU556573.1	Bocavirus pig/China/2009 strain PBoVAH0904 VP1/VP2 protein gene, partial cds	39.2	71.1	50%	2.9	100%	
FJ872544.1	Bocavirus pig/Swebo_1/SWE putative NP1 gene, complete cds; and VP1/VP2 gene, partial cds	39.2	71.1	50%	2.9	100%	

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

Sboca-F -----GGGCGAGAACATTGA 15
gi|290574483|gb|GU556588.1| -----GGGCGAGAACATTGA 15
gi|310877319|gb|HQ223038.1| CAAGGTGCAAAAAGAGCAAAAATGTCCGCACAGGGGGCGAGAACATTGA 3150
gi|299507634|gb|GU902967.1| CAAGGTGCAAAAAGAGCAAAAATGTCCGCACAGGGGGCGAGAACATTGA 1176
*****

```

```

Sboca-F AGAGGT-----15
gi|290574483|gb|GU556588.1| AGAGGTGAAGTGGATACAGGTGCGGGAAGTGGGCGGTGAGGCGGTGGCG 65
gi|310877319|gb|HQ223038.1| AGAGGTGAAGTGGATACAGGTGCGGGAAGTGGGCGGTGAGGCGGTGGCG 3200
gi|299507634|gb|GU902967.1| AGAGGTGAAGTGGATACAGGTGCGGGAAGTGGGCGGTGAGGCGGTGGCG 1226
*****

```

```

gi|290574483|gb|GU556588.1| ACAGATACACTATACAACAATGATCTGACAGCAGGGGTGCACATTATGTA 465
gi|310877319|gb|HQ223038.1| ACAGATACACTATACAACAATGATCTGACAGCAGGGGTGCACATTATGTA 3600
gi|299507634|gb|GU902967.1| ACAGATACACTATACAACAATGATCTGACAGCAGGGGTGCACATTATGTA 1626
*****

```

```

Sboca-R -----CACCAATACCCATACTCACAA----- 21
gi|290574483|gb|GU556588.1| TGACGGGTCACACCAATACCCATACTCACAA----- 496
gi|310877319|gb|HQ223038.1| TGACGGGTCACACCAATACCCATACTCACAAAGTGGATGGGACAGTGAGC 3650
gi|299507634|gb|GU902967.1| TGACGGGTCACACCAATACCCATACTCACAAAGTGGATGGGACAGTGAGC 1676
*****

```

Tamaño esperado: 495pb

Alineamiento pareado de los Primers para identificar secuencias reportadas en las bases de datos, con las que

Primer juego de primers de NS1 208

anillan:

Sequences producing significant alignments:

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>	<u>Links</u>
XM_002924330.1	PREDICTED: Ailuropoda melanoleuca fer-1-like 6 (C. elegans) (FER1L6), mRNA	30.1	30.1	21%	1205	100%	
HM053694.1	Porcine bocavirus 2 pig/ZJD/China/2006, complete genome	30.1	54.9	43%	1205	100%	
HM053693.1	Porcine bocavirus 1 pig/ZJD/China/2006, complete genome	30.1	30.1	21%	1205	100%	
HM053692.1	Bocavirus pig/ZJD/China/2006 isolate Z494 NS1 gene, partial cds	30.1	60.3	43%	1205	100%	
HM053691.1	Bocavirus pig/ZJD/China/2006 isolate Z491 NS1 gene, partial cds	30.1	60.3	43%	1205	100%	
HM053690.1	Bocavirus pig/ZJD/China/2006 isolate Z462 NS1 gene, partial cds	30.1	60.3	43%	1205	100%	
HM053689.1	Bocavirus pig/ZJD/China/2006 isolate Z375 NS1 gene, partial cds	30.1	60.3	43%	1205	100%	
HM053688.1	Bocavirus pig/ZJD/China/2006 isolate Z371 NS1 gene, partial cds	30.1	60.3	43%	1205	100%	
HM053687.1	Bocavirus pig/ZJD/China/2006 isolate Z369 NS1 gene, partial cds	30.1	60.3	43%	1205	100%	
HM053686.1	Bocavirus pig/ZJD/China/2006 isolate Z348 NS1 gene, partial cds	30.1	60.3	43%	1205	100%	
HM053685.1	Bocavirus pig/ZJD/China/2006 isolate Z290 NS1 gene, partial cds	30.1	60.3	43%	1205	100%	
HM053684.1	Bocavirus pig/ZJD/China/2006 isolate Z260 NS1 gene, partial cds	30.1	60.3	43%	1205	100%	
HM053683.1	Bocavirus pig/ZJD/China/2006 isolate Z255 NS1 gene, partial cds	30.1	60.3	43%	1205	100%	
HM053682.1	Bocavirus pig/ZJD/China/2006 isolate Z252 NS1 gene, partial cds	30.1	60.3	43%	1205	100%	
HM053681.1	Bocavirus pig/ZJD/China/2006 isolate Z249 NS1 gene, partial cds	30.1	60.3	43%	1205	100%	
HM053680.1	Bocavirus pig/ZJD/China/2006 isolate Z244 NS1 gene, partial cds	30.1	60.3	43%	1205	100%	

Clustal

```
Boca-F -----AAACTGGTTCCTGAGC----- 16
gi|298200897|gb|HM053674.1| -----AAACTGGTTCCTGAGCACATGCGC 24
gi|298200899|gb|HM053675.1| -----AAACTGGTTCCTGAGCACATGCGC 24
gi|298200948|gb|HM053694.1| CCTACGCCATCAGCAGCATCAACGGGAAGCTGGTTCCTGAGCACATGCGC 950
                               ** .*****
```

```
Boca-R -----AGACGCTGTTTCACTG----- 16
gi|298200897|gb|HM053674.1| CTGATGCTCGATTGCATGAGACGCTGTTTCACTG----- 208
gi|298200899|gb|HM053675.1| CTGATGCTCGATTGCATGAGACGCTGTTTCACTG----- 208
gi|298200948|gb|HM053694.1| CTGATGCTCGATTGCATGAGACGCTGTTTCACTGAGAACATCACCTCGTA 1150
```

TAMAÑO APROX 208 PB

Anexo 3. Análisis bioinformático TTV

FORMATOS DE INFORMACIÓN
REGISTRO ESTUDIO DE FACTIBILIDAD DE LA PRUEBA

Diciembre de 2010

Prueba: Amplificación por PCR del gen 5UTR DE TTV1 Y TTV2
Clasificación de uso de la Prueba: Confirmación presencia o ausencia de torque tenovirus porcino tipo 1 y 2

ANALISIS BIOINFORMÁTICO

5. Secuencias de los Primers usados:

Nombre del primer	Secuencia 5' - 3'	pb	T m calculada	% GC	Blanco a amplificar	Referencia	Tipo de PCR
PRIMERA PCR							
TTV1-F	CGGGTTCAGGAGGCTCAAT	19	57.3	57.9	5UTR	Segalés, et al 2009	convencional
TTV1-R	GCCATTGGAAGTGCCTTACT	22	57.6	50			
TTV2-F	TCATGACAGGGTTCACCGGAA	21	58.5	52.4			
TTV2-R	CGTCTGCGCACTTACTTATATACTCTA	27	55.7	40.7			

Alineamiento pareado de los Primers para identificar secuencias reportadas en las bases de datos, con las que

anillan:

Sequences producing significant alignments: **TTV 1**

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
HM633256.1	Torque teno sus virus 1 isolate TTV1Hlj20, complete genome	41.0	76.5	53%	0.70	100%	
HM633254.1	Torque teno sus virus 1 isolate TTV1Hlj5, complete genome	41.0	74.7	52%	0.70	100%	
HM633253.1	Torque teno sus virus 1 isolate TTV1Gx3-1, complete genome	41.0	76.5	53%	0.70	100%	
HM633252.1	Torque teno sus virus 1 isolate TTV1Fj3, complete genome	41.0	41.0	28%	0.70	100%	
HM633251.1	Torque teno sus virus 1 isolate TTV1Bj10, complete genome	41.0	76.5	53%	0.70	100%	
HM633248.1	Torque teno sus virus 1 isolate TTV1Bj5, complete genome	41.0	76.5	53%	0.70	100%	
HM633246.1	Torque teno sus virus 1 isolate TTV1Bj4-1, complete genome	41.0	76.5	53%	0.70	100%	
HM633245.1	Torque teno sus virus 1 isolate TTV1Bj3, complete genome	41.0	76.5	53%	0.70	100%	
HM633243.1	Torque teno sus virus 1 isolate TTV1Bj2-1, complete genome	41.0	76.5	53%	0.70	100%	

Sequences producing significant alignments: **TTV 1**

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>	<u>Links</u>
	genome						
<u>GU570202.1</u>	Torque teno sus virus 1 isolate TTV1_G26, complete genome	<u>41.0</u>	41.0	28%	0.70	100%	
<u>GU570201.1</u>	Torque teno sus virus 1 isolate TTV1_G21, complete genome	<u>41.0</u>	41.0	28%	0.70	100%	
<u>GU570200.1</u>	Torque teno sus virus 1 isolate TTV1_1914, complete genome	<u>41.0</u>	76.5	53%	0.70	100%	
<u>GU570199.1</u>	Torque teno sus virus 1 isolate TTV1_20N, complete genome	<u>41.0</u>	76.5	53%	0.70	100%	
<u>GU570198.1</u>	Torque teno sus virus 1 isolate TTV1_19N, complete genome	<u>41.0</u>	76.5	53%	0.70	100%	
<u>GU569888.1</u>	Torque teno sus virus 1 isolate c32 genomic sequence	<u>41.0</u>	41.0	28%	0.70	100%	
<u>GU569885.1</u>	Torque teno sus virus 1 isolate 393 genomic sequence	<u>41.0</u>	41.0	28%	0.70	100%	
<u>HM042347.1</u>	Torque teno sus virus isolate 2238 genomic sequence	<u>41.0</u>	41.0	28%	0.70	100%	
<u>HM042344.1</u>	Torque teno sus virus isolate 3111 genomic sequence	<u>41.0</u>	41.0	28%	0.70	100%	
<u>HM042340.1</u>	Torque teno sus virus isolate 2234 genomic sequence	<u>41.0</u>	41.0	28%	0.70	100%	
<u>HM042339.1</u>	Torque teno sus virus isolate C412 genomic sequence	<u>41.0</u>	41.0	28%	0.70	100%	
<u>HM042332.1</u>	Torque teno sus virus isolate 3931 genomic sequence	<u>41.0</u>	41.0	28%	0.70	100%	
<u>GU574717.1</u>	Torque teno sus virus 1 isolate TB 5' noncoding region genomic sequence	<u>41.0</u>	41.0	28%	0.70	100%	
<u>GU574716.1</u>	Torque teno sus virus 1 isolate ST 5' noncoding region genomic sequence	<u>41.0</u>	41.0	28%	0.70	100%	
<u>GU574715.1</u>	Torque teno sus virus 1 isolate PK-15 PCV-1 free 5' noncoding region genomic sequence	<u>41.0</u>	41.0	28%	0.70	100%	
<u>GU574713.1</u>	Torque teno sus virus 1 isolate MDCK 5' noncoding region genomic sequence	<u>41.0</u>	41.0	28%	0.70	100%	
<u>GU574712.1</u>	Torque teno sus virus 1 isolate MDBK 5' noncoding region genomic sequence	<u>41.0</u>	41.0	28%	0.70	100%	
<u>GU574711.1</u>	Torque teno sus virus 1 isolate MA-104 5' noncoding region genomic sequence	<u>41.0</u>	41.0	28%	0.70	100%	
<u>GU574710.1</u>	Torque teno sus virus 1 isolate K562 5' noncoding region genomic sequence	<u>41.0</u>	41.0	28%	0.70	100%	
<u>GU574709.1</u>	Torque teno sus virus 1 isolate H407 5' noncoding region genomic sequence	<u>41.0</u>	41.0	28%	0.70	100%	
<u>GU450331.1</u>	Torque teno sus virus SH0822/2008, complete genome	<u>41.0</u>	74.7	52%	0.70	100%	

Sequences producing significant alignments: **TTV 1**

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>	<u>Links</u>
FN687869.1	TT virus group 1 5' non-coding region, isolate Holguin 2	41.0	41.0	28%	0.70	100%	
FN687867.1	TT virus group 1 5' non-coding region, isolate Ciego de Avila 07	41.0	41.0	28%	0.70	100%	

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

TTV1-F -----CGGGTTCAGGAGGCTCAAT----- 19
gi|270304338_1-330 TACACTTCCGGGTTTCAGGAGGCTCAATTTGGCTCGCTTCGCTCGCACCAC 50
gi|291197451|emb|FN687866.1| -----CGGGTTCAGGAGGCTCAATTTGGCTCGCTTCGCTCGCACCAC 42
gi|307341477_1-330 AACACTTCGGGGTTTCAGGAGGCTCAATTTGGCTCGCTTCGCTCGCACCAC 50
gi|217330858|gb|EU908707.1| -----GTTTCAGGAGGCTCAATTTGGCTCGCTTCGCTCGCACCAC 39
gi|291197448|emb|FN687863.1| -----CGGTTTCAGGAGGCTCAATTTGGCTCGCTTCGCTCGCACCAC 41
gi|291585985_1-330 TACACTTCCGGGTTTCAGGAGGCTCAATTTGGCTCGCTTCGCTCGCACCAC 50
gi|257044042|gb|GQ423427.1| -----CGGGTTCAGGAGGCTCAATTTGGCTCGCTTCGCTCGCACCAC 42
gi|307341487_1-320 TACACTTCCGGGTTTCAGGAGGCTCAATTTGGCTCGCTTCGCTCGCACCAC 50
    
```

```

TTV1-R -----AGTAAGTG 8
gi|270304338_1-330 GTAACCAATCAGAATTAAGGCGTTCCCAATACACTGTATATAAGTAAGTG 299
gi|291197451|emb|FN687866.1| -TAACCAATCAGAATTAAGGCGTTCCCTGTAAACTG-ATATAAGTAAGTG 289
gi|307341477_1-330 GTAACCAATCAGAATTAAGGCGTTCCCACTAAACTGAATATAAGTAAGTG 299
gi|217330858|gb|EU908707.1| GTAACCAATCAGAATTAAGGCGTTCCCACTAAAGTGAATATAAGTAAGTG 288
gi|291197448|emb|FN687863.1| GTAACCAATCAGAATTAAGGCGTTCCCACTAAAGTGAATATAAGTAAGTG 290
gi|291585985_1-330 GTAACCAATCAGAATTAAGGCGTGCCCACTAAAGTGAATATAAGTAAGTG 298
gi|257044042|gb|GQ423427.1| GTAACCAATCAGAATTAAGGCGTTCCCGTAAACTGTATATAAGTAAGTG 291
gi|307341487_1-320 GTAACCAATCAGATTTAGGCGGTTCCCACTAAAGTGAATATAAGTAAGTG 299
    
```

```

TTV1-R CAGTTCGGAATGGC----- 22
gi|270304338_1-330 CAGTTCGGAATGGCTGAGTTTATGCCGCCAG- 330
gi|291197451|emb|FN687866.1| CAGTTCGGAATGGC----- 303
gi|307341477_1-330 CAGTTCGGAATGGCTGAGTTTATGCCGCCAG- 330
gi|217330858|gb|EU908707.1| CAGTTCGGAATGGC----- 303
gi|291197448|emb|FN687863.1| CAGTTCGGAATGGC----- 304
gi|291585985_1-330 CAGTTCGGAATGGCTGAGTTTATGCCGCCAGC 330
gi|257044042|gb|GQ423427.1| CAGTTCGGAATGGC----- 305
gi|307341487_1-320 CAGTTCGGAATGGCTGAGTTT----- 320
    
```

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>	<u>Links</u>
HM633241.1	Torque teno sus virus 2 isolate lung3, complete genome	50.0	50.0	32%	0.002	100%	
HM633240.1	Torque teno sus virus 2 isolate lung1, complete genome	50.0	85.5	55%	0.002	100%	
HM633237.1	Torque teno sus virus 2 isolate TTV2Ln21, complete genome	50.0	85.5	55%	0.002	100%	
HM633234.1	Torque teno sus virus 2 isolate TTV2Jx2, complete genome	50.0	50.0	32%	0.002	100%	
HM633231.1	Torque teno sus virus 2 isolate TTV2Gx3-2, complete genome	50.0	89.1	57%	0.002	100%	
HM633230.1	Torque teno sus virus 2 isolate TTV2Gx2, complete genome	50.0	89.1	57%	0.002	100%	
HM633228.1	Torque teno sus virus 2 isolate TTV2Bj12, complete genome	50.0	89.1	57%	0.002	100%	
HM633227.1	Torque teno sus virus 2 isolate TTV2Bj11, complete genome	50.0	89.1	57%	0.002	100%	

Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
Accession						
HM633226.1 Torque teno sus virus 2 isolate TTV2Bj8, complete genome	50.0	50.0	32%	0.002	100%	
HM633223.1 Torque teno sus virus 2 isolate TTV2J127, complete genome	50.0	85.5	55%	0.002	100%	
HM633222.1 Torque teno sus virus 2 isolate TTV2J12, complete genome	50.0	89.1	57%	0.002	100%	
HM633221.1 Torque teno sus virus 2 isolate TTV2J11, complete genome	50.0	85.5	55%	0.002	100%	
HM633220.1 Torque teno sus virus 2 isolate TTV2Fj2, complete genome	50.0	89.1	57%	0.002	100%	
HM633218.1 Torque teno sus virus 2 isolate TTV2Bj6-3, complete genome	50.0	89.1	57%	0.002	100%	

TTV2 TCATGACAGGGTTCACCGGAA----- 21
gi|269996471|gb|GQ466173.1| TCATGACAGGGTTCACCGGAAAGGGCTGCAAAAATTACAGCTAAAACCACAA 50
gi|304435593_1-260 TCATGACAGGGTTCACCGGAAAGGGCTGCAAAAATTACAGCTAAAACCACAA 50
gi|307341632_3-260 --ATGACAGGGTTCACCGGAAAGGGCTGCAAAAATTACAGCTAAAACCACAA 48
gi|291197458|emb|FN687873.1| TCATGACAGGGTTCACCGGAAAGGGCTGCAAAAATTACAGCTAAAACCACAA 50
gi|290574448_1-310 TCATGACAGGGTTCACCGGAAAGGGCTGCAAAAATTACAGCTAAAACCACAA 50
gi|291197465|emb|FN687880.1| TCATGACAGGGTTCACCGGAAAGGGCTGCAAAAATTACAGCTAAAACCACAA 50
gi|291197461|emb|FN687876.1| TCATGACAGGGTTCACCGGAAAGGGCTGCAAAAATTACAGCTAAAACCACAA 50
gi|291197463|emb|FN687878.1| TCATGACAGGGTTCACCGGAAAGGGCTGCAAAAATTACAGCTAAAACCACAA 50
gi|257123980|gb|GQ412748.1| TCATGACAGGGTTCACCGGAAAGGGCTGCAAAAATTACAGCTAAAACCACAA 50
gi|307341617_3-270 --ATGACAGGGTTCACCGGAAAGGGCTGCAAAAATTACAGCTAAAACCACAA 48
gi|307341547_1-270 TAATGACAGGGTTCACCGGAAAGGGCTGCAAAAATTACAGCTAAAACCACAA 50

TTV2R -----TAGAGTATAT 10
gi|269996471|gb|GQ466173.1| AGAATAAGAAAAGGACCAATCAGAAACACTT--CCCCTTTTAGAGTATAT 235
gi|304435593_1-260 AGAATAAGAAAAGGACCAATCAGAAACACTT--CCCCTTTTAGAGTATAT 235
gi|307341632_3-260 AGAATAAGTAAAGGACCAATCAGAAGAACTT--CCCCTTATAGAGTATAT 233
gi|291197458|emb|FN687873.1| AGAATAATAAAAAGAACCAA-CAGAAGAACTT--CCTCTTTTAGAGTATAT 233
gi|290574448_1-310 AGAATAATAAAAAGAACCAATCAGAAGAACTT--CCTCTTTTAGAGTATAT 287
gi|291197465|emb|FN687880.1| AGAATAATAAAAAGAACCAATCAGAAGAACTT--CCTCTTTTAGAGTATAT 235
gi|291197461|emb|FN687876.1| AGAATAATAAGAGAACCAATCAGAAGAACTT--CCTCTTTTAGAGTATAT 235
gi|291197463|emb|FN687878.1| AGAATAATAAAAAGAACCAATCAGAAACACTTTACCTCTTTTAGAGTATAT 236
gi|257123980|gb|GQ412748.1| AGCATAAGTAAAGAACCAATCAGAAACACTT--CCCCTTTTAGAGTATAT 246
gi|307341617_3-270 AGCATAACTAAAAGAACCAATCAGAAACACTT--CCCCTTTTAGAGTATAT 244
gi|307341547_1-270 AGCATATTAATCAACCAATCAGAAGAACTT--CCTCTTTTAGAGTATAT 246

TTV2R AAGTAAGTGCGCAGACG----- 27
gi|269996471|gb|GQ466173.1| AAGTAAGTGCGCAGACGAATGGCTGAGTTTATGCCGCTGGTGGTAGACAC 285
gi|304435593_1-260 AAGTAAGTGCGCAGACGAATGGCTG----- 260
gi|307341632_3-260 AAGTAAGTGCGCAGACGAATGGCTG----- 258
gi|291197458|emb|FN687873.1| AAGTAAGTGCGCAGACG----- 250
gi|290574448_1-310 AAGTAAGTGCGCAGACGAATGGC----- 310
gi|291197465|emb|FN687880.1| AAGTAAGTGCGCAGACG----- 252
gi|291197461|emb|FN687876.1| AAGTAAGTGCGCAGACG----- 252
gi|291197463|emb|FN687878.1| AAGTAAGTGCGCAGACG----- 253
gi|257123980|gb|GQ412748.1| AAGTAAGTGCGCAGACG----- 263
gi|307341617_3-270 AAGTAAGTGCGCAGACGAATGGCT----- 268
gi|307341547_1-270 AAGTAAGTGCGCAGACGAATGGCT----- 270

TAMAÑO APROX: 252PB TTV2

8. REFERENCIAS

Allander T. 2008. Humman bocavirus. *J Clin Virol.* 41: 29-33.

Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung- Lindell A, Andersson B. 2005. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl AcadSci USA* 102:12891–12896.

Allan G., McNeilly F. 2006. PMWS/PCVD: Diagnosis, disease and control: what do we know? *Proceedings of the 19th IPVS congress*, p 1:1-9.

Allan GM, Kennedy S, McNeilly F, Foster JC, Ellis JA, Krakowka SJ, Meehan BM, Adair BM. 1999. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J Comp Path* 121:1-11.

Bastien N, Brandt K, Dust K, Ward D, Li Y. 2006. Human bocavirus infection, Canada. *Emerg Infect Dis* 12:848–850.

Bigarre´, L., Beven, V., de Boisseson, C., Grasland, B., Rose, N., Biagini, P.,Jestin, A. 2005. Pig anelloviruses are highly prevalent in swine herds in France. *J. Gen. Virol.* 86, 631–635.

Blomström AL, Belak S, Fossum C, McKillen J, Allan G, Wallgren P, Berg M. 2009. Detection of a novel porcine boca-like virus in the background of porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome. *Virus Res*, 146:125-129.

Blomström Anne-Lie, Sandor Belák, Caroline Fossum, John McKillen, Gordon Allan, Per Wallgren, Mikael Berg. 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, 125–129.

Calsamiglia M., Segalés J., Quintana J., Rosell C., Domingo M. 2002. Detection of Porcine Circovirus Types 1 and 2 in serum and tissue samples of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol* 40(5):1848-1850.

Caroline Fossum. 2010. Proceedings of the 21 IPVS Congress, Vancouver, Canada- July 18-21.

Carrillo-Montes Ma. Guadalupe. 2006. Torque teno virus (TTV) y sus implicaciones en la medicina transfusional. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2006; 44 (Supl 2): 95-97.

Chae C. 2005. Review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet J* 169:326-336.

Choi C, Chae C. 2000. Distribution of porcine parvovirus in porcine circovirus 2 — infected pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome as shown by in-situ hybridization. *J Comp Pathol*; 123: 302–305.

Clark LK. 1996. Epidemiology and management of selected swine reproductive diseases. *Animal Reprod. Sci.* 42:447-454.

Clavijo JA. 2007. Circovirus Porcino tipo 2 (Pcv2) en Colombia: Evaluación serológica, caracterización histopatológica de las lesiones y detección del

antígeno viral mediante inmunohistoquímica. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. p 59.

Cong, M. E., Nichols, B., Dou, X. G., Spelbring, J. E., Krawczynski, K., Fields, H. A. & Khudyakov, Y. E. 2000. Related TT viruses in chimpanzees. *Virology* 274, 343–355.

Cutler RS, Molitor TW, Leman AD. 1983. Farm studies of porcine parvovirus infection. *J Am Vet Med Assoc.*182:592-594.

Darwich L., Segalés J., Mateu E. 2004. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by porcine circovirus 2: an immune riddle. *Arch Virol.* 149:857-874.

D. Nieto, M. Aramouni, L. Grau-Roma, J. Segales, T. Kekarainen 2011. Dynamics of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) DNA loads in serum of healthy and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected pigs. *Vet Microb* 152 284-290.

Ellis JA, Bratanich A, Clark EG, Allan G, Meehan B, Haines DM, Harding J, West KH, Krakowka S, Konoby C, Hassard L, Martin K, McNeilly F. 2000. Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Vet Diagn Invest* 12:21–27.

Ellis, J., Allan, G., Krakowka, S. 2008. Effect of coinfection with genogroup 1 porcine torqueteno virus on porcine circovirus 2-associated post-weaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine. *Am. J. Vet.* 69, 1608–1614.

Enoe C., Vigre H., Nielsen EO., Botner A., Bille-Hansen V., Jorsal SE., Baekbo P. A. 2006. Danish case-control study on risk factors for PMWS – Biosecurity in the herd. Proceedings of the 19th IPVS congress, p1:163.

Falcon A, Rodríguez M, Batalla D, Camacho J, Hernández E. 1988. Aislamiento de Parvovirus porcino de fetos momificados. Tec Pec Mex 6:185-191.

Fisher, R.A. The conditions under which χ^2 measures the discrepancy between observation and hypothesis. *J. R. Stat. Soc.* 1924, 87, 442-450.

Foulongne V, Olejnik Y, Perez V, Elaerts S, Rodiere M, Segondy M (2006) Human bocavirus in French children. *Emerg Infect Dis* 12:1251–1253.

Giseli A. Ritterbusch, Camila A. Sa Rocha, Nelson Mores, Neide L. Simon, Eraldo L. Zanella, Arlei Coldebella, Janice R. Ciacci-Zanella 2012. Natural co-infection of torque teno virus and porcine circovirus 2 in the reproductive apparatus of swine. *Res Vet Sci.* Jun; 92(3):519-23.

Grupo de Microbiología y epidemiología veterinaria, Universidad Nacional de Colombia. 2008-2011 Circovirus porcino tipo 2: Epidemiología, diagnóstico, caracterización y estrategias de control para la enfermedad en Colombia. Ministerio de Agricultura de Colombia, cod 202010010941.

Harding, J., 1997. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): Preliminary epidemiology and clinical presentation. Proceedings of the American Association of Swine Practitioners 28, 503.

Harding J. 2004. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. *Vet Microbiol*; 98:131-135

Harms PA, Halbur PG, Sorden SD. Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. *J Swine Health Prod.* p. 27-30.

Hiroaki Okamoto, Masaharu Takahashi, Tsutomu Nishizawa, Akio Tawara, Katsuhiko Fukai, Umetaro Muramatsu, Yoshihisa Naito⁴ and Akira Yoshikawa. 2002. Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaia). *Journal of General Virology* 83, 1291–1297.

Hui-Wen Chang, Chian-Ren Jeng, Tsang-Long Lin, Jiuan J. Liu, Ming-Tang Chiou, Yi-Chieh Tsai, Mi-Yuan Chia, Tong-Rong Jan, Victor F. Pang. 2006. Immunopathological effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) on swine alveolar macrophages by in vitro inoculation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Volume 110, Issues 3–4, 207-219.

Inami, T., Obara, T., Moriyama, M., Arakawa, Y. & Abe, K. 2000. Full-length nucleotide sequence of a simian TT virus isolate obtained from a chimpanzee: evidence for a new TT virus-like species. *Virology* 277, 330–335.

Jelcic, I., Hotz-Wagenblatt, A., Hunziker, A., zur Hausen, H. & de Villiers, E.-M. 2004. Isolation of multiple TT virus genotypes from spleen biopsy tissue from a Hodgkin's disease patient: genome reorganization and diversity in the hypervariable region. *J Virol* 78, 7498–7507.

J. KIM, Y. HA, AND C. CHAE. 2006. Potentiation of Porcine Circovirus 2–induced Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome by Porcine Parvovirus

Is Associated with Excessive Production of Tumor Necrosis Factor- α . *Vet Pathol* 43:718–725.

J.M. Soucie, D.D. Erdman, B.L. Evatt, L.J. Anderson, T.J. Török, M. El-Jamil, E. Barnhart, M. Tepper, H.N. Burrill, A.M. Pickett, and W.L. Mengeling. 2000. Investigation of porcine parvovirus among persons with hemophilia receiving Hyate: C porcine factor VIII concentrate. *Transfusion* Jun; 40(6):708-11.

Kekarainen, T., López-Soria, S. & Segalés, J. 2007. Detection of swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 in boar sera and semen. *Theriogenology* 68, 966-971.

Kekarainen, T. Segalés, J. 2009. Torque teno virus infection in the pig and its potential role as model of human infection. *Vet. J.* 180(2): 163-8.11

Kekarainen, T., Sibila, M., Segales, J. 2006. Prevalence of swine Torque teno virus in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs in Spain. *J. Gen. Virol.* 87, 833–837.

Kennedy S, Moffett D, McNeilly F, Meehan B, Ellis J, Krakowka S, Allan GM. 2000. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. *J Comp Pathol* 122:9–24.

Kim J. Choi C, 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. Path.* 128: 52-59.

Kim J, Chung HK, Jung T, Cho WS, Choi C, Chae C. 2002. Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms. *J Vet Med Sci* 64:57–62.

Komatsu, H., Inui, A., Sogo, T., Kuroda, K., Tanaka, T. & Fujisawa, T. 2004. TTV infection in children born to mothers infected with TTV but not with HBV, HCV, or HIV. *J Med Virol* 74, 499–506.

Krakowka S, Ellis JA, Meehan B, Kennedy S, McNeilly F, Allan G. 2000. Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Vet Pathol* 37:254–263.

Kupfer B, Vehreschild J, Cornely O, Kaiser R, Plum G, Viazov S, Franzen C, Tillmann RL, Simon A, Muller A, Schildgen O. 2006. Severe pneumonia and human bocavirus in adult. *Emerg Infect Dis* 12:1614–1616.

L. A. van Leengoed, J. Vos, E. Gruys, P. Rondhuis, A Bran. 1983. Porcine Parvovirus infection: review and diagnosis in a sow herd with reproductive failure. *The veterinary quarterly* vol. 5, no.3.

Laila Darwicha, Enric Mateua. 2012. Review Immunology of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res* 164, 61– 67.

Leonor Jofré M, Virus respiratorios emergentes. ISSN 0718-3321, www.neumologia-pediatria.cl.

M. Aramouni, J. Segale´s, M. Sibila, G.E. Martin-Valls, D. Nieto, T. Kekarainen, 2011. Torque teno sus virus 1 and 2 viral loads in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and porcine dermatitis and

nephropathy syndrome (PDNS) affected pigs. *Veterinary Microbiology* 153, 377–381.

Maggi, F., Fornai, C., Zaccaro, L., Morrica, A., Vatteroni, M. L., Isola, P., Marchi, S., Ricchiuti, A., Pistello, M. & Bendinelli, M. 2001. TT virus (TTV) loads associated with different peripheral blood cell types and evidence for TTV replication in activated mononuclear cells. *Journal Medical Virology* 64, 190-194.

Martelli, F., Caprioli, A., Di Bartolo, I., Cibir, V., Pezzotti, G., Ruggeri, F.M., Ostanello, F. 2006. Detection of swine torque teno virus in Italian pig herds. *J. Vet. Med. B: Infect. Dis. Vet. Public Health* 53, 234–238.

Martínez-Guinó, L., Kekarainen, T. & Segalés, J. 2009. Evidence of Torque teno virus (TTV) vertical transmission in swine. *Theriogenology* 71, 1390-1395.

Martínez, L., Kekarainen, T., Sibila, M., Ruiz-Fons, F., Vidal, D., Gortazar, C. & Segalés, J. 2006. Torque teno virus (TTV) is highly prevalent in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Veterinary Microbiology* 118, 223-229.

Mateusen B., Maes D., Van Soom A., Lefebvre D., Nauwynck H. 2007. Effect of porcine circovirus type 2 on embryos during early pregnancy. *Theriogenology* 68:896-901.

Matsubara, H., Michitaka, K., Horiike, N., Kihana, T., Yano, M., Mori, T. & Onji, M. 2001. Existence of TT virus DNA and TTV-like mini virus DNA in infant cord blood: mother-to-neonatal transmission. *Hepatology Research* 21, 280-287.

McKeown, N.E., Fenaux, M., Halbur, P.G., Meng, X.J. 2004. Molecular characterization of porcine TT virus, an orphan virus, in pigs from six different countries. *Vet. Microbiol.* 104, 113–117.

Mengeling WL. 1992. Porcine parvovirus. En: *Leman AD, Straw B, Mengeling WL, eds. Diseases of swine. 7 ed. Ames: Iowa State University, 299-311.*

Mengeling WL. 1986. Parvovirus porcine: induced failure reproductive. En: *Howard JL. Current veterinary therapy: food animal practice, 539-540.*

Mengeling WL. 2006. Porcine parvovirus. In: *Diseases of Swine, 9th Edition. Blackwell Publishing, Ames, IA.*

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL, MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL, MINISTERIO DE COMERCIO, INDUSTRIA Y TURISMO, MINISTERIO DE HACIENDA Y CRÉDITO PÚBLICO Y MINISTERIO DE PROTECCIÓN SOCIAL. 2007. Documento Compes 3458. Consejo nacional de política económica y social. Política nacional de sanidad e inocuidad para la cadena porcícola. 42p. **BOLETÍN DE PRENSA**, Bogotá, D.C., 31 agosto de 2011.

Nauwynck H., Lefebvre D., Misinzo G., Meerts P., Mateusen B., Sanchez R., Delputte P. 2007. Pathogenesis of Porcine Circovirus 2 infections. *AASV*, p489 – 495.

Niel C, Diniz-Mendes L, Devalle S. 2005. 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* ;86:1343–7.

Niel, C., Saback, L., Lampe, E. 2000. Co-infection with multiple TTV virus strains belonging to different genotypes is a common event in healthy Brazilian adults. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1926–1930.

Nielsen E., Baekbo P., Enoe C., Hassing A., Botner A., Jorsal S., Bille-Hansen V. 2006. The effect of PMWS on productivity and clinical expression in Danish herds from a case-control study. Proceedings of the 19th IPVS congress, p159.

Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K. 1997. A Novel DNA Virus (TTV) Associated with Elevated Transaminase Levels in Posttransfusion Hepatitis of Unknown Etiology. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 241:92-97.

Nishizawa, T., Okamoto, H., Konishi, K., Yoshizawa, H., Miyakawa, Y. & Mayumi, M. 1997. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 241, 92–97.

Okamoto, H., Akahane, Y., Ukita, M., Fukuda, M., Tsuda, Y., Miyakawa, Y. & Mayumi, M. 1998. Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A-G hepatitis. *Journal Medical Virology* 56, 128-132.

Okamoto, H., Nishizawa, T., Takahashi, M., Asabe, S., Tsuda, F. & Yoshikawa, A. 2001a. Heterogeneous Distribution of TT Virus of Distinct Genotypes in Multiple Tissues from Infected Humans. *Virology* 288, 358-368.

Okamoto, H., Nishizawa, T., Takahashi, M., Tawara, A., Peng, Y., Kishimoto, J. & Wang, Y. 2001b. Genomic and evolutionary characterization

of TT virus (TTV) in tupaia and comparison with species-specific TTVs in humans and nonhuman primates. *Journal of General Virology* 82, 2041-2050.

Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Tawara, A., Fukai, K., Muramatsu, U., Naito, Y., Yoshikawa, A., 2002. Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaia. *J. Gen. Virol.* 83, 1291– 1297.

Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Tawara, A., Sugai, Y., Sai, T., Tanaka, T. & Tsuda, F. 2000b. Replicative Forms of TT Virus DNA in Bone Marrow Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 270, 657-662.

Opriessnig T., Halbur P. 2005. Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) Surveillance Study. Iowa State University Animal Industry Report:1.

Opriessnig Tanja, Patrick G. Halbur. 2012. Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease. *Virus Research* 164, 20–32.

Opriessnig T, Meng XJ, Halbur PG. 2007. Porcine circovirus type 2-associated: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest* 19:591 – 615.

Ovaldia N 1991. Outbreak of porcine parvovirus disease in Panama. *Trop Anim Health Prod.* 23:181-185.

Pallares FJ, Halbur PG, Opriessnig T et al. 2002. Porcine circovirus type 2 (PCV2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) J Vet Diagn Invest 14: 515 – 9.

Peng, Y. H., Nishizawa, T., Takahashi, M., Ishikawa, T., Yoshikawa, A. & Okamoto, H. 2002. Analysis of the entire genomes of thirteen TT virus variants classifiable into the fourth and fifth genetic groups, isolated from viremic infants. Archives of Virology 147, 21-41.

Pogranichnyy R., Harms P., Sorde S., Yoon K-J. 2001. Case-control study on the role of PCV and other swine viruses in PMWS. AASV; 517 -519.

Rico Silvia, Molina Sadoh, Pabón Francisco. 2003. Detección y aislamiento del Parvovirus porcino en Medellín, Colombia. Rev Col Cienc Pec Vol. 16: 1

Rodriguez-Arrioja G., Segalés J., Rosell C., Rovira A., Pujols J., Planadurán J., Domingo M. 2003. Retrospective Study on Porcine Circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. J Vet Med B ;50:99-101.

Royer R., Nawagitgul P., Halbur P., Paul P. 2001. Susceptibility of Porcine Circovirus type 2 to commercial and laboratory disinfectants. J Swine Health and Production 9(6):281-284.

Segalés J, Allan GM, Domingo M. 2005. Porcine Circovirus disease. Anim Health Res Rev 6: 119 – 142.

Segalés J., Belak K., Bille-Hansen V., Chae C., Ellis J., Guedes R., Kostka F, Krakowka S., Moldal T., Morvan H., Opriessnig T., Quezada M., Quiroga M. Ramos-Vara J., Ristoski T., Stockhofe-Zurwieden N., Sydler

T., Tuboly T., Cortey M. 2010. International immunohistochemistry ring trial for the detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) antigen on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *IPVS*, p316.

Segalés J., Rosell C., Domingo M, 2004. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Vet Microbiol*;98:137-149.

Shaolun Zhai , Cheng Yue, Zuzhang Wei, Jinxue Long, Duoliang Ran, Tao Lin, Yu Deng, Lv Huang, Lichang Sun, Haihong Zheng, Fei Gao. Hao Zheng, Shengnan Chen, Shishan Yuan. 2010. High prevalence of a novel porcine bocavirus in weanling piglets with respiratory tract symptoms in China. *Arch Virol* (2010) 155:1313–1317.

Shulze C, Segales J, Neumann G, Hlinak A, Calsamiglia M, Domingo M. 2004. Identification of postweaning multisystemic wasting syndrome in European wild boar (*Sus scrofa*). *Vet Rec.* 154:694-696.

Taira O, Ogawa H, Nagao A, Tuchiya K, Nunoya T, Ueda S. 2009. Prevalence of swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 in Japanese swine with suspected post-weaning multisystemic wasting syndrome and porcine respiratory disease complex. *Vet Microbiol*, 139(3-4):347-50.

Timmusk, S., Wallgren, P., Brunborg, I.M., Wikstrom, F.H., Allan, G., Meehan, B.,McMenamy, M., McNeilly, F., Fuxler, L., Belak, K., Podersoo, D., Saar, T., Berg,M., Fossum, C. 2008. Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) pre- and post-epizootic postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Virus Genes* 36 (3), 509–520).

Vigre H., Baekbo P., Jorsal E., Bille-Hansen V., Hassing A-G., Enoe C., Botner A. 2005. Spatial and temporal patterns of pig herds diagnosed with

postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) during the first two years of its occurrence in Denmark. *Vet Microbiol* 105:17-26.

Wang C., Huang T-S., Huang C-C., Tu C., Jong M-H., Lin S-Y., Lai S-S. 2004. Characterization of Porcine Circovirus type 2 in Taiwan. *J Vet Med Sci*; 66(5):469-475.

Welsh J., Bienek C., Gomperts E., Simmonds P. 2006. Resistance of Porcine Circovirus and Chicken anemia virus to virus inactivation procedures used for blood products. *Transfusion* 46(11):1951-1958.

Zhai SL, Yue C, Wei ZZ, Long JX, Ran DL, Lin T, Deng Y, Huang L, Sun LC. 2010. High prevalence of a novel porcine bocavirus in weanling piglets with respiratory tract symptoms in China. *Arch Virol*, 155:1313-1317.