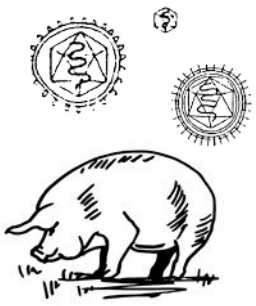
Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

Sub-área: Biología Celular y Molecular

PEDECIBA

Caracterización genética y biológica de virus porcinos emergentes circulantes en Uruguay

Lic. Natalia Ramos



Tutor: Prof. Dr. Juan Arbiza

Sección Virología. Facultad de Ciencias, UdelaR

Noviembre, 2018

«A disease/infection exists in a given region or country depending on the enthusiasm with which you are looking».

-Carlos Pijoan

«… We must have perseverance and above all confidence in ourselves. We must believe that we are gifted for something and that this thing must be attained».

-Marie Curie

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutor, Juan Arbiza por abrirme las puertas de este laboratorio hace ya 9 años, gracias por acompañarme en este camino, por todos los consejos y las enseñanzas. Muchas gracias también por la confianza y por la oportunidad de crecimiento que me has brindado en todo momento, que me ha permitido aprender y formarme paso a paso como investigadora y como docente. Gracias por tu calidad humana y el apoyo de todos los días.

También quiero agradecer a todos aquellos que me han ayudado a lo largo de estos años y han contribuido a la realización de esta tesis: a Santiago Mirazo por los constantes aportes realizados en los diferentes temas de este trabajo; a Gustavo Castro y Karina Cabrera que nos han brindado las muestras y la valoración clínica de los animales; a Paulo Roehe y Joao Pessoa que me han recibido en sus laboratorios y me han permitido aprender herramientas para el estudio de PCV2 y TTSuV; a Fernando Osorio por su valiosa colaboración en el estudio de PRRSV; a Sabina Victoria y Mariela Bolatti por su colaboración con los experimentos de citometría de flujo; a Geman Botto por su ayuda con la estadística; y a todos aquellos de la Facultad de Ciencias que me han ayudado de alguna manera y no han dudado en cederme su tiempo. Gracias a todos por haber contribuido al aprendizaje y a llevar adelante todos los obstáculos.

Gracias a Mabel, Sandra, Adriana y Ana María, por las charlas, por los viajes, por aguantarme y compartir en el día a día y más aún en este último tiempo. A todos mis compañeros de laboratorio, a los antiguos y a los nuevos, en especial a Dario, un gran amigo con el que he compartido muchas alegrías y muchas frustraciones, gracias por estar siempre y hacer del laboratorio un lugar más divertido.

A mis amigas por contenerme y llenarme de alegría siempre, en especial quiero agradecer a Julia, que siempre me ha dado una mano con mis dificultades en la computación, sin ella no se que hubiera hecho para armar esta tesis!!.

A mi familia, mis padres, mi hermana y mis abuelos, por su cariño y por su apoyo incondicional de siempre. Es muy lindo tenerlos y saber que están ahí para festejar los buenos momentos y sobrepasar los malos.

A Álvaro, mi compañero del día a día, gracias por estar ahí siempre que necesito, por bancarme en este último tiempo tan agitado, por las charlas de ciencia y por tus consejos. Gracias por darme siempre para adelante, acompañarme en la culminación de esta etapa y en el comienzo de nuevos caminos juntos.

Resumen

El Circovirus Porcino Tipo 2 (PCV2) y el Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV) son ejemplos de virus emergentes de gran importancia económica para la producción porcina a nivel mundial. Paralelamente, otros virus emergentes, como el Torque Teno Virus Porcino (TTSuV), si bien no constituyen un factor importante de preocupación para el sector productivo, revisten considerable interés por su posible impacto zoonótico y/o su eventual riesgo en potenciar el desarrollo de ciertas enfermedades del cerdo. Dado que en Uruguay no se realizan seguimientos rutinarios del estatus sanitario de los cerdos y existe un desconocimiento de la circulación de virus porcinos, esta tesis tuvo como objetivo identificar la presencia de PCV2 y TTSuV en cerdos pertenecientes a diferentes criaderos, y caracterizar a nivel molecular y biológico las cepas detectadas. Asimismo, este trabajo procuró evaluar si existe una relación sinérgica entre ambos virus (en cuanto a la frecuencia de infección y carga viral) que eventualmente potencie la patogenicidad. A su vez, se tuvo como objetivo investigar la presencia de PRRSV en cerdos de diferentes regiones del país, un virus que provoca serias patologías en cedos y forma parte de la lista de enfermedades del Código Sanitario para los Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).

Los principales hallazgos de esta tesis consisten en la identificación de PCV2 desde al menos el año 2010 en cerdos del Uruguay, lo cual significó el inicio de la vacunación contra este virus en el país. Paralelamente, se evidenció la presencia de PCV2 en jabalíes en una alta frecuencia de infección, lo cual sugiere a la población salvaje como reservorio de la enfermedad para el cerdo doméstico. Se obtuvieron 22 genomas completos y 40 cepas fueron caracterizadas a nivel genético. Se identificó la circulación de una cepa recombinante, no reportada en ninguna otra región, que resultó ser predominante en muestras de cerdo recolectadas en los años 2010-2014. Posteriormente, se caracterizó a nivel molecular una cepa mutante (PCV2d), potencialmente más virulenta que las cepas clásicas PCV2a/2b, la cual comenzó a circular globalmente a partir del año 2012. Esta cepa fue identificada en Uruguay por primera vez en el año 2013 y se sugiere, que culminó reemplazando a la cepa recombinante. Para conocer diferencias biológicas entre las diferentes cepas identificadas se comparó la localización sub-celular y la función apoptótica *in vitro* de ORF3, una proteína de PCV2 que ha sido asociada con la patogenicidad viral. No se observaron diferencias

sustaciales entre la cepa mutante y las cepas clásicas, y se especula que los cambios genéticos observados en PCV2d, no necesariamente implican cambios en la virulencia de esta cepa, sino simplemente un mecanismo que tiene el virus de evadir la respuesta inmune del hospedero. Asimismo, en esta tesis se abordaron diferentes estrategias para el aislamiento de una cepa recombinante de PCV2 y se realizó un trabajo preliminar sobre el desarrollo de una vacuna contra el virus.

Por otro lado, se detectó una alta frecuencia de infección de TTSuV (TTSuV1 y TTSuV2ka) tanto en cerdo doméstico como en jabalí y una gran heterogeneidad genética entre las cepas identificadas (27 cepas caracterizadas). Además, se evidenció una alta frecuencia de co-infección con PCV2. Si bien se ha considerado que estos virus pueden potenciar el desarrollo de ciertas enfermedades del cerdo, sobre todo en co-infección con PCV2, en este trabajo se observó una clara independencia entre la infección con PCV2 y la infección con TTSuV. De hecho, no se identificó una correlación entre la carga viral de TTSuV1 o TTSuVk2a con el estatus de infección por PCV2, sintomatología o edad. Dada su distribución ubicua y falta de asociación significativa con PCV2 o con el estatus sanitario de los cerdos se plantea un posible rol de TTSuV como componentes de la microbiota o “viroma” del hospedero.

Por último, se evidenció la circulación de PRRSV en Uruguay desde al menos el año 2011, lo cual fue inesperado debido a que los países limítrofes no han reportado la enfermedad y significó un impacto importante tanto para la producción porcina regional como mundial. Se identificó que la cepa circulante es del tipo Americano y se logró adaptar a cultivo celular cepas de campo colectadas en los años 2013, 2014 y 2016.

Esta tesis permitió avanzar en la comprensión de la epidemiología molecular de estos virus emergentes porcinos en Uruguay. Se considera que el conocimiento generado desde diversos enfoques y el trabajo multidisciplinario son fundamentales para la prevención y vigilancia de la salud animal, lo que contribuirá a una mejora de la producción porcina nacional.

Lista de abreviaturas

aa: aminoácidos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADV: Virus de la enfermedad de Aujeszky

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARNm sg: ARN mensajero subgenómico

BLAST: Herramienta básica de búsqueda de alineamiento local

BSA: Albúmina de suero bovino

CSFV: Virus de la Peste Porcina Clásica

Ct: Ciclo umbral

DIA: División Industria Animal

DIEA: Dirección de Estadísticas Agropecuarias

DILAVE: División Laboratorios Veterinarios

DMV: vesículas de membrana doble

DO: Densidad óptica

dpi: días post-infección

DSA: División Sanidad Animal

DTT: Ditiotreitol

EE: Epidermitis exudativa

ELISA: Ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas

GFP: Proteína verde fluorescente

ICTV: Comité Internacional de Taxonomía viral

IFA: Ensayo de inmunofluorescencia

INF-I: Interferón tipo 1

JUNV: Virus Junin

MGAP: Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca

mPCV2b: mutante del genotipo PCV2b o PCV2d

Nab: anticuerpos neutralizantes

NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica

NLS: Sitio de localización nuclear

nt: nucléotidos

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal

ORF: Marco abierto de lectura

PAMs: Macrófagos alveolares porcinos

pb: pares de bases

PBMC: Células mononucleares humanas de sangre periférica

PBS: Tampón fosfato salino

PBS-T: Tampón fosfato salino con Tween

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa

PCV: Circovirus Porcino

PCV1: Circovirus Porcino tipo 1

PCV2: Circovirus Porcino tipo 2

PCV3: Circovirus Porcino tipo 3

PCV2a-e: Circovirus Porcino tipo 2 de los genotipos a-e

PCV2-ED: Enfermedad Entérica asociada a PCV2

PCV2-LD: Enfermedad Respiratoria asociada a PCV2

PCV2-RD: Enfermedad Reproductiva asociada a PCV2

PCV2-SD: Enfermedad Sistémica asociada a PCV2

PCVAD: Enfermedades asociadas a PCV2

PDNS: Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina

PK-15: Líneas celular de riñón de cerdo

PMWS: Síndrome del Desmedro Multisistémico Postdestete

PRDC: Enfermedad del complejo respiratorio porcino

PRRS: Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino

PRRSV: Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino

PRRSV-1: Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino tipo 1 o europeo

PRRSV-2: Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino tipo 2 o americano

qPCR: PCR cuantitativa

RCA: Amplificación por círculo rodante

RCR: Mecanismo de replicación de círculo rodante

RT: Transcripción reversa

RTC: Complejo de replicación y transcripción de PRRSV

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SFB: Suero fetal bovino

SIV: Virus de la Influenza Porcina

SK: Línea celular de riñón de cerdo

s/s/a: sustituciones por sitio por año

ST: Línea celular de testículo de cerdo

TA: Temperatura ambiente

TMRCA: Tiempo estimado del antepasado común más reciente

TRS: Secuencias reguladoras de la transcripción

TTSuV: Torque Teno Virus Porcino

TTSuV1: Torque Teno Virus Porcino tipo 1

TTSuVk2a: Torque Teno Virus Porcino tipo k2a

TTSuVk2b: Torque Teno Virus Porcino tipo k2b

TTV: Torque Teno Virus

TTVh: Torque Teno Virus Humano

UTR: Región no codificante

VLP: Partículas de tipo viral

Tabla de contenidos

Agradecimientos I

Resumen II

Lista de abreviaturas IV

1. Introducción general 1
1.1. Virosis emergentes porcinas 1
1.2. Situación del sector porcino en Uruguay 4
1.3. Situación de las principales virosis emergentes porcinas en la región 6
1.4. Situación de las virosis emergentes porcinas en Uruguay 7

2. Hipótesis de trabajo 8

3. Objetivo general 9

4. Parte I. Estudio de PCV2 en Uruguay. 10
4.1. Revisión bibliográfica 10
4.1.1. Taxonomía viral y características generales. 10
4.1.2. Historia y distribución actual. 10
4.1.3. Enfermedades asociadas a PCV2 y transmisión. 12
4.1.4. Patogenia y ciclo replicativo 13
4.1.5. Genotipos de PCV2 16
4.1.6. Organización genómica de PCV2 17
4.1.7. Dinámica evolutiva de PCV2 23
4.1.8. PCV2 en jabalí 28
4.2. Objetivos específicos parte I 29
4.3. Capítulo 1. Detección molecular de PCV2 en lechones con EE en Uruguay. 30
ARTÍCULO I 32
4.4. Capítulo 2. Evidencia de circulación de cepas de PCV2 recombinantes en Uruguay. 39
ARTÍCULO II 41
4.5. Trabajo complementario. Identificación de cepas recombinantes de PCV2 en Chile. 55
4.6. Capítulo 3. Detección de una cepa PCV2b mutante (mPCV2b-PCVd) en Uruguay. 63
ARTÍCULO III 66
4.7. Capítulo 4. Estudio molecular de PCV2 en cerdos domésticos y jabalíes en Uruguay entre los años 2010 a 2014: predominio de circulación de cepas recombinantes 72
ARTÍCULO IV 76
4.8. Anexo 1 capítulo 4. Detección molecular de PCV2 en pecarí (*Pecari tajacu*) en Uy 89
4.8.1. Introducción 89
4.8.2. Muestras y metodología 89
4.8.3. Resultados y discusión. 90
4.9. Anexo 2 capítulo 4. Identificación de deleción en el gen *rep* de una cepa de PCV2 detectada en jabalí 93
4.9.1. Introducción 93
4.9.2. Muestras y metodología 93
4.9.3. Resultados y discusión 93
4.10. Capítulo 5. Localización intracelular y función apoptótica *in vitro* de la proteína *ORF3* de una cepa PCV2d. 98
ARTÍCULO V (en preparación) 100
4.11. Capítulo 6. Evaluación de diferentes estrategias para el aislamiento de una cepa de campo de PCV2 en cultivos celulares. 127
4.11.1. Introducción 127

4.11.2. Estrategia implementada y resultados obtenidos 128
4.11.3. Discusión. 138
4.12. Capítulo 7. Expresión de un fragmento de la cápside de PCV2 en un sistema de presentación de antígeno al sistema inmune basado en las propiedades de auto-brotación de la proteína Z del virus Junin como plataforma para el desarrollo de una vacuna contra PCV2. 140
4.12.1. Introducción 140
4.12.2. Estrategia metodológica y resultados obtenidos 142
4.12.3. Discusión 148
5. Parte II. Estudio de TTSuV en Uruguay 152
5.1. Revisión bibliográfica 152
5.1.1 Taxonomía viral y características generales 152
5.1.2 Descubrimiento de TTSuV y distribución actual. 153
5.1.3. Asociación con la enfermedad en el cerdo y transmisión 153
5.1.4 Patogenia 154
5.1.5. Organización genómica 156
5.1.6. Variabilidad genómica 159
5.1.7. Importancia de los TTV en la salud pública 160
5.2. Objetivos específicos parte II 162
5.3. Identificación de una elevada frecuencia de infección y una gran heterogeneidad genética de TTSuV1 y TTSuVk2a en cerdos domésticos y jabalíes, infectados y no infectados con PCV2, en Uruguay. 163
ARTÍCULO VI 170
5.4. Trabajo complementario. Detección y caracterización molecular de TTVh en Uy 185
6. Parte III. Estudio de PRRSV en Uruguay 192
6.1. Revisión bibliográfica 192
6.1.1 Taxonomía viral y características generales 192
6.1.2. Descubrimiento y distribución actual 192
6.1.3. Enfermedades asociadas y transmisión. 194
6.1.4 Organización genómica y proteínas virales. 195
6.1.5. Patogenia y ciclo replicativo 198
6.1.6. Variabilidad genética y vacunas actuales 202
6.2. Objetivos específicos parte III 205
6.3. Primer reporte de infección por PRRSV en cerdos del Uruguay 206
ARTÍCULO VII 211
6.4. Anexo. Evidencia serológica de SIV en cerdos del Uruguay 222
7. Conclusiones y perspectivas 224
8. Referencias 231

1. Introducción general

1.1. Virosis emergentes porcinas

Según la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades emergentes son aquellas que no habían sido reportadas previamente en una población o que han existido pero están incrementando rápidamente en incidencia o rango geográfico (Segalés, 2013). Evidentemente, el surgimiento de nuevas enfermedades y la re-emergencia de enfermedades de registro histórico en una región, es un evento en el que intervienen varios factores, ya sea relativos a la sanidad animal, producción de alimentos, atención médica y sistemas de salud, cambios en el ambiente, en el comportamiento del ser humano y en la adaptación de los microorganismos (Morse, 1995). De hecho, la mayor parte de los patógenos han existido por un largo tiempo pero solo se vuelven detectables al desarrollar ciertas habilidades en respuesta a influencias externas, resultando así en su predominancia en el ecosistema a expensas de la salud pública veterinaria o humana (Skovgaard, 2007).

Durante los últimos 20-30 años, junto al rápido crecimiento a nivel mundial de la industria porcina han aumentado en número e importancia diversas enfermedades emergentes infecciosas que afectan a los cerdos, las cuales se han visto favorecidas principalmente por los sistemas de cría intensiva y por el comercio internacional (Segalés, 2013). Si bien la naturaleza de los agentes infecciosos que afectan a los cerdos es variada (bacterias, hongos, helmintos, protozoarios, virus), nos centraremos en los virus, que de hecho según algunos autores, representan a la mayoría de los agentes causantes de enfermedades emergentes (Cleaveland et al., 2001).

Hace varias décadas atrás, las enfermedades más importantes que afectaban a los cerdos eran de carácter “uni-factorial”, aquellas en las que solo la presencia de un agente infeccioso es suficiente para desencadenar la enfermedad y generar pérdidas significativas en la producción. Algunos ejemplos son las enfermedades causadas por el virus de la Peste Porcina Clásica (CSFV, por sus siglas en inglés), el virus de la Peste Porcina Africana, virus de la Diarrea Epidémica Porcina, virus de la Fiebre Aftosa y el virus de la enfermedad de Aujeszky (ADV, por sus siglas en inglés). En general, estas enfermedades han sido controladas en

varios países debido a programas de vacunación o planes de erradicación. Sin embargo, siguen siendo de gran interés para los productores y autoridades sanitarias ya que muchas veces han re-emergido en diferentes áreas del mundo, ya sea en un área geográfica donde no habían estado con anterioridad o en zonas donde habían sido erradicadas (Segalés, 2013).

Por otro lado, en la actualidad, las enfermedades denominadas "multi-factoriales" poseen una importancia creciente a nivel mundial. En este tipo de enfermedades, la mera presencia del agente infeccioso no es suficiente para desencadenar la enfermedad y otros factores como el sistema de producción, el manejo sanitario, las infecciones concomitantes y el background genético, género, edad y sistema inmune de los animales juegan un papel preponderante en la expresión de la enfermedad. El Circovirus Porcino Tipo 2 (PCV2, por sus siglas en inglés) y el virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV, por sus siglas en inglés) son dos claros ejemplos de virus emergentes porcinos que están asociados a enfermedades de carácter multi-factorial. De hecho, hoy en día tanto el Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS, por sus siglas en inglés) como la Enfermedad Sistémica asociada a PCV2 (PCV2-SD, por sus siglas en inglés) son las dos enfermedades de mayor impacto económico global para la industria porcina (Osorio, 2010; Segalés, 2013).

Finalmente, existe una última categoría de agentes infecciosos, que su implicancia en el desarrollo de enfermedades en el cerdos es limitada o incierta. Muchos de estos agentes, como el virus de la Hepatitis E, si bien es asintomático en el cerdo, constituye un factor de riesgo de gran interés para la salud pública debido a su posible transmisión zoonótica, la cual puede contribuir a una continua propagación del virus (Meng, 2012). Asimismo, otros virus como el Retrovirus Endógeno Porcino y el Herpesvirus Linfotrópico Porcino son motivo de preocupación en xeno-trasplantes humanos con órganos, tejidos y células de cerdo (Abrahante et al., 2011). Por último, otro ejemplo que pertenece a esta categoría, es el Torque Teno sus virus (TTSuV, por sus siglas en inglés), que si bien su rol como patógeno continúa siendo debatido, ha sido considerado como agente co-factor en el desarrollo de enfermedades del cerdo, especialmente las asociadas a PCV2 (Kekarainen et al., 2006; Ellis et al., 2008; Aramoundi et al 2011; Segalés, 2013). En la Tabla 1.1 se detallan las virosis emergentes de

identificación más reciente. Cabe resaltar, que los virus que poseen un impacto evidente en el sector productivo como PRRSV y PCV2, son extensamente estudiados, mientras que la mayoría de las virosis agrupadas en la última categoría descripta reciben menor atención por parte de los científicos y en general, su biología, epidemiología y patogenicidad permanecen desconocidas (Meng, 2012).

Tabla 1.1 Virosis emergentes porcinas

Virus	Familia	Año de emergencia	Potencial Zoonótico	Enfermedad clínica en el cerdo
Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino	*Arteriviridae*	1991	No	Enfermedad respiratoria en lechones y reproductiva en madres
Circovirus Porcino Tipo 2	*Circoviridae*	1997	No	PCVAD, PCV2-SD
Virus de la Hepatitis E	*Hepeviridae*	1997	Si	Subclínico
Virus de Menangle	*Paramyxoviridae*	1997	Si	Enfermedad reproductiva
Retrovirus Endógeno Porcino	*Retroviridae*	1997	No	Desconocida
Torovirus Porcino	*Coronaviridae*	1998	Desconocido	Posiblemente diarrea
Sapovirus Porcino	*Caliciviridae*	1999	Posiblemente	Diarrea
Herpesvirus Linfotrópico Porcino	*Herpesviridae*	1999	No	Desconocido pero relacionado a ELP
Virus Nipah	*Paramyxoviridae*	1999	Si	Enfermedad respiratoria y síndrome neurológico
Torque Teno sus virus	*Aneloviridae*	2002	Desconocido	Desconocida. Asociado a PCV2-SD y otras PCVAD.
Virus Bungowannah	*Flaviviridae*	2007	Desconocido	Síndrome Myocarditis Porcina
Kobuvirus porcino	*Picornaviridae*	2008	Desconocido	Desconocido
Bocavirus porcino	*Parvoviridae*	2008	Desconocido	Desconocido
Virus pandémico H1N1*	*Orthomyxoviridae*	2009	Si	Subclínico. Enfermedad respiratoria
Deltacoronavirus Porcino**	*Coronaviridae*	2014	Desconocido	Diarrea
Circovirus Porcino Tipo 3***	*Circoviridae*	2016	Desconocido	Desconocido. Asociado a PCVAD

PCVAD, por sus siglas en inglés, Enfermedades asociadas al Circovirus Porcino Tipo 2; PCV2-SD, por sus siglas en inglés, Enfermedad sistémica asociada a Circovirus Porcino Tipo 2; ELP, Enfermedad linfoproliferativa post-transplante. Extraído de Meng, 2012. *Información extraída de Torremorell et al., 2012. ** Información extraída de Wang et al., 2014. *** Información extraída de Franzo et al., 2018.

Si bien se especula que solo se conoce el 5 % de los virus que existen en la naturaleza, un número creciente de agentes virales se descubren año a año (Segalés, 2013). Probablemente, los avances en las técnicas de biología molecular en los últimos años, como la metagenómica, son responsables de este fenómeno (Blomström, 2011). Como ejemplo claro de ello, se destaca el descubrimiento en 2016 de un nuevo virus porcino denominado Circovirus Porcino Tipo 3 (PCV3) identificado por secuenciación masiva (Palinski et al., 2016). Sorprendentemente, estos virus resultaron estar genéticamente más emparentados con los Circovirus Caninos que con los Circovirus Porcinos previamente descritos (Palinski et al., 2016). Sin embargo, aún no existen datos del todo concluyentes que relacionen estrictamente este virus con una manifestación clínica en particular. Probablemente, PCV3 ha estado infectando a los cerdos desde hace ya varios años, siendo la infección subclínica su forma más común de manifestación (Franzo et al., 2018).

Por otra parte, es necesario destacar que algunas de las enfermedades virales emergentes y re-emergentes porcinas son de declaración obligatoria ante la Organización Mundial de Salud Animal (OIE), una organización inter-gubernamental encargada de mejorar la sanidad animal a nivel mundial. En la lista del año 2018 se encuentran la encefalomielitis por virus Nipah, Peste Porcina Africana, Peste Porcina Clásica, Gastroenteritis transmisible y PRRS, junto a otras enfermedades de origen no viral (OIE, 2018a).

.

1.2. Situación del sector porcino en Uruguay

Según el Censo General Agropecuario realizado por la Dirección de Estadísticas Agropecuarias (DIEA) del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP), en el año 2011 se registraron en nuestro país 8.080 explotaciones con cerdos representando el 18 % del total de explotaciones agropecuarias. Sin embargo, solo un tercio de estas explotaciones tienen producción comercial (DIEA, 2011). En general, las demás explotaciones destinan la producción al autoconsumo pudiendo realizar ventas ocasionales que permiten satisfacer necesidades básicas y/o solucionar imprevistos de las economías familiares (González y Bauza, 2009). La producción primaria (actividades de reproducción, cría y/o engorde de animales) se concentra en productores pequeños (80,8%) mientras que los productores

medianos y grandes tienen una menor participación (17,6% y 1,6% respectivamente). Los establecimientos productores se ubican mayoritariamente en la zona centro-sur del país, siendo los departamentos de mayor producción Montevideo, Canelones, San José, Soriano, Rocha y parte de Florida y Lavalleja. Uruguay no posee ningún tipo de restricción sanitaria en lo que refiere a la producción de cerdos y el comercio uruguayo de carne de cerdo es básicamente interno y se comercializa principalmente en carnicerías y supermercados (Uruguay XXI, 2013).

A nivel mundial, la industria porcina es una actividad económica relevante en muchos países, siendo la carne de cerdo, la carne roja más consumida en 2015 según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. En Uruguay, si bien no es la carne más consumida (aproximadamente el 15% del consumo total de carnes en el año 2014), la cadena porcina ha mostrado un comportamiento dinámico y un potencial de crecimiento muy importante tanto en las importaciones como en la demanda interna de productos porcinos. De hecho, el consumo por habitante creció un 54% entre 2009 y 2014 y el volumen de carne de cerdo importada por Uruguay creció de forma considerable en el período 2007-2015 (Gorga y Quintans, 2015). Según datos del año 2016 de la División Industria Animal (DIA) y de la División Sanidad Animal (DSA) del MGAP, la carne porcina, grasa y otros productos derivados que se consumen en Uruguay, provienen principalmente de la importación desde otros países con producción desarrollada, siendo Brasil el principal país de origen de las importaciones, representando el 78% del total del volumen importado, seguido por España (11%), Chile (6%) y Bélgica (5%). Otros países como Finlandia, Argentina, Estados Unidos, Dinamarca, Alemania, Noruega, Italia, Canadá y Paraguay, representan el 2% de las importaciones. Por otro lado, han sido importados animales en pie principalmente desde Argentina y semen desde España. Datos de la DSA del año 2010 también detallan importaciones de animales en pie y semen desde Australia y Holanda, respectivamente (Comunicación personal, MVD Gustavo Castro).
En contraste al aumento en la demanda de carne y productos derivados del cerdo en nuestro país, en los últimos años se ha observado una caída de la producción local de carne porcina. Según la información publicada de la DIEA del MGAP, las existencias de cerdos en Uruguay descendieron un 4% en 2015 respecto a 2011 (de 225 a 216 miles de cabezas) y un 13% en

2016 respecto al año 2015 (de 216 a 187 miles de cabezas). A su vez, la faena de suinos incluyendo el autoconsumo predial disminuyó un 5% en el año 2016 respecto al año 2015, mientras que la faena en establecimientos habilitados cayó en un 8% entre estos años (Gorga, 2017).

1.3. Situación de las principales virosis emergentes porcinas en la región

Los datos sobre la circulación de importantes virosis emergentes en la región son limitados, más aún en el contexto previo a la realización de esta tesis. Si bien se consideraba que PCV2 estaba ampliamente distribuido a nivel mundial (Segalés et al. 2005), la circulación de este virus se conocía únicamente en Brasil, Argentina y Chile. En Brasil, PCV2 fue detectado en material de archivo desde 1988 (Ciacci-Zanella et al., 2006), sin embargo, los primeros casos de PCV2-SD fueron identificados por primera vez en el año 2000 (Ciacci-Zanella y Mores, 2000). Por otro lado, en Argentina, se detectó la presencia de PCV2 en muestras de cerdos con sintomatología compatible a las PCVAD recolectadas entre los años 2003-2008 (Pereda et al., 2011). Finalmente, los únicos datos que se conocían de PCV2 en Chile correspondían a 4 secuencias del gen de la cápside viral depositadas en la base de datos del GenBank las cuales fueron detectadas en planteles de producción intensiva ubicados en la zona central de Chile (Noriega et al., 2007). Por otro lado, la circulación de otros virus emergentes porcinos como TTSuV era desconocida en la mayoría de los países Sudamericanos, existiendo algunos reportes en Brasil (de Arruda Leme et al., 2012; de Castro et al., 2012). Con respecto a los antecedentes sobre virus de notificación obligatoria, según datos de la OIE del año 2013 los países de América del Sur en donde se había reportado alguna vez la circulación de PRRSV eran Chile, Perú, Venezuela, Bolivia y Colombia. Particularmente en Chile, fue detectado por primera vez en el año 1999, y fue erradicado en el 2009. Sin embargo, en el año 2013 fue identificado un nuevo brote de la enfermedad (Neira et al., 2017). Asimismo, otros virus porcinos como CSFV fueron detectados en Brasil hasta el año 2009 y ADV, en Brasil y Argentina hasta el año 2012 (OIE, 2013).

1.4. Situación de las virosis emergentes porcinas en Uruguay

Prácticamente, no existen antecedentes en relación al monitoreo de virosis emergentes porcinas en Uruguay. Los últimos relevamientos serológicos de virus de alto impacto sanitario fueron realizados por la División Laboratorios Veterinarios (DILAVE), MGAP entre los años 1998 y 2000. Estos estudios evaluaron la presencia de anticuerpos contra PRRSV, ADV y CSFV y resultaron negativos en todos los casos (Comunicación personal, MVD Gustavo Castro). Por lo tanto, no se conoce la situación actual sobre la circulación de estas virosis emergentes ni de otras también importantes para el sector porcino como PCV2 o Influenza Porcina (SIV, por sus siglas en inglés).

El dinámico crecimiento del sector porcino en Uruguay claramente exige la existencia de un adecuado sistema de control sanitario que potencie al sector. A su vez, el aumento registrado de las importaciones en Uruguay en los últimos años implican un riesgo para el estatus sanitario de los cerdos de nuestro país, ya que evidentemente el comercio internacional globalizado es un factor que predispone la aparición de enfermedades emergentes (Cortey et al., 2012). Por lo tanto, investigaciones centradas en el conocimiento de la circulación de virosis emergentes que afectan a los cerdos son de gran necesidad e importancia para el país, sobre todo porque en Uruguay no se realizan estudios de virus porcinos de forma rutinaria y sostenida.

2. Hipótesis de trabajo

Como hipótesis de trabajo se sostiene que dada la distribución ubicua de PCV2 y TTSuV a nivel mundial, estos virus circulan ampliamente en las poblaciones de cerdos de Uruguay, pero la falta de normas de vigilancia de rutina e investigaciones dedicadas al estudio de estas virosis en nuestro país, hacen que se desconozca el real impacto que tienen estas infecciones. Lo mismo ocurre a nivel Sudamericano, donde la información sobre la circulación de estos patógenos y otros virus porcinos todavía es muy escasa, lo que aumenta el potencial daño sanitario generado ante una eventual emergencia. Asimismo, la aplicación prevista en esta tesis de una batería de metodologías y técnicas adaptadas a estos virus en el país, permitirá avanzar en la comprensión de su biología y epidemiología molecular. Esto redundará en una mejora del manejo sanitario de los cerdos a través de un conocimiento generado desde diversos enfoques.

En el caso de PRRSV, ya que la vigilancia a nivel mundial se encuentra más controlada (enfermedad denunciable ante la OIE) y dado que en los países limítrofes no se ha reportado la enfermedad, las posibilidades de identificar casos positivos en el país son menores. Sin embargo, la re-emergencia de PRRSV en Chile significa una alerta para los países de la región. Por lo tanto, el monitoreo de la circulación del virus ya sea mediante la identificación de anticuerpos y la optimización de un sistema de detección molecular, será realmente muy importante en nuestro país, contribuyendo a controlar de forma más rápida un potencial brote de la enfermedad ante la aparición de síntomas clínicos sospechosos.

3. Objetivo general

Esta tesis tiene como objetivo general investigar la presencia de PCV2, TTSuV y PRRSV, con el fin de evaluar el estatus sanitario de los cerdos domésticos y jabalíes del Uruguay en relación a estas virosis emergentes porcinas. A su vez, se pretende caracterizar a nivel genético y biológico las cepas detectadas. Esto último implica, por un lado, identificar los genotipos circulantes y evaluar su relación filogenética con cepas regionales y extra-regionales y por otro, analizar la función *in vitro* de proteínas virales o adaptar las cepas circulantes a cultivos celulares. Por otro lado, este trabajo procura determinar si existe una relación sinérgica entre PCV2 y TTSuV, en términos de frecuencia de infección y carga viral, que eventualmente pueda potenciar el desarrollo de las PCVAD.

4. Parte I. Estudio de PCV2 en Uruguay.

4.1. Revisión bibliográfica

4.1.1. Taxonomía viral y características generales.

Los Circovirus Porcinos (PCV) son los virus más pequeños que infectan mamíferos con un diámetro menor a los 20 nm. Son virus sin envoltura viral y su cápside posee simetría icosahédrica (Fig.4.1.1). El genoma es de ácido desoxirribonucleico (ADN) circular con un tamaño menor a los 2000 nucleótidos (nt) (Tischer et al., 1982). Según el Comité Internacional de Taxonomía viral (ICTV, por sus siglas en inglés), los PCV junto con los Circovirus caninos y aviares pertenecen a la familia *Circoviridae*, género *Circovirus* (ICTV, 2017). Son virus resistentes a la inactivación por cloroformo, pH ácido y a temperaturas entre 56 ºC y 70 ºC durante 15 min (Allan et al., 1994).

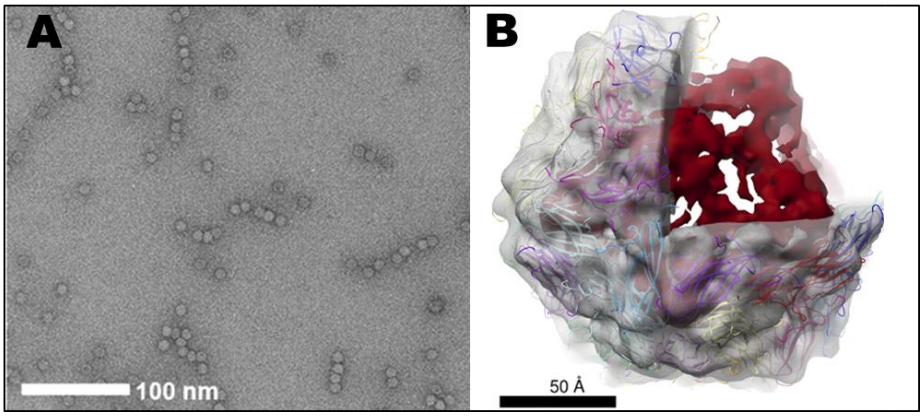


Figura 4.1.1. Estructura de PCV2. A) Microscopía electrónica de transmisión con tinción negativa en donde se observan las partículas virales. B) Corte superficial de la cápside (gris transparente) que contiene las subunidades estructurales (diagrama en cinta) y el ácido nucleico empaquetado (rojo). Extraído con modificaciones de Khayat et al., 2011

4.1.2. Historia y distribución actual.

El Circovirus Porcino Tipo 1 (PCV1) fue identificado a principios de los años 70 como un virus contaminante de algunas líneas celulares de riñón de cerdo, las células PK-15 (ATCC-CCL33) (Tischer et al., 1974). Posteriormente, fue demostrado que este virus no causaba enfermedad en cerdos infectados (Tischer et al., 1986). A principios de los años 90 en Canadá, emergió una nueva enfermedad en cerdos denominada Síndrome del Desmedro Multisistémico Postdestete (PMWS, por sus siglas en inglés) (Clark, 1996; Harding 1996), y desde entonces es una de las

principales enfermedades emergentes de gran impacto económico para la industria porcina a nivel global. Durante unos pocos años, el PMWS permaneció sin causa conocida, hasta que en el año 1998, PCV2 fue identificado como el principal agente etiológico de esta enfermedad. El análisis de su genoma reveló un 70% de identidad de secuencia nucleotídica con el virus no patogénico anteriormente descrito, PCV1 (Ellis et al., 1998; Hamel, et al., 1998; Meehan et al., 1998). Más tarde, PCV2 fue también relacionado con otros síndromes y enfermedades que afectan al cerdo, incluidos bajo el término PCVAD (Opriessnig et al., 2007).

Actualmente, se considera que PCV2 es un virus ubicuo que se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial (Grau-Roma et al., 2011). Incluso, a pesar de que ha sido descubierto hace 20 años, análisis retrospectivos de muestras de archivo mostraron evidencia de su circulación desde 1962 en Europa (Jacobsen et al., 2009) y desde 1973 en América (Ramírez-Mendoza et al., 2009). Dado el carácter multi-factorial de las PCVAD, su diagnóstico se basa no solamente en la detección del virus sino que también en la identificación de síntomas compatibles y lesiones histopatológicas características (Larochelle et al., 2003). Es por ello, que si bien el PMWS ha sido descrito en países de todos los continentes, aún existen lugares en los cuales la infección está presente pero el proceso clínico no ha sido aún descrito (Fig.4.1.2).

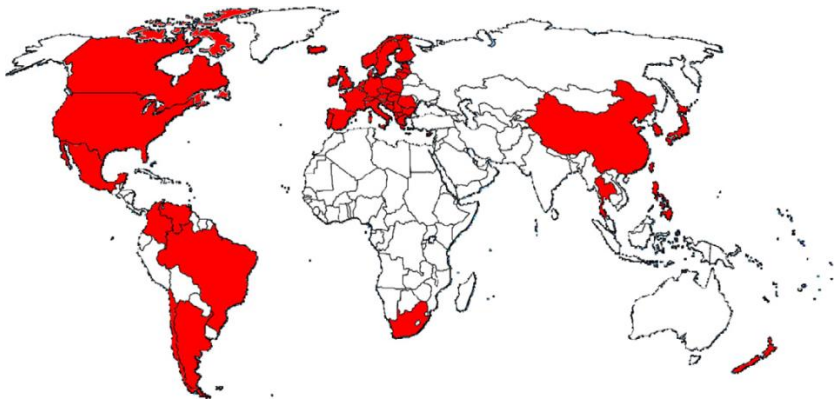


Figura 4.1.2. Países en los que se ha diagnosticado el PMWS. Extraído de Grau-Roma et al., 2011.

4.1.3. Enfermedades asociadas a PCV2 y transmisión.

El PMWS, actualmente denominado PCV2-SD, ocasiona una alta mortalidad en cerdos de 2 a 4 meses y una considerable reducción del rendimiento productivo (Chae, 2005). El desmedro, retraso en el crecimiento, palidez en la piel, dificultad respiratoria o diarrea y linfoadenopatía generalizada son algunos de los signos clínicos más frecuentes (Allan y Ellis, 2000). El diagnóstico histopatológico revela depleción moderada a severa de linfocitos con inflamación granulomatosa de los tejidos linfoides y la carga viral de PCV2 es moderada a alta en los tejidos dañados (Segalés, 2012)

Las PCVAD también incluyen: Enfermedad Respiratoria (PCV2-LD, por sus siglas en inglés); Enfermedad Entérica (PCV2-ED, por sus siglas en inglés); Enfermedad Reproductiva (PCV2-RD, por sus siglas en inglés) y Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina (PDNS, por sus siglas en inglés). La presentación clínica típica de la PCV2-LD es la disnea o dificultad respiratoria. En general se observa una neumonía proliferativa necrotizante y una ausencia de lesiones en tejido linfoide con una elevada a moderada carga viral en el pulmón. Por otro lado, en la PCV2-ED el signo clínico principal es la diarrea. El diagnóstico histopatológico revela una enteritis granulomatosa con depleción linfocitaria con inflamación granulomatosa en placas de Peyer y el animal presenta una moderada a elevada cantidad del virus en la mucosa intestinal. En el caso de la PCV2-RD, los signos más comunes son los abortos y la aparición de fetos momificados. Los retornos al estro son regulares y se puede detectar una elevada cantidad del virus en el corazón de los fetos. Por último en el PDNS, los animales presentan pápulas y máculas rojo oscuro en la piel principalmente en extremidades posteriores y área perineal. Se observan lesiones cutáneas hemorrágicas y necrotizantes y/o riñones hinchados y pálidos (Segalés, 2012). Paralelamente, PCV2 ha sido asociado aunque esporádicamente a otras enfermedades como linfadenitis necrotizante, tremor congénito y epidermitis exudativa (EE) (Chae, 2005).

Comúnmente también pueden ocurrir infecciones subclínicas en las que no hay signos clínicos evidentes pero existe una menor ganancia media diaria de peso en los animales de la granja. En el tejido linfoide las lesiones histológicas pueden ser leves o estar ausentes y la carga viral es baja (Segalés, 2012).

PCV2 tiene la capacidad de transmitirse por una amplia variedad de rutas pero la principal es la vía oro-nasal (Rose et al., 2012). Los estudios de infección experimental han demostrado que es excretado a través de diferentes secreciones incluyendo secreciones nasales, saliva, moco traqueal, orina, heces, semen, entre otros, tanto de animales enfermos como de cerdos con infección subclínica. Sin embargo, en cerdos con PCVAD la cantidad de virus eliminado es mayor (Segalés et al., 2005).

4.1.4. Patogenia y ciclo replicativo

Es claro que el sistema inmunitario juega un rol importante en la patogenia del virus pero no es del todo evidente por qué solo un 10-30% de los cerdos infectados desarrollan PCV2-SD (Fig.4.1.3). La característica más destacada es la depleción linfocitaria que afecta tejidos linfoides primarios (timo) y secundarios (ganglio linfático, bazo, amígdalas), así como a los linfocitos circulantes. Las infecciones experimentales con PCV2 pueden reproducir la PCV2-SD, sin embargo, cuando los cerdos presentan infecciones concomitantes con otros patógenos la enfermedad es más grave. Los cerdos con PCV2-SD muestran patrones alterados de expresión de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de diversas citoquinas (Darwich et al., 2004). En particular, se ha observado un evidente rol de la IL-10 en la infección por PCV2 y probablemente, la inmunosupresión mediada por esta citoquina puede jugar un rol importante en la patogénesis viral (Darwich y Mateu, 2012).

PCV2 se puede detectar habitualmente en el citoplasma y raramente en el núcleo de células del linaje monocito / macrófago y células dendríticas, pero al parecer no son blancos eficientes para la replicación del virus sino que estarían destinados a la acumulación de antígenos virales. Incluso, se ha sugerido que PCV2 puede utilizar a estas células para su diseminación generalizada (Steiner et al., 2008; Darwich y Mateu, 2012). También se ha detectado en el citoplasma de células epiteliales de pulmón y riñón, células del endotelio vascular, células acinares y ductulares pancreáticas, células musculares lisas, hepatocitos, enterocitos y cardiomiocitos fetales (Allan y Ellis, 2000; Darwich et al., 2004). Se sugiere que en las células de origen epitelial y endotelial la replicación del virus es más eficiente y en general depende de la actividad mitótica (Steiner et a., 2008).

Por otro lado, a pesar de la marcada depleción linfocitaria (células B y T) observada en PCV2-SD no se conoce el mecanismo por el cual esto ocurre. De hecho, se ha debatido intensamente si PCV2 es capaz o no de replicarse en linfocitos. Sin embargo, existe evidencia que sostiene que el virus puede infectar linfocitos considerando los altos niveles de ARNm virales detectados. El impacto de la replicación viral en la viabilidad de los linfocitos continúa sin definirse, probablemente una combinación de procesos apoptóticos, lisis inducida por virus y otros mecanismos que aún se desconocen, pueden incidir en la depleción linfocitaria (Darwich y Mateu, 2012).

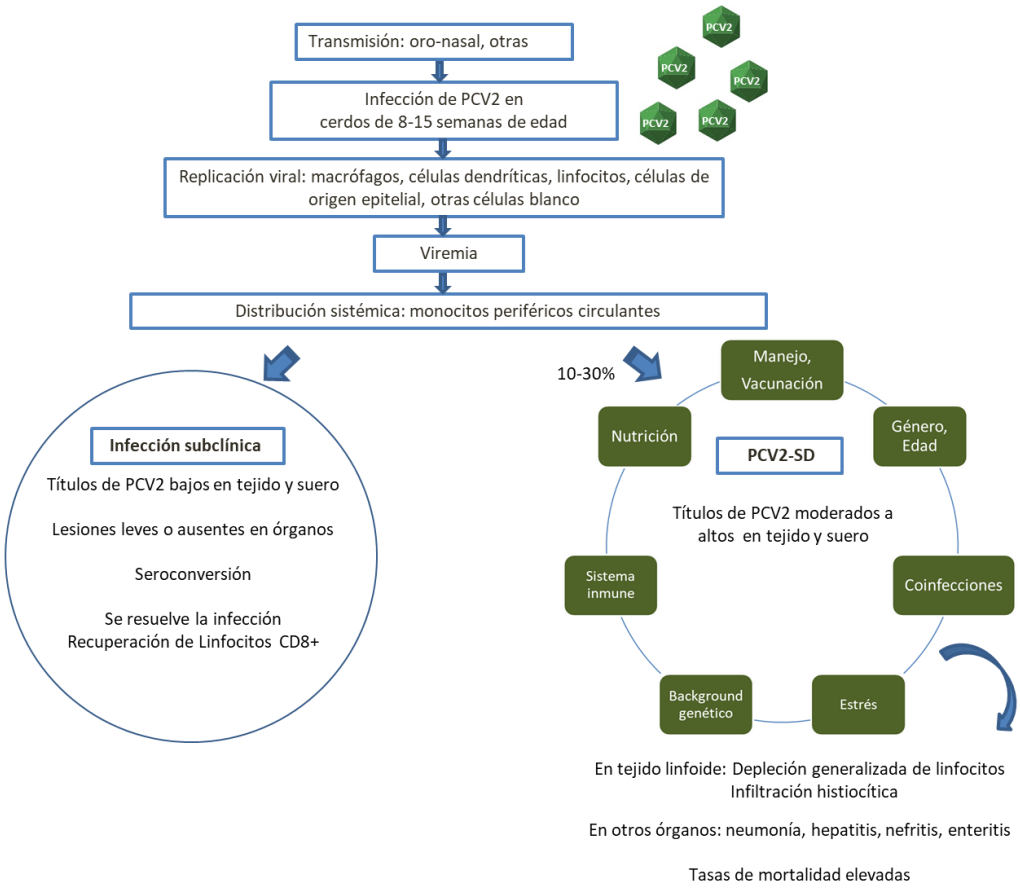


Figura 4.1.3. Modelo de patogénesis de PCV2. Tras la infección con el virus puede producirse una infección subclínica o en un 10-30% de los casos una PCV2-SD. Esto depende de una gran variedad de factores como la alimentación, el manejo sanitario, infecciones concomitantes con otros patógenos y características intrínsecas del animal. Esta enfermedad provoca una descompensación sistémica que eleva las tasas de mortalidad en la granja. Extraído con modificaciones de Darwich et al., 2004 y Opriessnig et al., 2007.

No se conoce aún con profundidad todas las etapas del ciclo de replicación de PCV2. En primer lugar, se ha reportado que PCV2 se une a los glicosaminoglicanos (heparán sulfato y condroitín sulfato B) de las células blanco (Misinzo et al., 2006). La internalización es por vía endocítica y el mecanismo depende del tipo celular (Fig.4.1.4). Se observó que el proceso de internalización mediado por clatrinas observado en líneas celulares monocíticas 3D4/31 y epiteliales no conduce a una infección productiva. En cambio, la internalización regulada por una pequeña GTPasa independiente de clatrina, caveolina y dinamina ocurre sólo en células epiteliales y conduce a una replicación más eficiente. La etapa de desnudamiento también parece ser diferente según el tipo celular. Mientras que en las líneas celulares monocíticas 3D4/31 se requiere de una acidificación de los endosomas, en las células epiteliales el desnudamiento puede ocurrir también a bajo pH (Nauwynck et al., 2012). El genoma de ADN de cadena simple se transporta al núcleo y se convierte en un intermediario replicativo de doble cadena mediante enzimas del hospedero. A partir del intermediario replicativo, ocurre la transcripción y la replicación mediante el mecanismo de replicación de círculo rodante (RCR) (ver sección 4.1.6.1). Tanto el ensamblaje como la liberación del virus de la célula son aún centro de debate (Finsterbusch y Mankertz, 2009). Un estudio *in vitro* basado en la visualización de las etapas del ciclo replicativo con microscopía electrónica, sugiere que el virus puede ser liberado por brotación, exocitosis y lisis (Rodríguez-Cariño et al., 2011).

Para el aislamiento del virus en cultivos celulares han sido utilizadas diferentes líneas celulares susceptibles a la infección por PCV2, siendo las más apropiadas las PK-15 (Tischer et al., 1982; Edwards y Sands, 1994). Debido a que las PK-15 se encuentran persistentemente infectadas con el virus no patogénico PCV1 (Tischer et al., 1974), se han utilizado otras alternativas para el aislamiento viral como las ST (testículo de cerdo) (Viancelli et al., 2012; Cruz y Araujo., 2014). Asimismo, se conoce que el tratamiento de las células infectadas con glucosamina es importante para lograr una adecuada replicación del virus (Tischer et al., 1987). Generalmente el virus no produce un efecto citopático evidente y para obtener buenos títulos virales son necesarios varios pasajes sucesivos en cultivos celulares (Allan y Ellis, 2000).

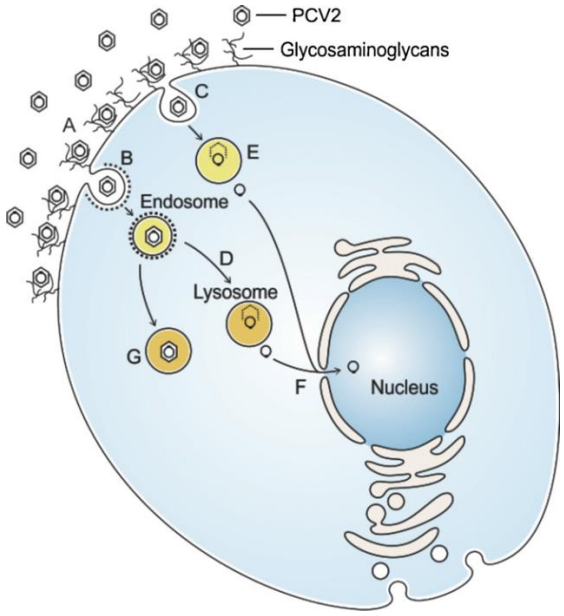


Figura 4.1.4. Esquema de las etapas de adsorción, penetración y desnudamiento de PCV2 en células blanco. A) El virus se adhiere a la superficie celular a través de los receptores de glicosaminoglicanos (Glycosaminoglycans, en inglés). B) Endocitosis mediada por clatrina. Este mecanismo se observa en células epiteliales y en líneas celulares monocíticas 3D4/31. C) Internalización por una vía independiente de clatrina, caveolina y dinamina dependiente de GTPasa y actina. Este mecanismo se observa solo en células epiteliales, el cual conduce a una replicación de PCV2 más eficiente. El desnudamiento por esta vía ocurre a bajo pH (E). En cambio el desnudamiento de PCV2 cuando ingresa por la vía mediada por clatrina requiere de la acidificación del sistema endosoma/lisosoma (endosome/lysosome, en inglés) (D). El transporte al núcleo todavía no se conoce con exactitud (F). Se ha observado que PCV2 se acumula dentro de monocitos, macrófagos y células dendríticas sin producirse la etapa de desnudamiento (G). Extraído de Nauwynck et al., 2012.

4.1.5. Genotipos de PCV2

En la actualidad, las cepas de PCV2 se pueden dividir en cinco genotipos (PCV2a, PCV2b, PCV2c, PCV2d-mPCV2b, PCV2e) basado en análisis filogenéticos. PCV2a, PCV2b y PCV2d tiene una distribución mundial y son los genotipos mayoritarios (Franzo et al., 2015a), mientras que PCV2c y PCV2e son minoritarios. PCV2c, se reportó puntualmente en Dinamarca en la década de 1980 (Dupont et al., 2008) y ha sido identificado recientemente en el Pantanal brasileño (Franzo et al., 2015b). PCV2e, ha sido reportado recientemente en EEUU y México en cepas colectadas entre los años 2006-2015 (Davies et al., 2016).

Se propuso que el tiempo de origen estimado de los principales genotipos de PCV2 fue al principio del siglo XX (Firth et al., 2009) o entre la mitad del XIX y primera mitad del siglo XX

(Franzo et al., 2016a). PCV2a demostró ser el genotipo más antiguo, con un tiempo estimado del antepasado común más reciente (TMRCA, por sus siglas en inglés) en 1966 (1945-1983) (Firth et al., 2009) o 1964 (1948-1974) (Franzo et al., 2016a). Justamente, la primera detección de cepas de PCV2 se remonta al año 1962 siendo del genotipo PCV2a (Jacobsen et al., 2009). Para PCV2b, el TMRCA se ha estimado en 1989 (1980-1995) (Firth et al., 2009) o 1973 (1952-1996) (Franzo et al., 2016a). La primera cepa PCV2b fue identificada en 1979 en Suiza (Wiederkehr et al., 2009). Para PCV2d, se estimó que el TMRCA fue 1986 (1971-1996) basado en el análisis del genoma completo, siendo similar a PCV2b, lo que indica que PCV2d y PCV2b pueden haberse bifurcado temprano y evolucionado de forma independiente (Xiao et al., 2015). Hasta el momento, la cepa PCV2d más antigua disponible en la base de datos del GenBank fue detectada en 1999 en Suiza (Xiao et al., 2016).

Si bien actualmente se encuentra en desuso, la clasificación descripta por Olvera et al. (2007) divide a los genotipos clásicos PCV2a y PCV2b en subtipos. PCV2a comprende 5 subtipos (2A-2E) y el genotipo PCV2b, 3 subtipos (1A-1C) (Olvera et al., 2007). Esta clasificación permite observar la gran variabilidad existente entre las cepas de PCV2 siendo el genotipo más antiguo el que presenta una mayor diversidad.

4.1.6. Organización genómica de PCV2

Según el sistema de clasificación basado en ácido nucleico viral ideado por David Baltimore, PCV2 se clasifica dentro del Grupo II (Baltimore, 1971), ya que posee un genoma de ADN monocatenario circular ambisense. El genoma viral posee una longitud variable entre 1767-1777 nt con tres marcos abiertos de lectura principales (ORFs) denominados ORF1, ORF2 y ORF3 (Fig.4.1.5A). En algunos casos se han identificado cepas con genomas de 1766 nt producto de deleciones en regiones no codificantes (Guo et al., 2010).

El ORF1 (gen *rep*) se extiende entre los nucleótidos 51 al 995 (hebra sentido o positiva) y codifica para un complejo proteico que interviene en la replicación. La ORF2 (gen *cap*) codifica la proteína de la cápside y se transcribe en la hebra anti-sentido o negativa. La longitud de este gen varía según el genotipo de 702 a 717 nt (ver sección 4.1.6.2). Los extremos 5´ de estos ORFs están separados por la región inter-génica que contiene el origen de replicación (Ori-Ri)

y las terminaciones 3´ están separadas por una región inter-génica más corta (Ri_C) (Lv et al., 2014). El ORF3 se localiza solapado completamente a ORF1 y se transcribe en sentido contrario, extendiéndose entre los nucleótidos 671 al 357. Este gen codifica para una proteína no estructural proapoptótica que se considera que podría estar implicada en la patogénesis viral (Liu et al., 2005; Liu et al., 2006).

Otros ORFs, como ORF4 y ORF5, han sido recientemente identificados, aunque más estudios son necesarios para una mejor comprensión de sus posibles funciones. El gen ORF4 se encuentra solapado a ORF3 y orientado en la misma dirección con aproximadamente 180 nt en longitud (nt 565-386). Se observó que codifica para una proteína putativa que no es esencial para la replicación, pero aparentemente podría tener un rol anti-apoptótico y modulador del sistema inmune del hospedero mediante la regulación de linfocitos CD4+ y CD8+ durante la infección viral (He et al., 2013). Por otro lado, ORF5 codifica para una proteína putativa también no esencial para la replicación viral pero desempeña probablemente un papel importante en la infección persistente de PCV2 mediante la regulación de la vía de señalización NF-κB (Lv et al., 2015).

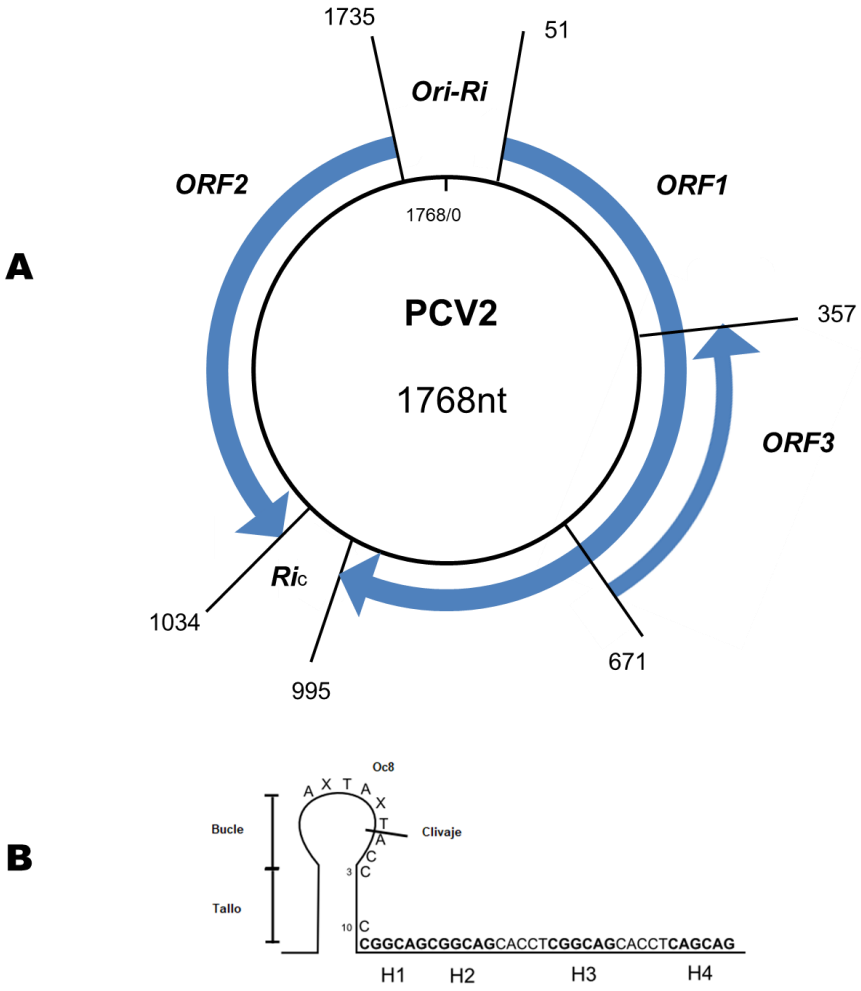


Figura 4.1.5. Representación esquemática del genoma circular de PCV2. A) La posición nucleotídica de los ORFs principales en el genoma fue establecida tomando como referencia la cepa con número de acceso al Genbank AF027217 (1768 nt). ORF1 consiste en 945 nt y es transcripto desde la hebra sentido. ORF2 y ORF3 se transcriben en la hebra anti-sentido y poseen 702 y 315 nt, respectivamente. ORF3 se solapa completamente con ORF1. Ori-Ri: Región inter-génica que contiene el origen de replicación. Ri_C: región inter-génica que separa los extremos 3' de ORF1 y ORF2. B) Origen de replicación de PCV2 (Ori). Se indica la estructura en horquilla (bucle y tallo). En el bucle se observa la secuencia conservada de 8 nucleótidos (Oc8) y se indica el sitio de clivaje del complejo Rep/Rep'. H1-4: hexámeros. Los pentámeros: CACCT. Imagen B extraída de Faurez et al., 2009.

4.1.6.1. Proteínas Rep

ORF1 codifica 2 proteínas esenciales para la replicación del ADN viral a través del mecanismo RCR denominadas, el complejo *Rep/Rep'* (Cheung, 2012). *Rep* es traducida a partir del transcripto completo de ORF1 y posee 314 aminoácidos (aa) (37.5 kDa). *Rep'* es originada por empalme alternativo del transcripto primario dando como resultado una proteína más pequeña de 178 aa (20.2 kDa). Ambas proteínas contienen en su extremo N-terminal 3 motivos aminoacídicos conservados involucrados en el inicio del mecanismo de RCR (R-I, R-II y R-III). El dominio denominado *P-loop*, el cual se cree es un dominio helicasa putativo que exhibe actividad de ATPasa en presencia de iones divalentes, solo está presente en *Rep* (Faurez et al., 2009; Cheung, 2012; Lv et al., 2014). Debido a que son imprescindibles para la replicación del genoma, estas proteínas poseen una alta homología de secuencia con las proteínas *Rep* de PCV1 (aproximadamente un 85% de homología a nivel de aa) (Lv et al., 2014). El Origen de replicación en los PCV contiene una secuencia conservada de 8 nucleótidos (Oc8) flanqueada por repetidos invertidos (secuencias palindrómicas) que forman una estructura en horquilla. La Oc8 se localiza en el bucle de la horquilla y contiene el sitio de clivaje. Adyacente a esta estructura se localizan repeticiones en tándem de hexámeros (H1-4) y pentámeros (Fig.4.1.5B) (Cheung, 2012). Luego de la formación del intermediario replicativo de doble cadena llevada a cabo por enzimas del hospedero en el núcleo celular, el complejo *Rep/Rep'* se une al origen de replicación en H1 y H2. Esto provoca un cambio conformacional que expone al Oc8 simple cadena y el complejo realiza un corte en el ADN en el sitio de clivaje. Se genera un extremo 3'-OH libre desde el cual la ADN polimerasa celular inicia la replicación mientras el complejo permanece adherido al extremo 5' del genoma. Luego de una ronda de replicación el complejo *Rep/Rep'* sella covalentemente el ADN, liberando el genoma unicatenario (Fig.4.1.6) (Faurez et al., 2009; Finsterbusch y Mankertz, 2009; Cheung, 2012).

Otros 6 ARNs son transcriptos a partir de ORF1 según un estudio realizado en cultivos celulares infectados con PCV2 (designados Rep3a, Rep3b, Rep3c, NS515, NS672 y NS0), sin embargo estos a diferencia de *Rep* y *Rep'* no demostraron ser capaces de traducirse en proteínas funcionales (Cheung, 2003).

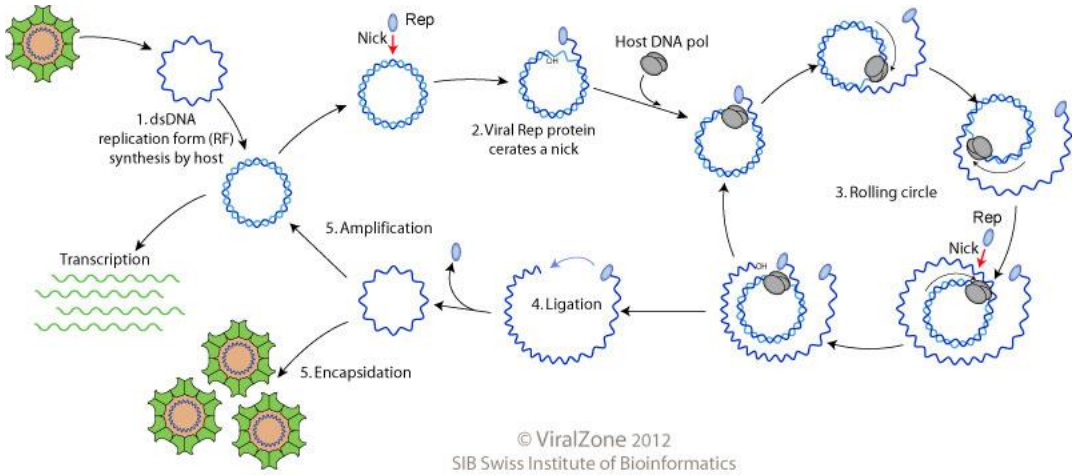


Figura 4.1.6. Esquema ilustrativo del mecanismo de replicación del ADN de PCV2 por círculo rodante. 1) Enzimas del hospedero sintetizan la forma replicativa de ADN de doble cadena (dsDNA replication form, en inglés) a partir del cual se realiza la transcripción y la replicación del genoma viral. 2) El complejo Rep (*Rep/Rep'*) realiza un corte (Nick, en inglés) luego de unirse a H1 y H2 del Ori. 3) Comienza la amplificación por círculo rodante (Rolling circle, en inglés) a partir del extremo 3' OH generado. 4) El complejo Rep también se encarga de ligar (Ligation, en inglés) covalentemente los genomas con simple cadena recién sintetizados. 5) El genoma puede ser encapsidado (Encapsidation, en inglés) o ser molde de nuevas rondas de amplificación (Amplification, en inglés). Extraído de ViralZone.

4.1.6.2. Proteína *Cap*

El gen *cap* se transcribe a partir de la hebra complementaria en la forma replicativa del virus, dando lugar a una proteína de aproximadamente 27.8 kDa que compone la cápside icosahédrica compuesta por 60 capsómeros (simetría T=1) (Lv et al., 2014). La longitud de la secuencia de ORF2 varía según el genotipo siendo de 702 nt en PCV2a y PCV2b, de 705 nt en PCV2d y PCV2c, y de 717 nt en el caso del genotipo PCV2e. Debido a ello, el tamaño de la proteína *Cap* varía según el genotipo viral (Tabla 4.1.1).

Tabla 4.1.1. Características de ORF2 para cada uno de los genotipos de PCV2.

Genotipo (genoma completo)	Posición en el genoma (nt)	Proteína (aa)
PCV2a (1768nt)	1735-1034 (complementario)	233
PCV2b (1767nt)	1734-1033 (complementario)	233
PCV2c (1767nt)	1734-1030 (complementario)	234
PCV2d (1767nt)	1734-1030 (complementario)	234
PCV2e (1777nt)	1744-1028 (complementario)	238

Cap es la principal proteína inmunogénica del virus. Los estudios han confirmado que la cápside de PCV2 posee al menos 8 epítopes antigénicos diferentes. Han sido caracterizados 3 sitios antigénicos específicos (aa 65-87, 113-139, 169-183) y 5 epítopes conformacionales superpuestos dentro de las regiones aa 47-63, 165-200 y 230-233 (Lv et al., 2014; Karuppannan y Opriessnig, 2017). La región comprendida entre los aa 169-180, está muy conservada entre las cepas de PCV2 y es un epítope "señuelo", resultando en la producción de anticuerpos no neutralizantes (Trible y Rowland, 2012). En el extremo N-terminal se localiza la señal de localización nuclear. Por otra parte, la proteína *Cap* de PCV2 es bastante similar en tamaño a la *Cap* de PCV1, sin embargo presentan una identidad de secuencia aminoacídica mucho menor a la observada para las proteínas *Rep* de ambos virus (aproximadamente un 65% de identidad aa) (Weingartl, 2002; Lv et al., 2014).

4.1.6.3. Proteína *ORF3*

El gen ORF3 codifica para una proteína de 104 aa (11.9 kDa) la cual no posee similitud con ninguna proteína conocida. Fue identificada por primera vez en el año 2005 y desde entonces su estructura y función reciben la atención de varios grupos de investigación. Se ha demostrado que no es esencial para la replicación pero tiene función apoptótica en las células infectadas y transfectadas (Liu et al., 2005). Asimismo, se ha encontrado una asociación entre esta función y la localización de la proteína en el núcleo celular (Lin et al., 2011). A su vez, se ha observado en estudios con modelos *in vivo* que puede tener un rol importante en la patogénesis viral (Liu et al., 2006; Karuppannan et al., 2009). Cabe destacar que *ORF3* es la única proteína que difiere drásticamente en tamaño y también en secuencia entre PCV1 y PCV2. *ORF3* de PCV1 posee 207 aa y comparte un 61.5 % de similitud aminoacídica con la *ORF3* de PCV2 (Liu et al., 2005).

4.1.7. Dinámica evolutiva de PCV2

4.1.7.1. Variabilidad genética: mutación y recombinación

Los principales mecanismos evolutivos de PCV2 son la mutación y la recombinación, los cuales pueden contribuir en la emergencia de nuevos genotipos virales, representando una potencial amenaza y riesgo en el control de las PCVAD (Olvera et al. 2007; Gagnon et al., 2010).

El análisis de genomas completos revelaron que la tasa de mutación de PCV2 se encuentra en el entorno de 10^{-3}–10^{-4} sustituciones/sitio/año (s/s/a) (Firth et al., 2009). Resultados similares han sido obtenidos por otros autores (3.1×10^{-3}–6.6×10^{-3}s/s/a) (Pérez et al., 2011). Esto significa que estos virus, a pesar de tener un genoma de ADN, poseen tasas de mutación similares a las de algunos virus ARN (Duffy et al., 2008). Incluso, a pesar de la función conservada de la proteína *Rep*, se ha visto que PCV2 poseen un número relativamente alto de cambios nucleotídicos no-sinónimos en el gen *rep*, lo cual no ha sido visto en otros miembros de la familia *Circoviridae* (Hughes y Piontkivska, 2008). Sin embargo, es el gen *cap* el que está sujeto a mayor presión selectiva y la evasión de la respuesta inmune del hospedero parece ser una fuerza importante para la aparición y propagación de nuevas variantes. Es por ello, que el gen *cap* presenta mayor variabilidad entre los diferentes genotipos de PCV2 y por ese motivo ha sido utilizado como marcador filogenético y epidemiológico (Olvera et al., 2007). A su vez, se sugiere que pequeñas diferencias en los genotipos de PCV2 podrían manifestarse en distintos grados de virulencia (Opriessnig et al., 2006).

Por otro lado, el virus puede experimentar con frecuencia eventos de recombinación, cumpliendo un importante rol en la evolución de estos virus (Olvera et al. 2007; Gagnon et al., 2010). Si bien la recombinación puede suceder en cualquier parte del genoma viral, se ha identificado que la primera región del gen *rep (*aproximadamente entre los nucléotidos 51-420) y las regiones inter-genéticas son los sitios más susceptibles a la recombinación (Olvera et al., 2007; Franzo et al., 2016a) (Fig.4.1.7). Debido a la naturaleza altamente conservada de *rep*, es poco probable que el intercambio de segmentos dentro este gen altere las propiedades fenotípicas o de virulencia de estas cepas emergentes recombinantes. Sin embargo, recombinaciones dentro del ORF2 son más propensas a influir en la diversidad fenotípica y antigénica de PCV2 (Ssemadaali et al., 2015). Se han identificado numerosas cepas recombinantes con puntos de recombinación tanto en ORF1 como en ORF2 (Cai et al., 2011,

2012; Cheung, 2009; Hesse et al., 2008; Kim et al., 2009; Ma et al., 2007) pero en ningún caso han sido reportadas en altas tasas de infección.

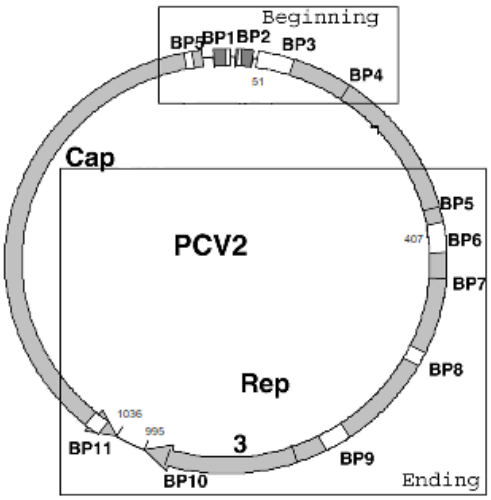


Figura 4.1.7. Sitios frecuentes de recombinación en el genoma de PCV2. Se indican los puntos más frecuentes de recombinación (BP) inicial y final (beginning y ending, respectivamente en inglés) entre genomas de PCV2, calculados utilizando algoritmos RDP, MaxChi, GeneConv, BootScan, SiScan y Chimera. Se observó mayor cantidad de eventos de recombinación en BP3 y BP6 que corresponden a la primera porción del gen *rep*. Extraído con modificaciones de Olvera et al., 2007.

4.1.7.2. Emergencia de genotipos de PCV2 y vacunas

Se conocen dos cambios importantes en la dinámica de población de PCV2. En ambos casos se produjo el aumento inicial de un genotipo que se extendió globalmente siguiendo las principales rutas comerciales porcinas y luego fue reemplazado por un genotipo emergente posterior. El primer evento consistió en el reemplazo de la cepa PCV2a, predominante previo al año 2003, por la cepa del genotipo PCV2b (Beach y Meng, 2012). Esto estuvo acompañado de brotes de PCVAD más severos y coincidió con reportes de los primeros casos de PCV2-SD en varios países del mundo (Horlen et al., 2007; Carman et al., 2008; Segalés et al., 2013; Constans et al., 2015). El segundo evento, fue la aparición del genotipo PCV2d (inicialmente denominado mutante PCV2b), y su rápido crecimiento y distribución mundial a partir del año 2012 que llevó al reemplazo del genotipo PCV2b (Guo et al., 2012; Opriessnig et al., 2013;

Salgado et al.,2014; Seo et al., 2014; Eddicks et al., 2015). Asimismo, se demostró que la nueva cepa emergente exhibe mayor virulencia *in vivo* en comparación con cepas PCV2a y PCVb (Guo et al., 2012).

Cabe destacar que este patrón evolutivo de PCV2 está acompañado de la aparición puntual de otros genotipos como es el caso de PCV2c y el reciente descubrimiento de PCV2e, pero su prevalencia es baja y su distribución se encuentra restringida (ver sección 4.1.5). Ello podría indicar que estos genotipos tienen un menor *fitness* replicativo y tal vez también, una menor tasa de transmisión en comparación con otros genotipos PCV2 (Xiao et al., 2016).

Particularmente, PCV2d se puede clasificar en PCV2d-1 y PCV2d-2, con una divergencia genética sustancial entre ellos (Fig. 4.1.8). Las cepas PCV2d-1 fueron identificadas por primera vez en 2002 en China (Wang et al., 2009; Cortey et al., 2011b) y fueron antiguamente incluidas dentro del genotipo PCV2b (como subtipo 1C) (Olvera et al., 2007); mientras que las cepas PCV2d-2 fueron reconocidos por primera vez en 2008 en China y son las que se han vinculado más tarde con un aumento en la virulencia y distribución a nivel mundial (Guo et al., 2012; Xiao et al., 2015).

El uso globalizado de vacunas comerciales contra PCV2 comenzó en el año 2006, aunque las primeras vacunas fueron introducidas en el año 2004 en algunos países europeos (Karuppannan y Opriessnig, 2017). Todas las vacunas recombinantes están basadas en la proteína *Cap*, mientras que las vacunas inactivadas son preparaciones con virus enteros. Asimismo, las vacunas comerciales disponibles hoy en día están basadas en el genotipo PCV2a y todas son eficientes en inducir inmunidad humoral y celular (Tabla 4.1.2). A pesar de la eficacia de las vacunas en reducir las lesiones y la viremia, no elimina completamente la infección con PCV2 (Beach y Meng, 2012; Karuppannan y Opriessnig, 2017).

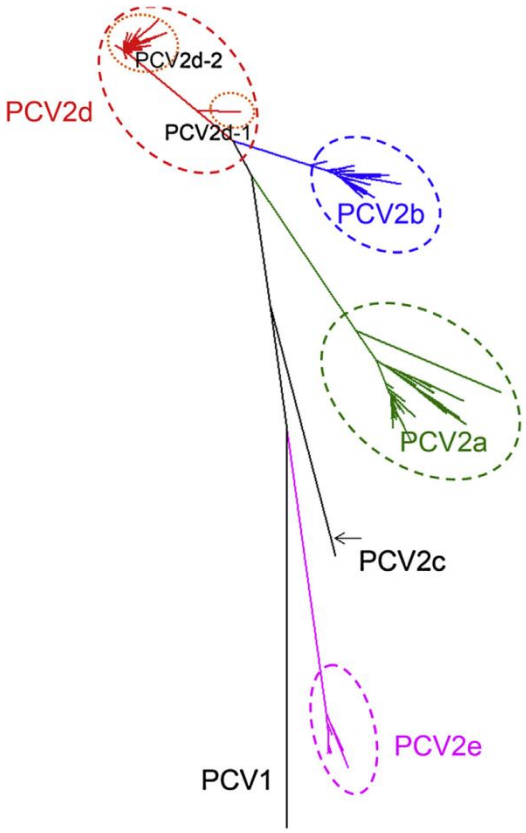


Figura 4.1.8. Análisis filogenético basado en el gen ORF2 de PCV2. Se muestran las relaciones filogenéticas entre los genotipos actuales de PCV2. PCV1 fue utilizado como grupo externo. Extraído de Xiao et al., 2016.

Tabla 4.1.2. Vacunas comerciales disponibles.

Vacuna	Empresa	Antígeno	Uso
Circovac®	Merial	Virus Inactivado PCV2a	Madres/lechones (>3semanas)
Ingelvac CircoFLEX®	Boehringer Ingelheim	Proteína de cápside PCV2a recombinante*	lechones (>3semanas)
Circumvent®	Intervet (Merck)	Proteína de cápside PCV2a recombinante*	lechones (>3semanas)
Porcilis® PCV	Schering-Plough (Merck)	Proteína de cápside PCV2a recombinante*	lechones (>3semanas)
Fostera™ PCV (originalmente conocida como Suvaxyn® PCV2 One Dose™)	Pfizer	Virus quimérico PCV1-2a Inactivado	lechones (>3semanas)

*expresadas en sistema Baculovirus. Extraído de Bach y Meng, 2012.

Es interesante que el primer remplazo genotípico sucedió un poco antes del inicio de la vacunación generalizada, mientras que el cambio o *genotype shift* reciente ocurrió en presencia de una vacunación masiva a nivel mundial (Karuppannan y Opriessnig, 2017). De hecho, varios trabajos reportaron la emergencia del genotipo PCV2d (particularmente del PCV2d-2) en cerdos con PCVAD en casos de sospecha de fallo en la vacunación (Xiao et al., 2012; Opriessnig et al., 2013; Salgado et al., 2014; Seo et al., 2014; Eddicks et al., 2015; Xiao et al., 2016).

La prevalencia de PCV2d-2 en EE.UU ha aumentado de un 37.8% en 2012 a un 72% en 2016 y ha reemplazado al genotipo PCV2b no solamente en este país sino que también en América del Sur, Europa y Asia (Segalés, 2015; Xiao et al., 2015; Xiao et al., 2016). Suponiendo buenas prácticas de vacunación, el aumento en la prevalencia de PCV2d, el cual se estima que ha divergido antes de la introducción de las vacunas, podría reflejar la falta de una protección inmunológica completa contra este genotipo por las vacunas actuales. Sin embargo, estudios experimentales controlados y ensayos de campo muestran que las vacunas basadas en PCV2a confieren una protección cruzada adecuada contra la enfermedad clínica ante el desafío con virus del genotipo PCV2a, PCV2b y PCV2d (Karuppannan y Opriessnig, 2017).

A pesar de la efectividad de las vacunas de PCV2 en reducir los signos clínicos de las PCVAD, la emergencia de nuevas cepas o variantes con potencial incremento de la virulencia, da la apertura al debate sobre si las vacunas existentes inducen una presión selectiva en el campo y si requieren una actualización que incluya las nuevas cepas. Lo que ocurre con PCV2 también ha ocurrido por ejemplo con las vacunas de Parvovirus Canino, ya que es efectiva en prevenir la enfermedad pero las cepas circulantes fueron periódicamente remplazadas luego de la introducción de la vacunación (Truyen, 2006). Otro ejemplo similar, es la enfermedad de Marek en donde las vacunas son consideradas “vacunas con fugas”, ya que previenen los síntomas clínicos pero no la transmisión del virus y por tanto pueden influenciar en la evolución de cepas virales heterólogas que no están presentes en la formulación vacunal (Read et al., 2015).

4.1.8. PCV2 en jabalí

Varias características hacen del jabalí una especie muy interesante para la investigación epidemiológica de enfermedades virales: posee una distribución mundial; comparte agentes infecciosos con el cerdo doméstico; presenta una gran habilidad para adaptarse a diferentes ambientes; posee una alta tasa de reproducción y es capaz de recuperarse ante eventuales descensos del tamaño poblacional (Ruiz-Fons et al., 2008).

Los datos sobre la circulación de PCV2 en jabalí son escasos y la información existente proviene únicamente de Europa. El virus ha sido detectado en estudios serológicos en jabalíes de varios países europeos (Bélgica: Sánchez et al., 2001; España: Vicente et al., 2004; Ruiz-Fons et al., 2006; República Checa: Sedlak et al., 2008; Alemania: Sattler et al., 2012; Croacia: Roic et al., 2012) y por detección directa de antígeno o ADN viral (España: Vicente et al., 2004; Alemania: Knell et al., 2005; Reiner et al., 2010; Hungría: Csagola et al., 2006). Todos estos estudios indican que PCV2 circula ampliamente entre las poblaciones europeas de jabalí, con seroprevalencias del 15-45% (Sánchez et al., 2001; Vicente et al., 2004; Roic et al., 2012) y frecuencias de infección de un 20% (Cságola et al., 2006). Paralelamente, el primer caso de PCV2-SD en jabalí ha sido descripto en Alemania (Schulze et al., 2003), lo que indica claramente que tanto el cerdo doméstico como el jabalí son susceptibles no solo a la infección por el virus sino que también al desarrollo de enfermedades asociadas. Asimismo, debido a que las cepas de PCV2 aisladas en jabalíes han demostrado ser idénticas a las detectadas en cerdos pertenecientes a la misma región (Knell et al., 2005; Cságola et al., 2006), se ha sugerido que el jabalí puede ser un potencial reservorio de la enfermedad para el cerdo doméstico. Ello implica un gran impacto a nivel sanitario, sobre todo en países como Uruguay en donde el contacto entre la población salvaje y el cerdo doméstico es muy frecuente.

4.2. Objetivos específicos parte I

1. Optimizar e implementar una técnica de detección molecular de PCV2 que permita determinar la frecuencia de infección en muestras de cerdos pertenecientes a diversos criaderos del Uruguay.

2. Caracterizar genéticamente las cepas detectadas: identificar genotipos predominantes, evaluar circulación de cepas recombinantes y establecer relaciones filogenéticas con cepas regionales y extra-regionales.

3. Investigar la circulación de PCV2 en poblaciones de jabalíes en Uruguay con el fin de evaluar su rol potencial como reservorios naturales de la infección para el cerdo doméstico.

4. Analizar la localización intra-celular y función apoptótica *in vitro* de la proteína *ORF3* de diferentes cepas detectadas en Uruguay.

5. Evaluar posibles estrategias para la replicación de cepas de campo en cultivos celulares.

6. Expresar un fragmento de la cápside de PCV2 en un sistema de presentación de antígeno al sistema inmune basado en la proteína Z del virus Junin, como plataforma para el desarrollo de una vacuna contra PCV2

4.3. Capítulo 1. Detección molecular de PCV2 en lechones con EE en Uruguay.

El punto de partida de la investigación de PCV2 en Uruguay se centra en la colaboración directa con el Doctor en Veterinaria Gustavo Castro, del área Suinos de Facultad de Veterinaria. Tras observar una alta mortalidad de cerdos con sintomatología clínica diversa (desmedro, retraso en el crecimiento, abortos, diarrea, problemas respiratorios, adenomegalia, entre otras) y debido a que el diagnóstico bacteriológico diferencial realizado por las autoridades sanitarias (DILAVE-MGAP) no logró identificar el agente etiológico en la mayoría de los casos, muestras pertenecientes a cerdos de criaderos localizados en diferentes regiones del país fueron enviadas a la Sección Virología de la Facultad de Ciencias. Principalmente, las muestras provenían de cerdos con sintomatología clínica y en menor medida de cerdos asintomáticos. Si bien los problemas sanitarios comenzaron a constatarse a finales del año 2010, el muestreo se realizó principalmente entre los años 2011-2014 y abarcó cerdos de todas las edades. Se obtuvieron tanto muestras de suero como de órganos (en el caso de mortalidad). Tanto la valoración clínica, la identificación de los síntomas clínicos y la toma de muestras fueron realizadas por profesionales veterinarios. Además de la mencionada vinculación directa con el Doctor en Veterinaria Gustavo Castro se destaca también el estrecho contacto con la Sociedad de Criadores de Cerdos del Uruguay a través de la Doctora en Veterinaria Karina Cabrera, quien también nos ha enviado muestras de casos con sintomatología compatible con PCV2. Paralelamente, fueron incluidas en el trabajo muestras de cerdo destinados a la faena en frigoríficos del país y algunas muestras de archivo de cerdos asintomáticos del año 2010, siendo recolectadas un total de 154 muestras.

Este capítulo describe los primeros casos de infección por PCV2 en Uruguay los cuales fueron identificados en lechones con EE de un criadero de cría a campo de Canelones en junio del año 2011. Se trataba de animales recién destetados que presentaban problemas de piel, con desmejoramiento de estado y retraso en el crecimiento (Fig. 4.3.1 complementaria). La EE es una infección cutánea aguda y generalizada que afecta a lechones de aproximadamente 5 a 35 días. Si bien la bacteria *Staphylococcus hyicus* es el agente etiológico de esta patología, no es una enfermedad muy común sobre todo en cría a campo ya que otros factores son requeridos para el desarrollo de la enfermedad (Chae, 2005; Foster, 2012). Por este motivo, se sospechó de la circulación de PCV2 debido a que es un agente inmunosupresor que puede actuar como

un potencial co-factor en la progresión de la EE. De hecho, dos artículos previos han reportado que tanto PCV2 como Parvovirus Porcino pueden ser potenciales co-factores de la EE (Wattrang et al., 2002; Whitaker et al., 1990), y es probable que estén involucrados en el desarrollo y/o progresión de la lesión. Por lo tanto, este artículo no sólo significó el primer reporte de PCV2 en el país sino que también constituyó otra evidencia a favor de la posible asociación de PCV2 con esta enfermedad.

Tras la caracterización molecular de las cepas identificadas mediante la amplificación del gen *cap* completo, se observó la circulación de cepas del genotipo PCV2b. Esto era lo esperable ya que a partir del año 2003 la cepa PCV2b era la más prevalente a nivel mundial (Beach y Meng, 2012). Incluso, los datos regionales sobre la epidemiología molecular del virus previo al año 2011 mostraban que en Brasil predominaba la circulación de cepas PCV2b (subtipo 1AB) con identificación escasa de cepas PCV2a (subtipo 2D) (Chiarelli-Neto et al., 2009). Mientras que en Argentina y en Chile, todas las cepas que se habían identificado eran del genotipo PCV2b (Pereda et al., 2011; Noriega et al., 2007). Particularmente, este estudio pudo evidenciar una alta identidad de secuencia nucleotídica y aminoacídica entre las cepas Uruguayas y cepas Brasileras.

Por otra parte, fue realizada la necropsia de uno de los 3 animales con EE por el Laboratorio Central DILAVE Miguel Rubino, MGAP y se informó la observación de severas lesiones en la piel presentes en la totalidad del cuerpo del animal pero con mayor importancia en rostro, miembros y abdomen. Las lesiones presentaban zonas eritematosas, máculas, pústulas y costras. Se observó un aumento de tamaño bilateral de linfonódulos inguinales, linfoadenomegalia de linfonódulos mesentéricos, esplenomegalia y pulmones con importante congestión difusa bilateral (Fig. 4.3.2 complementaria). Muestras de pulmón, linfonódulos mesentéricos y linfonódulos periféricos (inguinal y poplíteo) fueron enviadas a la sección Virología de la Facultad de Ciencias. Las muestras fueron procesadas y se logró amplificar el gen *cap* de PCV2 por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en todos los órganos testeados (Fig. 4.3.3 complementaria).

ARTÍCULO I

Research in Veterinary Science 93 (2012) 1042–1045

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Research in Veterinary Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/rvsc

Detection and molecular characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) from piglets with exudative epidermitis in Uruguay

Natalia Ramos [a], Santiago Mirazo [a], Gustavo Castro [b], Juan Arbiza [a,*]

[a] Sección Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, Montevideo 11400, Uruguay
[b] División Sanidad Animal, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Constituyente 1476, Montevideo 11200, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:
Received 20 September 2011
Accepted 6 January 2012

Keywords:
PCV2
Molecular characterization
PCV2b genotype
PCVAD
Exudative epidermitis
Uruguay

ABSTRACT

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is an economically important emerging pathogen associated with distinct syndromes and diseases in swine, collectively known as porcine circovirus associated diseases (PCVAD).

The main purpose of this study was to investigate the presence of PCV2 in piglets affected with exudative epidermitis (EE) in Uruguay. In addition we aimed to analyze the phylogenetic relationships of the isolated strains.

In June 2011 an outbreak of EE detected in a small herd was reported. Piglets presented skin lesions compatible with EE and symptoms associated with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) were also observed. Sera from affected and healthy animals were tested for the presence of viral DNA.

Exclusively, diseased piglets were infected with PCV2. Phylogenetic analysis showed that PCV2 isolates belonged to PCV2b genotype.

We report the detection and molecular characterization of PCV2 strains for the first time in Uruguay.
© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Porcine circovirus type 2 (PCV2), member of *Circoviridae* family, is a small non-enveloped virus, containing a single-strand circular DNA genome (Allan and Ellis, 2000). PCV2 is worldwide distributed and is considered to be an important emerging pathogen associated with several different syndromes and diseases in pigs, collectively known as porcine circovirus associated diseases (PCVAD) (Grau-Roma et al., 2011; Opriessnig et al., 2007). Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) is the most economically important PCVAD and has a severe impact in swine production (Chae, 2005). Common clinical signs in PMWS include wasting, unthriftiness and enlarged lymph nodes (Allan and Ellis, 2000). In addition, PCV2 has been associated with exudative epidermitis (EE); an acute often fatal generalized skin infection affecting mainly suckling piglets (Chae, 2005). Even though EE is caused by *Staphylococcus hyicus*, predisposing factors are probably necessary for the progression of the disease (Tanabe et al., 1996).

Genomic structure of PCV2 consists of three major open reading frames (ORFs). ORF2 (*cap* gene) encodes the capsid protein which contains the more variable nucleotide sequence of the viral genome (Nawagitgul et al., 2000).

PCV2 is classified into two main genotypes, PCV2a and PCV2b (Segalés et al., 2008) which were further subdivided into different clusters, 1A–1C and 2A–2E for PCV2b and PCV2a, respectively (Olvera et al., 2007). A third genotype, PCV2c, was only found in Denmark (Dupont et al., 2008).

In South America, PCV2 has been circulating in Brazil since 1988 (Zanella and Mores, 2003) and was also detected in Argentina (Pereda et al., 2011) and Chile (Noriega et al., 2007). In Uruguay, cases of PCV2 infection have not been reported and PCVAD has not ever been identified. Even though EE has been previously described (Riet Correa et al., 1977), clinical cases that occurred in our country have not been thoroughly investigated.

In this study, we report the detection and molecular characterization of the first strains of PCV2 in Uruguay, isolated from piglets with EE and PMWS-associated symptoms.

In June 2011 an outbreak of EE among weaned piglets in a small herd situated in South-eastern Uruguay was reported to animal health governmental officers. Microbiological identification of *S. hyicus* from skin swabs was carried out in Laboratory 'Miguel A. Rubino', from Ministry of Livestock, Agriculture and Fishery according to standard procedures (Barrow and Feltham, 1993). The outbreak occurred in a herd raised under free-range, in which contact between animals is expected to be minimal and probabilities of horizontal transmission are reduced. Since EE is more

* Corresponding author. Tel.: +598 2 5258618; fax: +598 2 5258617.
E-mail address: jarbiza@fcien.edu.uy (J. Arbiza).

0034-5288/$ - see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.rvsc.2012.01.006

commonly observed in herds under intensive management system (Dee, 2001), we hypothesized that cofactors, as PCV2 infection, should be contributing for the clinical manifestation of the disease.

Blood samples were extracted by trained veterinary personnel from six (three of them symptomatic) out of the seven piglets of the herd. One of the affected animals was euthanized. Popliteal and inguinal lymph nodes were obtained from this animal. Samples were kept in ice-cold until processing.

DNA was extracted from 200 μL of serum or organ homogenized using a commercial kit (Genomic DNA purification kit, Fermentas Life Sciences) according to manufacturer's instructions. To avoid cross contamination, samples were processed individually and were stored at −20 °C.

As internal control, a region of 314 base pairs (bp) of the beta actin gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) (Ng et al., 1985).

In order to detect PCV2 DNA, the complete ORF2 was amplified by PCR as previously described (Fort et al., 2007). PCR produced an expected fragment of 750 bp which was purified (NucleoSpin® Extract II, Macherey–Nagel, Germany) and sequenced in both directions by Macrogen Sequencing Service, Korea.

Sequence alignment was performed using Clustal W software and genotyping studies were performed by analyzing ORF2 published sequences corresponding to the three different genotypes. The degree of identity among sequences at nucleotide and amino acid level was determined using BioEdit v. 7.0.5 software. Phylogenetic tree was reconstructed by neighbor-joining method with the Kimura two-parameter model as the model of nucleotide substitution using MEGA v. 5.0 software. Bootstrap values were determined with 1000 replicates of the dataset.

Physical examination of affected piglets showed a generalized dermatitis, characterized by severe skin lesions with erythematous areas, macules and scabs. *S. hyicus* was isolated and identified from lesion swabs of affected piglets. Additionally, diseased animals presented signs of wasting and growth retardation and had palpable inguinal lymph nodes.

Quality of DNA extracted from all serum and lymph node samples was suitable for PCR, as confirmed by the amplification of the beta actin gene fragment.

DNA of PCV2 was detected in serum samples from the three EE affected piglets and the complete *cap* gene was satisfactorily amplified and sequenced. Viral DNA was also amplified from lymph nodes of the euthanized individual. By contrast, PCV2 was not detected in blood specimens collected from healthy animals.

Nucleotide sequence data reported in this work have been submitted to GenBank and have been assigned the accession numbers JN644769, JN644770 and JN644771.

Comparison of the Uruguayan isolates with published ORF2 sequences revealed a closely relationship with PCV2b genotype strains. In particular, our isolates grouped within 1A/B cluster (Fig. 1). Sequences presented the typical PCV2b 1A/B motif within the ORF2 (nucleotides (nt) 262–267). In addition, phylogenetic reconstruction showed that strains detected in this work clustered together with high bootstrap values (Fig. 1). In fact, the analysis of the *cap* gene revealed that they are very closely related and are nearly identical both at nucleotide and amino acid level. Sequence analysis and comparison of our isolates with strains reported from South American countries, showed a very high nucleotide and amino acid identity (99.7% and 100%, respectively) with four of the Brazilian isolates included in this study (accession numbers DQ861896, DQ861899, DQ856574 and DQ856580). By contrast, the comparison with Chilean strains revealed an identity ranging from 97.5% to 98.7% and 92% to 95% at nucleotide and amino acid level, respectively.

Taking into account that PCV2 DNA was detected in serum samples exclusively from EE affected piglets, it may be argued that these animals had a concomitant PCV2 infection, suggesting a possible role of the virus in the development of the disease. Furthermore, viral DNA was also detected in lymph nodes of euthanized animal, which confirmed that EE affected piglet was infected with PCV2. This is in complete agreement with previous studies in which PCV2 had been demonstrated to be a cofactor in the full experimental reproduction of EE (Wattrang et al., 2002; Kim and Chae, 2004). Results presented here constitute further direct evidence of the association between PCV2 infection and occurrence of EE. Anyway, it remains unclear whether PCV2 is synergistic or opportunistic pathogen.

In Uruguay, PMWS has never been reported. Despite the fact that the affected piglets presented PMWS-associated clinical symptoms and were PCV2 infected, it was not possible to establish an accurate diagnosis of PMWS. Further investigation of histopathological lesions is required. Certainly, thorough characterization of the PMWS-associated signs affecting the piglets, far exceed the purpose of this investigation.

Molecular characterization of the isolates was based on the analysis of cap gene. This region is suitable for genotyping studies and is considered a reliable phylogenetic marker for PCV2 strains since it is possible to reconstruct the same tree as with the whole viral genome (Olvera et al., 2007).

Uruguayan PCV2 strains detected in serum from EE affected piglets clustered with PCV2b 1A/B genotype isolates. Moreover, the multiple alignment of the cap gene reveled that they presented the PCV2b 1A/B signature consensus sequence CCCCGC described by Jantafong et al. (2011). Of note, in this work it was not possible to differentiate sequences from cluster A and B which is not surprisingly since the segregation into cluster A and B could optimally be achieved by analyzing the whole genome (Olvera et al., 2007).

The fact that Uruguayan isolates clustered together and were identical at both nucleotide and amino acid level might be due to the fact that strains were isolated from an outbreak and likely a unique source of infection existed.

On the other hand, since our country keeps a wide commercial exchange with Brazil, which includes porcine livestock import, it is not surprising that strains detected in this work were found to be closely related to four Brazilian strains isolated in 2006 (DQ861896, DQ861899, DQ856574 and DQ856580), sharing 100% identities at amino acid level. Actually, in most of the local herds, breeding pigs are brought mainly from the east and south-east of Brazil, where these strains have been reported (Martins Gomes de Castro et al., 2007, 2008). Unfortunately, the information regarding the origin of breeding animals in this herd is lacking, thus limiting our capacity to shed light over the potential source of infection. However, the possibility that the outbreak was due to imported cases of PCV2 infection should not be discarded.

In summary, here we account the detection and molecular characterization of PCV2 strains for the first time in Uruguay, isolated from EE affected piglets. Cases of EE have occurred and been reported in our country. Nevertheless, this is the first study demonstrating the presence of a subjacent PCV2 infection in affected animals. Hence, concomitant PCV2 infection may have been a relevant predisposing factor for the development of EE.

Results reported represent the first experimental data regarding PCV2 circulation in Uruguay and although the presence of the virus in nationwide herds must be investigated, information presented here constitutes a useful basis for further epidemiological studies regarding the heterogeneity of PCV2 strains in South America.

Conflict of interest

Authors declare that they have no conflict of interests.

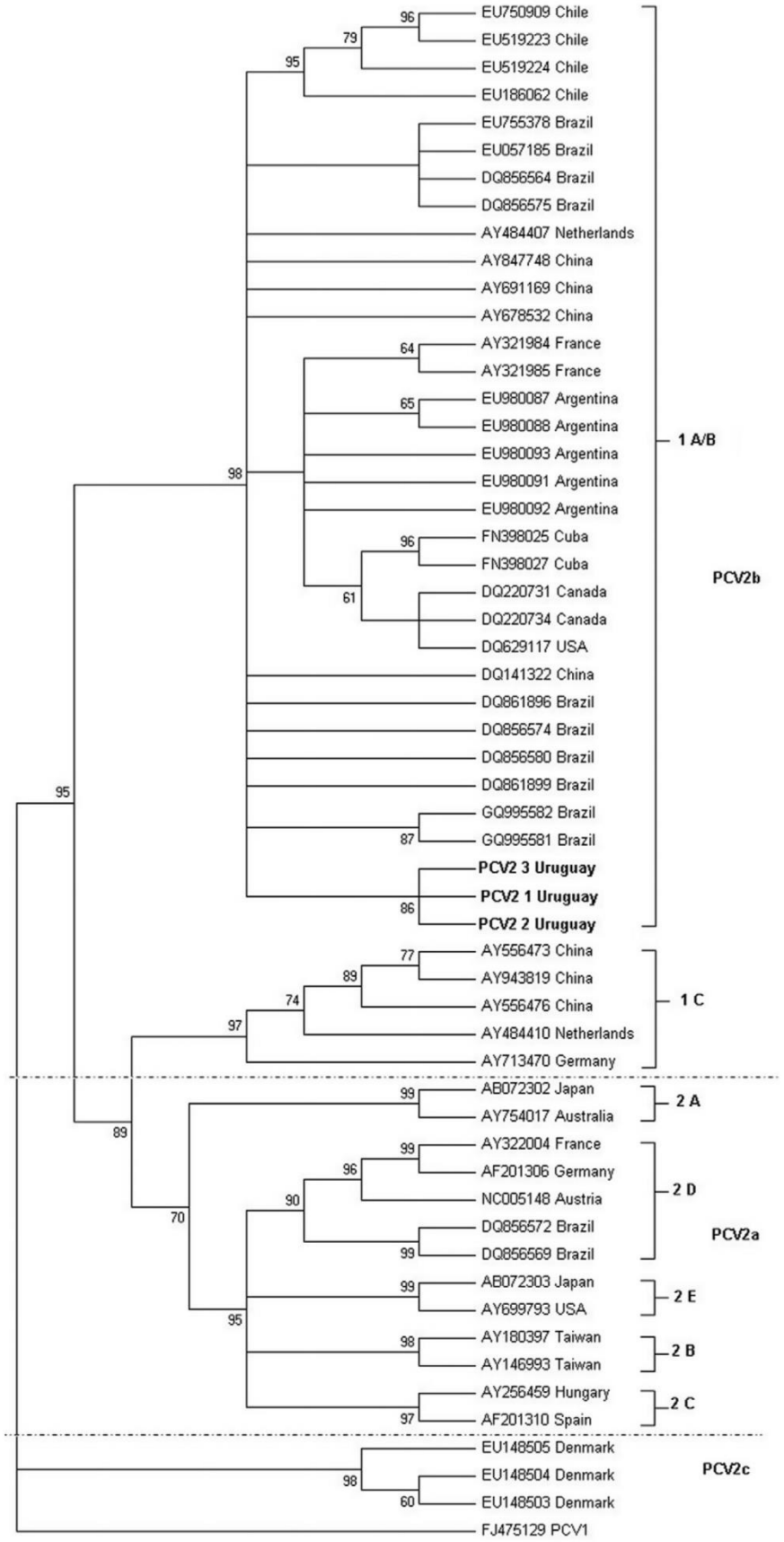


Fig. 1. Phylogenetic tree constructed by the neighbor-joining method based on the complete 702-nt sequence of the PCV2 ORF2. PCV2 strains isolated in this study are shown in bold. Fifty two strains whose entire or partial sequences have been reported were included for comparison. PCV1 isolate FJ475129 was included as outgroup.

Acknowledgments

Authors would like to thank Dr. Martí Cortey for his technical support in data analysis and Dra. Nora Negrín and Silvia Silveyra for their assistance in microbiological diagnosis. Authors are also grateful to PEDECIBA and ANII.

References

Allan, G., Ellis, J., 2000. Porcine circoviruses: a review. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 12, 3–14.

Barrow, G.I., Feltham, R.K.A., 1993. Cowan and Steele's Manual for the Identification of Medical Bacteria, Third ed. Cambridge University Press, Cambridge.

Chae, C., 2005. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. Veterinary Journal 169, 326–336.

Dee, S., 2001. Miscellaneous conditions of nursery pigs. Food Animal 23, 14–18.

Dupont, K., Nielsen, E.O., Baekbo, P., Larsen, L.E., 2008. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. Veterinary Microbiology 128, 56–64.

Fort, M., Olvera, A., Sibila, M., Segales, J., Mateu, E., 2007. Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS affected pigs. Veterinary Microbiology 125, 244–255.

Grau-Roma, L., Fraile, L., Segalés, J., 2011. Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. Veterinary Journal 187, 23–32.

Jantafong, T., Boonsoongnern, A., Poolperm, P., Urairong, K., Lekcharoensuk, C., Lekcharoensuk, P., 2011. Genetic characterization of porcine Circovirus type 2 in piglets from PMWS-affected and -negative farms in Thailand. Virology Journal 8, 88–93.

Kim, J., Chae, C., 2004. Concurrent presence of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in retrospective cases of exudative epidermitis in pigs. Veterinary Journal 167, 104–106.

Martins Gomes de Castro, A.M., Cortez, A., Heinemann, M.B., Brandão, P.E., Richtzenhain, L.J., 2007. Genetic diversity of Brazilian strains of porcine circovirus type 2 (PCV-2) revealed by analysis of the cap gene (ORF-2). Archives of Virology 152, 1435–1445.

Martins Gomes de Castro, A.M., Cortez, A., Heinemann, M.B., Brandão, P.E., Richtzenhain, L.J., 2008. Molecular diversity of Brazilian strains of porcine circovirus type 2 (PCV-2). Research in Veterinary Science 85, 197–200.

Nawagitgul, P., Morozov, I., Bolin, S.R., Harms, P.A., Sorden, S.D., Paul, P.S., 2000. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. Journal of General Virology 81, 2281–2287.

Ng, S.Y., Gunning, P., Eddy, R., Ponte, P., Leavitt, J., Shows, T., Kedes, L., 1985. Evolution of the functional human beta-actin gene and its multi-pseudogene family: conservation of noncoding regions and chromosomal dispersion of pseudogenes. Molecular Cell Biology 5, 2720–2732.

Noriega, J., Reyes, P., Bucarey, S., 2007. Circovirus porcino: un virus pequeño que genera un gran problema. Avances en Ciencias Veterinarias 22, 62–71.

Olvera, A., Cortey, M., Segales, J., 2007. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. Virology 357, 175–185.

Opriessnig, T., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2007. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. Journal of Veterinay Diagnostic Investigation 19, 591–615.

Pereda, A., Piñeyro, P., Bratanich, A., Quiroga, M.A., Bucafusco, D., Craig, M.I., Cappuccio, J., Machuca, M., Rimondi, A., Dibárbora, M., Sanguinetti, H.R., Perfumo, J.C., 2011. Genetic characterization of porcine circovirus type 2 from pigs with porcine circovirus associated diseases in Argentina. ISRN Veterinary Science. doi:10.5402/2011/560905.

Riet Correa, F., de Freitas, A., Repiso, M.V., 1977. Epidermitis exudativa en suinos del Uruguay. Veterinaria 14, 25–32.

Segalés, J., Olvera, A., Grau-Roma, L., Charreyre, C., Nauwynck, H., Larsen, L., Dupont, K., McCullough, K., Ellis, J., Krakowka, S., Mankertz, A., Fredholm, M., Fossum, C., Timmusk, S., Stockhofe-Zurwieden, N., Beattie, V., Armstrong, D., Grassland, B., Baekbo, P., Allan, G., 2008. PCV-2 genotype definition and nomenclature. Veterinary Record 162, 867–868.

Tanabe, T., Sato, H., Sato, H., Watanabe, K., Hirano, M., Hirose, K., Kurokawa, S., Nakano, K., Saito, H., Maehara, N., 1996. Correlation between occurrence of exudative epidermitis and exfoliative toxin-producing ability of *Staphylococcus hyicus*. Veterinary Microbiology 48, 9–17.

Wattrang, E., McNeilly, F., Allan, G.M., Greko, C., Fossum, C., Wallgren, P., 2002. Exudative epidermitis and porcine circovirus-2 infection in a Swedish SPF-herd. Veterinary Microbiology 2325, 1–13.

Zanella, J.R.C., Mores, N., 2003. Diagnostic of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Swine in Brazil caused by porcine circovirus type 2 (PCV2). Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária é Zootecnia 55, 522–527.



Figura 4.3.1 complementaria. Lechones con EE infectados con PCV2. Se observan lesiones en la piel con presencia de zonas eritematosas y costras en oreja (A), lomo (B) y miembros (C). En D se muestra estado general de un lechón afectado. Fotos cedidas por Gustavo Castro.

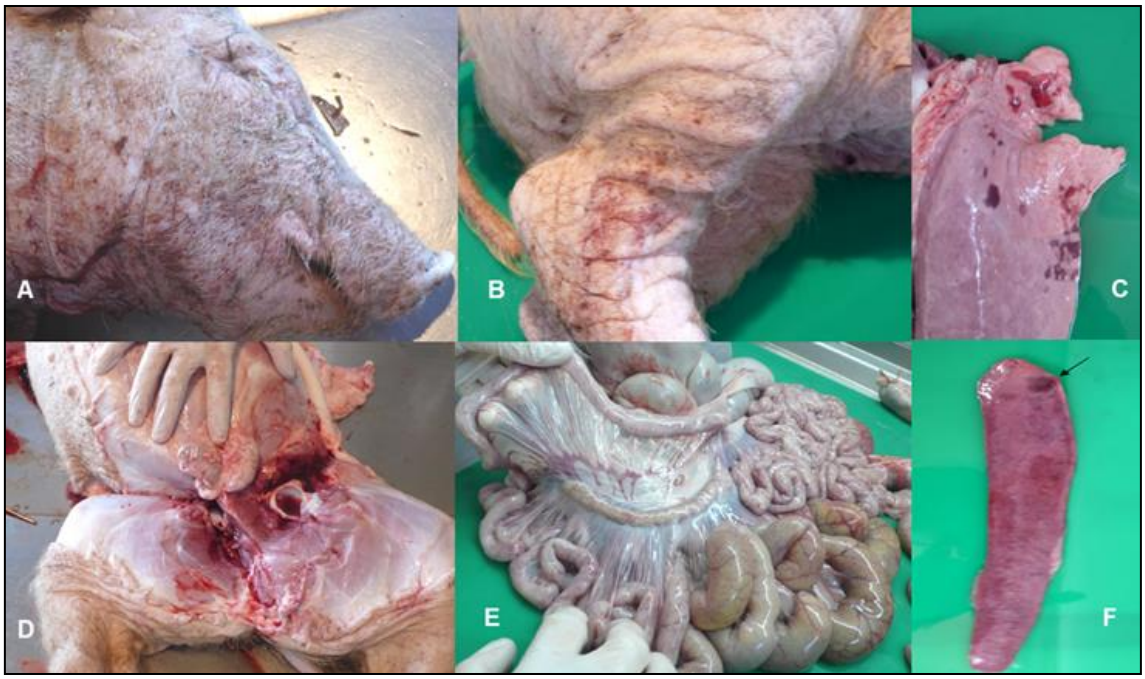


Figura 4.3.2 complementaria. Necropsia de lechón con EE infectado con PCV2. Se observan lesiones en la piel en el rostro (A) y miembros (B). Se observa severa congestión pulmonar difusa con focos de consolidación (C), linfoadenomegalia bilateral de linfonódulos inguinales (D), congestión de intestino delgado con linfoadenomegalia de linfonódulos mesentéricos (E) y esplenomegalia con congestión y lesión hemorrágica focal (flecha) (F). Informe de Necropsia por la Dra. Marcela Noel Preliasco Arin. Departamento de Patobiología Laboratorio Central DILAVE "Miguel C. Rubino" Montevideo.

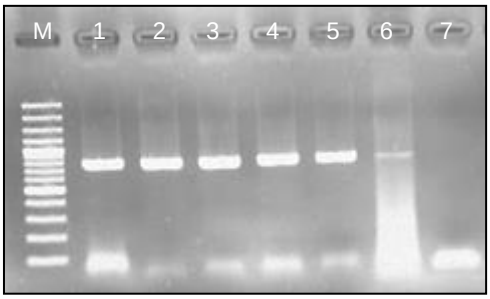


Figura 4.3.3 complementaria. Amplificación del gen *cap* en órganos de animal con EE. Se muestra corrida electroforética de productos de PCR de 759 pares de bases (pb) (que comprenden los 702 pb de la *cap* completa) en gel de agarosa 1.5%. Carril M: Marcador de peso molecular de 100pb plus (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). Carril 1-6: Muestra de pulmón derecho, pulmón izquierdo, ganglio mesentérico de tracto intestinal anterior, ganglio mesentérico de tracto intestinal posterior, ganglio inguinal y ganglio poplíteo, respectivamente. Carril 7: Control negativo.

4.4. Capítulo 2. Evidencia de circulación de cepas de PCV2 recombinantes en Uruguay.

En este capítulo, se profundizó en la caracterización genética de las cepas previamente detectadas en lechones con EE (denominadas PCV2_Uy1 en este capítulo, ya que las 3 cepas eran idénticas genéticamente) y se detectaron dos nuevos casos de infección por PCV2. Uno correspondía a un cerdo de engorde sin sintomatología de un criadero de Soriano (PCV2_Uy2) y el otro a un lechón destetado con desmedro y retraso en el crecimiento de un criadero de Montevideo (PCV2_Uy3). Al igual que los casos de EE, estas muestras fueron colectadas en el año 2011. Se observó que a nivel del gen *cap* todas las cepas detectadas mostraron un alto porcentaje de identidad nucleotídica y un 100% de identidad aminoacídica y todas presentaron el típico motivo nucleotídico correspondiente al genotipo PCV2b cluster 1A/B (Fig. 4.4.1 complementaria). Sin embargo, al analizar las secuencias del gen *rep*, se observó una mayor variabilidad entre las cepas Uruguayas, lo cual fue inesperado debido a que es el gen más conservado del genoma viral.

Por un lado, el gen *rep* de la cepa PCV2_Uy3 presentó el motivo nucleotídico correspondiente al genotipo PCV2b y cluster 1A. Por lo tanto, la amplificación de este otro gen permitió definir el subtipo viral para esta cepa. A su vez, el análisis de secuencia de la misma mostró una alta identidad de secuencia nucleotídica y aminoacídica con cepas brasileras, en particular con la cepa de número de acceso al GenBank DQ923524. El hecho de que esta cepa esté estrechamente relacionada con cepas Brasileras, sugiere que probablemente se deba a un caso importado.

Por otro lado, al analizar las secuencias del gen *rep* de PCV2_Uy1 y PCV2_Uy2, se pudo observar la presencia de marcadores correspondientes tanto al genotipo PCV2b subtipo 1A como al genotipo PCV2a. Esto se vio reflejado en la discordancia observada entre los árboles filogenéticos de *rep* y *cap* para PCV2_Uy1 y PCV2_Uy2. Mientras que a nivel de *cap* agruparon con cepas del genotipo PCV2b 1A/B, a nivel de *rep* agruparon con cepas del genotipo PCV2a 2D con un buen soporte estadístico. Asimismo, al analizar los genes juntos, estas cepas se agrupan con altos valores de bootstrap (100%) en un cluster separado (no 1A, no 1B, no 1C) dentro del genotipo PCV2b (Fig. 4.4.2 complementaria). Para corroborar la existencia de eventos de recombinación en PCV2_Uy1 y PCV2_Uy2 se amplificó su genoma completo y fueron utilizados dos programas de detección de recombinantes, RDP y SIMPLOT. Con ambos

se identificó que ambas cepas Uruguayas eran recombinantes, siendo el parental mayoritario una cepa del genotipo PCV2b 1A y el parental minoritario una cepa PCV2a 2D. Con el programa RDP, de la base de datos utilizada (información en el material suplementario del artículo) se identificaron potenciales parentales con orígenes europeos (Fig. 4.4.3 complementaria). Con el programa SIMPLOT, los puntos de recombinación estimados para PCV2_ Uy1 fueron las posiciones 151 y 773, y para PCV2_Uy 2, las posiciones 140 y 768. Ello acompaña lo observado en la comparación de marcadores genéticos entre cepas parentales y las cepas recombinantes. Sin embargo, con el programa RDP se estima un punto de recombinación inicial menor al observado en el SIMPLOT, alrededor de la posición 80 (Fig. 4.4.3 complementaria). De todas formas, se puede concluir que el evento de recombinación ocurrió dentro de una región extensa del gen *rep*.

En definitiva, este artículo evidencia la circulación de cepas no recombinantes (PCV2_Uy3, genotipo PCV2b-1A) y recombinantes inter-genotípicos (PCV2_Uy1 y PCV2_Uy2, PCV2b-1A/PCV2a-2D), siendo estas últimas las primeras cepas recombinantes reportadas en Sudamérica. Asimismo, se proponen diferentes fuentes de infección por PCV2 en Uruguay, probablemente involucrando orígenes brasileños y europeos. Estos hallazgos concuerdan con el hecho de que frecuentemente el genoma de PCV2 puede experimentar eventos de recombinación sobre todo en la primera región del gen *rep* (Olvera et al., 2007) y es por ello, que este trabajo sugiere que para la correcta caracterización genética de cepas de PCV2 es necesario analizar ambos genes y no sólo el gen *cap*.

Por último, cabe resaltar que en este trabajo se optimizó un sistema de detección molecular del genoma viral basado en una PCR anidada que mejora la sensibilidad y la especificidad y es la técnica que se utilizó para el análisis del resto de las muestras de esta tesis.

ARTÍCULO II

Infection, Genetics and Evolution 19 (2013) 23–31

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid

Molecular analysis of Porcine Circovirus Type 2 strains from Uruguay: Evidence for natural occurring recombination

Natalia Ramos [a], Santiago Mirazo [a], Gustavo Castro [b], Juan Arbiza [a,*]

[a] Sección Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, Montevideo 11400, Uruguay
[b] División Sanidad Animal, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Constituyente 1476, Montevideo 11200, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:
Received 11 March 2013
Received in revised form 11 June 2013
Accepted 14 June 2013
Available online 24 June 2013

Keywords:
Porcine Circovirus Type 2
Molecular analysis
Inter-genotypic recombination
Uruguay

ABSTRACT

Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) is a worldwide distributed virus and is considered an important emerging pathogen related to several distinct disease syndromes in pigs.

Genomic structure consists of three major open reading frames (ORFs). ORF1 (*rep* gene) encodes replication-related proteins, ORF2 (*cap* gene) encodes the capsid protein and ORF3 encodes a protein putatively involved in virus-induced apoptosis.

Based on *cap* gene sequences, PCV2 strains are classified into two main genotypes, PCV2a with five clusters (2A–2E) and PCV2b with three clusters (1A–1C).

According to previous theorical studies, PCV2 strains can eventually undergo intra and inter-genotype recombination, mainly within the *rep* gene. Ever since, several evidences of recombination in the field have been reported and confirmed this hypothesis.

In South America, data regarding molecular characterization of PCV2 strains is still scant. Genotyping studies in the region have concluded that PCV2b is the predominant circulating genotype in the region and till now, no recombinant strains have ever been reported.

In this work we thoroughly characterized at the molecular level Uruguayan PCV2 strains by extensive sequence data analysis. Moreover, recombination software tools were applied to explore and characterize eventual occurrence of natural recombination events.

Two recombinant PCV2 strains were detected in this study, as a consequence of an inter-genotype recombination event between PCV2b-1A and PCV2a-2D, as the major and minor parent, respectively. According to recombination software analysis, in both cases the event occurred within the ORF1.

Herein, extensive viral sequence dataset is provided, including the characterization of the first PCV2 recombinant strains ever reported in South America. Additionally, our results suggested a multi-centered source of PCV2 infection in Uruguay, which probably involved Brazilian and European origins.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) is an extensively distributed pathogen considered an important emerging virus related to several distinct disease syndromes in pigs, collectively known as Porcine Circovirus Associated Diseases (PCVAD) (Opriessnig et al., 2007). One of the major syndromes is the Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) which has a severe economic impact on swine production and industry worldwide (Chae, 2005). Common clinical signs in this emerging disease include wasting, growth retardation and enlarged lymph nodes (Allan and Ellis, 2000). PCVAD also comprise Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome (Rosell et al., 2000), Porcine Respiratory Disease Complex (Kim et al., 2003) and reproductive failure (West et al., 1999). In addition, PCV2 has been associated with others swine diseases as exudative epidermitis (EE) (Kim and Chae, 2004; Wattrang et al., 2002), and congenital tremor (Stevenson et al., 2001).

PCV2 belongs to *Circoviridae* family and is a small non-enveloped virus, containing a single-strand ambisense circular DNA genome of about 1.76 kb (Allan and Ellis, 2000). Genomic structure consists of three major open reading frames (ORFs). ORF1 (*rep* gene) encodes replication-related proteins (Mankertz and Hillenbrand, 2001), ORF2 (*cap* gene) encodes the capsid protein which forms the icosahedral capsid (Nawagitgul et al., 2000) and ORF3 encodes a protein putatively involved in virus-induced apoptosis (Liu et al., 2005).

Based on phylogenetic analysis performed with *cap* gene, PCV2 strains are classified into two main genotypes, PCV2a with five clusters (2A–2E) and PCV2b with three clusters (1A–1C) (Olvera et al., 2007; Segalés et al., 2008). A third genotype, PCV2c, was only found in Denmark (Dupont et al., 2008).

* Corresponding author. Tel.: +598 2 5258618x7140; fax: +598 2 5258617.
E-mail addresses: nramos@fcien.edu.uy (N. Ramos), smirazo@fcien.edu.uy (S. Mirazo), gucastro@mgap.gub.uy (G. Castro), jarbiza@fcien.edu.uy (J. Arbiza).

1567-1348/$ - see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.06.017

Despite the apparently different pathogenicity of the PCV2 strains, analysis of their genomes of worldwide isolates showed a high level of sequence homology (>93%) among them (Larochelle et al., 2002; Mankertz et al., 2000; Meehan et al., 2001; Olvera et al., 2007). Nevertheless, point mutations together with recombination are important forces of PCV2 evolution that contribute to generate genetic variations between viral genomes.

The eventual existence of PCV2 recombination was evaluated by Olvera et al., 2007, analyzing a large dataset of complete genome PCV2 sequences deposited in GenBank using recombination software. Ever since, several evidences of recombination in the field have been reported to validate this hypothesis (Cadar et al., 2012; Cai et al., 2011, 2012; Cheung, 2009; Gagnon et al., 2010; Hesse et al., 2008; Kim et al., 2009; Ma et al., 2007). Moreover, the co-infection with PCV2 strains of different genotypes in pig population, the precondition for recombination, has also been reported (Cheung, 2009; Zhai et al., 2011).

In South America, data regarding molecular characterization of PCV2 isolates is still scant. Genotyping studies of the virus have been carried out exclusively in Brazil, Argentina, Chile and Uruguay, concluding that PCV2b is the predominant circulating genotype in the region (Noriega et al., 2007; Pereda et al., 2011; Ramos et al., 2012; Ciacci-Zanella et al., 2009). Co-circulation of both main genotypes has been detected only in Brazilian pig population (Ciacci-Zanella et al., 2009; de Castro et al., 2012). Nevertheless, in South America, the coexistence of multiples strains in the same pig has not ever been identified and cases of natural recombination have not ever been reported.

In Uruguay, the first set of PCV2 strains has been identified in 2011 in piglets affected with EE (Ramos et al., 2012). Preliminary sequence analysis revealed that the isolates belonged to PCV2b genotype and were closely related to a set of Brazilian PCV2 strains.

The aim of this work was to thoroughly investigate the genetic heterogeneity of PCV2 strains isolated from pigs of two Uruguayan herds, in order to contribute to shedding light over the molecular epidemiology of this emergent infection in the region.

Herein, we present a comprehensive molecular study of the PCV2 strains detected, analyzing an extensive sequence of the viral genome. Our findings reveal the circulation of two natural intergenotypic PCV2 recombinants for the first time in South America, providing an additional evidence of recombination in the field strongly supported by incongruent phylogenetic trees and data from recombination software analysis. We also report the first complete genome sequence data of PCV2 strains from Uruguay.

2. Materials and methods

2.1. Cases and samples

In this study were included three piglets belonging to two Uruguayan herds. Two of them presented PCV2 associated symptoms and the third was asymptomatic.

One of the clinical cases included in this investigation was previously described Ramos et al. (2012) and corresponded to an animal affected with EE. The second clinical case evaluated corresponded to a piglet with PMWS-associated symptoms including wasting and growth retardation.

Blood samples of piglets were extracted by trained veterinary personnel, and serum was obtained.

2.2. DNA extraction and PCV2 detection

DNA was extracted from 200 μL of serum using a commercial kit (QIAamp DNA Mini Kit QIAGEN) according to manufacturer's instructions.

PCV2 DNA detection of affected EE piglet is published elsewhere (Ramos et al., 2012) and the strain was named PCV2_Uy 1 in this investigation. Remaining two cases included in this study were diagnosed under a different and more sensitive experimental protocol. In order to detect PCV2 in this samples, a small region within *cap* gene of 225-bp was amplified by nested PCR as previously described Kim et al. (2001).

2.3. Amplification of cap and rep gene by PCR

The complete ORF2 sequence of the PCV2 strain isolated from piglet affected with EE was previously obtained (Ramos et al., 2012). In order to amplify the entire viral *cap* gene of remaining cases, a single PCR was carried out using the primer set reported by Fort et al. (2007). PCR amplification were performed in 50 μl reaction volume containing 1X PCR buffer, 2 mM $MgCl_2$, 0.5 μM each primer, 0.2 mM of each dNTP and 1.5 U Taq DNA polymerase (Fermentas, Life Sciences) and 10 μL of DNA. Cycling conditions were: 94 °C for 5 min, followed by 37 cycles of 30 s at 94 °C, 1 min at 50 °C and 1 min at 72 °C and a final extension cycle of 10 min at 72 °C.

In addition, the whole *rep* gene was also amplified by a PCR method according to Liu et al. (2005). The PCR reaction mixture was the same as for the *cap* gene and cycling conditions consisted of an initial step at 94 °C for 5 min, 40 cycles of 45 s at 94 °C, 1 min at 58 °C and 1 min at 72 °C and a final extension at 72 °C for 10 min.

PCR products of the expected size were purified using a commercial kit (NucleoSpin® Extract II, Macherey–Nagel, Germany) and sequenced in both directions by Macrogen Sequencing Service, Korea. To corroborate the nucleotide sequence in each case, PCR reactions were performed and sequenced three times.

2.4. Phylogenetic analysis and genetic typing using cap and rep gene

In order to conduct genotyping studies, the molecular analysis of the three PCV2 strains from Uruguay based on *cap* gene was performed with ORF2 published sequences corresponding to different PCV2 genotypes and subtypes. In addition, seven regional strains were included with the aim to establish the relationship between Uruguayan strains and other South American isolates. Sequence alignment was carried out using Clustal W software and the degree of identity among sequences at nucleotide and amino acid was determined by using BioEdit v. 7.0.5.

Phylogenetic tree was reconstructed based on 702 nucleotide sequence by neighbour-joining method with the Kimura two-parameter (K2P) model as the model of nucleotide substitution using MEGA v 5.0 software. Bootstrap values were determined with 1000 replicates of the dataset and a consensus tree was generated. A PCV1 isolate was included as an out-group (FJ475129).

The molecular characterization of the isolates derived from *rep* gene analysis was carried out by a similar approach to that used for the ORF2 region. ORF1 nucleotide sequences of several PCV2 strains deposited in GenBank were included in the phylogenetic analysis and consensus neighbor-joining tree was constructed on the basis of 945 nucleotide sequence.

2.5. Recombination analysis

The recombination study was performed analyzing the entire PCV2 genome of potential recombinants. The complete nucleotide sequences were obtained by PCR amplification of three overlapping amplicons as previously described Vlasakova et al. (2011). Sequencing results of purified PCR products were spliced and consensus sequences were obtained for the two potential recombinant strains isolated.

In order to find evidence of the possibly recombinant origin of Uruguayan strains an integrated software package, the recombination detection program (RDP v.3.44), was used (Martin et al., 2010). This computer program detects recombinants from a group of aligned DNA sequences using a range of different recombination detection methods. Seven methods (RDP, GeneConv, BootScan, MaxChi, Chimera, SiScan, 3Seq) were evaluated in this study and a highest acceptable *p*-value of 0.01 and Bonferroni correction were used as general settings. To minimize increasing noisy recombination signals, a small dataset of selected complete PCV2 genomic sequences of different genotypes and subtypes ($n = 35$, shown in Supplementary Material) were included in the RDP analysis excluding known recombinant sequences. Each potential recombinant strain was analyzed separately.

Additionally, a BootScan analysis implemented in SIMPLOT software v. 3.5.1 (Lole et al., 1999) was employed to further investigate this possible recombination event and to confirm the potential parental PCV2 lineages and putative recombination breakpoints previously analyzed and estimated by RDP software.

Four groups of complete genomic sequences were included in SIMPLOT analysis: a group of potential recombinants (two Uruguayan isolates), a group of a reference sequences from PCV2b 1A genotype (AY322001; AY484414; DQ923523), a group of PCV2a 2D genotype sequences (AY322004; AF109399; EU057186) and an out-group (PCV1 isolate FJ475129). A similarity plot was firstly generated comparing the percentage of identity versus genome position of the query isolate to the panel of references sequences. Thereafter, the bootscanning analysis was performed with a window size of 200 bp and a step size of 20 bp. Potential recombination event was considered when a query sequence groups alternatively (with an excess of ~70% permuted trees) with different reference sequences across its entire length.

Sequence comparison of possible recombinants and their potential parents at genetic marker positions for different genotypes and subtypes clusters were also evaluated and considered as an additional evidence of recombination.

3. Results

3.1. PCV2 detection

PCV2 DNA was detected in the two additional cases included in this study (asymptomatic piglet and the animal with PMWS-associated symptoms) and an expected 225 pb fragment was amplified by PCR in each case. The newly detected strains isolated from these two piglets were named PCV2_Uy 2 and PCV2_Uy 3, respectively.

3.2. Molecular analysis of cap gene

The complete *cap* coding region was amplified and sequenced in the two newly cases detected. Phylogenetic reconstruction based on this gene revealed that Uruguayan strains were closely related with PCV2b genotype isolates and grouped within 1A/B cluster (Fig. 1).

The analysis of the *cap* gene showed a nucleotide identity of 99.7% among Uruguayan isolates and an identity of 100% at amino acid level. Sequence comparison of our isolates with strains reported from South America showed a very high nucleotide and amino acid sequence identity (99.7–100% and 100%, respectively) with two of the Brazilian isolates included in this study (accession numbers DQ861896 and DQ923523). In particular, the isolate PCV2_Uy 3 was identical at both nucleotide and amino acid level with these Brazilian strains and also shared a very high nucleotide and amino acid sequence similarity (99.8% and 100%, respectively) with the Brazilian isolate DQ923524. On the other hand, our isolates shared a nucleotide and amino acid identity of 99.1–99.5% with Argentinean strains, which were in turn more closely related to isolates from France, Cuba, Canada and USA (Fig. 1).

By contrast, sequences comparision with other two genotypes revealed that PCV2c strains resulted to be the most distantly related sequences with the Uruguayan isolates (nucleotide and amino acid similarities of 90.1–90.7% and 87.9–88.4%, respectively). In addition, the comparison of our strains with PCV2a genotype isolates revealed a percentage of nucleotide identity ranging from 91.5% to 93.4% and amino acid identities of 90–93.5%, sharing the slighter similarity with strains of subtype 2D.

3.3. Molecular analysis of rep gene

A 945-bp region corresponding to the entire ORF1 gene was amplified and sequenced in the three strains isolated from Uruguay.

As it was not possible to differentiate sequences from cluster 1A and 1B using the cap gene, the analysis of the rep region was conducted to further investigate the genetic subtyping of the strains.

The phylogenetic reconstruction using ORF1 coding region indicated that PCV2_Uy 3 was closely related to sequences of PCV2b-1A subtype, comprising a statically support cluster (bootstrap value 98%) (Fig. 2). In particular, as showed with *cap* gene analysis, this Uruguayan isolate clustered together with Brazilian strains DQ923523 and DQ923524 sharing with them 99.8% and 100% identities at nucleotide and amino acid level, respectively.

Surprisingly and by contrast, the phylogenetic tree showed that PCV2_Uy 1 and PCV2_Uy 2 grouped together within PCV2a genotype-2D subtype cluster (Fig. 2). Construction of identity matrices revealed that PCV2_Uy 1 and 2 isolates shared a nucleotide identity of 99.5% among them and a sequence homology ranging from 98.9% to 99.3% with the PCV2a-2D isolates included in the analysis. Nevertheless, these Uruguayan strains resulted to be more distantly related with PCV2_Uy 3 showing a nucleotide similarity of 97.9%. Comparison of PCV2_Uy 3 with PCV2a-2D ORF1 sequences also revealed less percentages of nucleotide identity (97.6–97.8%).

On the other hand, amino acid analysis showed that PCV2 isolates included in this study shared percentages of identity $\geqslant 97\%$, showing that *rep* protein is highly conserved between viral genotypes compared with *cap* gene (Olvera et al., 2007).

Amino acid sequence identity among Uruguayan isolates ranged from 99.3% to 99.6% and in particular, PCV2_Uy 1 was identical at amino acid level with PCV2a-2D strains AF201306, AY322004, and EU057186.

A single amino acid change was identified between PCV2_Uy 1 and PCV2_Uy 2 (Ile105Met). Moreover, these Uruguayan strains presented Glu-34 as well as all isolates belonging to PCV2a genotype. However, PCV2_Uy 3 presented Asp-34 as all members of the PCV2b-1A cluster analyzed.

3.4. Identification of conflicting phylogenies

Preliminary analysis of two different genomic regions showed incongruent phylogenetic trees for two Uruguayan isolates PCV2_Uy 1 and 2. The fact that these viruses clustered within PCV2b-1A/B lineage when the *cap* gene was analyzed (Fig. 1) and grouped within PCV2a-2D cluster when the *rep* gene was used (Fig. 2), provided evidence of a possible inter-genotypic recombination event. Additionally, the phylogenetic tree reconstructed based on 1647 nucleotides of viral genome (combining both genes) showed that potential recombinant strains grouped together with high bootstrap values (100%) in a new cluster (non 1A, non 1B, non 1C) within the PCV2b genotype. However, as expected, PCV2_Uy 3 clustered together with Brazilian isolates DQ923523 and DQ923524 within PCV2b genotype subtype 1A (bootstrap value of 99%) (data not shown).

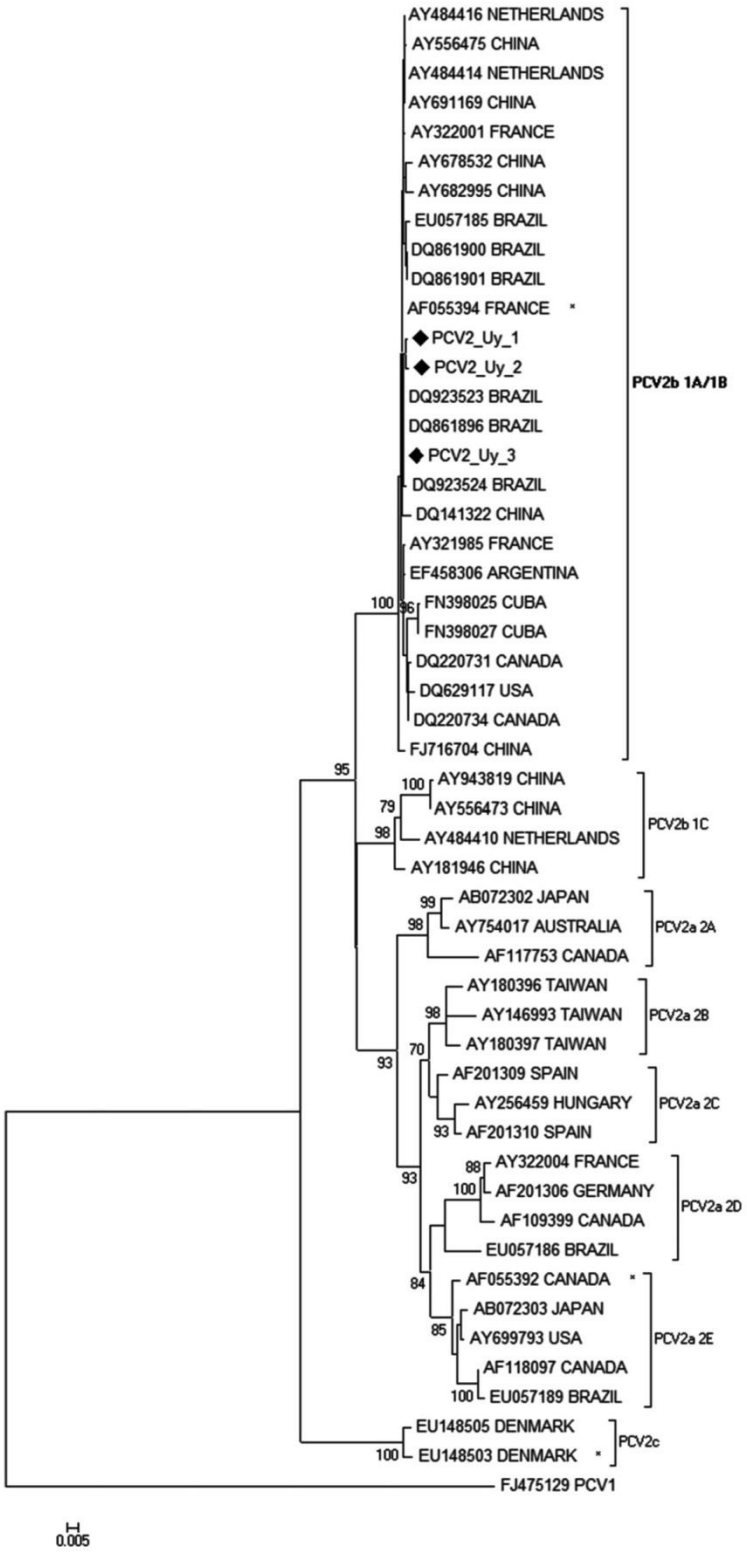


Fig. 1. Phylogenetic tree constructed by the neighbor-joining method based on the complete 702-nt sequence of the *cap* gen. Uruguayan strains (♦) were compared with forty-seven strains and GenBank accession numbers and country are specified. Genotypes and subtypes are indicated with straight brackets. Asterisks indicate reference strains of each PCV2 genotype. PCV1 isolate FJ475129 was included as outgroup.

3.5. Genetic characterization of potential recombinants complete genomes

The whole genome of PCV2_Uy 1 and 2 was amplified and sequenced. In both cases, the genome length consisted of 1767 nucleotides. ORF1 comprised bases 51–995, ORF2 region was located between bases 1734–1033 (complement) and ORF3 gene between nucleotides 671–357 (complement). The nucleotide identity among strains was 99.6% presenting a total of six nucleotide differences, four within ORF1 region (genome positions: 365, 381, 596,

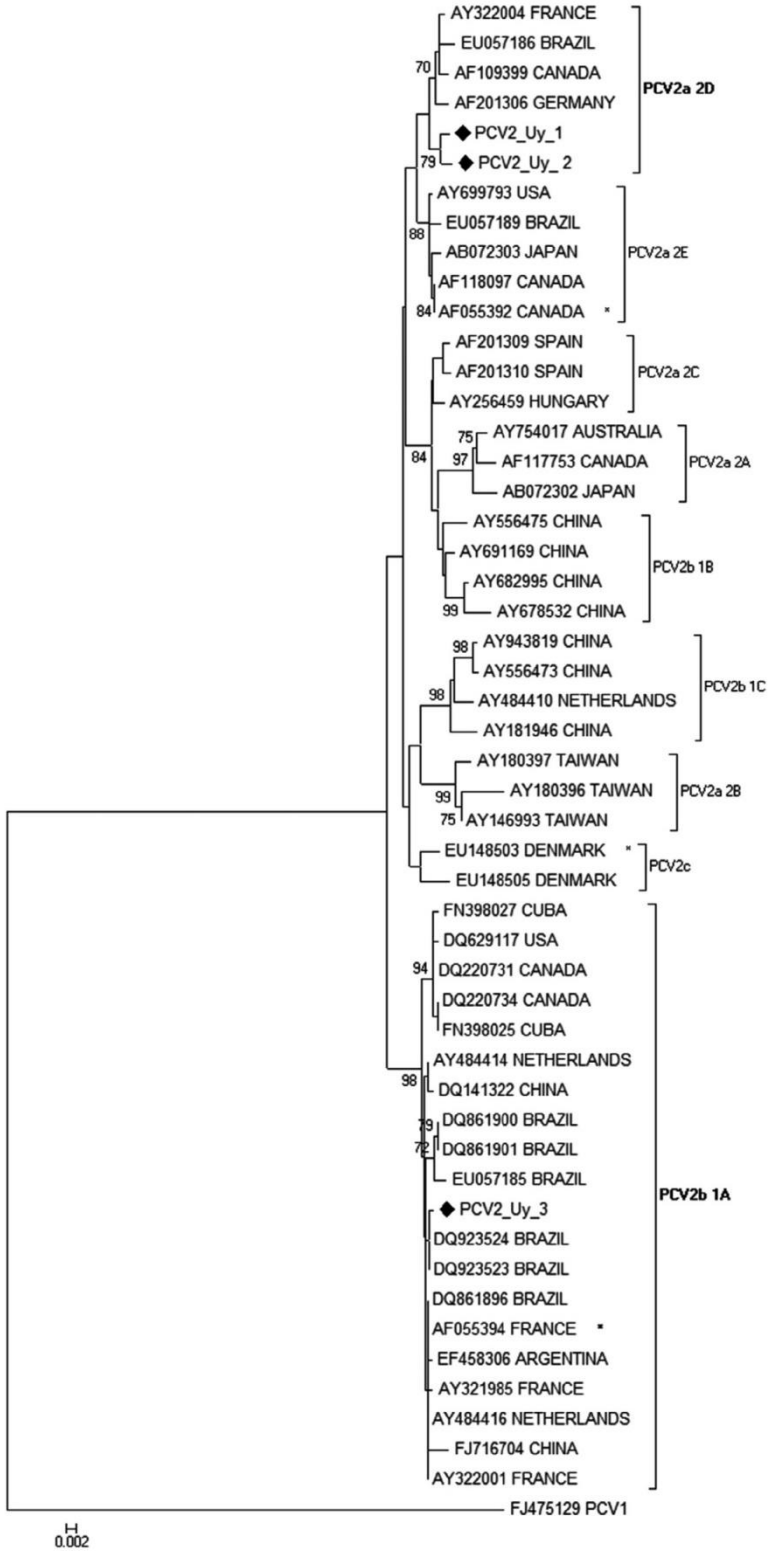


Fig. 2. Phylogenetic tree constructed by the neighbor-joining method based on the entire 945-nt sequence of the PCV2 ORF1. Forty-seven strains whose complete sequences have been reported (accession numbers and country indicated) were included for comparison with PCV2 strains isolated in this study (♦). Genotypes and subtypes are indicated with straight brackets. Asterisks indicate reference strains of each PCV2 genotype. PCV1 isolate FJ475129 was included as outgroup.

971) and two within the *cap* gene (genome positions: 1258 and 1549). Nucleotide changes in intergenic regions were not observed. Of note, most of the differences between PCV2_Uy 1 and 2 were observed within *rep* gene in the region corresponding to ORF3, resulting in two amino acid changes in the ORF3 protein among isolates (Phe26Leu; Asn103His).

Comparing these potential recombinants sequences with the 1665-nucleotide sequence amplified of PCV2_Uy 3 isolate, a total

of twenty-five nucleotides differences were observed. This PCV2b-1A Uruguayan strain shared a nucleotide identity of 98.6% with PCV2_Uy 1 and PCV2_Uy 2, presenting different changes with each one. Noticeably, twenty-one changes were found within ORF1 region and seven were observed within the region corresponding to ORF3 gene, resulting in three amino acid changes (Asp37Tyr; Gly41Ser; Lys104Gln) in the proapoptotic protein comparing PCV2_Uy 3 with the Uruguayan recombinant strains.

Nucleotide sequences data reported in this paper have been submitted to GenBank and have been assigned the accession numbers KC688418, KC688419 and KC688420 for PCV2_Uy 1, PCV2_Uy 2 and PCV2_Uy3, respectively.

3.6. Recombination software analysis

PCV2_Uy 1 and 2 were detected as recombinants using RDP3 software and in both cases the recombination events were statistically supported by RDP, GENECONV, BootScan, Maxchi, Siscan and 3Seq with average p-values $\leqslant 4.6 \times 10^{-3}$. The two recombinants originated from the same parental lineages. Results from software analysis showed with percentage of probabilities higher than 99% that the major parent was a PCV2b-1A strain and the minor parent was a member of PCV2a-2D genotype. In particular, the parent sequences selected from the dataset resulted to be AY32001 (major parent) and AY320004 (minor parent) for PCV2_Uy 1 and AY484414 (major parent) and AF109399 (minor parent) for PCV2_Uy 2.

In addition, to corroborate the results obtained using RDP software, a similarity plot analysis was carried out with selected putative parental sequences using SIMPLOT software. Results obtained for the recombination analysis were very similar among isolates studied. In the Fig. 3a is shown the similarity plot generated for PCV2_Uy 1. The results indicated that the recombinant presented a high nucleotide similarity with a PCV2a-2D isolate (blue) within a large region of the *rep* gene and with a PCV2b-1A strain (red) within the complete *cap* gene (Fig. 3a). Bootscanning analysis also suggested and confirmed discrepancies in phylogenetic origin of PCV2_Uy 1 and 2 (Fig. 3b). This analysis clearly showed that the crossover region was located in the *rep* gene and potential breakpoints were estimated to be nt151 and nt773 for PCV2_Uy 1 and nt140 and nt768 for PCV2_Uy 2 (data not shown). Similar data was obtained by RDP analysis.

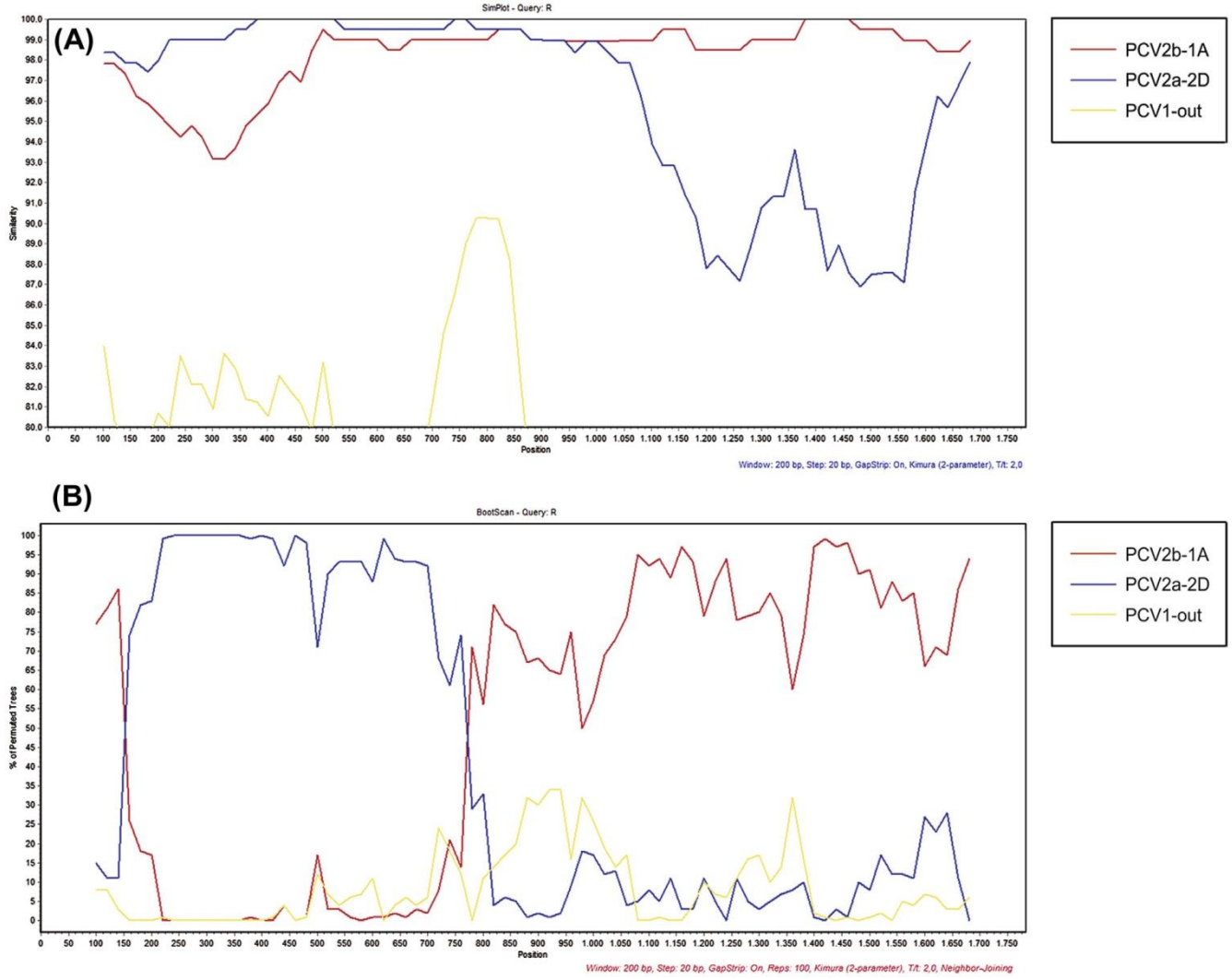


Fig. 3. SIMPLOT recombination analysis. (A) Similarity plot generated using the complete genome of PCV_Uy 1 as query sequence (*R*) and representative parent complete genome sequences of genotypes PCV2b-1A (red) and PCV2a-2D (blue) (AY32001 and AY320004, respectively). A PCV1 isolate was used as outgroup (yellow). (B) Bootscanning analysis performed with PCV_Uy 1 as query sequence using a sliding window of 200 nt moving in 20 nt steps. (For interpretation of color in this Figure, the reader is referred to the web version of this article).

Table 1
Nucleotide sequence comparison at genetic marker positions between Uruguayan isolates and strains of different PCV2 genotypes and subtypes.

Genome Position	PCV2b_1A	PCV2b_1B	PCV2b_1C	PCV2a_	PCV2a_2D	PCV2_Uy	PCV2_Uy 3
(*Rep* Gene)				2A,2B,2C,2E		1 y 2	
89 (39)	C	A	A	A	A	C	C
110 (60)	T	G	G	G	G	T	A*
152 (102)	T	G	G	G	G	G	T
161 (111)	A	C	C	C	C	C	A
248 (198)	G	G	G	G	A	A	G
254 (204)	G	A	A	A	A	A	G
279 (229)	C	C	C	C	T	T	C
338 (288)	C	T	T/C	T/C	T	T	C
389 (339)	G	A	A	A	A	A	G
551 (501)	T	G/C	G	C/G	C	C	T
716 (666)	C	C	G	G	G	G	C
737 (687)	G	G	C	G	G	G	G
752 (702)	A	A	T	A	A	A	A
761 (711)	A	A	T	A	A	A	A
872 (822)	T	T	C	C	C	T	T
(*Cap* Gene antisense)							
1328 (408)	G	G	T	T	T	G	G
1465 (271)	C	C	C	T	T	C	C
1470 (266)	C	C	A	A	A	C	C
1471 (265)	G	G	G	T	T	G	G
1472 (264)	G	G	G	T	T	G	G
1473 (263)	G	G	G	T	T	G	G
1474 (262)	G	G	G	T	T	G	G

* Specific nucleotide mutation of PCV2_Uy3 isolate.

3.7. Sequence comparison of recombinants and their potential parental lineages

To further investigate the recombination events, sequence comparison at genetic marker positions was carried out between recombinants and PCV2 strains of different genotypes and subtypes (Table 1). This analysis was useful to corroborate the probably site of recombination (black gray shading). Data obtained confirmed (revealed by marker positions 89 and 110 and 248, 279, 338, 551 and 716) that the parental lineages were PCV2b-1A and PCV2a-2D, respectively (Table 1).

For the Uruguayan isolate PCV2_Uy 3 the analysis evidenced almost exclusively PCV2b-1A marker positions. However, a specific nucleotide difference was observed in genome position 110 (Table 1) which was also noted in only two Brazilian isolates (DQ923523 and DQ923524).

4. Discussion

PCV2 is an emerging pathogen causative of several distinct syndromes and diseases and is considered to have a severe economic impact on swine production (Segalés et al., 2005). In South America little is known about the molecular epidemiology of this emergent viral infection. Investigations about genetic heterogeneity of PCV2 strains in South America evidenced that the PCV2b genotype (and particularly the subtype 1A) is the most prevalent in this area (Pereda et al., 2011; Ramos et al., 2012; Ciacci-Zanella et al., 2009). The circulation of PCV2a genotype was also identified in Brazil and only subtypes 2D and 2E has been detected (Ciacci-Zanella et al., 2009).

In this study, we thoroughly investigated the genetic variability of Uruguayan strains on the basis of the cap and rep genes analysis. The ORF2 region, the most variable in the PCV2 genome, is a reliable phylogenetic marker for PCV2 strains since it is possible to reconstruct the same tree as with the whole viral genome. For this reason the cap gene is the most suitable for genotyping studies (Olvera et al., 2007). Consistent with data reported in our previous study (Ramos et al., 2012), phylogenetic tree performed with this gene showed that PCV2 Uruguayan strains clustered with PCV2b genotype isolates and more specifically within 1A/B cluster (Fig. 1). Of note, it was not possible to differentiate sequences from cluster 1A and 1B in this analysis which is not surprisingly since the segregation into cluster 1A and 1B could optimally be achieved by analyzing the rep gene (Olvera et al., 2007). In fact, the phylogenetic reconstruction based on ORF1 revealed that the Uruguayan strain PCV2_Uy3 belonged to subtype 1A (Fig. 2). This case corresponded to a piglet with PMWS-associated symptoms belonging to a herd localized in Montevideo and notably, was found to be very closely related to two Brazilian isolates. Tacking to account that our country keeps with Brazil a wide commercial exchange including porcine livestock, it is not surprisingly that PCV2_Uy 3 probably was to do an imported case. Nevertheless, our capacity to determine the potential source of infection is very limited by the absence of information about the origin of breeding pigs of this herd. However, it is well known that Uruguayan herds have brought breeding pigs from the south of Brazil where phylogenetic related strains DQ923523 and DQ923524 have been reported (Dezen et al., 2010).

By contrast, the analysis of the ORF1 gene showed that PCV2_Uy 1 and 2 clustered within the PCV2a-2D cluster (Fig. 2) and resulted to be distantly related to PCV2_Uy 3 and PCV2b-1A isolates.

The existence of conflicting phylogenies of the different viral genomic regions for PCV2_Uy 1 and 2 implied a possible evidence for natural recombination. In fact, this hypothesis was confirmed using recombination detection programs (Fig. 3) and sequence comparison at genotype-specific marker positions between recombinants and potential parent lineages (Table 1). Moreover, phylogenetic reconstruction based on the complete genome showed that PCV2_Uy 1 and 2 grouped together in a new cluster within PCV2b genotype with a very high statistical support (bootstrap value, 100%) (data not shown), providing an additional evidence of recombination event since it was not possible to reconstruct the same tree as with the cap gene.

Recombination is an important event for viral evolution. PCV2 can undergo recombination contributing to generate genetic diversity among strains (Olvera et al., 2007). According to the theoretical recombination analysis of PCV2 GenBank sequences realized by Olvera et al. (2007), the *rep* gene was the best supported recombinant region. Precisely, inter-genotypic PCV2 natural recombination events occurring within the *rep* gene have been reported (Hesse et al., 2008; Kim et al., 2009; Ma et al., 2007). Nevertheless, various studies have been also demonstrated inter and intra-genotypic recombination within the ORF2 region (Cadar et al., 2012; Cai et al., 2012).

In this study, recombination analysis showed that the recombination events have been occurred between PCV2b and PCV2a strains (Fig. 3). Results revealed that both Uruguayan recombinants are similar and subtypes involved in recombination process were 1A and 2D as major and minor parent, respectively. In fact, according to Olvera et al. (2007) these subtype clusters were mainly identified as the most common parents of PCV2 recombination. Additionally, the recombination site for PCV2_Uy 1 and 2 was predicted to be within ORF1 gene. Previous hypothetical analysis showed that the best supported putative recombination beginning was in the first part of the *rep* gene (between positions 42–89) and the best supported ending was between position 389 and 429 (corresponding to splice donor for the *rep'* transcript) (Olvera et al., 2007). According to these observations, subsequent investigations have been also demonstrated that the region of recombination occurred commonly in the first part of the *rep* gene (Kim et al., 2009; Ma et al., 2007). Nonetheless, in this study the estimated beginning breakpoint was at the positions 151 or 140 and the ending breakpoint was at positions 773 or 768, corresponding to a more comprehensive recombination site.

Recombinants strains belonged to a herd localized in Canelones (south-eastern of Uruguay). One of them was isolated from an affected animal with EE and the other corresponded to an asymptomatic piglet obtained one month after the EE outbreak. Taking into account that these cases belonged to the same herd and shared a high nucleotide identity, one may assume that these two PCV2 isolates were due to the same source of infection. Furthermore, due to the fact that the more likely parental strains identified in recombination analysis were isolated from France (AY32001 and AY320004) and Netherlands (AY484414), an European origin of these strains should not be discarded. Even more, it is known that Uruguay has also imported semen and breeding pigs from Spain and Netherlands. Once more, the information regarding the origin of breeding animals in this herd is lacking, thus restraining our capacity to shed light over the potential source of infection.

By contrast, a Brazilian origin for recombinants is not probably since available strains from this country were also included in the RDP recombination analysis but were not selected as potential recombinant parents by the software. Additionally, it was corroborated by using SIMPLOT. Anyway, the lack of larger sequence dataset including several complete PCV2 genome sequences from South America, limited the conclusions of our study. Unfortunately the dataset of GenBank PCV2 complete genome sequences in South America only include eighteen entire genome sequences of Brazilian isolates and one corresponding to an Argentinean strain. In addition, the possibility of an autochthonous recombination event remains to be evaluated by the investigation of the circulation of PCV2a genotype in nationwide swine herds, and even in the wild boar population.

On the other hand, as cap gene is considered the viral phylogenetic marker, the majority of phylogenetic studies of PCV2 were only conducted on the basis of ORF2. Nevertheless, the results obtained in this study demonstrated that the combined analysis with rep and cap gene or the complete genome analysis is necessary and mandatory to really elucidate the genetic variability and phylogenetic relationships between PCV2 isolates, basically due to recombination events among PCV2 strains, commonly occurring within ORF1 region.

Intra and inter-genotype PCV2 recombination can lead to the emergence of new PCV2 strains contributing to the viral genetic diversity. Amino acid sequence comparison between recombinants and the PCV2b-1A strain isolated from Uruguay revealed that the recombination event generated one amino acid change in Rep protein, typically found in PCV2a strains (Asp34Glu). This resulted in a chimerical virus with a Rep protein of genotype PCV2a and a cap protein of PCV2b genotype. Moreover, the numerous nucleotide differences among recombinants and the non recombinant strain within ORF1 produced a more dramatic change in the ORF3 protein generating three substitutions at positions 37, 41 and 104. Although the effect of PCV2 recombination on the viral pathogenesis is still unclear, these kinds of changes within the ORF3 protein should be considered since this protein plays a role in viral pathogenesis (Liu et al., 2005). However, further investigations including isolation of recombinant virus and studies of protein function are needed to evaluate the potential alterations in the pathogenicity.

Additionally, although recombinants shared a high sequence identity, most of the nucleotide differences among them were also identified within the ORF3 gene. For this reason, the comparison of the ORF3 protein function between these viruses is of special interest since PCV2_Uy1 and 2 corresponding to symptomatic and asymptomatic cases, respectively.

The molecular analysis of three Uruguayan strains from two swine herds evidenced the existence of different sources of PCV2 infection in our country, suggesting possible Brazilian and European sources. Nowadays, diversity among isolates is probably explained by the exchange of pigs among countries, moving their accompanying viruses. According to Cortey et al. (2012), globalization is the main factor leading the increase of the risk of emerging pathogens outbreaks. As a result, the circulation of PCV2 in nationwide swine herds must be investigated and molecular characterization of complete PCV2 genomes should be conducted to elucidate the genetic variability and potential recombination events that can affect the characteristic of the virus, providing information about regional molecular epidemiology and PCV2 evolution.

5. Conclusions

In summary, we thoroughly analyzed three PCV2 strains isolated from Uruguay on the basis of a comprehensive study with the viral rep and cap genes. Our findings revealed the circulation of a strain belonging to the PCV2b-1A genotype closely related to a set of Brazilian strains. More interestingly, we identified for the first time in South America the circulation of two PCV2 recombinant isolates which arose from recombination events between PCV2b-1A and PCV2a-2D strains within ORF1 region. Indeed, this study provides an additional strongly supported evidence for

natural recombination in the field using different recombination detection methods. This investigation also suggests that phylogenies based on single genome region could be conducted to wrong interpretations and the analysis of complete genomes is the best option to investigate PCV2 genetic variability and possible recombination events.

Data reported here contributes to better knowledge of the molecular epidemiology of this emergent virus in a regional context demonstrating the existence of newly emergent recombinants strains ever reported in South America. Additionally, we generated a set of PCV2 complete and partially complete genome sequences contributing to the expansion of the limited regional dataset of PCV2 complete sequences.

Continuous investigation is essential for the knowledge of PCV2 evolution and for understanding the genetic heterogeneity of PCV2 in South America.

6. Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interests.

Acknowledgments

Authors would like to thank Dra. Dora Ruchansky for her technical support in recombinant analysis. Authors are also grateful to Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) and Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.06.017.

References

Allan, G., Ellis, J., 2000. Porcine Circoviruses: a review. J. Vet. Diagn. Invest. 12, 3–14.
Cadar, D., Cságola, A., Lorincz, M., Tombácz, K., Spînu, M., Tuboly, T., 2012. Detection of natural inter- and intra-genotype recombination events revealed by cap gene analysis and decreasing prevalence of PCV2 in wild boars. Infect. Genet. Evol. 12, 420–427.
Cai, L., Han, X., Ni, J., Yu, X., Zhou, Z., Zhai, X., Chen, X., Tian, K., 2011. Natural recombinants derived from different patterns of recombination between two PCV2b parental strains. Virus Res. 158, 281–288.
Cai, L., Ni, J., Xia, Y., Zi, Z., Ning, K., Qiu, P., Li, X., Wang, B., Liu, Q., Hu, D., Yu, X., Zhou, Z., Zhai, X., Han, X., Tian, K., 2012. Identification of an emerging recombinant cluster in Porcine Circovirus type 2. Virus Res. 165, 95–102.
Chae, C., 2005. A review of Porcine Circovirus 2-associated syndromes and diseases. Vet. J. 169, 326–336.
Cheung, A.K., 2009. Homologous recombination within the capsid gene of Porcine Circovirus type 2 subgroup viruses via natural co-infection. Arch. Virol. 154, 531–534.
Ciacci-Zanella, J.R., Simon, N.L., Pinto, L.S., Viancelli, A., Fernandes, L.T., Hayashi, M., Dellagostin, O.A., Esteves, P.A., 2009. Detection of Porcine Circovirus type 2 (PCV2) variants PCV2-1 and PCV-2 in Brazilian pig population. Res. Vet. Sci. 87, 157–160.
Cortey, M., Pileri, E., Segalés, J., Kekarainen, T., 2012. Globalisation and global trade influence molecular viral population genetics of Torque Teno Sus Viruses 1 and 2 in pigs. Vet. Microbiol. 156, 81–87.
de Castro, A.M., Cruz, T.F., Salgado, V.R., Kanashiro, T.M., Ferrari, K.L., Araujo Jr., J.P., Brandão, P.E., Richtzenhain, L.J., 2012. Detection of Porcine Circovirus genotypes 2a and 2b in aborted foetuses from infected swine herds in the State of São Paulo. Brazil. Acta Vet. Scand. 54, 29–32.
Dezen, D., Rijsewijk, F.A., Teixeira, T.F., Holz, C.L., Cibulski, S.P., Franco, A.C., Dellagostin, O.A., Roehe, P.M., 2010. Multiply-primed rolling-circle amplification (MPRCA) of PCV2 genomes: applications on detection, sequencing and virus isolation. Res. Vet. Sci. 88, 436–440.
Dupont, K., Nielsen, E.O., Baekbo, P., Larsen, L.E., 2008. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. Vet. Microbiol. 128, 56–64.
Fort, M., Olvera, A., Sibila, M., Segalés, J., Mateu, E., 2007. Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS affected pigs. Vet. Microbiol. 125, 244–255.
Gagnon, C.A., Music, N., Fontaine, G., Tremblay, D., Harel, J., 2010. Emergence of a new type of Porcine Circovirus in swine (PCV): a type 1 and type 2 PCV recombinant. Vet. Microbiol. 144, 18–23.
Hesse, R., Kerrigan, M., Rowland, R.R., 2008. Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field. Virus Res. 132, 201–207.
Kim, J., Chae, C., 2004. Concurrent presence of Porcine Circovirus type 2 and porcine parvovirus in retrospective cases of exudative epidermitis in pigs. Vet. J. 167, 104–106.
Kim, J., Han, D.U., Choi, C., Chae, C., 2001. Differentiation of Porcine Circovirus (PCV)-1 and PCV2-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. J. Virol. Methods 98, 25–31.
Kim, J., Chung, H.K., Chae, C., 2003. Association of Porcine Circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. Vet. J. 166, 251–256.
Kim, H.K., Luo, Y., Moon, H.J., Park, S.J., Keum, H.O., Rho, S., Park, B.K., 2009. Phylogenetic and recombination analysis of genomic sequences of PCV2 isolated in Korea. Virus Genes 39, 352–358.
Larochelle, R., Magar, R., D'Allaire, S., 2002. Genetic characterization and phylogenetic analysis of Porcine Circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions. Virus Res. 90, 101–112.
Liu, J., Chen, I., Kwang, J., 2005. Characterization of a previously unidentified viral protein in Porcine Circovirus type 2-infected cells and its role in virus induced apoptosis. J. Virol. 79, 8262–8274.
Lole, K.S., Bollinger, R.C., Paranjape, R.S., Gafkari, D., Kulkarni, S.S., Novak, N.G., Ingersoll, R., Sheppard, H.W., Rat, S.C., 1999. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. J. Virol. 73, 152–160.
Ma, C.M., Hon, C.C., Lam, T.Y., Li, V.Y., Wong, C.K., de Oliveira, T., Leung, F.C., 2007. Evidence for recombination in natural populations of Porcine Circovirus type 2 in Hong Kong and mainland China. J. Gen. Virol. 88, 1733–1737.
Mankertz, A., Hillenbrand, B., 2001. Replication of Porcine Circovirus type 1 requires two proteins encoded by the viral rep gene. Virology 279, 429–438.
Mankertz, A., Domingo, M., Folch, J.M., LeCann, P., Jestin, A., Segalés, J., Chmielewicz, B., Plana-Duran, J., Soike, D., 2000. Characterization of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. Virus Res. 66, 65–77.
Martin, D.P., Lemey, P., Lott, M., Moulton, V., Posada, D., Lefeuvre, P., 2010. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. Bioinformatics 26, 2462–2463.
Meehan, B.M., McNeilly, F., McNair, I., Walker, I., Ellis, J.A., Krakowka, S., Allan, G.M., 2001. Isolation and characterization of Porcine Circovirus 2 from cases of sow abortion and porcine dermatitis and nephropathy syndrome. Arch. Virol. 146, 835–842.
Nawagitgul, P., Morozov, I., Bolin, S.R., Harms, P.A., Sorden, S.D., Paul, P.S., 2000. Open reading frame 2 of Porcine Circovirus type 2 encodes a major capsid protein. J. Gen. Virol. 81, 2281–2287.
Noriega, J., Reyes, P., Bucarey, S., 2007. Circovirus porcino: un virus pequeño que genera un gran problema. Avances en Ciencias Veterinarias 22, 62–71.
Olvera, A., Cortey, M., Segalés, J., 2007. Molecular evolution of Porcine Circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. Virology 357, 175–185.
Opriessnig, T., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2007. Porcine Circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. J. Vet. Diagn. Invest. 19, 591–615.
Pereda, A., Piñeyro, P., Bratanich, A., Quiroga, M.A., Bucafusco, D., Craig, M.I., Cappuccio, J., Machuca, M., Rimondi, A., Dibárbora, M., Sanguinetti, H.R., Perfumo, J.C., 2011. Genetic characterization of Porcine Circovirus type 2 from pigs with Porcine Circovirus associated diseases in Argentina. ISRN Vet. Sci.. http://dx.doi.org/10.5402/2011/560905.
Ramos, N., Mirazo, S., Castro, G., Arbiza, J., 2012. Detection and molecular characterization of Porcine Circovirus type 2 (PCV2) from piglets with exudative epidermitis in Uruguay. Res. Vet. Sci. 93, 1042–1045.
Rosell, C., Segalés, J., Ramos-Vara, J.A., Folch, J.M., Rodriguez-Arrioja, G.M., Duran, C.O., Balasch, M., Plana-Durán, J., Domingo, M., 2000. Identification of Porcine Circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. Vet. Rec. 146, 40–43.
Segalés, J., Allan, G.M., Domingo, D., 2005. Porcine Circovirus diseases. Anim. Health Res. Rev. 6, 119–142.
Segalés, J., Olvera, A., Grau-Roma, L., Charreyre, C., Nauwynck, H., Larsen, L., Dupont, K., McCullough, K., Ellis, J., Krakowka, S., Mankertz, A., Fredholm, M., Fossum, C., Timmusk, S., Stockhofe-Zurwieden, N., Beattie, V., Armstrong, D., Grassland, B., Baekbo, P., Allan, G., 2008. PCV-2 genotype definition and nomenclature. Vet. Rec. 162, 867–868.
Stevenson, G.W., Kiupel, M., Mittal, S.K., Choi, J., Latimer, K.S., Kanitz, C.L., 2001. Tissue distribution and genetic typing of Porcine Circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tremors. J. Vet. Diagn. Invest. 13, 57–62.
Vlasakova, M., Jackova, A., Vilcek, S., 2011. Genetic typing of Porcine Circovirus type 2 (PCV-2) isolates from Slovakia. Res. Vet. Sci. 90, 168–173.
Wattrang, E., McNeilly, F., Allan, G.M., Greko, C., Fossum, C., Wallgren, P., 2002. Exudative epidermitis and Porcine Circovirus-2 infection in a Swedish SPF-herd. Vet. Microbiol. 2325, 1–13.
West, K.H., Bystrom, J.M., Wojnarowicz, C., Shantz, N., Jacobson, M., Allan, G.M., Haines, D.M., Clark, E.G., Krakowka, S., McNeilly, F., Konoby, C., Martin, K., Ellis, J.A., 1999. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with Porcine Circovirus 2. J. Vet. Diagn. Invest. 11, 530–532.
Zhai, S.L., Chen, S.N., Wei, Z.Z., Zhang, J.W., Huang, L., Lin, T., Yue, C., Ran, D.L., Yuan, S.S., Wei, W.K., Long, J.X., 2011. Co-existence of multiple strains of Porcine Circovirus type 2 in the same pig from China. Virol. J. 13 (8), 517.

Supplementary Material. Accession number, genotype and geographic origin of the 35 PCV2 strains used for RDP recombination analysis.

Accession Number	Genotype/Subtype	Geographic origin
FN398025	PCV2b/1A	Cuba
FN398027	PCV2b/1A	Cuba
DQ629117	PCV2b/1A	USA
DQ220731	PCV2b/1A	Canada
DQ141322	PCV2b/1A	China
FJ716704	PCV2b/1A	China
AY321985	PCV2b/1A	France
AY322001*	PCV2b/1A	France
EF458306	PCV2b/1A	Argentina
DQ923524	PCV2b/1A	Brazil
DQ923523*	PCV2b/1A	Brazil
EU057185	PCV2b/1A	Brazil
AY484416	PCV2b/1A	Netherlands
AY484414*	PCV2b/1A	Netherlands
AY682995	PCV2b/1B	China
AY556475	PCV2b/1B	China
AY943819	PCV2b/1C	China
AY181946	PCV2b/1C	China
AY556473	PCV2b/1C	China
AB072302	PCV2a/2A	Japan
AY754017	PCV2a/2A	Australia
AF117753	PCV2a/2A	Canada
AY180397	PCV2a/2B	Taiwan
AY180396	PCV2a/2B	Taiwan
AY146993	PCV2a/2B	Taiwan
AY256459	PCV2a/2C	Hungary
AF201309	PCV2a/2C	Spain
AY322004*	PCV2a/2D	France
AF201306	PCV2a/2D	Germany
AF109399*	PCV2a/2D	Canada
EU057186*	PCV2a/2D	Brazil
AB072303	PCV2a/2E	Japan
AY699793	PCV2a/2E	USA
EU057188	PCV2a/2E	Brazil
AF118097	PCV2a/2E	Canada

* Sequences used in SIMPLOT analysis



Figura 4.4.1 complementaria. Motivo de ADN conservado en los nucleótidos 262-267 de *cap* según el genotipo de PCV2. Alineamiento de secuencias *cap* representativas de cada genotipo PCV2. Se resalta en rojo el motivo correspondiente al genotipo PCV2b 1 A/B correspondiente a las cepas Uruguayas PCV2_Uy1, 2 y 3. En amarillo se muestra el motivo de PCV2b 1C y en verde el de PCV2a.

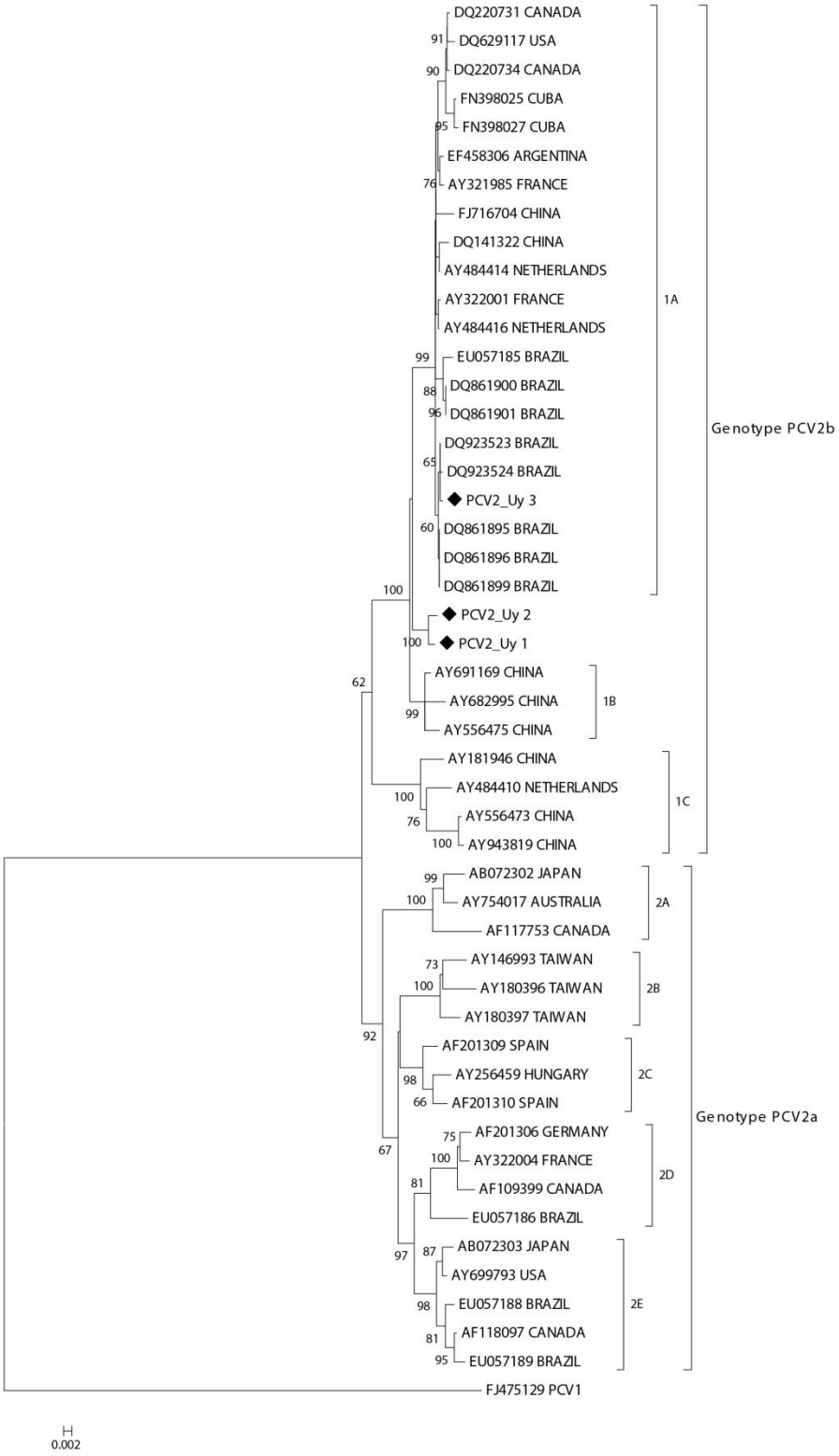


Figura 4.4.2 complementaria. Análisis filogenético de gen *rep* y *cap* solapados. Se observa como PCV2_Uy1 y PCV2_Uy2 agrupan en un cluster independiente dentro de PCV2b.

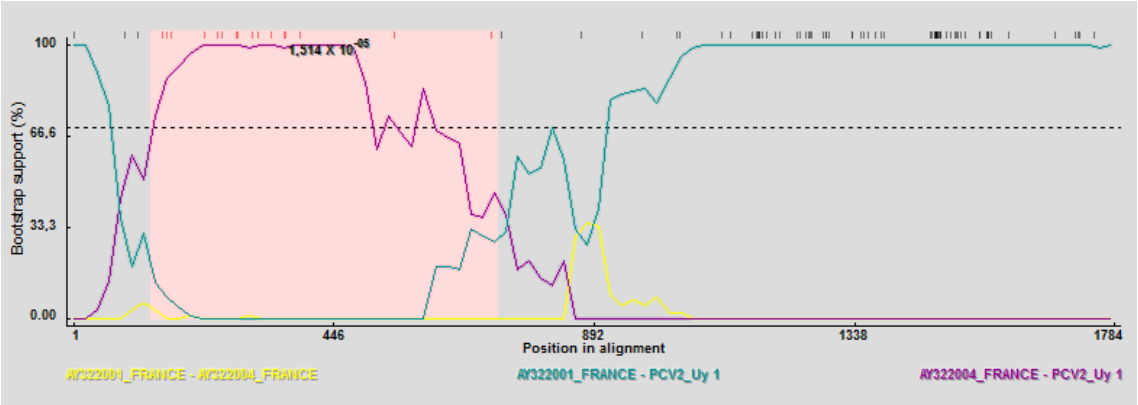


Figura 4.4.3 complementaria. Análisis en RDP. Visualización del método de Bootscan para PCV2_Uy 1. Se observan los parentales minoritario PCV2a 2D (violeta) y mayoritario PCV2b 1A (azúl) ambos de origen Francés. La región rosada corresponde a la zona de recombinación.

4.5. Trabajo complementario. Identificación de cepas recombinantes de PCV2 en Chile.

A raíz de la publicación del artículo sobre circulación de cepas de PCV2 recombinantes en Uruguay, realizamos una colaboración con el Dr. Victor Neira del Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile en Santiago, para la identificación de cepas recombinantes en Chile.

En este estudio, se realizó el análisis molecular de un fragmento del gen *cap* de cepas de PCV2 colectadas entre los años 2005-2008 en Chile. Se observó la circulación predominante de cepas PCV2b y en menor medida, se detectaron algunas cepas del genotipo PCV2a. Por último, se identificó un grupo de cepas recombinantes PCV2a/PCV2d que circularon en los diferentes años estudiados.

Este trabajo constituye el segundo reporte de recombinantes de PCV2 en Sudamérica. A diferencia de las cepas recombinantes detectadas en Uruguay, los eventos de recombinación en las cepas Chilenas se originaron en el gen *cap*. Sin embargo, no se pudo profundizar en su caracterización ya que no se contaba con secuencias de otras regiones del genoma viral.

Neira et al. Virology Journal (2017) 14:191
DOI 10.1186/s12985-017-0850-1

Virology Journal

RESEARCH Open Access

Genetic analysis of porcine circovirus type 2 from pigs affected with PMWS in Chile reveals intergenotypic recombination

Victor Neira[1], Natalia Ramos[2], Rodrigo Tapia[1], Juan Arbiza[2], Andrónico Neira-Carrillo[3], Manuel Quezada[4], Álvaro Ruiz[4] and Sergio A. Bucarey[5*]

Abstract

Background: Porcine circovirus type 2 (PCV2) is a very small, non-enveloped and icosahedral virus, with circular single stranded DNA genome. This virus is the most ubiquitous and persistent pathogen currently affecting the swine industry worldwide. PCV2 has been implicated as the major causative agent of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), a disease which is characterized by severe immunosuppressive effects in the porcine host. Worldwide PCV2 isolates have been classified into four different genotypes, PCV2a, PCV2b, PCV2c and PCVd. The goal of this work was to conduct the first phylogenetic analysis of PCV2 in Chile.

Methods: PCV2 partial ORF2 sequences (462 nt) obtained from 29 clinical cases of PMWS in 22 Chilean intensive swine farms, covering over the 90% of the local pork-production, were analyzed.

Results: 14% and 52% of sequences belonged to the genotypes PCV2a and PCV2b, respectively. Surprisingly, 34% of sequences were PCV2a/PCV2d recombinant viruses.

Conclusions: Our findings suggested that a novel cluster of Chilean sequences emerged resulting from intergenotypic recombination between PCV2a and PCV2d.

Keywords: PCV2, PMWS, Genetic diversity, Recombination

Background

Porcine Circovirus type 2 (PCV2) is a small non-enveloped virus, member of the genus *Circovirus*, family *Circoviridae* [1]. PCV2 is primary causative agent of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and other diseases in swine referred to as porcine circovirus associated diseases (PCVAD) [2]. PMWS was first described in Canada in 1991, and nowadays it has been described in pig population worldwide, having a serious economic impact on the global swine industry. Pigs affected with PMWS show decreased weight gain, progressive weight loss, enlarged lymph nodes, and others non-specific clinical signs such as dyspnea and diarrhea [3] .

The genome of PCV2 is a 1.76–1.77 kb single-stranded circular DNA, containing three main open reading frames (ORFs) which encode viral proteins [4]. ORF1 encodes for the replicase protein (Rep) and splice variants involved in viral replication, ORF2 encodes for the capsid (Cap), an exclusive structural protein [5], and ORF3 encodes a non-structural protein which causes apoptosis in PCV2 infected cells and has been associated with pathogenicity [6]. PCV2 isolates could be classified into four different genotypes, PCV2a, PCV2b, PCV2c and PCV2d, based on pairwise sequence comparisons (PASC) [7], and most recently based on reference sequences and/or marker positions [8]. PCV2a and PCV2b are the major groups, worldwide distributed, while PCV2c has been described only in Denmark from swine historic archived tissues [9] and recently from wild boar in Brazil [10]. PCV2d correspond to a PCV2b mutant (mPCV2b) described in some countries of Europe, Asia, North America and South America [8, 11]. Moreover, a

* Correspondence: sbucarey@uchile.cl
[5]Centro Biotecnológico Biovetec, Departamento de Ciencias Biológicas Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

new cluster of PCV2 has been recently described and proposed as the PCV2e genotype [12].

In South America, PMWS and PCVAD have been reported; phylogenetic studies have only been conducted in Brazil, Argentina, Uruguay and Colombia [10, 13, 14]. The objective of this study is to evaluate the genetic diversity of PCV2 using sequences in pig affected by PMWS obtained from intensive swine farms in Chile.

Methods

Samples

The samples used in this study were obtained from fixed tissues submitted between 2005 and 2008 to the Veterinary Pathology Laboratory, University of Concepcion, based on PMWS suspected clinical signs. Samples from 20 intensive pig farms located in 5 administrative regions of Chile Central, plus an extensive wild boar farm were included, and data about geographic localization was registered. Further, clinical PMWS diagnosis was confirmed by macroscopic, microscopic lesions and "in situ" hybridization (ISH) based on the technique described by Segalés and Domingo, 2002 [3]. Subsequently, a subset of 51 PCV2 positive samples were selected for PCR testing and sequencing based on its ISH intensity.

PCV2 DNA sequencing

Paraffin embedded tissues were manually deparaffinized using xylene. After, the DNA was extracted using QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Valencia, USA) following manufacturer's instructions. First, samples were tested using a selective PCR protocol, which is able to differentiate PCV2a and PCV2b viruses and identify mixed infections [15]. Also, samples were tested with sequencing PCR primers based on protocol described by Quintana et al., 2002 [16]. This PCR protocol amplifies a 652 bp fragment located between genomic positions 940 and 1596. PCR products were visualized in a 1.8% agarose gel and purified using QIAquick PCR Purification Kit. Sequencing was performed directly on the PCR products, which were sequenced on an ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) at Macrogen USA (MD, United States).

Genotyping study

Molecular characterization of PCV2 strains was performed on the basis of sequence analysis of 462 nt of the ORF2. Sequence alignment was carried out with Clustal W algorithm including reference sequences corresponding to different PCV2 genotypes [8] and sequences from neighbor countries. The degree of identity among nucleotide and amino acid sequences was determined by using BioEdit v. 7.0.5. Phylogenetic tree was reconstructed by the neighbor-joining method using MEGA v5.0 software. Bootstrap values were determined with 1000 replicates of the dataset and PCV1 sequence was included as outgroup (FJ475129).

Recombination analysis

In order to analyze the potential recombinant strains, an integrated software package, the recombination detection program (RDP v.3.44), was used [17]. The general settings were a highest acceptable p-value of 0.01 and Bonferroni correction. A dataset of selected PCV2 sequences of different genotypes (n = 18), were included in the RDP analysis excluding known recombinant sequences. Each potential recombinant strain was analyzed separately.

Additionally, SIMPLOT software v. 3.5.1 [18] was employed to further analyze the potential parental PCV2 lineages and putative recombination breakpoints previously analyzed and estimated by RDP software. Four groups of 462 nt of ORF2 sequences were included in SIMPLOT analysis: a group of potential recombinants (O1/2008, M1/2007, L1/2007, H3/2007, H4/2007, B4/

Table 1 List of PCV2 sequences including farm ID, year of collection, administrative region, and genotype

Farm	Year	Region	Genotype	Sequence ID	Accession No
H	2005	VI	PCV2a	H/2005	KU992879
N	2005	VIII	PCV2b	N/2005	KU992890
B	2005	VIII	PCV2rec	B1/2005	KU992870
B	2005	VIII	PCV2rec	B2/2005	KU992871
K	2006	RM	PCV2b	K/2006	KU992885
N	2006	VIII	PCV2b	N/2006	KU992891
C	2006	VI	PCV2rec	C/2006	KU992875
J	2007	RM	PCV2a	J/2007	KU992874
A	2007	RM	PCV2b	A1/2007	KU992866
A	2007	RM	PCV2b	A2/2007	KU992867
A	2007	RM	PCV2b	A3/2007	KU992868
A	2007	RM	PCV2b	A4/2007	KU992869
B	2007	VIII	PCV2b	B/2007	KU992872
D	2007	VIII	PCV2b	D/2007	KU992876
E	2007	IX	PCV2b	E/2007	KU992877
G	2007	VI	PCV2b	G/2007	KU992892
I	2007	VII	PCV2b	I/2007	KU992884
P	2007	VIII	PCV2b	P/2007	KU992886
R	2007	VIII	PCV2b	R/2007	KU992894
H	2007	VI	PCV2rec	H1/2007	KU992880
H	2007	VI	PCV2rec	H2/2007	KU992887
H	2007	VI	PCV2rec	H3/2007	KU992881
L	2007	RM	PCV2rec	L/2007	KU992888
M	2007	VI	PCV2rec	M/2007	KU992889
F	2008	VII	PCV2b	F1/2008	KU992878
B	2008	VIII	PCV2rec	F2/2008	KU992873
O	2008	RM	PCV2rec	O/2008	KU992893
Q	2013	RM	PCV2a	Q1/2013	KU992882
Q	2013	RM	PCV2a	Q2/2013	KU992883

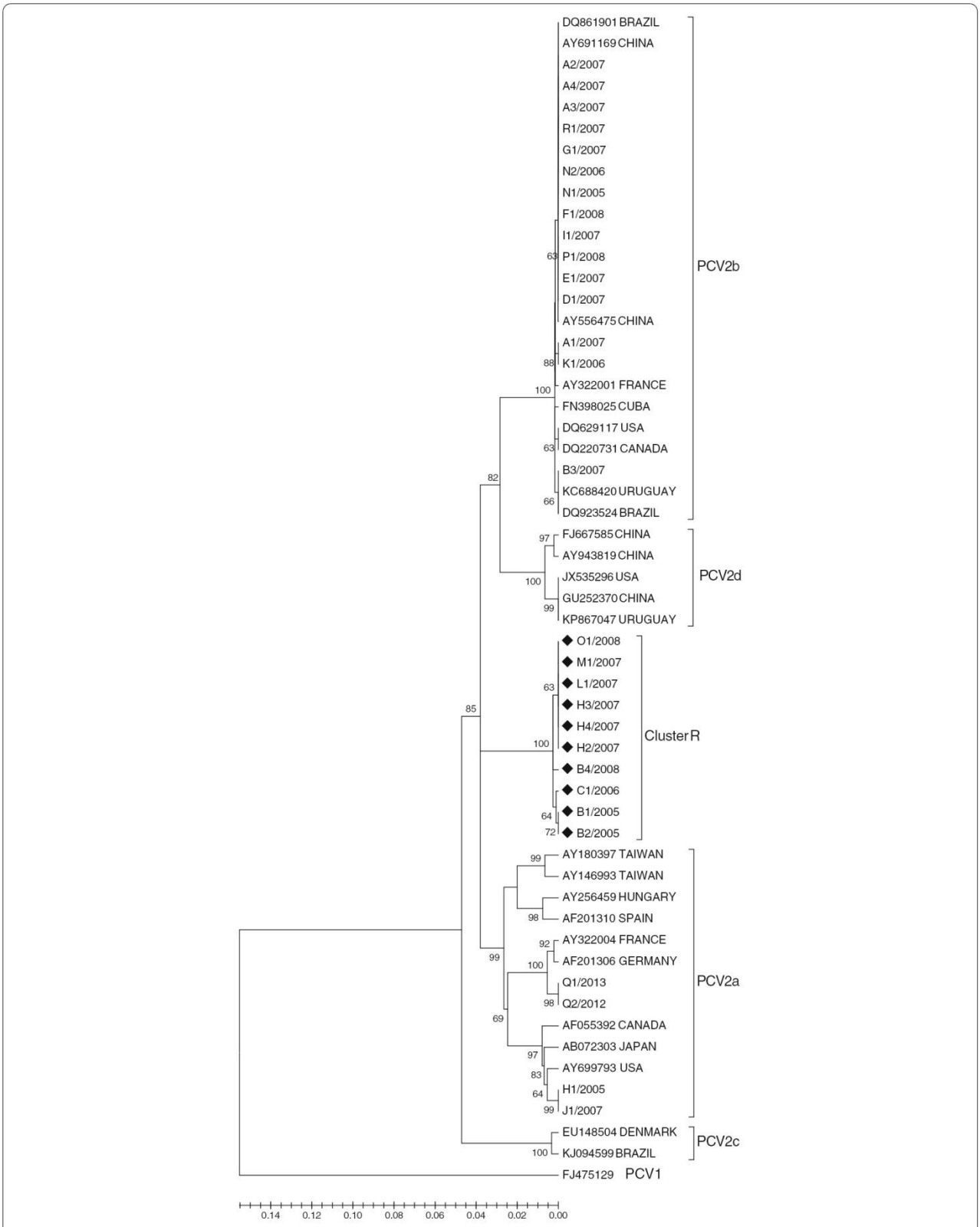


Fig. 1 Phylogenetic tree generated by neighbor-joining method using 462-nt sequence of ORF2 PCV2. Chilean strains were compared with twenty-five PCV2 reference strains. PCV1 was included as out-group. GenBank accession numbers and country of origin are specified. Genotypes are indicated with straight brackets

2008, C1/2006, B1/2005, B2/2005), a group of a reference sequences from PCV2d genotype (AY943819; JX535296), a group of PCV2a genotype sequences (AY180397; AY146993) and an out-group (PCV1 isolate FJ475129). A similarity plot was generated comparing the percentage of identity versus genome position of the query isolate to the panel of references sequences. Analysis was performed with a window size of 100 nt and a step size of 20 nt. The analysis of potential recombinant strains was also carried out by the identification of conflicting phylogenetic trees in different regions of the alignment based on the putative recombination breakpoints observed in SIMPLOT and RDP analysis. Phylogenetic reconstructions were realized as described above. One phylogenetic tree was constructed on the basis of the minor parent region (nucleotides 100 to 389) and the other comprised the major parent region concatenated alignment of nucleotides 1 to 99 and 390 to 462.

Results

PCV2 genetic material was amplified by selective PCR in 19 out 51 samples. No mixed infections were identified. Ten samples, tested negative for selective PCR, were amplified by sequencing primers. Therefore, 29 out 51 tissues samples were sequenced, 28 corresponding to 18 intensive swine farms and 1 from an extensive wild boar farm. Genomic sequences were deposited into GenBank™ with accession numbers (KU992866 to KU992894) and each sequence included a farm code and year (Table 1).

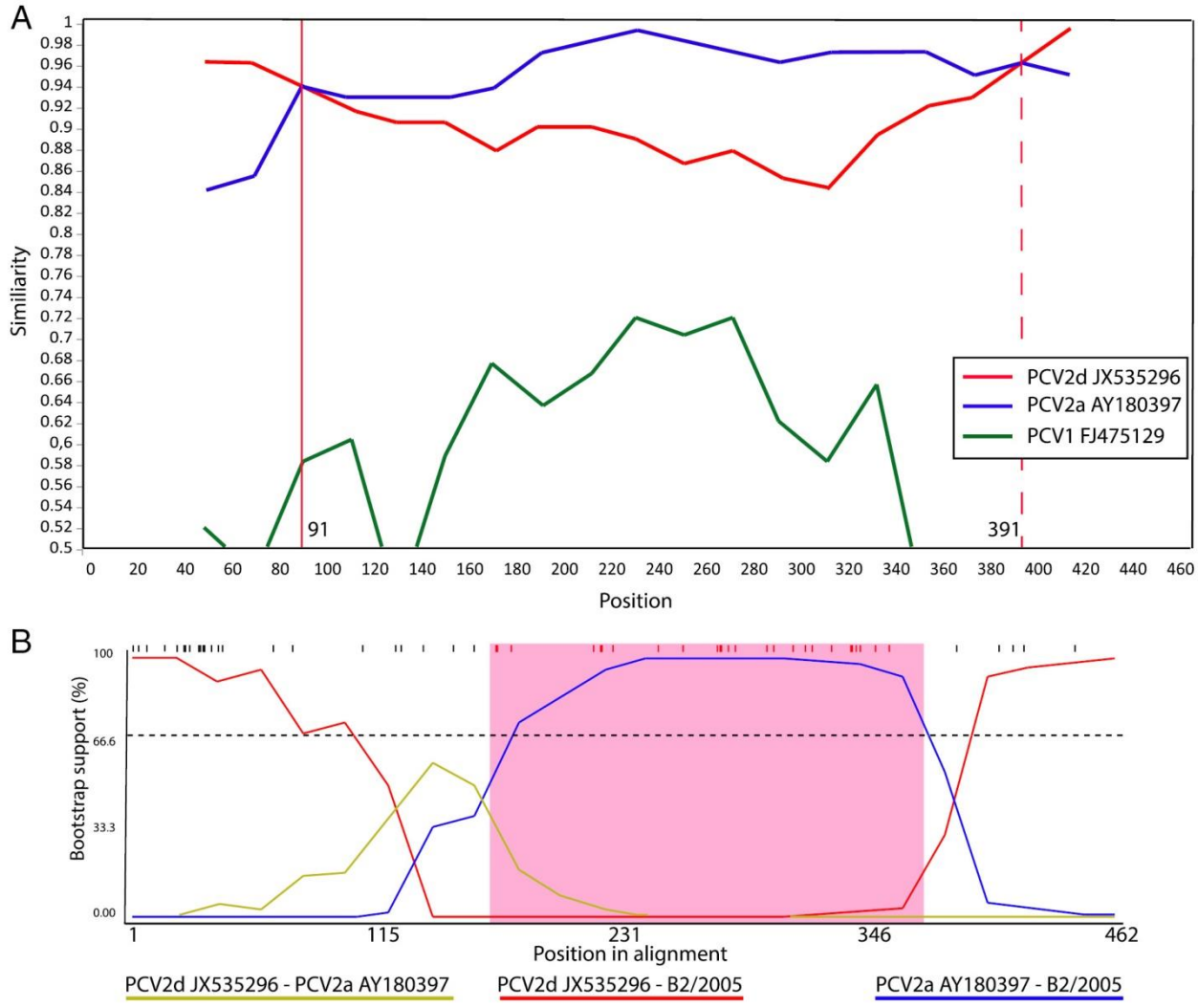


Fig. 2 Recombination analysis. **a** Similarity plot generated by SIMPLOT software based on 462 nt of ORF2 sequence using B2/2005 as query sequence and representative parent sequence of genotypes PCV2d (red) and PCV2a (blue) (JX535296 and AY180397, respectively). A PCV1 isolate was used as outgroup (green). The analysis was performed with a window size of 100 nt and a step size of 20 nt. **b** BootScan analysis and potential breakpoints for B2/2005 predicted by RDP3 software

Phylogenetic analysis using the partial ORF2 sequences obtained (462 nt) showed that PCV2 sequences belonged to PCV2b (15 out 29), PCV2a (4 out 29), and 10 sequences segregated independent labeled as Cluster R (Fig. 1). PCV2b Chilean sequences came from 10 pig farms and a nucleotide identity of 99.9% was observed in this group. On the other hand, PCV2a Chilean sequences were obtained from 3 pig farms, sharing a nucleotide identity of 96.9% among them.

Ten isolates were grouped in a new cluster with a very high statistical support (bootstrap value, 100%) (Fig. 1), suggested the possible presence of recombinant strains. This

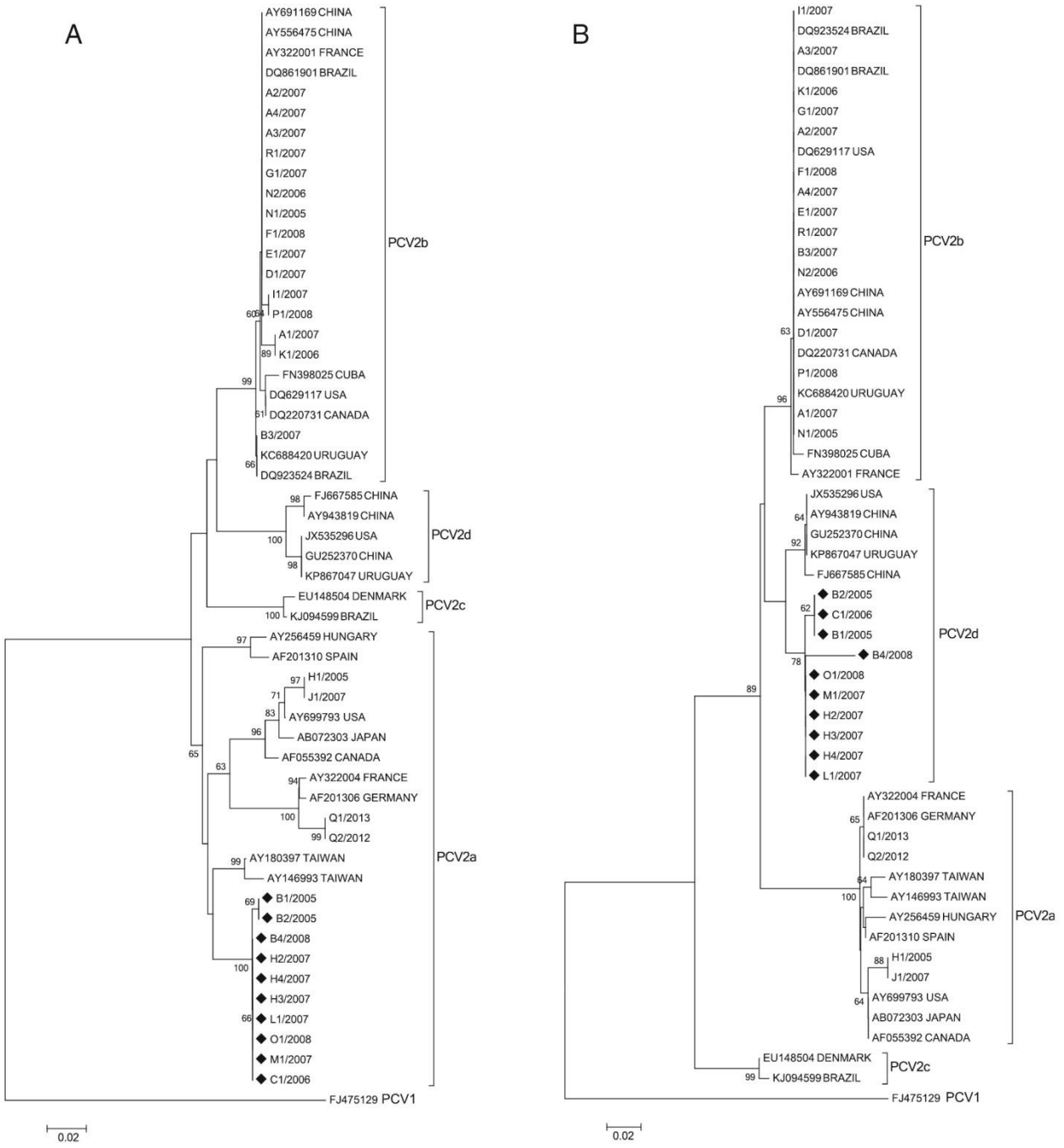


Fig. 3 Phylogenetic trees generated by neighbor-joining method based on **a** the minor parent region estimated with SIMPLOT and RDP software (nt 100–389) and **b** the major parent region (concatenated alignment of nt 1–99 and nt 390–462). Chilean strains were compared with twenty-five PCV2 reference strains. GenBank accession numbers and country of origin are specified. Genotypes are indicated with straight brackets. Discordant clustering patterns of potential Chilean recombinant strains with different genotypes are observed (✦)

cluster contained viruses from 6 different pig farms with nucleotide identity of 99.5%. These sequences were detected as recombinants using RDP3 software and the recombination events were statistically supported by BootScan, Maxchi, Chimera and 3Seq methods with average *p*-values of 1.9×10^{-5}, 6.6×10^{-4}, 1.6×10^{-2} and 4.3×10^{-3}, respectively. Results showed that all recombinant sequences were originated from the same parental lineages. The parent sequences resulted to be JX535296 (major parent, PCV2d genotype) and AY180397 (minor parent, PCV2a genotype). In addition, a similarity plot analysis was carried out with putative parental sequences using SIMPLOT software to corroborate the results obtained using RDP3 software. In the Fig. 2a is shown the similarity plot generated for B2/2005 sequence as an example, indicated that the recombinant presented a nucleotide similarity with a PCV2a isolate (blue) between nucleotides 91 and 391, and with an PCV2d strain (red) between nucleotides 1 to 91 and 391 to 462. Moreover, recombination graph of the recombination event for B2/2005 is also shown using BootScan method (Fig. 2b) and nucleotides 132 and 386 were predicted by RDP software to be the potential breakpoints.

On the other hand, two phylogenies were constructed based on the major and minor parental regions taking to account data obtained of SIMPLOT and RDP software (Fig. 3). In the phylogeny based on the minor parental region, Chilean potential recombinant sequences clustered within PCV2a genotype (Fig. 3a). However, in the phylogeny based on the major parental region, recombinant viruses resulted to be more closely related to a set of PCV2d sequences (Fig. 3b). The occurrence of incongruent phylogenetic trees strongly provided an additional evidence of recombination. Finally, the closest sequence publicly available presents an identity of 98% (p-distance) and was obtained from Thailand (PCV2/Thailand/THKUF49/2007, # HQ701666), which correspond a PCV2d virus.

Discussion

The study conducts the first phylogenetic analysis of PCV2 in Chile. PCV2 isolated from Chilean intensive swine farms, covering over the 90% of the pork production, resulting a complete national perspective of PCV2. The results confirm the high presence of PCV2b (52%) and less represented PCV2a (14%). Surprisingly, 34% of sequences were PCV2a/PCV2d recombinant viruses. The no amplification of these 10 sequences by the selective PCR was further explained due to these primers were not able to amplified PCV2d, the major parenteral of these viruses. Furthermore, we were not able to detect PCV2d variant in the Chilean PCV2 diversity even if was the major parent of the recombinant viruses, probably this event occurred years before and the recombinant remained. PCV2a and PCV2b, and the recombinant viruses were found since 2005. Nevertheless, were not observed geographical, temporal and other patterns, most likely due to there is not enough sequences per farm.

Recently, a large-scale study determinates that the PCV2 vaccination is important factor in the PCV2 ecology, driving the evolution and epidemiology of the virus. PCV2 vaccination by selective pressure generates vaccine scape-mutants, which become new genotypes waves [19]. Interestingly, the vaccination against PCV2 in Chile started in 2007 and massive in swine farms around 2008–2009. This study includes samples since 2005 to 2013, but differences before and after massive vaccination were not reported mostly due low number of isolates per farm and year.

Six farms presented PCV2 recombinant viruses; this event was observed in samples from 2005. However, even if geographical or others patterns were not identified, probably the presence of these recombinant viruses is linked between farms. There are not similar sequences reported with this particular recombination in the world; therefore, probably this recombination event occurred in Chile and then was spread to the rest of the farms.

Recombination events are common among PCV2 strains, which have been reported in several countries [20, 21]. Also, different patterns of recombination have been described, with break points in both ORF1 and ORF2, which suggest that the recombination can occur easily in PCV2 co-infections [22].

On the other hand, PCV2b was the most common genotype in Chilean farms during the PMWS outbreak, as has been found of the rest of the world, where more than 50% of the viral sequences belonged into PCV2b [11]. PCV2b sequences did not show divergence over time among samples obtained in 2005 to 2008 from several different farms and present 99.9% identity with viruses found in the rest of the world.

Conclusions

This is the first study that revealed the genetic diversity of PCV2 in Chile during a PWMS outbreak. Our findings suggested that a novel cluster of Chilean sequences emerged resulting from recombination between genotypes PCV2a and PCV2d within ORF2. However, analysis of the complete PCV2 genome and further surveillance of PCV2 is needed to confirm the real impact of these recombinant viruses.

Acknowledgments

We thank to Michelle Lineros, Daniela Rojas and Miguel Lopez for technical support.

Funding

This work has been supported by FONDEF from Chilean Council for Science and Technology (CONICYT), program IDeA, project IT13I20021 granted to Sergio A. Bucarey.

Availability of data and materials
All DNA sequences have been submitted in genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) under the following accession numbers: KU992879, KU992890, KU992870, KU992871, KU992885, KU992891, KU992875, KU992874, KU992866, KU992867, KU992868, KU992869, KU992872, KU992876, KU992877, KU992892, KU992884, KU992886, KU992894, KU992880, KU992887, KU992881, KU992888, KU992889, KU992878, KU992873, KU992893, KU992882, KU992883.

Authors' contributions
VN and RT performed the tests, analyzed and interpreted sequencing analysis and contributing in writing the manuscript. NR performed molecular analysis including genotyping and recombination studies and contributing in writing the manuscript. JR interpreted molecular analysis. MQ and AR performed the sample collection, macroscopic and histological examination of PMWS samples. AN contributed in writing the manuscript. SAB performed PCR tests, analyzed and interpreted genotyping data and contributed in writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate
Not applicable.

Consent for publication
Not applicable.

Competing interests
The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note
Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details
[1]Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile. [2]Sección Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. [3]Laboratorio Polyforms, Departamento de Ciencias Biológicas Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile. [4]Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción, Chillán, Chile. [5]Centro Biotecnológico Biovetec, Departamento de Ciencias Biológicas Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Received: 6 January 2017 Accepted: 17 September 2017
Published online: 04 October 2017

References
1. Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, Koch MA. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. Nature. 1982;295(5844):64–6.
2. Allan G, Meehan B, Todd D, Kennedy S, McNeilly F, Ellis J, Clark EG, Harding J, Espuna E, Botner A, et al. Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. Vet Rec. 1998;142(17):467–8.
3. Segales J, Domingo M. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. Vet Q. 2002;24(3):109–24.
4. Zhai SL, Chen SN, Xu ZH, Tang MH, Wang FG, Li XJ, Sun BB, Deng SF, Hu J, Lv DH, et al. Porcine circovirus type 2 in China: an update on and insights to its prevalence and control. Virol J. 2014;11:88.
5. Cheung AK. Comparative analysis of the transcriptional patterns of pathogenic and nonpathogenic porcine circoviruses. Virology. 2003;310(1):41–9.
6. Choi CY, Rho SB, Kim HS, Han J, Bae J, Lee SJ, Jung WW, Chun T. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 promotes secretion of IL-6 and IL-8 in porcine epithelial cells by facilitating proteasomal degradation of regulator of G protein signalling 16 through physical interaction. J Gen Virol. 2015;96(Pt 5):1098–108.
7. Cortey M, Pileri E, Sibila M, Pujols J, Balasch M, Plana J, Segales J. Genotypic shift of porcine circovirus type 2 from PCV-2a to PCV-2b in Spain from 1985 to 2008. Vet J. 2011;187(3):363–8.
8. Franzo G, Cortey M, Olvera A, Novosel D, Castro AM, Biagini P, Segales J, Drigo M. Revisiting the taxonomical classification of porcine Circovirus type 2 (PCV2): still a real challenge. Virol J. 2015;12:131.
9. Dupont K, Nielsen EO, Baekbo P, Larsen LE. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. Vet Microbiology. 2008;128(1–2):56–64.
10. Franzo G, Cortey M, de Castro AM, Piovezan U, Szabo MP, Drigo M, Segales J, Richtzenhain LJ. Genetic characterisation of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from feral pigs in the Brazilian Pantanal: an opportunity to reconstruct the history of PCV2 evolution. Vet Microbiology. 2015;178(1–2):158–62.
11. Xiao CT, Halbur PG, Opriessnig T. Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d. J Gen Virol. 2015;96(Pt 7):1830–41.
12. Davies B, Wang X, Dvorak CM, Marthaler D, Murtaugh MP. Diagnostic phylogenetics reveals a new porcine circovirus 2 cluster. Virus Res. 2016;217:32–7.
13. Pereda A, Pineyro P, Bratanich A, Quiroga MA, Bucafusco D, Craig MI, Cappuccio J, Machuca M, Rimondi A, Dibarbora M, et al. Genetic characterization of porcine circovirus type 2 from pigs with porcine circovirus associated diseases in Argentina. ISRN Vet Sci. 2011;2011:560905.
14. Rincon Monroy MA, Ramirez-Nieto GC, Vera VJ, Correa JJ, Mogollon-Galvis JD. Detection and molecular characterization of porcine circovirus type 2 from piglets with porcine circovirus associated diseases in Colombia. Virol J. 2014;11:143.
15. Hesse R, Kerrigan M, Rowland RR. Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field. Virus Res. 2008;132(1–2):201–7.
16. Quintana J, Balasch M, Segales J, Calsamiglia M, Rodriguez-Arrioja GM, Plana-Duran J, Domingo M. Experimental inoculation of porcine circoviruses type 1 (PCV1) and type 2 (PCV2) in rabbits and mice. Vet Res. 2002;33(3):229–37.
17. Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefeuvre P. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. Bioinformatics. 2010;26(19):2462–3.
18. Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, Ingersoll R, Sheppard HW, Ray SC. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. J Virol. 1999;73(1):152–60.
19. Franzo G, Tucciarone CM, Cecchinato M, Drigo M. Porcine circovirus type 2 (PCV2) evolution before and after the vaccination introduction: a large scale epidemiological study. Sci Rep. 2016;6:39458.
20. Huang Y, Shao M, Xu X, Zhang X, Du Q, Zhao X, Zhang W, Lyu Y, Tong D. Evidence for different patterns of natural inter-genotype recombination between two PCV2 parental strains in the field. Virus Res. 2013;175(1):78–86.
21. Ramos N, Mirazo S, Castro G, Arbiza J. Molecular analysis of porcine Circovirus type 2 strains from Uruguay: evidence for natural occurring recombination. Infect Genet Evol. 2013;19:23–31.
22. Ma CM, Hon CC, Lam TY, Li VY, Wong CK, de Oliveira T, Leung FC. Evidence for recombination in natural populations of porcine circovirus type 2 in Hong Kong and mainland China. J Gen Virol. 2007;88(Pt 6):1733–7.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



4.6. Capítulo 3. Detección de una cepa PCV2b mutante (mPCV2b-PCVd) en Uruguay.

En este capítulo se reporta la circulación de cepas mutantes de PCV2b (mPCV2b) en Uruguay, las cuales mostraron estar estrechamente relacionadas con cepas del genotipo PCV2b subtipo1C. Se llevó a cabo el análisis de los genomas completos de 5 cepas (PCV2_Uy35, PCV2_Uy 91, PCV2_Uy93, PCV2_Uy94 y PCV2_Uy99) todas ellas detectadas en muestras colectadas en el año 2013 de cerdas que habían abortado. PCV2_Uy35 fue identificada en un criadero de Canelones y las demás en un criadero de Soriano.

La clasificación de variantes de PCV2 fue un tema debatido desde sus comienzos. Incluso, la alta tasa de mutación y la frecuencia con que ocurren recombinaciones en el genoma viral hacen que sea una tarea aún más difícil. En el año 2008, las cepas de PCV2 se dividían en tres genotipos: PCV2a, PCV2b y PCV2c (Segalés et al., 2008). Posteriormente, Wang et al. (2009) describe la existencia de dos genotipos adicionales, PCV2d y PCV2e. Sin embargo, Cortey et al. (2011b) declararon la inexistencia de estos dos nuevos genotipos, ya que en definitiva, las cepas pertenecían al genotipo PCV2b subtipo 1C y al genotipo PCV2a, respectivamente. Por lo tanto, para estimular el uso de criterios unificados para la clasificación de PCV2 que permitan la comparación de los datos de epidemiología molecular a nivel mundial, propusieron una nomenclatura estandarizada de tres genotipos basada en el análisis de secuencias de nucleótidos del genoma completo y del gen *cap*, definiéndose dos umbrales de distancia de 0.020 y 0.035, respectivamente. Cuando la distancia entre dos secuencias era mayor que dichos valores, se asumía que las cepas pertenecían a dos genotipos distintos.

A pesar de ello, la clasificación de PCV2 continuó siendo controvertida. De hecho, más tarde, fue reportada la circulación de un nuevo genotipo en China denominado PCV2d (cepa BHD HM038017) (Guo et al., 2010), pero si bien se utilizó el mismo nombre que en Wang et al., (2009) no se trataba de la misma cepa. Luego de este hallazgo, Xiao et al., (2012) reportaron la identificación en E.E.U.U. de una nueva cepa que presentaba una alta identidad de secuencia nucleotídica con la cepa BHD detectada previamente. Posteriormente, otros investigadores informaron la circulación de este nuevo mutante en diferentes países (Salgado et al., 2014, Seo et al., 2014; Eddicks et al, 2015).

Mientras que algunos autores sostenían que esta cepa se clasificaba dentro de un nuevo genotipo, denominado PCV2d (Seo et al., 2014; Xiao et al 2015), otros sugerían que era una cepa mutante que se clasificaba dentro del genotipo PCV2b y que estaba estrechamente relacionada con el subtipo 1C denominada, mPCV2b (Eddicks et al., 2015; Chae, 2015).

En este contexto fue publicado este artículo y se decidió respetar el criterio propuesto por Cortey et al. (2011b). Por lo tanto, PCV2_Uy35, PCV2_Uy 91, PCV2_Uy93, PCV2_Uy94 y PCV2_Uy99 fueron clasificadas como cepas mPCV2b y no como cepas PCV2d. Dada la situación internacional sobre la emergencia de esta cepa que comenzó a identificarse rápidamente luego del 2012 en muchos países, los resultados obtenidos en este estudio proporcionaron una evidencia adicional de la circulación globalizada de cepas mPCV2b y revelaron la importancia del comercio internacional en la emergencia de nuevas cepas.

Posteriormente, de todas formas, se decidió cambiar la nomenclatura por PCV2d (Xiao et al. 2015; Franzo et al., 2015a) y fueron definidos nuevos umbrales de distancia para la clasificación. Si bien para el análisis del genoma completo fue establecido un nuevo umbral de 0.038, para el gen *cap* no pudo definirse con exactitud un único valor de corte que permita definir todos los genotipos (Franzo et al., 2015a). Dentro del nuevo genotipo PCV2d, se hizo una distinción entre cepas PCV2d-1 y PCV2d-2. Las primeras corresponden a las antiguamente incluidas dentro del genotipo PCV2b subtipo 1C y las segundas, corresponden a la cepa emergente distribuida actualmente en varios países e incluso asociada a una mayor virulencia *in vivo* (Xiao et al., 2016).

La circulación de PCV2d-2 ha reemplazando al genotipo PCV2b (el cual en la actualidad sólo incluye los subtipos 1A y 1B) (Xiao et al., 2016) y casualmente, en muchos casos fue identificada en cerdos con PCVAD con sospecha de falla en la vacunación (Xiao et al., 2012; Opriessnig et al., 2013; Salgado et al., 2014; Seo et al., 2014; Eddicks et al., 2015). Este hecho, sumado a que todas las vacunas comerciales disponibles en la actualidad son del genotipo PCV2a, permite especular con la idea de que las estrategias de vacunación podrían condicionar la evolución y la epidemiología de PCV2. En efecto, al analizar y comparar las cepas PCV2d con cepas PCV2b no sólo se observó que poseen una Lys adicional en el extremo C-terminal (región de la proteína que está localizada en la superficie del virus y por

tanto es blanco de anticuerpos neutralizantes), sino que también se ha observado un cambio de una Arg a una Lys en la posición 59 de la proteína. Este último cambio parece ser el más importante ya que es en esta posición que también se diferencian con las cepas PCV2d-1. En la Fig.4.6.1 complementaria se muestra un alineamiento de la proteína *Cap* de diferentes genotipos incluyendo las cepas Uruguayas, realizado con el programa BioEdit v. 7.0.5. En él se detallan los dominios que contienen sitios antigénicos y las mutaciones presentes en las cepas PCV2d.

El papel crítico del cambio aminoacídico en la posición 59 en el fenotipo de neutralización de PCV2 fue previamente demostrado, en particular, la sustitución Ala59Arg en cepas PCV2a (Huang et al., 2011). Asimismo, mediante un análisis *in silico*, se han identificado variaciones en la cápside de PCV2d en regiones de epítopes conformacionales que posiblemente pueden causan cambios en la estructura antigénica de la superficie viral, lo que permite una mejor unión de PCV2d a la célula hospedera (Zhan et al 2016).

El trabajo descrito en este capítulo acompañado de todas las investigaciones en las que se ha reportado la circulación de mPCV2b-PCVd, sugieren la importancia del monitoreo continuo de la epidemiología molecular de PCV2 para el control de variantes que puedan potencialmente evadir la inmunidad preexistente.

ARTÍCULO III

Infection, Genetics and Evolution 33 (2015) 320–323

Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid

Short communication

First identification of Porcine Circovirus Type 2b mutant in pigs from Uruguay

Natalia Ramos [a], Santiago Mirazo [a], Gustavo Castro [b], Juan Arbiza [a,*]

[a] Sección Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, Montevideo 11400, Uruguay
[b] División Sanidad Animal, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Constituyente 1476, Montevideo 11200, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:
Received 19 March 2015
Received in revised form 19 May 2015
Accepted 21 May 2015
Available online 21 May 2015

Keywords:
PCV2b mutant
PCV2b-1C genotype
Uruguay

ABSTRACT

Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) is a worldwide distributed virus and is considered an important emerging pathogen related to several distinct disease syndromes in pigs.

PCV2 strains are classified into three genotypes: PCV2a, with five subtypes (2A–2E), PCV2b with three subtypes (1A–1C) and PCV2c, only found in Denmark.

Recently, several reports suggested the circulation of newly emerging PCV2b mutants (mPCV2b) isolated from pigs with PCVAD in cases of suspected vaccine failure.

In this work, we report for the first time the identification of mPCV2b in pigs from Uruguay, providing an additional evidence of a global circulation. Complete genome characterization and phylogenetic analysis reveal that Uruguayan strains, as well as mPCV2b previously reported are closely related to other sequences already classified as PCV2b-1C. Furthermore, results showed that mPCV2b presented different genetic markers in the capsid protein compared with classical PCV2a/b strains. Further investigation about antigenic shift of the mPCV2b strains including the Uruguayan isolates is needed.

© 2015 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Porcine Circovirus Type 2 (PCV2), member of *Circoviridae* family, is a small non-enveloped virus related to several diseases in pigs, collectively known as Porcine Circovirus Associated Diseases (PCVAD) (Opriessnig et al., 2007). PCV2 is an emerging pathogen extensively distributed and the causative agent of the Systemic Disease (SD), the most economically important PCVAD with a severe impact on swine production and industry worldwide (Segalés, 2012).

PCV2 genome consists in a single-strand ambisense circular DNA of about 1.7 kb in length with three major open reading frames (ORFs). ORF1 (*rep* gene) encodes replication-related proteins (Mankertz and Hillenbrand, 2001), ORF2 (*cap* gene) encodes the capsid protein, which forms the icosahedral capsid (Nawagitgul et al., 2000) and ORF3 encodes a protein putatively involved in virus-induced apoptosis *in vitro* and viral pathogenesis *in vivo* (Liu et al., 2005, 2006).

PCV2 strains are classified into two main genotypes, both associated with clinical PCVAD of variable degree of severity: PCV2a, with five subtypes (2A–2E) and PCV2b with three subtypes (1A–1C) (Olvera et al., 2007; Segalés et al., 2008). A third genotype, PCV2c, was exclusively found in Denmark from archived material of non-diseased herds (isolates from 1980, 1987 and 1990) (Dupont et al., 2008).

Until the last decade, PCV2a was the predominant genotype worldwide. However, since 2003 a drastic global replacement has occurred and PCV2b emerged as the most prevalent genotype in commercial swine population, concomitantly with an increased severity of PCVAD outbreaks (Beach and Meng, 2012).

In the last three years, several reports suggested the circulation of a newly emerging PCV2b mutant (mPCV2b) isolated from pigs with PCVAD in cases of suspected vaccine failure (Eddicks et al., 2015; Guo et al., 2012; Opriessnig et al., 2013; Salgado et al., 2014; Seo et al., 2014). Interestingly, mPCV2b showed more virulence *in vivo* compared with classical PCV2a/b strains (Guo et al., 2012).

This newly emerging PCV2 was first detected in China (strain BDH: GenBank HM038017) and originally reported as PCV2d (Guo et al., 2010), considering its similarity with isolates previously classified as PCV2d by Wang et al. (2009). However, a subsequent analysis by Cortey et al. (2011) showed that the classification of these strains as novel genotypes was incorrect. Therefore, a common criteria to differentiate PCV2 genotypes was defined on the basis of ORF2 sequences and a distance threshold of 0.035 (Cortey et al., 2011; Segalés et al., 2008).

* Corresponding author.
E-mail addresses: nramos@fcien.edu.uy (N. Ramos), smirazo@fcien.edu.uy (S. Mirazo), gucastro@mgap.gub.uy (G. Castro), jarbiza@fcien.edu.uy (J. Arbiza).

http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2015.05.023
1567-1348/© 2015 Published by Elsevier B.V.

Based on the nomenclature system established by the EU consortium, it is proposed to rename PCV2d as mPCV2b, in order to avoid scientific confusion regarding PCV2 genotype names (Chae, 2015).

Herein, we report for the first time in Uruguay the detection and complete genome analysis of mPCV2b isolates. Moreover, with the aim to contribute to shed light over the epidemiological status of PCV2 worldwide, we present a comprehensive molecular study including the sequence data of emerging mutants recently reported.

2. Materials and methods

2.1. Samples and PCV2 detection

In this study five pigs with reproductive failure from two Uruguayan farms during April and December 2013 were included. Blood samples were collected by trained veterinary personnel and DNA was extracted from 200 μL of serum using a commercial kit (QIAmp DNA Mini Kit, Qiagen USA) according to the manufacturer's instructions. In order to detect PCV2, a small region within the *cap* gene of 225-bp was amplified by nested PCR as previously described (Kim et al., 2001).

2.2. Complete genome amplification and sequencing

The complete genome nucleotide sequences were obtained by nested and semi-nested PCR amplification of four overlapping amplicons using previously reported primers by Vlasakova et al. (2011) and Fort et al. (2007). Table 1 shows the list of primers and the strategy used in this study for amplifying PCV2 entire viral genome.

Second-round PCR products were purified (NucleoSpin® Extract II, Macherey nn-Nagel, Germany) and DNA was sequenced directly in both directions by Macrogen authomatic sequencing service, Korea.

2.3. Genotyping and molecular analysis

Complete genome sequence analysis was performed with Clustal W software and identity matrices were constructed by BioEdit v7.0.5 software.

Genotyping studies were carried out by analyzing ORF2 published sequences corresponding to different PCV2 genotypes and subtypes according to Cortey et al., 2011. Phylogenetic tree was reconstructed by the neighbor-joining method using MEGA v5.0 software. Bootstrap values were determined with 1000 replicates of the dataset and a consensus tree was generated. PCV1 isolate FJ475129 was included as outgroup.

3. Results and discussion

Five PCV2 strains were identified from cases of reproductive failure on two Uruguayan farms during 2013. Sequencing results of purified second-round PCR products were spliced and consensus complete genome sequences were obtained, named PCV2_Uy 35, PCV2_Uy 91, PCV2_Uy 93, PCV2_Uy 94 and PCV2_Uy 99 (GenBank accession numbers: KP867046, KP867047, KP867048, KP867049 and KP867050, respectively).

The genome length of Uruguayan strains consisted in 1767 nucleotides. ORF1 and ORF3 encoded a protein of 314 and 104 amino acids, respectively. However, compared to classic PCV2 circulating strains, ORF2 region was located between bases 1734–1030 (complement) and had one additional amino acid in the Cap protein (Lys-234).

The analysis of complete genome showed a nucleotide identity of 99.8–100% among Uruguayan isolates. Strains belonging to the same farm (PCV2_Uy 91, PCV2_Uy 93, PCV2_Uy 94 and PCV2_Uy 99) were identical at both nucleotide and amino acid level. Instead, PCV2_35 presented two different nucleotides, one silent mutation within ORF2 region (genome position 1258) and one within ORF1 region (genome position 559) which resulted in an amino acid substitution in Rep protein (His170Arg) and in ORF3 protein (Val38Ala). These two mutations consisted in new shifts not previously found in any of the published PCV2 sequences.

According to phylogenetic reconstruction based on *cap* gene, Uruguayan strains were very closely related with isolates already classified within PCV2b-1C genotype by Olvera et al., 2007 (AY943819, AY556473, AY556476, AY484410 and AY181946) (Fig. 1). Additionally, Uruguayan isolates grouped in a monophyletic group with a very high statistical support (bootstrap value, 95%) with the mPCV2b strains recently reported in USA, Korea, China, Germany and Brazil (JX535296, KJ437506, KJ133547, HM038017, KP698401 and KJ187306) (Fig. 1). The same was concluded from the phylogenetic analysis of complete genome sequences (data not shown).

Construction of identity matrices based on the entire viral genome revealed that Uruguayan strains shared a sequence homology ranging from 99.3% to 100% with mPCV2b sequences. Particularly, PCV2_Uy 91, 93, 94 and 99 were identical at both nucleotide and amino acid level with an emerging PCV2b mutant isolated in USA in 2012 (JX535296) (Opriessnig et al., 2013). Furthermore, these isolates shared a nucleotide identity of 99.9% with the Chinese BDH strain (Guo et al., 2010).

As expected, the complete genome comparison of Uruguayan isolates with sequences classified within PCV2b-1C genotype showed in turn a high percentage of nucleotide identity ranging from 97.6% to 99.2%. Nevertheless, Uruguayan strains resulted to be more distantly related with the rest of the PCV2b, PCV2a and

Table 1
Primers used for the amplification and sequencing of entire viral genome.

PCR/primer	Primer position	Annealing temperature/n° of cycles	PCR product
1st round			
SP1/PC4R Vlasakova et al. (2011)	544-563/417-400	55 °C/30	1641 pb
2nd round			
capFw/capRw Fort et al. (2007)	998-1018/1756-1739	50 °C/37	759 pb*
PC3/PC4R Vlasakova et al. (2011)	1209-1229/417-400	55 °C/35	976 pb*
1st round			
PC5/PC2R Vlasakova et al. (2011)	103-124/1439-1420	55 °C/30	1337 pb
2nd round			
SP1/PC2R Vlasakova et al. (2011)	544-563/1439-1420	55 °C/35	896 pb*
PC5/PC6R Vlasakova et al. (2011)	103-124/740-720	55 °C/35	638 pb*

* Sequenced overlapping amplicons.

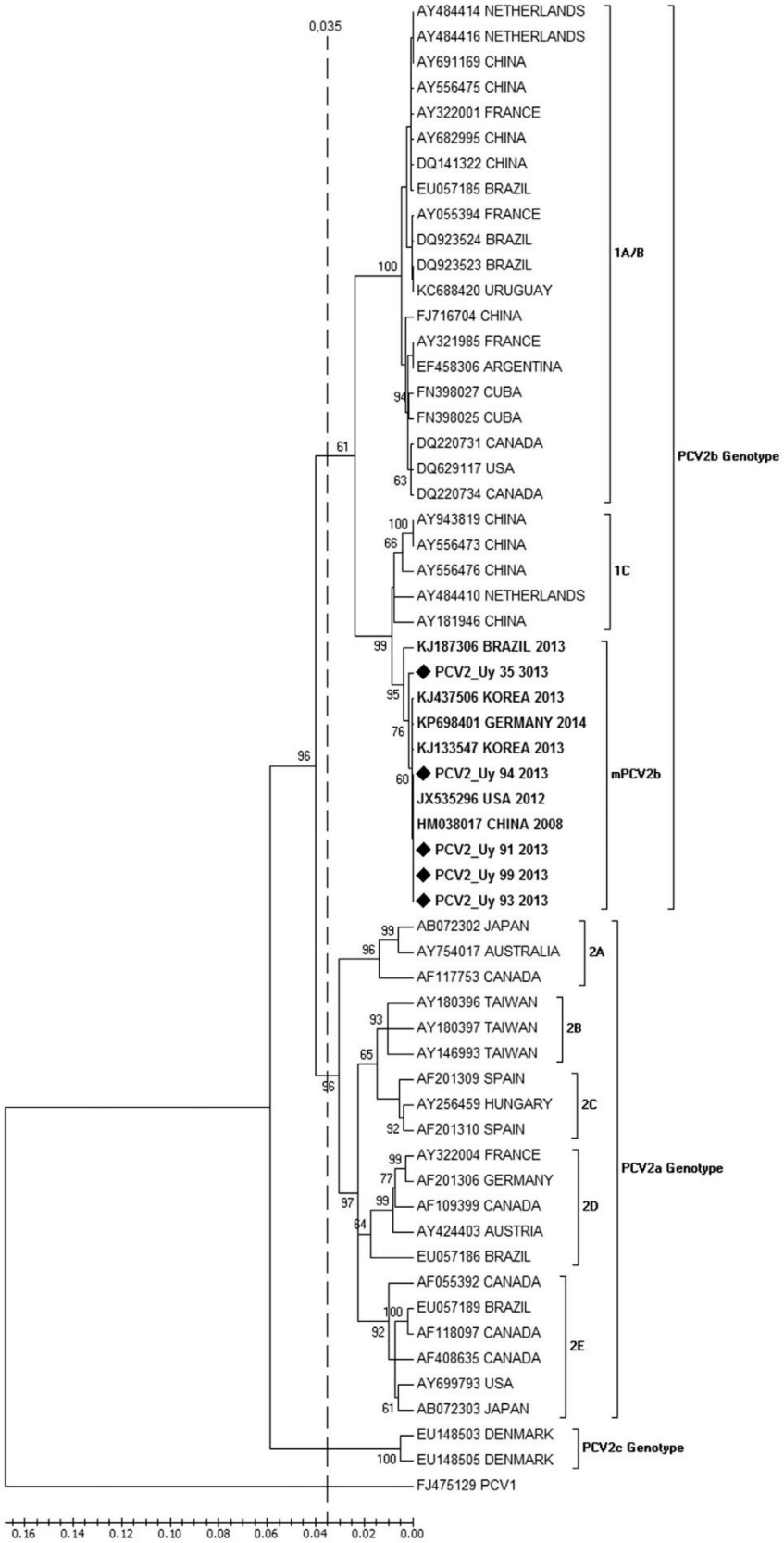


Fig. 1. Linearized neighbor-joining tree based on the *p*-distance method using the complete 702-nt sequence of the *cap* gene. The dashed line indicates the theoretical threshold of 0.035 proposed in Cortey et al., 2011 for the PCV2 genotype definition. Uruguayan strains (♦) were compared with fifty-three PCV2 strains. GenBank accession numbers and country of origin are specified. Genotypes and subtypes are indicated with straight brackets. Collection date of stains classified as mPCV2b is detailed.

PCV2c isolates included in this study, showing a nucleotide similarity ⩽96.3%.

The analysis of genetic markers of PCV2b-1C and mPCV2b sequences showed eight different marker positions in *cap* gene (genome positions: 1246, 1252, 1258, 1284, 1558, 1559, 1560 and 1712) and one in the intergenic region (genome position: 1735). These mutations resulted in three amino acid changes in the Cap protein: Try8Phe (UAC → UUC), Ala59Lys (GCU → AAA) and Pro151Thr (CCC → ACC).

In Uruguay, PCV2 infection was detected for the first time in 2011 and thereafter only PCV2b-1A and recombinant (PCV2b-1A/PCV2a-2D) strains have been circulating in the country (Ramos et al., 2013). In this study, we now report the recent circulation of mPCV2b strains in Uruguay. Interestingly, these isolates showed high levels of nucleotide identity with PCV2b-1C strains which were identified in China and Netherlands between the years 2003 and 2005 (Olvera et al., 2007). This result is consistent with very recently data reported by Eddicks et al., 2015 and even some authors consider that mPCV2b may have existed in the early 2000s (Chae, 2015). However, the molecular characterization showed differences at genetic markers between mPCV2b and PCV2b-1C strains.

Noticeably, mutations in genome positions 1558, 1559 and 1560 of mPCV2b strains resulted in a drastic codon change and the Ala → Lys substitution at position 59 in the Cap protein. This data is in complete agreement with observations reported by Opriessnig et al., 2013. Moreover, the critical role of amino acid change at position 59 in the neutralization phenotype of PCV2 was demonstrated (Huang et al., 2011). In particular, the substitution Ala59Arg in the Cap of PCV2a strains resulted in a loss of recognition or neutralization by the monoclonal antibody (mAb) 8E4 (Huang et al., 2011).

Analysis of sequences of different genotype and subtypes included in this study showed that while PCV2a and PCV2b-1C sequences presented Ala-59, PCV2b-1A and 1B had Arg-59. In turn, mPCV2b strains are the only ones that presented Lys-59. Since a single amino acid change in the Cap protein might result in a antigenic switch, as previously seen by using different mAb (Saha et al., 2012), implications of this amino acid change in the viral antigenic properties should be further investigated. This issue is, in fact, of major concern considering that the current commercial vaccines are exclusively based on PCV2a strains (Beach and Meng, 2012), likely leading to a global vaccine failure.

4. Conclusions

In the last years, several reports have revealed the circulation of mPCV2b in Asia and North America. Herein, further evidence of a global emergence of this newly detected isolates is provided, which is in concordance with the rapid increase of these strains recently observed also in Europe and South America.

Molecular and phylogenetic data presented here suggest that mPCV2b isolates are nearly equal to sequences identified in early 2000s, reported as PCV2b-1C genotype. Nonetheless, comparing mPCV2b and PCV2b-1C sequences, differences at genetic markers in the *cap* gene were observed.

Thus, additional detailed analysis of the several important amino acid substitutions observed in mPCV2b sequences within the Cap protein, will contribute to the understanding of the complex molecular epidemiology of the virus, and to the development of rational immune prophylactic strategies for the control of PCV2-associated disease.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interests.

Acknowledgments

Authors are grateful to Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) and Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII).

References

Beach, N.M., Meng, X.J., 2012. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine Circovirus type 2 (PCV2). Virus Res. 164, 33–42.
Chae, C., 2015. An emerging porcine circovirus type 2b mutant (mPCV2b) originally known as PCV2d. Vet. J. 203, 6–9.
Cortey, M., Olvera, A., Grau-Roma, L., Segalés, J., 2011. Further comments on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and nomenclature. Vet. Microbiol. 149, 522–523.
Dupont, K., Nielsen, E.D., Baeko, P., Larsen, L.E., 2008. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. Vet. Microbiol. 128, 56–64.
Eddicks, M., Fux, R., Szikora, F., Eddicks, L., Majzoub-Altweck, M., Hermanns, W., Sutter, G., Palzer, A., Banholzer, E., Ritzmann, M., 2015. Detection of a new cluster of porcine circovirus type 2b strains in domestic pigs in Germany. Vet. Microbiol. 176, 337–343.
Fort, M., Olvera, A., Sibila, M., Segalés, J., Mateu, E., 2007. Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS affected pigs. Vet. Microbiol. 125, 244–255.
Guo, L., Lu, Y., Wei, Y., Huang, L., Liu, C., 2010. Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China. Virol. J. 7, 273–284.
Guo, L., Fu, Y., Wang, Y., Lu, Y., Wei, Y., Tang, Q., Fan, P., Liu, J., Zhang, L., Zhang, F., Huang, L., Liu, D., Li, S., Wu, H., Liu, C., 2012. A porcine circovirus type 2 (PCV2) mutant with 234 amino acids in capsid protein showed more virulence in vivo, compared with classical PCV2a/b strain. PLoS ONE 7, e41463.
Huang, L.P., Lu, Y.H., Wei, Y.W., Guo, L.J., Liu, C.M., 2011. Identification of one critical amino acid that determines a conformational neutralizing epitope in the capsid protein of porcine circovirus type 2. BMC Microbiol. 11, 188–197.
Kim, J., Han, D.U., Choi, C., Chae, C., 2001. Differentiation of Porcine Circovirus (PCV)-1 and PCV2-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. J. Virol. Methods 98, 25–31.
Liu, J., Chen, I., Du, Q., Chua, H., Kwang, J., 2006. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. J. Virol. 80, 5065–5073.
Liu, J., Chen, I., Kwang, J., 2005. Characterization of a previously unidentified viral protein inporcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus induced apoptosis. J. Virol. 79, 8262–8274.
Mankertz, A., Hillenbrand, B., 2001. Replication of porcine circovirus type 1 requires two proteins encoded by the viral rep gene. Virology 279, 429–438.
Nawagitgul, P., Morozov, I., Bolin, S.R., Harms, P.A., Sorden, S.D., Paul, P.S., 2000. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. J. Gen. Virol. 81, 2281–2287.
Olvera, A., Cortey, M., Segalés, J., 2007. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. Virology 357, 175–185.
Opriessnig, T., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2007. Porcine Circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. J. Vet. Diagn. Invest. 19, 591–615.
Opriessnig, T., Xiao, C.T., Gerber, P.F., Halbur, P.G., 2013. Emergence of a novel mutant PCV2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the U.S. concurrently infected with PPV2. Vet. Microbiol. 163, 177–183.
Ramos, N., Mirazo, S., Castro, G., Arbiza, J., 2013. Molecular analysis of Porcine Circovirus Type 2 strains from Uruguay: evidence for natural occurring recombination. Infect. Genet. Evol. 19, 23–31.
Saha, D., Lefebvre, D.J., Ooms, K., Huang, L., Delputte, P.L., Doorsselaere, J.V., Nauwynck, H.J., 2012. Single amino acid mutations in the capsid switch the neutralization phenotype of porcine circovirus 2. J. Gen. Virol. 93, 1548–1555.
Salgado, R.L., Vidigal, P.M., de Souza, L., Onofre, T.S., Gonzaga, N.F., Eller, M.R., Bressan, G.C., Fietto, J.L., Almeida, M.R., Silva Júnior, A., 2014. Identification of an emergent porcine circovirus-2 in vaccinated pigs from a Brazilian farm during a postweaning multisystemic wasting syndrome outbreak. Genome Announc. 20 2 (2).
Segalés, J., 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. Virus Res. 164, 10–19.
Segalés, J., Olvera, A., Grau-Roma, L., Charreyre, C., Nauwynck, H., Larsen, L., Dupont, K., McCullough, K., Ellis, J., Krakowka, S., Mankertz, A., Fredholm, M., Fossum, C., Timmusk, S., Stockhofe-Zurwieden, N., Beattie, V., Armstrong, D., Grassland, B., Baekbo, P., Allan, G., 2008. PCV-2 genotype definition and nomenclature. Vet. Rec. 162, 867–868.
Seo, H.W., Park, C., Kang, I., Choi, K., Jeong, J., Park, S.J., Chae, C., 2014. Genetic and antigenic characterization of a newly emerging porcine circovirus type 2b mutant first isolated in cases of vaccine failure in Korea. Arch. Virol. 159, 3107–3111.
Vlasakova, M., Jackova, A., Vilcek, S., 2011. Genetic typing of porcine circovirus type 2 (PCV-2) isolates from Slovakia. Res. Vet. Sci. 90, 168–173.
Wang, F., Guo, X., Gea, X., Wang, Z., Chen, Y., Cha, Z., Yang, H., 2009. Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2. Virus Res. 145, 151–156.

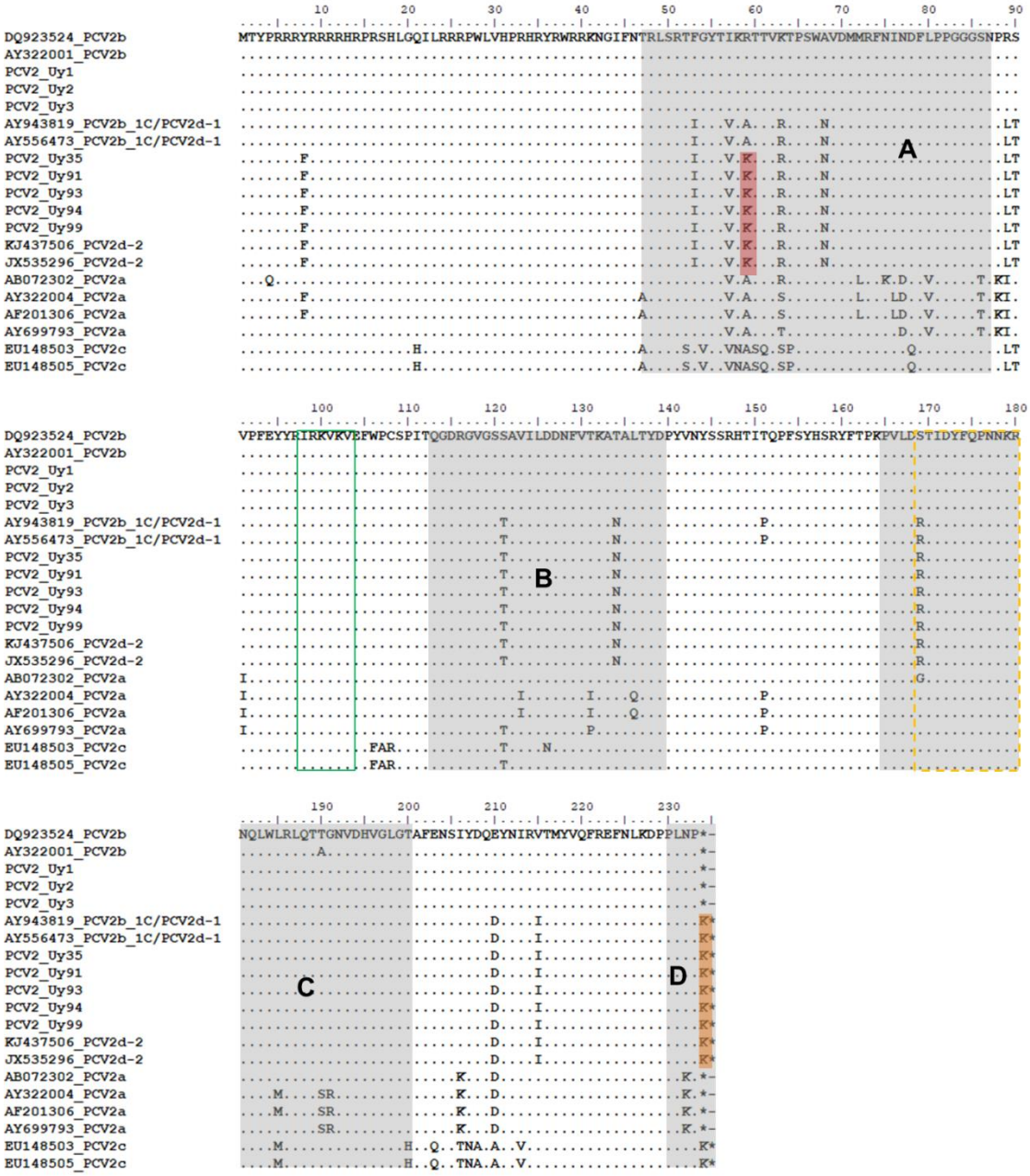


Fig.4.6.1 complementaria. Alineamiento aminoacídico de la *Cap* de diferentes genotipos de PCV2. En gris se muestran los dominios de reconocimiento de anticuerpos que contienen epítopes lineales y conformacionales (A-D) definidos por Karuppannan y Opriessnig, 2017. El recuadro de línea punteada amarilla muestra el epítope señuelo inmunodominante dentro del epítope C. El recuadro de línea continua verde muestra el dominio putativo del receptor de unión al sulfato de heparina (Misinzo et al., 2006). Únicamente las cepas PCV2d-2, incluyendo las cepas PCV2_Uy35, PCV2_Uy91, PCV2_Uy93, PCV2_Uy94 y PCV2_Uy99, poseen una Lys en la posición 59 (marcado en rojo). Tanto las PCV2d-1 como las PCV2d-2 poseen una Lys extra en el extremo C-terminal (marcado en anaranjado) y también puede observarse en cepas PCV2c. Las cepas Uruguayas caracterizadas en el capítulo anterior se incluyeron en el alineamiento, todas ellas con cápside típica del genotipo PCV2b.

4.7. Capítulo 4. Estudio molecular de PCV2 en cerdos domésticos y jabalíes en Uruguay entre los años 2010 a 2014: predominio de circulación de cepas recombinantes

Este capítulo comprende el estudio de la frecuencia de infección y caracterización genética de PCV2 en Uruguay en 299 muestras (154 de cerdo doméstico y 145 de jabalíes) colectadas durante el periodo 2010-2014. En este trabajo se emplea el sistema de detección molecular previamente optimizado (capítulo 2, ver sección 4.4) y se perfeccionan las técnicas de amplificación del genoma completo presentadas en los capítulos 2 y 3 (secciones 4.4 y 4.6). Cabe resaltar, que en este estudio se incluyeron las cepas identificadas en los capítulos anteriores y ahora son denominadas por su número de acceso al GenBank. Asimismo, en este capítulo se considera para la clasificación de las cepas el sistema de 4 genotipos: PCV2a, PCV2b, PCV2c y PCV2d.

En el caso de los cerdos domésticos la mayoría de las muestras analizadas correspondían a cerdos con sintomatología clínica asociada a las PCVAD (92/145), el resto eran muestras de cerdos asintomáticos (26/145) o de cerdos destinados a faena en frigoríficos (36/145). Las muestras fueron colectadas preferentemente en granjas pequeñas y medianas localizadas en 13 de los 19 Departamentos del Uruguay. Con este estudio se pretendió analizar el escenario epidemiológico de PCV2 en un periodo de tiempo de 4 años y observar los posibles efectos de la introducción de la vacunación en el país. En efecto, como hecho importante de esta tesis, la identificación de PCV2 por primera vez en el Uruguay, significó el comienzo de la vacunación generalizada a finales del 2011 y principios del año 2012. Sin embargo, de todas maneras, en los años siguientes se continuaron reportando casos con síntomas compatibles con PCV2 en diferentes criaderos.

Por otro lado, este trabajo analizó muestras de jabalí recolectadas en las Fiestas Nacionales del Jabalí en Aiguá (Departamento de Maldonado) en los años 2011-2014. El jabalí europeo *Sus scrofa* fue introducido en Uruguay en las primeras décadas del siglo XX. En razón de las propias características de la especie, la no existencia de depredadores naturales y debido a un ambiente favorable, el jabalí experimentó un importante incremento demográfico y una gran expansión en su distribución original que aún continúa. En la actualidad, se distribuye por casi todo el territorio nacional (Lombardi et al., 2007). Como resultado de su omnivorismo, rusticidad y hábitos predadores, fueron constatados daños crecientes, lo cual llevó a que en 1982 se

dictara una norma jurídica declarándolo plaga nacional y libre de caza (Decreto Nº 463/1982). El jabalí es el origen genético de los actuales cerdos domésticos y se presume que actualmente las poblaciones de jabalí en nuestro país comprenden cruzamientos con cerdos domésticos, lo que genera una gran variedad en fenotipos aunque con un predominio de las características salvajes (Herrero y Fernández de Luco, 2003). De hecho, numerosos son los episodios reportados donde jabalíes han ingresado a criaderos de cerdos domésticos originando cruzamientos perjudiciales (Lombardi et al., 2007). Evidentemente, el contacto frecuente entre los cerdos domésticos y el jabalí en Uruguay representa un claro riesgo para la transmisión de enfermedades. Por este motivo, este estudio tuvo como objetivo monitorear el estatus sanitario de las poblaciones de jabalí con respecto a la infección por PCV2, a modo de evaluar el posible papel de los mismos como fuente de infección para los cerdos domésticos.

Los resultados descritos en este capítulo indican que el 40.3% de las muestras analizadas de cerdos domésticos estaban infectadas con PCV2. Asimismo, se analizó la frecuencia de infección en relación a la cantidad de muestras disponibles por año y se observó una notoria fluctuación en el porcentaje de positivos por año, así como también en la cantidad de casos con sintomatología asociada a PCV2. Se estima que esta oscilación se deba a la inestabilidad de las prácticas de vacunación y de las estrategias de bioseguridad implementadas en Uruguay para el control de esta infección. En cuanto a la caracterización molecular de las cepas detectadas, se evidenció la presencia de una gran heterogeneidad genética de cepas de PCV2, observándose la circulación de diferentes genotipos y de cepas recombinantes. Se pudo determinar la infección de PCV2 en Uruguay desde al menos el año 2010, siendo PCV2a el único genotipo detectado en ese año. Posteriormente en 2011, que coincide con el año en el que se constataron mayor cantidad de casos con sintomatología asociada a PCV2, se identificó la presencia del genotipo PCV2b y un 75% de las cepas caracterizadas en ese año resultaron ser cepas recombinantes. En el año 2012, decae tanto el número de casos con sintomatología disponibles como el porcentaje de PCV2 positivos en las muestras analizadas, lo cual podría explicarse por el inicio de la vacunación masiva contra PCV2 en Uruguay. De todas formas, en ese año las cepas caracterizadas resultaron ser recombinantes en su totalidad. Luego, en el 2013, como se describió en el capítulo 3 de esta tesis (ver sección 4.6), comienza a circular en Uruguay la cepa mutante PCV2d. Se observó una co-circulación de cepas PCV2d y cepas

recombinantes (43.5% cada variante) y una circulación minoritaria de los genotipos clásicos PCV2a y PCV2b. Por último, en el año 2014, si bien se pudo caracterizar sólo una cepa, esta pertenecía al genotipo PCV2d con lo que se especula, que al igual a lo ocurrido a nivel mundial, este genotipo sustituyó al genotipo anteriormente prevalente, en el caso de Uruguay, la cepa recombinante. En apoyo a esta hipótesis, en el año 2017 fueron analizadas muestras de un criadero de Rocha que presentaba problemas respiratorios en lechones y de abortos en madres, constatándose 3 casos positivos de PCV2. Se realizó la caracterización genética de 2 de las 3 cepas identificadas mediante la amplificación del gen *rep* y del gen *cap*, pudiéndose evidenciar que se trataban de cepas del genotipo PCV2d (Uy1-2017 y Uy2-2017) (Fig.4.7.1.complementaria). Estas cepas resultaron ser idénticas entre ellas y presentaron una alta identidad de secuencia nucleotídica con las cepas PCV2d Uruguayas previamente detectadas, observándose solo un cambio a nivel del gen *rep* A365G (posición en relación al genoma completo). Evidentemente, este resultado obtenido 3 años más tarde del último dato desarrollado en este capítulo, indica que es muy probable que la sustitución de cepas recombinantes por cepas del genotipo PCV2d haya ocurrido en Uruguay. De todas formas, el procesamiento de un mayor número de muestras es necesario para confirmar este hecho.

Por otro lado, la frecuencia de infección de PCV2 identificada en poblaciones de jabalí fue de un 24.8%. A diferencia de lo que se observó en los cerdos domésticos, el porcentaje de positivos en relación a la cantidad de muestras disponibles se mantuvo relativamente constante en el periodo estudiado. Ello indica probablemente, la ausencia de presiones selectivas y/o políticas activas de salud animal en la población de jabalíes. Paralelamente, la caracterización genética de cepas identificadas en animales salvajes resultó ser muy difícil. Se especulan dos posibles causas, por un lado la incorrecta preservación y condición de las muestras durante largas sesiones de caza y por otro, cargas virales del virus muy bajas que dificultan la amplificación de grandes fragmentos del genoma. Sin embargo, como hecho destacado, las dos cepas caracterizadas en jabalí identificadas en el año 2012, resultaron estar estrechamente relacionadas con cepas Uruguayas detectadas en cerdo doméstico.

En definitiva, este trabajo permitió proporcionar un conjunto de datos muy valioso de 40 secuencias de PCV2, de las cuales 22 son genomas completos. Asimismo, significó la primera evidencia del predominio de la circulación de cepas recombinantes en relación a otros

genotipos de PCV2. Si bien han sido identificadas cepas recombinantes en diferentes países, siempre han estado asociadas a casos puntuales y no a una circulación mayoritaria (Ma et al., 2007; Hesse et al., 2008; Cheung, 2009; Kim et al., 2009; Cai et al., 2011, 2012;). Por otro lado, la alta circulación de PCV2d desde 2013 en Uruguay refleja el reciente surgimiento y expansión global de esta cepa emergente. Finalmente, estos resultados sugieren que los jabalíes contribuyen al riego de la transmisión de PCV2 al cerdo doméstico, siendo una amenaza real para el control y mantenimiento de la salud animal.

ARTÍCULO IV

Gene 637 (2017) 230–238

Contents lists available at ScienceDirect

Gene

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gene

Research paper

Molecular study of Porcine Circovirus type 2 in wild boars and domestic pigs in Uruguay from 2010 to 2014: Predominance of recombinant circulating strains

Natalia Ramos[a], Dario Porley[a], Santiago Mirazo[a], Gustavo Castro[b], Karina Cabrera[c], Alejandra Lozano[d], Juan Arbiza[a,*]

[a] Sección Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, Montevideo 11400, Uruguay
[b] Área Suinos, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Alberto Lasplaces 1550, Montevideo 11600, Uruguay
[c] Asociación Uruguaya de Productores de Cerdos, Treinta y Tres 1525, Montevideo 11000, Uruguay
[d] Área Medicina Preventiva y Epidemiologia, Facultad de Veterinaria, Alberto Lasplaces 1550, Montevideo 11600, Uruguay

ARTICLE INFO

Keywords:
Porcine Circovirus type 2
Molecular epidemiology
Recombinant strains
Swine
Wild boar
Uruguay

ABSTRACT

Porcine Circovirus type 2 (PCV2) is a worldwide distributed pathogen and one of the most economically relevant swine infections. Four genotypes have been recognized and it is well known that PCV2a, PCV2b and PCV2d have a global distribution. However, the information about recombinant strains circulation and their influence in driving PCV2 evolution is a poorly studied area.

In Uruguay, PCV2 associated symptoms began to be frequently observed in pigs from different farms since 2010. The main purpose of this study was to thoroughly investigate the molecular epidemiology of PCV2 in nationwide swine herds and free-living wild boars during the period 2010–2014, providing an extensive viral sequence dataset.

Surprisingly, the findings revealed a predominance of recombinant strains circulation, evidencing for the first time in the field that PCV2 recombination can lead to the emergence of strains able to compete and potentially displace parental ones. In addition, the circulation of the genotypes PCV2d (29%), PCV2b (10.5%) and PCV2a (7.9%) were also observed. Since 2013, a high circulation of PCV2d was identified in the country and probably reflected the recent global scenario of the emergence of this genotype.

In addition, fluctuations in the frequency of PCV2 infection in the period evaluated may suggest a limitation of biosecurity strategies implemented in Uruguay for the disease control, including the instability of vaccination practices.

On the other hand, the sustained PCV2 infection observed in wild boar population and the similarity among circulating viral strains from these animals and domestic pigs, suggested that wild animals could serve as permanent reservoir of the disease.

Altogether, this work put forward that many factors play a role in PCV2 heterogeneity including rapid viral spread and evolution, recombination, wide movement within national boundaries and multiples introduction events resulting of international trade. Continuous monitoring of viral epidemiology is needed to better understand the PCV2 population dynamics in Uruguay and the development of appropriate strategies are required for disease control.

1. Introduction

Porcine Circovirus type 2 (PCV2), a small non-enveloped virus classified into Circoviridae family, is an extensively distributed pathogen considered an important emerging virus related to several syndromes in pigs. PCV2 is considered the primary etiological agent of

Abbreviations: DNA, deoxyribonucleic acid; dNTP, deoxyribonucleoside triphosphate; EE, exudative epidermitis; MGAP, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca; mPCV2b, PCV2b mutant or PCV2d genotype; nt, nucleotide; ORFs, open reading frames; ORF1, open reading frame 1 or *rep* gene/name of the semi-nested PCR amplicon defined in Table 1; ORF2, open reading frame 2 or *cap* gene/name of the nested PCR amplicon defined in Table 1; ORF3, open reading frame 3 that encodes a protein involved in virus-induced apoptosis; ORF1/2, name of the semi nested PCR amplicon defined in Table 1; P300, name of the nested PCR amplicon defined in Table 1; PCR, polymerase chain reaction; PCV2, Porcine Circovirus type 2; PCV2a, PCV2b, PCV2c and PCV2d, genotypes of PCV2; PCV2-SD, the systemic disease associated with PCV2

* Corresponding author at: Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay.
E-mail addresses: nramos@fcien.edu.uy (N. Ramos), dporley@fcien.edu.uy (D. Porley), smirazo@fcien.edu.uy (S. Mirazo), jarbiza@fcien.edu.uy (J. Arbiza).

http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2017.09.058
Received 9 August 2017; Received in revised form 22 September 2017; Accepted 26 September 2017
Available online 28 September 2017
0378-1119/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

the systemic disease (PCV2-SD), a severe disease which has significant economic impact on swine production and industry worldwide (Segalés, 2012). Common clinical signs in PCV2-SD include wasting, growth retardation and enlarged lymph nodes (Allan and Ellis, 2000). PCV2 has also been related to reproductive failure, enteric disease, respiratory disorders, porcine dermatitis and nephropathy syndrome and proliferative and necrotizing pneumonia (Segalés, 2012). In addition, PCV2 has been associated with others swine diseases as exudative epidermitis (EE) (Wattrang et al., 2002; Kim and Chae, 2004; Ramos et al., 2012).

PCV2 genome consists in a single-strand ambisense circular DNA ranging from 1766 to 1768 nucleotides (nt) with three major open reading frames (ORFs). ORF1 (*rep* gene) encodes replication-related proteins, ORF2 (*cap* gene) encodes the capsid protein which forms the icosahedral capsid and ORF3 encodes a protein involved in virus-induced apoptosis (Lv et al., 2014).

Both mutation and genetic recombination are common and important mechanisms in the evolution of PCV2 and particularly, the high frequency of PCV2 recombination reported raises undoubtedly a greater challenge for PCV2 classification (Franzo et al., 2016). To date, PCV2 strains can be divided into four genotypes (PCV2a, PCV2b, PCV2c and PCV2d-mPCV2b) based on phylogenetic analysis. PCV2a, PCV2b and PCV2d have a worldwide distribution (Franzo et al., 2015a), while PCV2c, was reported from Denmark in the 1980s (Dupont et al., 2008) and has recently been identified in the Brazilian Pantanal (Franzo et al., 2015b).

Several countries in South America, including Argentina, Brazil, Chile, Colombia and Uruguay, have reported the molecular detection of PCV2 strains in domestic pigs and genotyping studies of the virus have revealed that PCV2b is the predominant circulating genotype in the region (Noriega et al., 2007; Ciacci-Zanella et al., 2009; Pereda et al., 2011; Ramos et al., 2012; Rincón Monroy et al., 2014). On the other hand, several reports suggest that PCV2 circulates at high rate among wild boar population in Europe and it has been speculated that these animals might serve as an important PCV2 potential reservoir (Vicente et al., 2004; Cságola et al., 2006; Ruiz-Fons et al., 2006, 2008). However, data regarding the circulation of PCV2 in wild boar population in South America is still scant. In the few reports from this region (all from Brazil), PCV2 was detected by PCR in two wild boars from a semi-intensive wildlife boars farm (Castro et al., 2012) and seroprevalence of the virus in captive wild boars was reported, ranging from 54 to 95% (Barbosa et al., 2014). Moreover, PCV2 infection was detected in feral pigs in Brazilian Pantanal (Franzo et al., 2015b). Nevertheless, no data are currently available about molecular epidemiology of PCV2 in free-living wild boars.

In Uruguay, the first set of PCV2 strains has been detected in 2011 in domestic pigs affected with EE (Ramos et al., 2012). Then, the circulation of the first PCV2 recombinant strains ever reported in South America was detected which arose from recombination events between PCV2b (subtype 1A according to Olvera et al., 2007 classification) and PCV2a (subtype 2D according to Olvera et al., 2007 classification) strains within ORF1 (Ramos et al., 2013). In addition, we recently reported the first detection of PCV2d in Uruguayan pigs (Ramos et al., 2015).

The aim of this work was to thoroughly investigate the circulation of PCV2 in nationwide swine herds and free-living wild boars during 2010–2014 and to describe the genetic heterogeneity and variability of Uruguayan PCV2 strains, providing information about regional molecular epidemiology and PCV2 evolution.

2. Materials and methods

2.1. Samples

2.1.1. Domestic pigs

In this study were included 154 samples (lungs, livers, lymph nodes and/or sera) of domestic pigs belonging to different commercial, medium and small-sized farms located in 13 Departments (Canelones, Colonia, Durazno, Flores, Florida, Lavalleja, Soriano, Maldonado, Montevideo, Paysandú, Rocha, Salto and San José) comprising the south, north, east and west of Uruguay. One hundred and eighteen samples were obtained by trained veterinary personnel during the period 2010–2014, as part of a supporting plan of the official animal-health screening program for diseases in pigs (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, MGAP). Ninety-two of these samples came from pigs with PCV2-associated symptoms and 26 belong to asymptomatic pigs. The remaining 36 samples were obtained from slaughterhouses during 2013–2014 and data about health conditions is not available.

Eight cases included in this investigation were previously described by our research group (Ramos et al., 2012, 2013, 2015).

2.1.2. Wild boars

In Uruguay, wild boars were officially declared as a national pest in 1982 (Decree 463/982). Since then, every year the 'National Wild Boar Festival' is carried out where several hunting groups certified by MGAP participate. This study comprised a total of 145 samples (lymph nodes and sera) from 4 consecutive festivals (2011–2014) that were provided by hunters. Samples were collected in 4 different hunting areas from departments of Cerro Largo, Maldonado and Rocha (east and southeast of Uruguay).

2.2. DNA extraction and PCV2 detection

DNA was extracted from 200 μL of serum or 25 mg of tissue using a commercial kit (QIAmp DNA Mini Kit, Qiagen USA) according to manufacturer's instructions. PCV2 DNA was detected by amplifying a small region of 225-bp within the *cap* gene by nested PCR as previously described (Kim et al., 2001).

2.3. Complete genome amplification and sequencing

Complete genome nucleotide sequences were obtained by nested and semi-nested PCR amplification of four overlapping amplicons named ORF2, P300, ORF1 and ORF1/2. Table 1 shows the list of primers and the strategy used in this study for amplifying the PCV2 entire viral genome. PCR amplifications were performed in 50 μL reaction volume containing 1 × PCR buffer, 2 mM MgCl2, 0,5 μM each primer, 0,2 mM of each dNTP and 1,5 U Taq DNA polymerase (Fermentas, Life Sciences). Second-round PCR products of the expected size were purified using a commercial kit (Zymoclean™ Gel DNA recovery kit, USA) and DNA was sequenced directly in both directions by Macrogen automatic sequencing service, Korea and Institut Pasteur Montevideo sequencing service. Sequencing results of purified PCR products were spliced and consensus sequences were obtained.

2.4. Genotyping and molecular analysis

In order to conduct genotyping studies, the molecular analysis of PCV2 strains from Uruguay was performed based on ORF2 marker positions proposed by Franzo et al. (2015a). Moreover, sequences were also classified and evaluated for recombination using ORF1 marker positions as previously reported (Ramos et al., 2013). Further confirmation about the identification of recombinant strains was carried out following the procedures described by Ramos et al. (2013).

Sequences were aligned using Clustal W software and the degree of identity among sequences at nucleotide and amino acid was determined by using BioEdit v. 7.0.5. Phylogenetic trees based on concatenated ORF1 and ORF2 genes and on complete genome were reconstructed by the neighbour-joining method with the Kimura two-parameter model as the model of nucleotide substitution, using MEGA v. 5.0 software. Evolutionary model that best fitted to the dataset was selected with ModelTest tool. Bootstrap values were determined with 1000 replicates

Table 1
Primers used for the amplification and sequencing of entire viral genome.

Type of reaction/primer (primer position)	Reference or primer sequence (5′-3′)	Annealing temperature/no. of cycles	PCR product size (name)
1st round			
SP1/PC4R (544–563/417–400)	Vlasakova et al. (2011)	55 °C/30	1641pb
2nd round			
capFw/capRw (998–1018/1756–1739)	Fort et al. (2007)	50 °C/37	759pb[a] (ORF2)
PCV300F/PCV300R (1597–1616/130–111)	GTTGAAGATGCCATTTTTCC/TCTTCGGAAGGATTATTSAG	49 °C/35	300pb[a] (P300)
1st round			
ORF1Fw/PC2R (50–70/1439–1420)	TATGCCCAGCAAGAAGAATGG/Vlasakova et al. (2011)	55 °C/30	1389pb
2nd round			
ORF1Fw/ORF1Rw (50–70/997–976)	TATGCCCAGCAAGAAGAATGG/CCTCAGTAATTTATTTCATATG	58 °C/35	947pb[a] (ORF1)
SP1/PC2R (544–563/1439–1420)	Vlasakova et al. (2011)	55 °C/35	895pb[a] (ORF1/2)

[a] Sequenced overlapping amplicons.

of the dataset. Forty eight sequences of the four genotypes were included in the phylogenetic analysis. Additionally, Uruguayan recombinant strains (GenBank accession numbers KC688418 and KC688419) previously characterized (Ramos et al., 2013) were also incorporated and PCV1 isolate FJ475129 was included as outgroup. Bootstrap support values above 70% were considered a significant evidence for phylogenetic grouping.

In order to perform the molecular analysis of the strains in which it was not possible to sequence both genes, phylogenetic analysis based on ORF1 gene and/or ORF1/2 fragment were also carried out by a similar approach to that used for the complete genome analysis.

3. Results

3.1. PCV2 detection

3.1.1. Domestic pigs

PCV2 DNA was detected in 62 (frequency of infection 40.3%) samples from pigs belonging to different Uruguayan farms situated in Canelones, Colonia, Durazno, Flores, Florida, Lavalleja, Montevideo, Salto, San José and Soriano Departments. PCV2 was identified in 36 samples of pigs with PCV2-associated symptoms, 12 samples from asymptomatic pigs and 14 samples obtained from slaughterhouses without symptomatology data. The number of samples tested in each year and the percentage of PCV2 positive samples by nested PCR are shown in Fig. 1A.

3.1.2. Wild boars

PCV2 DNA was detected in 36 out 145 samples (frequency of infection 24.8%). Positive samples by nested PCR corresponded to animals belonging to 4 hunting locations in Cerro Largo, Maldonado and Rocha Departments (east and southeast of Uruguay) in the period 2011–2014. The number of samples analysed per year and the percentage of PCV2 positive samples are shown in Fig. 1B.

3.2. Molecular characterization of PCV2 strains

Thirty out of 62 strains detected in pigs and 2 strains isolated from wild boars were genotyped. Data regarding PCV2 isolates characterized in this work ordered according to the year of sample collection, animal category, geographic origin and clinical signs are indicated in Table 2. Eight strains previously reported by our research group (Ramos et al., 2013, 2015) were also included in the table to summarize all Uruguayan characterized isolates in the period 2010–2014.

3.2.1. Genetic analysis of complete and nearly-complete genome sequences

Fifteen PCV2 complete genomes and 5 nearly-complete genomes of 1647 to 1730 nt in length were obtained. These 20 Uruguayan PCV2 isolates were included in the phylogenetic analysis based on concatenated ORF1 and ORF2 genes (1647 nt) (Fig. 2). All characterized strains were isolated from pigs, except URUJ2 that was obtained from a wild boar (Table 2). According to the phylogenetic reconstruction URUJ2, URU31 and URU70 grouped within PCV2b cluster, URU87 within PCV2d, and URU8 and URUF12 within PCV2a (Fig. 2). Identical tree topology was observed with the complete genome (data not shown) and these results are consistent with the classification proposed by Franzo et al., 2015a. The analysis of both genes revealed that PCV2b-1A Uruguayan isolates (including the previously characterized isolate KC688420) shared a nucleotide identity of 99.6–100%. Furthermore, URU87 presented a high nucleotide sequence identity ranging from 99.8–100% with PCV2d Uruguayan isolates previously characterized (KP867046, KP867047, KP867048, KP867049 and KP867050). On the contrary, PCV2a genotype strains had not been ever reported in Uruguay. Regarding isolates of this genotype detected in this study, URU8 and URUF12 shared a nucleotide identity of 97.1%. Moreover, URU8 resulted to be more closely related with PCV2a-2D strains showing a nucleotide similarity of 98–99.3%. However, URUF12 exhibited a higher percentage of nucleotide identity (98.7–99.2%) with PCV2a-2E isolates included in the analysis.

On the other hand, a set of 14 isolates were very closely related with recombinant Uruguayan strains previously characterized (KC688418 and KC688419) and grouped together in a novel cluster within PCV2b genotype with a very high statistical support (cluster R bootstrap value 100%) (Fig. 2). Construction of identity matrices based on the 1647 nt sequence revealed a nucleotide identity ranging from 99.4% to 100% among Uruguayan recombinant isolates. Moreover, similarity of 99.2%–100% was observed at amino acid level and additional amino acid changes within ORF1 than ORF2 were noticed (data not shown).

Recombinant processes and origin of these strains were evaluated and confirmed following the procedures previously described by Ramos et al., 2013. The 14 recombinants originated from the same parental lineages (PCV2b-1A as major parent and PCV2a-2D as minor parent) and the event occurred within ORF1 (comprising a region of approximately 600 nt) (data not shown). In addition, taking to account that it was used the same dataset employed for the phylogenetic tree (based on concatenated genes) and each potential recombinant strain was analysed separately, results from RDP software (Martin et al., 2010), showed that most of the recombinant Uruguayan strains exhibited evidence of the same recombination event that KC688418. In these

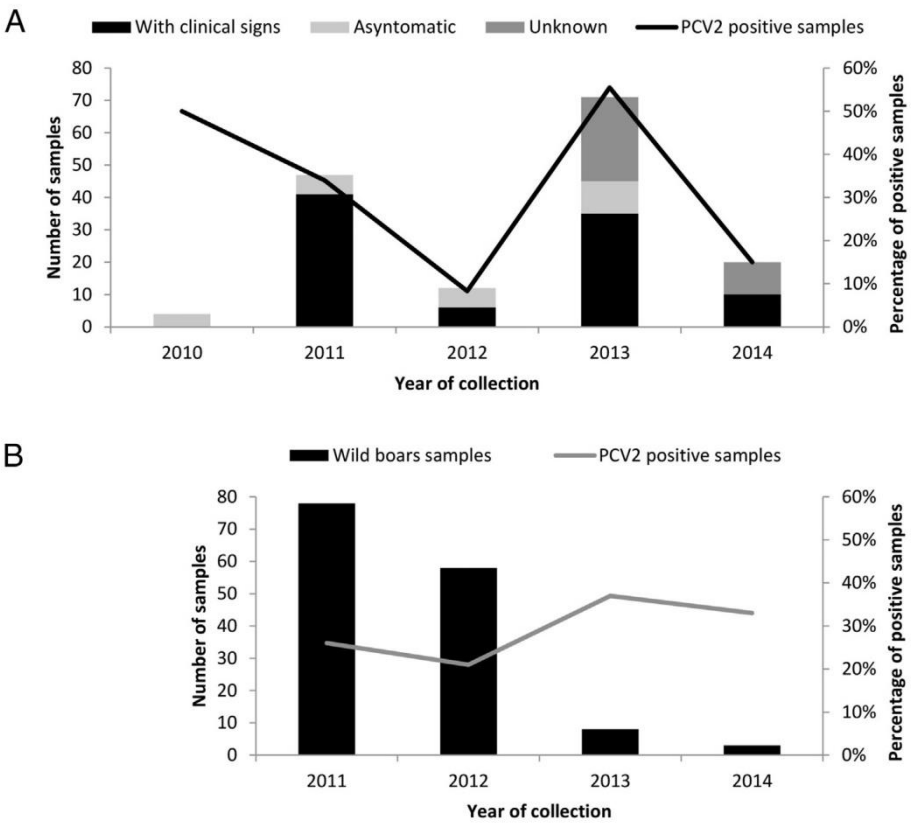


Fig. 1. PCV2 detection in domestic pig and wild boar. (A) Number of domestic pig samples tested for PCV2 between 2010 and 2014 is shown in columns. Samples from asymptomatic pigs or animals with PCV2-associated symptoms in each column are represented in light grey and black, respectively. Samples obtained from slaughterhouses without information about symptomatology are shown in dark grey. Line represents the percentage of PCV2 positive samples by nested PCR. (B) Number of wild boar samples tested for PCV2 in the period 2011 to 2014 is shown in dark columns. Grey line represents the percentage of positive samples per year.

cases, the potential parental sequences selected from the dataset resulted to be URUJ2 (major parent) and AY320004 (minor parent) with percentages higher than 99% (data not shown). However, URU11 presented evidence of the same recombination event that KC688419 and sequences DQ923523 and AF109399 resulted selected as major and minor parents, respectively. In the case of URU56 the parental sequences resulted to be URUJ2 and AF109399, a combination of both recombinant strains previously described. Data regarding evidences of recombination event and putative breakpoints estimated by SimPlot (Lole et al., 1999) and RDP software, respectively, are shown in Supplementary material.

3.2.2. Genetic analysis of partial genome sequences

Twelve PCV2 partial genomes were obtained (strains URU3, URU75, URU37 URU42611, URUF815, URU39, URUF33, URUG, URU288, URU90 and URU1832 isolated from pigs and URUJ1 isolated from a wild boar). In these cases, it was not possible to sequence both complete genes. Amplified regions and sequence obtained for each isolates are indicated in Table 2.

The phylogenetic reconstruction based on ORF1 showed that URUG was very closely related to sequences of PCV2b, comprising a statistically supported cluster (bootstrap value, 99%) (Fig. 3A). Indeed, the construction of identity matrices based on ORF1 gene showed a nucleotide identity of 99.5–99.7% among Uruguayan PCV2b isolates, and URUG resulted to be more closely related to URUJ2 and URU70 (data not shown). Additionally, URU39, URUF33, URU288, URU90 and URU1832 clustered together with PCV2d isolates (bootstrap value 99%) (Fig. 3A). In fact, these isolates shared a nucleotide identity that ranged from 99.5% to 100% and with URU87 and PCV2d strains previously detected in Uruguay (Ramos et al., 2015).

On the other hand, the phylogenetic analysis using ORF1 showed that URU75, URU37, URU42611 and URUF815 grouped together within the recombinant cluster (Fig. 3A). Comparison of these isolates with the Uruguayan recombinant strains previously characterized, KC688418 and KC688419, revealed very high percentages of nucleotide identity (99.2–100%). In particular, the isolate URU75 resulted to be identical with KC688419, while URU42611 and URUF815 were more closely related to KC688418 (99.7% and 99.4%, respectively). Moreover, URU37 showed a nucleotide identity of 99.6% with both recombinant strains. This analysis is consistent with the phylogenetic reconstruction based on the fragment ORF1/2, in which URU75, URU42611 and URU37 grouped together with Uruguayan recombinant strains (Fig. 3B). The fact that these viruses grouped within PCV2a cluster with the ORF1 and within PCV2b lineage with the ORF1/2 region (Fig. 3), provided additional evidence of the inter-genotypic recombination event within *rep* gene.

In the case of URUF815, the inclusion of this isolate in the phylogenetic analysis based on combining both genes and ORF1/2 fragment was not possible due to the fact that only ORF1 and ORF2 partial gene were obtained (1450nt). Nonetheless, sequence analysis revealed that this isolate shared a nucleotide identity of 99.5% with KC688418 (data not shown).

As is shown in Table 2, the complete ORF1 gene of the isolate URU3 and URUJ1 could not be obtained. The phylogenetic analysis based on the fragment ORF1/2 showed that URU3 clustered together with PCV2a isolates (Fig. 3B). In particular, this isolate shared a nucleotide identity of 100% with URU8. Indeed, both strains were detected in pig samples belonging to the same farm collected during different time periods of 2010. On the other hand, URUJ1 resulted to be more closely related with Uruguayan recombinant strains (Fig. 3B). In fact, the sequence analysis showed a very high nucleotide identity with KC688418 (99.9%). Moreover, the partial ORF1 sequence obtained for URUJ1 was identical to KC688418 and ORF1 marker positions for recombination (Ramos et al., 2013) were identified in the sequenced region (data not shown).

Table 2
PCV2 Uruguayan isolates characterized at the molecular level. Information of animal category, year of collection, geography origin, clinical signs, sequence obtained, genotype and accession number are indicated.

Sample name	Sample origin (category)	Year of collection	Department origin	Clinical signs	Sequence obtained	Genotype	Accession number
URU3	Swine (boar)	2010	Soriano	Without clinical signs	ORF2 ORF1/2 P300	PCV2a-2D	MF616437
URU8	Swine (sow)	2010	Soriano	Without clinical signs	Complete genome	PCV2a-2D	MF616425
URU19	Swine (sow)	2011	Montevideo	Abortion	Complete genome	Recombinant	MF616421
Uy3[a]	Swine (weaner)	2011	Montevideo	Wasting, growth retardation	ORF1 ORF2	PCV2b-1A	KC688420
URU31	Swine (weaner)	2011	Montevideo	Without clinical signs	Complete genome	PCV2b-1A	MF616414
Uy2[a]	Swine (fattener)	2011	Soriano	Without clinical signs	Complete genome	Recombinant	KC688419
Uy1[a]	Swine (weaner)	2011	Canelones	Exudative epidermitis	Complete genome	Recombinant	KC688418
URU33	Swine (weaner)	2011	Canelones	Exudative epidermitis	Complete genome	Recombinant	MF616423
URU35	Swine (weaner)	2011	Canelones	Exudative epidermitis	Complete genome	Recombinant	MF616424
URU11	Swine (fattener)	2011	Canelones	Without clinical signs	Complete genome	Recombinant	MF616417
URU56	Swine (weaner)	2011	San José	Wasting	ORF1 ORF2	Recombinant	MF616430
URU59	Swine (weaner)	2011	San José	Wasting	Complete genome	Recombinant	MF616422
URU62	Swine (sow)	2011	Flores	Abortion	Complete genome	Recombinant	MF616419
URU75	Swine (sow)	2012	Canelones	Abortion	ORF1 ORF1/2	Recombinant	MF616433
URUJ1	Wild boar	2012	Maldonado	–	ORF2 ORF1/2 P300	Unknown[b]	MF616436
URUJ2	Wild boar	2012	Maldonado	–	ORF1 ORF2 P300	PCV2b-1A	MF616432
URU37	Swine (sow)	2013	Canelones	Abortion	ORF1 ORF1/2	Recombinant	MF616434
URU42	Swine (sow)	2013	Canelones	Abortion	Complete genome	Recombinant	MF616418
Uy35[a]	Swine (sow)	2013	Canelones	Abortion	Complete genome	PCV2d	KP867046
URU39	Swine (sow)	2013	Canelones	Abortion	ORF1	PCV2d	MF616439
URUF33	Swine (fattener)	2013	Canelones	Unknown (slaughterhouse)	ORF1	PCV2d	MF616440
URUF815	Swine (fattener)	2013	Florida	Unknown (slaughterhouse)	ORF1 ORF2 partial	Recombinant	MF616438
URUG	Swine (weaner)	2013	Lavalleja	Diarrhea	ORF1	PCV2b-1A	MF616441
URU70	Swine (weaner)	2013	Colonia	Wasting	Complete genome	PCV2b-1A	MF616413
URU288	Swine (weaner)	2013	Canelones	Respiratory disorders, wasting	ORF1	PCV2d	MF616442
URU1310	Swine (weaner)	2013	Canelones	Respiratory disorders, wasting	Complete genome	Recombinant	MF616416
URU2310	Swine (weaner)	2013	Canelones	Respiratory disorders, wasting	ORF1 ORF2 ORF1/2	Recombinant	MF616428
URU3310	Swine (weaner)	2013	Canelones	Respiratory disorders, wasting	Complete genome	Recombinant	MF616415
URU22510	Swine (sow)	2013	Canelones	Abortion	Complete genome	Recombinant	MF616420
URU22611	Swine (weaner)	2013	Montevideo	Diarrhea	ORF1 ORF2 ORF1/2	Recombinant	MF616429
URU42611	Swine (weaner)	2013	Montevideo	Diarrhea	ORF1 ORF1/2	Recombinant	MF616435
URUF16	Swine (fattener)	2013	Colonia	Unknown (slaughterhouse)	ORF1 ORF2	Recombinant	MF616431
URU87	Swine (sow)	2013	Durazno	Without clinical signs	Complete genome	PCV2d	MF616427
URU90	Swine (sow)	2013	Durazno	Without clinical signs	ORF1	PCV2d	MF616443
Uy91[a]	Swine (sow)	2013	Durazno	Abortion	Complete genome	PCV2d	KP867047
Uy93[a]	Swine (sow)	2013	Durazno	Abortion	Complete genome	PCV2d	KP867048
Uy94[a]	Swine (sow)	2013	Durazno	Abortion	Complete genome	PCV2d	KP867049
Uy99[a]	Swine (sow)	2013	Durazno	Abortion	Complete genome	PCV2d	KP867050
URUF21	Swine (fattener)	2013	San José	Unknown (slaughterhouse)	Complete genome	PCV2a-2E	MF616426
URU1832	Swine (weaner)	2014	Canelones	Wasting	ORF1	PCV2d	MF616444

[a] Strains previously reported by Ramos et al., 2013, 2015.
[b] Possible recombinant.

3.3. Genotype distribution of Uruguayan strains detected in domestic pigs

The analysis of PCV2 genotypes distribution in Uruguay in the period 2010–2014 revealed a wide circulation of the recombinant isolates. Twenty out of 38 genotyped isolates (52.63%) resulted to be recombinant sequences within ORF1, including the isolates analysed in this study and the strains previously characterized in Uruguay (Table 2). The rest of the genotypes identified were PCV2d (29%), PCV2b (10.5%) and PCV2a (7.9%). Of note, in 2010, all characterized strains belonged to PCV2a genotype and then, in 2011, the recombinant and PCV2b strains were detected in 82% and 18% of the characterized isolates, respectively. In the following year, the single characterized strain resulted to be recombinant and in 2013 the PCV2d genotype was frequently found (43.5%). However, the circulation of the recombinant strains was also observed (43.5%). By contrast, the genotypes PCV2a and PCV2b were identified in 4.3% and 8.7% of the characterized samples, respectively. Finally, in 2014, only one of the 3 strains detected could be genotyped and resulted to belong to PCV2d genotype. The percentage of each genotype identified in pig samples per year is indicated in Fig. 4.

4. Discussion

PCV2 is a widely distributed emerging pathogen and is considered to have a severe economic impact on swine production and industry worldwide (Segalés, 2012). In terms of evolution, the high mutation rate (about 10^{-3}–10^{-4} substitutions/site/year) (Firth et al., 2009) and the high frequency of recombination reported (Franzo et al., 2015a) are important characteristics of PCV2 that in synergy, may alter their phenotypic properties and fitness under selective pressures. Indeed, with the introduction of commercial vaccines in 2006 (Chae, 2012), new variants with genetic mutations have emerged. The major changes in population dynamic of PCV2 consisted in a switching event that resulted in the replacement of the previously predominant PCV2a genotype by PCV2b, and the recent emergence of a mutant PCV2b, denominated PCV2d, exhibiting more virulence *in vivo* compared with classical PCV2a/b strains (Guo et al., 2012; Ssemadaali et al., 2015). Moreover, the information about recombinant circulation and their influence in driving PCV2 evolution is a poorly studied area. For these reasons, the better knowledge of the molecular epidemiology of this emergent virus is critical for evaluating and predicting how genetic changes in PCV2 can influence diagnostic, vaccine-related or disease outcomes (Ssemadaali et al., 2015).

The main purpose of this study was to update the molecular epidemiology of PCV2 in Uruguay during the period 2010–2014, by analysing the frequency of the virus detection in wild boars and pigs, the genotypes distribution and the heterogeneity of the identified isolates.

Pig production in Uruguay has always been a little livestock sector

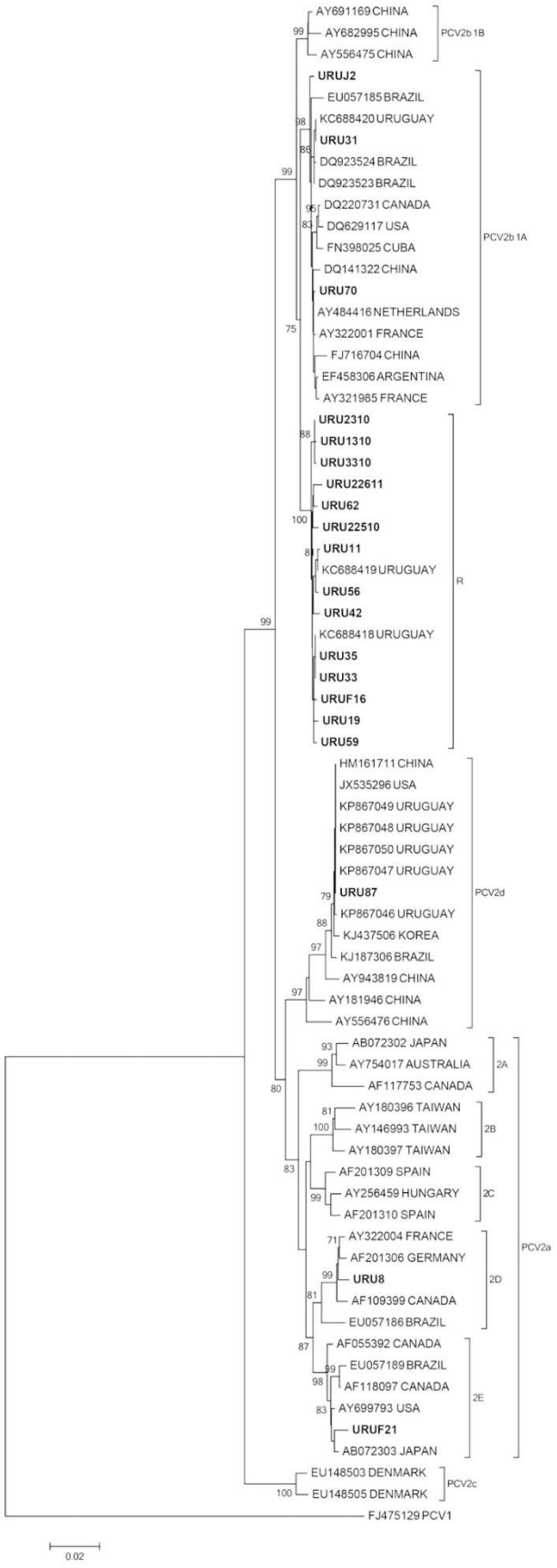


Fig. 2. Phylogenetic analysis performed with concatenated genes of PCV2. Tree was constructed by the neighbour-joining method based on 1647 nt sequence of PCV2 (combining both genes). Forty eight strains of the four genotypes (accession numbers and country are specified) were included for comparison with PCV2 isolates detected in this study (in bold). Genotypes and subtypes are indicated with straight brackets. PCV1 isolate FJ475129 was included as outgroup. Uruguayan recombinant strains previously characterized by our research group are KC688418 and KC688419. Recombinant cluster is indicated (R). Bootstrap support values above 70% are shown.

with approximately 200.000 heads and has been characterized by the predominance of small-scale holdings with traditional forms of production. Pig meat is almost entirely destined for the internal market and the commercial activity is located mainly in the south of the country (Canelones, San José and Florida) (OPYPA, 2015). Since the end of the year 2010 and the beginning of 2011, PCV2-associated symptoms began to be frequently observed in pigs from different farms in Uruguay. The first report of molecular detection of PCV2 in the country was in pigs with EE during June of 2011 (Ramos et al., 2012). However in this work, we detected the circulation of PCV2 since the year 2010 (in samples from asymptomatic pigs) and the only genotype identified in this period was PCV2a (Figs. 1A and 4). Despite the differences in the number of tested animals, we observed percentages of PCV2 infection of 50% and 34% in 2010 and 2011, respectively (Fig. 1A). In 2011, a greater number of samples were collected throughout the year; most of them from pigs with PCV2-associated symptoms (Fig. 1A). In this period, recombinant strains within ORF1 were identified and characterized for the first time in the country and in the region (Ramos et al., 2013). In fact, in this study, we observed a high circulation of recombinant strains (82% of characterized samples) during 2011 and we also detected, to a lesser extent, the circulation of PCV2b isolates (Fig. 4).

The PCV2 vaccination was not a common practice in Uruguay until the detection of the virus in 2011, which resulted in a gradual initiation of vaccination campaigns especially in large farms. Subsequently in 2012, a few samples were obtained and the percentage of positive samples by nested PCR decreased (Fig. 1A), which may be the result of an effective plan of vaccination. However, in 2013 the number of samples obtained and the percentage of PCV2 infection increased dramatically (Fig. 1A). Although 26 samples were obtained from slaughterhouses (Fig. 1A), the highest percentage of positive samples in 2013 came from pigs with PCV2-associated symptoms (data not shown). Interestingly, in that year we had identified the emergence of the PCV2d genotype in pigs for the first time in Uruguay (Ramos et al., 2015). Additionally, the results of this work showed that in this period all PCV2 genotypes, except PCV2c, were identified and the recombinant strains were still detected as it was in 2011 and 2012. Indeed, we observed a clear co-circulation of PCV2d and recombinant strains (Fig. 4).

The circulation of PCV2d in Uruguay since 2013 probably reflected the global scenario of the shift from PCV2b to mPCV2b or PCV2d (Guo et al., 2012; Opriessnig et al., 2013; Salgado et al., 2014; Seo et al., 2014; Eddicks et al., 2015; Xiao et al., 2015). Furthermore, the outbreaks of PCV2d were associated with episodes of vaccine failure (Opriessnig et al., 2013; Seo et al., 2014). In fact, symptomatic cases were observed in vaccinated animals from Uruguay during this period and this could explain the increase, despite vaccination, in the reception of samples from pigs with PCV2-associated symptoms and the emergence of this genotype. However, this scenario could be also explained by the high prevalence of PCV2d worldwide and their rapid spread linked to livestock movements and trade routes (Xiao et al., 2015), especially in countries in which improper vaccination practices are carried out. Indeed, in Uruguay, PCV2 vaccination may have not been maintained over time, particularly in small farms thus contributing to the rapid dissemination of this emerging strain.

On the other hand, as occurred in 2012, in 2014 the number of samples collected decreased and the percentage of positive samples was also very low (Fig. 1A). This reflects a different scenario than in 2010,

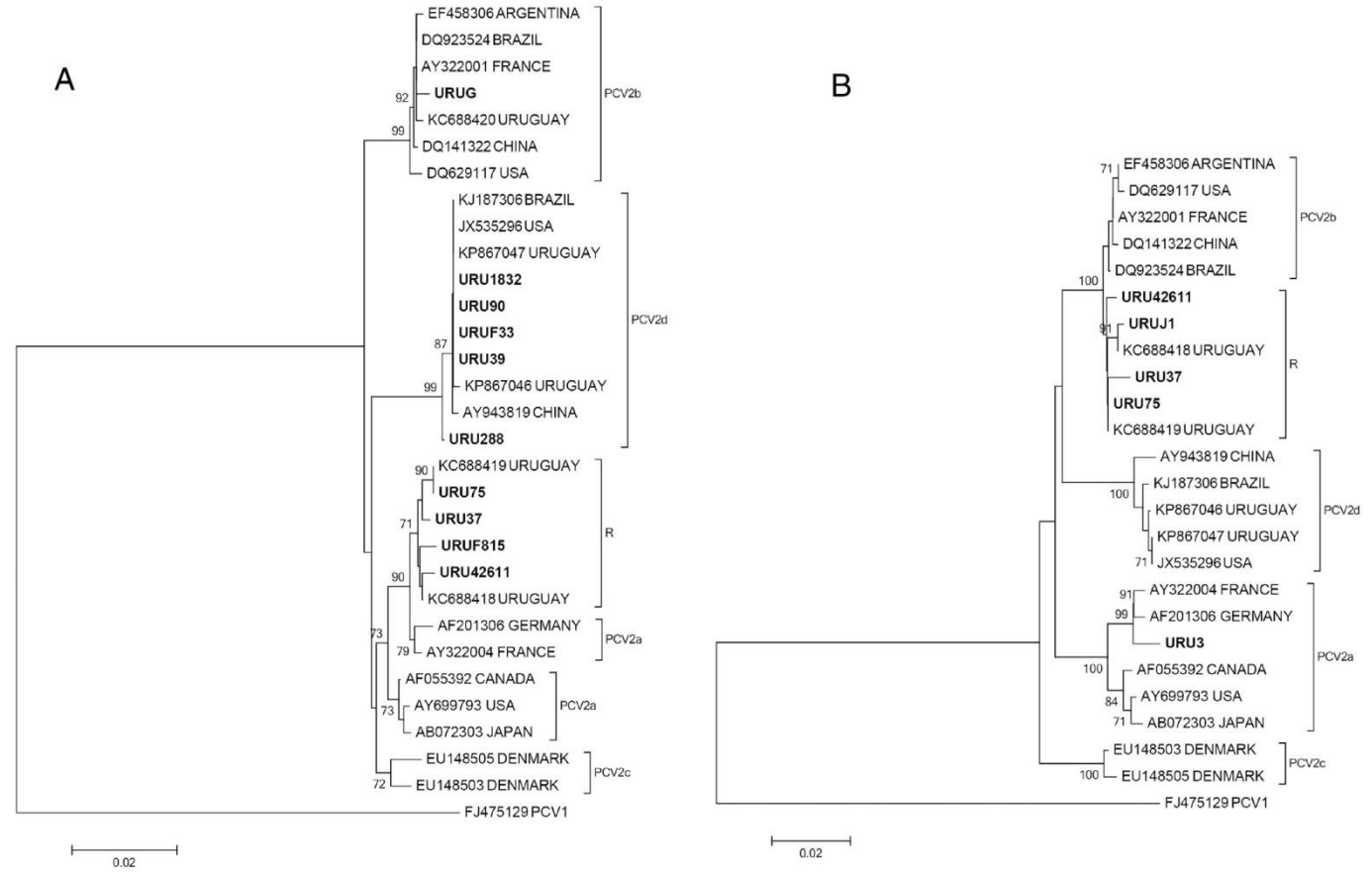


Fig. 3. Phylogenetic analysis performed with partial genome regions. Phylogenetic reconstruction of Uruguayan PCV2 isolates (indicated in bold) based on ORF1 gene (A) and the fragment ORF1/2 (B). Genotypes are indicated with straight brackets. PCV1 isolate FJ475129 was included as outgroup. Uruguayan recombinant strains previously characterized are KC688418 and KC688419. Recombinant cluster is indicated (R). Bootstrap support values above 70% are shown.

when despite the small number of tested samples, the percentage of positives cases was very high. Probably, the difference lies in that in 2010 PCV2 had not been identified as a sanitary problem for Uruguayan farms, together with a lack of knowledge about the disease and the absence of vaccination practices, while in 2014, after the increase of sanitary problems during 2013, the emergence of the disease was mitigated by successful animal health policies, better knowledge of the disease and the re-implementation of immunization practices. Additionally, despite the low number of tested samples and strains identified in 2014, the one single characterized isolate, resulted to be closely related with PCV2d strains (Fig. 4). Further investigation, including analysis of genetic variability of strains identified after 2014 is required to determine whether a shift from recombinant strains to PCV2d has occurred.

In spite of the high circulation of PCV2d genotype since 2013, the structure of PCV2 population in Uruguay during the period analysed in this study was characterized by the clear predominance of recombinant strains, which is not consistent with reports from European, South American and Asian countries, where several authors recognized a PCV2b as the main circulating genotype (Noriega et al., 2007; Ciacci-Zanella et al., 2009; Henriques et al., 2011; Pereda et al., 2011; Rincón Monroy et al., 2014; Franzo et al., 2015c; Li et al., 2016). Moreover, the sustained predominance of recombinant strains circulation and their widespread geographic distribution observed in this work (Table 2), are

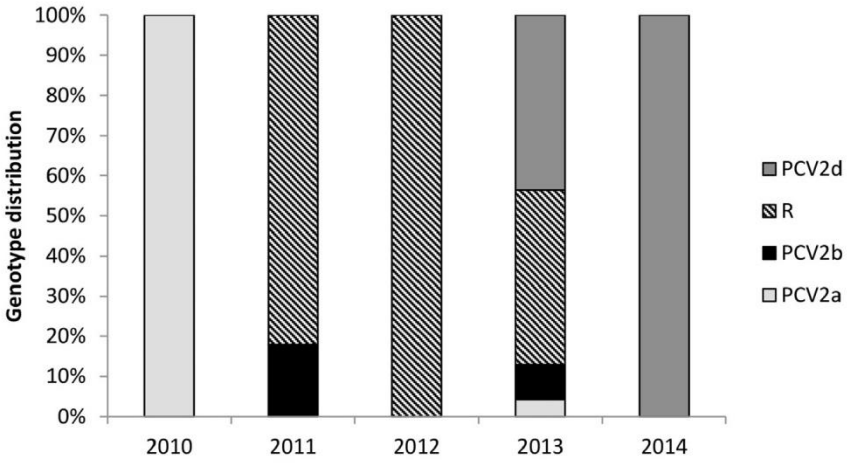


Fig. 4. Distribution of PCV2 genotypes in pigs during the 2010–2014 period. Frequency of detection (%) of different PCV2 genotypes in each year is shown in bars. R, recombinant strains.

inconsistent with others results that showed circulation of recombinant strains in limited geographic areas during relatively short timeframes (Franzo et al., 2015c). Nevertheless, a recent work suggested that recombinant forms display comparable population dynamics to those of major genotypes, being able to compete and potentially displace parental ones (Franzo et al., 2016). However, until now, PCV2 epidemiological studies from different countries have not revealed the predominance of a recombinant circulating form. Probably, some recombinant sequences have not been identified or misclassified affecting the interpretation of the results, due to the fact that, nowadays, a classification approach based on the ORF2 gene is preferred and PCV2 recombination within ORF1 are the most frequents events (Olvera et al., 2007; Franzo et al., 2015a). In fact, PCV2 complete genome sequencing is laborious, time-consuming and expensive (Franzo et al., 2015a). Precisely, only 50% of swine strains detected in this work could be characterized and it was not possible to sequence both complete genes in 11 out of 30 isolates. However, these cases could be characterized because the complete or partial ORF1 gene could be sequenced and analysed. Indeed, the identification of recombination event within ORF1 in PCV2 Uruguayan isolates makes this gene a required epidemiological marker for the virus in the country and the classification based only in ORF2 gene may not be accurate in this context.

Individual analysis of each recombinant strain in RDP software showed that all recombination events occurred between PCV2b-1A and PCV2a-2D, as the major and minor parents, respectively. However, the presence of different potential parental sequences selected from the dataset was observed, identifying three groups of recombinant sequences (Supplementary material). Even though most of recombinant strains identified presented evidence of the same recombination event than the previously characterized strain KC688418 (Ramos et al., 2013), the existence of multiple independent recombination events may not be entirely ruled out. Nevertheless, a strongly supported monophyletic recombinant cluster (Fig. 2) and the high evolution rate of PCV2 (Firth et al., 2009) suggest that a single event of recombination could have occurred, followed by several accumulating mutations. Interestingly, unlike the isolates from genotypes PCV2b, PCV2a and PCV2d identified in this study, the Uruguayan recombinant strains showed several mutations within ORF1. Moreover, some of them corresponded to non-synonymous changes (data not shown). This sharply contrasts with the commonly accepted opinion that ORF1 is a highly conserved gene (Olvera et al., 2007) and apparently, in this case the variability observed in this gene did not affect the fitness of the virus. From a biological point of view this phenomenon needs additional *in vitro* studies.

In parallel, the circulation of PCV2 was also studied in wild boar population during the years 2011–2014 from hunting areas located in the east and southeast of Uruguay. A frequency of infection of 24.8% was observed, which is in agreement with those observed in European countries (Knell et al., 2005; Cságola et al., 2006).

In comparison with domestic pigs and despite the variation in the number of tested samples per year, no drastic changes were observed in the frequencies of PCV2 infection in wild animals during the period analysed (Fig. 1B), probably due to the inexistence of selective pressures and/or active animal health policies in wild boar population. This support the hypothesis that the fluctuation observed in the percentage of positive samples of domestic pigs possibly arise from differences in the implementation of immunization practices and control strategies in the period studied. Additionally, the characterization of isolates detected in wild boars was less efficient than in domestic pigs since only two strains could be analysed, URUJ1 and URJ2. Probably, improper preservation and condition of samples during long hunting sessions could have impeded a better characterization. URUJ1 resulted to be very closely related (99.9% of nucleotide identity) with the recombinant strain KC688418 detected in domestic pig (Ramos et al., 2013). However, the ORF1 complete sequence is required to confirm that URUJ1 is a recombinant isolate (Table 2). On the other hand, URUJ2 belonged to PCV2b, a genotype which also circulated in domestic pigs in the same period of time. In particular, URUJ2 resulted to be selected by the RDP software as the major parental sequence for the most of Uruguayan recombinant strains (Supplementary material). In fact, an autochthonous origin of the recombinant strains should not be ruled out, since the circulation of both parental lineages was observed in the country. Indeed, ORF2 sequences of KC688418 and URUJ2 were identical at the nucleotide and amino acid level (data not shown). In the case of the minor parent, the sequences AY322004 (France) or AF109399 (Canada) selected from the dataset resulted to be very closely related with URU8, a strain isolated prior to the identification of recombinant strains (Supplementary material; Fig. 2 and Table 2). However, the exact parental sequences remain unidentified, especially the minor parent, and the results obtained in this work are a plausible approximation to the real scenario.

The fact that similar PCV2 isolates circulate in wild boars and domestic pigs, may suggest an epidemiological role of wild boars in the transmission of PCV2 which is in agreement with the speculation of others authors about the potential of wild boars as natural reservoir of the disease for domestic population (Cságola et al., 2006; Castro et al., 2012; Franzo et al., 2015b). In fact, in our country, wild boar population undergoes rapid expansion and is genetically characterized by the existence of European and Asian wild boar lineages with introgressive hybridization events with domestic pigs (García et al., 2011). This suggests a frequent contact between swine and free living animals which promotes viral spread.

On the other hand, according to García et al., 2011 after the first introduction of European wild boar in Uruguay, a second introduction occurred in the border between our country and the Brazilian state Rio Grande do Sul. Therefore, the land border with Brazil and the free movement of wild boar populations could result in a route of entry of the virus into the country. In addition and as mentioned, others routes of viral entry could be the porcine livestock trade between countries. Since 2007, Uruguay has imported animals or semen from Brazil, Spain and Netherlands, nevertheless, our capacity to determine the potential source of infection of each case is very limited by the absence of information about the origin of breeding pigs or semen of the different herds studied.

International trade is the main factor that leads to an increase of risk of pathogen emergence (Cortey et al., 2012) and probably it could explained, together with the intrinsic PCV2 evolution processes, the extensive genetic variability observed in our country. Additional epidemiological studies, including a retrospective analysis of the virus circulation before 2010 and the continuous surveillance of viral epidemiology are needed to better understand the population dynamic of PCV2 in Uruguay.

5. Conclusion

PCV2 exhibits an extremely high genetic heterogeneity among domestic swine isolates.

Findings revealed the circulation of all described PCV2 genotypes, excepting PCV2c, and, more importantly, a clear predominance of recombinant strains. This evidences for the first time in the field that PCV2 recombination can lead to the emergence of highly adapted strains. Additionally, the high frequency of PCV2 infection in wild boars suggests that wild animals could serve as permanent reservoir of the disease, increasing the genetic burden in the nature.

On the other hand, fluctuations in the percentage of positive domestic pig samples highlight the instability of vaccination practices and severe deficiencies of biosecurity strategies implemented in Uruguay for the control of PCV2 infection.

Results showed that the epidemiological scenario of PCV2 in Uruguay reflects the two switching events that have been described for the virus in regard of the predominant strains worldwide. In this case, however, recombinant sequences were the more frequently detected,

instead of PCV2b isolates, as was reported elsewhere. Analyses presented here is a likely approximation to the real scenario of PCV2 population dynamics in Uruguay, characterized by a recent multi-step introduction of PCV2, with a rapid viral spread.

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.09.058.

Funding

Part of this work was supported by ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación) (FCE_2_2011_1_6731).

Declaration of conflict of interest

None.

Acknowledgments

Authors are grateful to Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) and Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC).

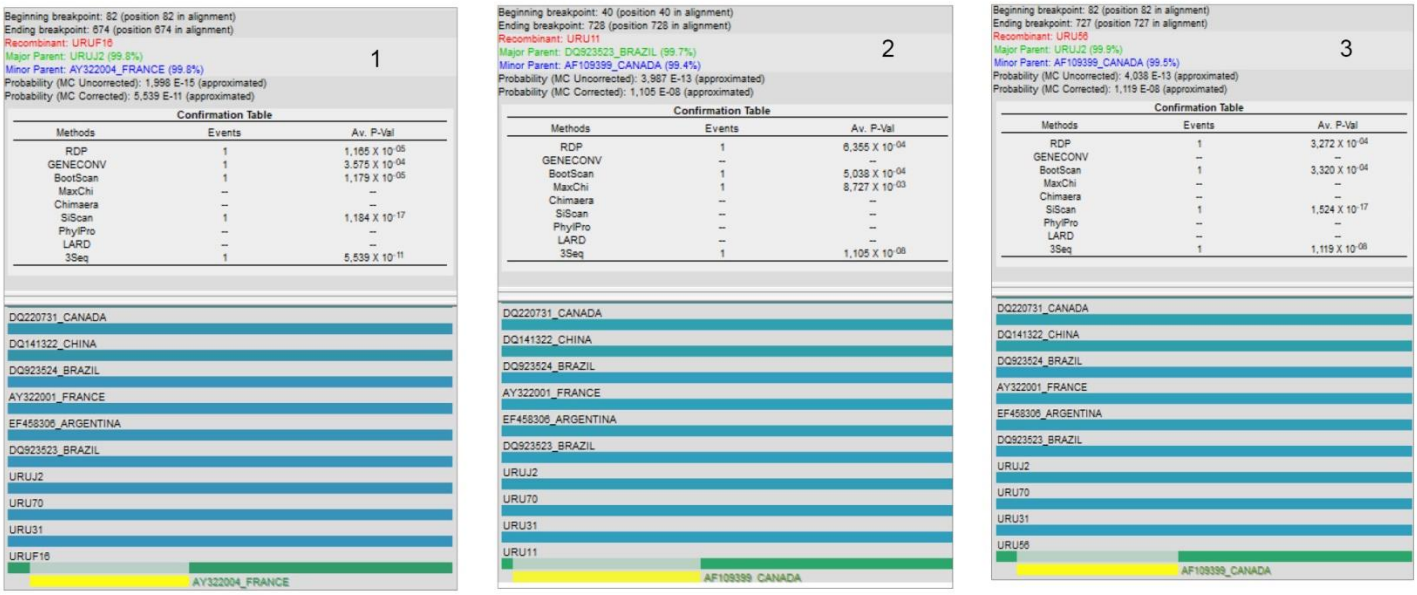
References

Allan, G., Ellis, J., 2000. Porcine circoviruses: a review. J. Vet. Diagn. Investig. 12, 3–14.
Barbosa, C.N., Martins, N.R., Freitas, T.R., Lobato, Z.I., 2014. Serological survey of porcine circovirus-2 in captive wild boars (*Sus scrofa*) from registered farms of South and South-east Regions of Brazil. Transbound. Emerg. Dis. 63, e278–e280.
Castro, A.M.M.G., Castro Jr., F.G., Budiño, F.E.L., Baldin, C.M., Silva, S.O.S., Brandao, P.E., Richtzenhain, L.J., 2012. Detection of genetic characterization of porcine circovirus 2 (PCV2) in Brazilian wildlife boars. Braz. J. Microbiol. 43, 1022–1025.
Chae, C., 2012. Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: efficacy and clinical application. Vet. J. 194, 151–157.
Ciacci-Zanella, J.R.C., Simon, N.L., Pinto, L.S., Viancelli, A., Fernandes, L.T., Hayashi, M., Dellagostin, O.A., Esteves, P.A., 2009. Detection of porcine Circovirus type 2 (PCV2) variants PCV2-1 and PCV-2 in Brazilian pig population. Res. Vet. Sci. 87, 157–160.
Cortey, M., Pileri, E., Segalés, J., Kekarainen, T., 2012. Globalisation and global trade influence molecular viral population genetics of Torque Teno Sus Viruses 1 and 2 in pigs. Vet. Microbiol. 156, 81–87.
Cságola, A., Kecskemeti, S., Kardos, G., Kiss, I., Tuboly, T., 2006. Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boar. Arch. Virol. 151, 495–507.
Dupont, K., Nielsen, E.D., Baeko, P., Larsen, L.E., 2008. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. Vet. Microbiol. 128, 56–64.
Eddicks, M., Fux, R., Szikora, F., Eddicks, L., Majzoub-Altweck, M., Hermanns, W., Sutter, G., Palzer, A., Banholzer, E., Ritzmann, M., 2015. Detection of a new cluster of porcine circovirus type 2b strains in domestic pigs in Germany. Vet. Microbiol. 176, 337–343.
Firth, C., Charleston, M.A., Duffy, S., Shapiro, B., Holmes, E.C., 2009. Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: porcine circovirus 2. J. Virol. 83, 12813–12821.
Fort, M., Olvera, A., Sibila, M., Segalés, J., Mateu, E., 2007. Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS affected pigs. Vet. Microbiol. 125, 244–255.
Franzo, G., Cortey, M., de Castro, A.M., Piovezan, U., Szabo, M.P., Drigo, M., Segalés, J., Richtzenhain, L.J., 2015a. Genetic characterisation of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from feral pigs in the Brazilian Pantanal: an opportunity to reconstruct the history of PCV2 evolution. Vet. Microbiol. 178, 158–162.
Franzo, G., Cortey, M., Olvera, A., Novosel, D., Castro, A.M., Biagini, P., Segalés, J., Drigo, M., 2015b. Revisiting the taxonomical classification of Porcine Circovirus type 2 (PCV2): still a real challenge. Virol. J. 12, 131–138.
Franzo, G., Tucciarone, C.M., Dotto, G., Gigli, A., Ceglie, L., Drigo, M., 2015c. International trades, local spread and viral evolution: the case of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains heterogeneity in Italy. Infect. Genet. Evol. 32, 409–415.
Franzo, G., Cortey, M., Segalés, J., Hughes, J., Drigo, M., 2016. Phylodynamic analysis of porcine circovirus type 2 reveals global waves of emerging genotypes and the circulation of recombinant forms. Mol. Phylogenet. Evol. 100, 269–280.
García, G., Vergara, J., Lombardi, R., 2011. Genetic characterization and phylogeography of the wild boar *Sus scrofa* introduced into Uruguay. Genet. Mol. Biol. 34, 329–337.
Guo, L., Fu, Y., Wang, Y., Lu, Y., Wei, Y., Tang, Q., Fan, P., Liu, J., Zhang, L., Zhang, F., Huang, L., Liu, D., Li, S., Wu, H., Liu, C., 2012. A porcine circovirus type 2 (PCV2) mutant with 234 amino acids in capsid protein showed more virulence in vivo, compared with classical PCV2a/2b strain. PLoS One 7, e41463.
Henriques, A.M., Duarte, M., Fagulha, T., Ramos, F., Barros, S.C., Luís, T., Fevereiro, M., 2011. Molecular study of porcine circovirus type 2 circulating in Portugal. Infect. Genet. Evol. 11, 2162–2172.
Kim, J., Chae, C., 2004. Concurrent presence of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in retrospective cases of exudative epidermitis in pigs. Vet. J. 167, 104–106.
Kim, J., Han, D.U., Choi, C., Chae, C., 2001. Differentiation of Porcine Circovirus (PCV)-1 and PCV2-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. J. Virol. Methods 98, 25–31.
Knell, S., Willems, H., Hertrampf, B., Reiner, G., 2005. Comparative genetic characterization of Porcine Circovirus type 2 samples from German wild boar populations. Vet. Microbiol. 109, 169–177.
Li, L., Yuan, W., Guo, H., Ma, Z., Song, Q., Wang, X., Li, H., 2016. Prevalence and genetic variation of porcine circovirus type 2 in Hebei, China from 2004 to 2014. Gene 586, 222–227.
Lole, K.S., Bollinger, R.C., Paranjape, R.S., Gafkari, D., Kulkarni, S.S., Novak, N.G., Ingersoll, R., Sheppard, H.W., Rat, S.C., 1999. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. J. Virol. 73, 152–160.
Lv, Q.Z., Guo, K.K., Zhang, Y.M., 2014. Current understanding of genomic DNA of porcine circovirus type 2. Virus Genes 49, 1–10.
Martin, D.P., Lemey, P., Lott, M., Moulton, V., Posada, D., Lefeuvre, P., 2010. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. Bioinformatics 26, 2462–2463.
Noriega, J., Reyes, P., Bucarey, S., 2007. Circovirus porcino: un virus pequeño que genera un gran problema. Av. en Cienc. Vet. 22, 62–71.
Olvera, A., Cortey, M., Segalés, J., 2007. Molecular evolution of Porcine Circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. Virology 357, 175–185.
Opriessnig, T., Xiao, C.T., Gerber, P.F., Halbur, P.G., 2013. Emergence of a novel mutant PCV2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the U.S. concurrently infected with PPV2. Vet. Microbiol. 163, 177–183.
OPYPA. Oficina de Planificación y Política Agropecuaria del MGAP, Anuario, 2015. Análisis Sectorial y Cadenas Productivas en Uruguay.
Pereda, A., Piñeyro, P., Bratanich, A., Quiroga, M.A., Bucafusco, D., Craig, M.I., Cappuccio, J., Machuca, M., Rimondi, A., Dibárbora, M., Sanguinetti, H.R., Perfumo, J.C., 2011. Genetic characterization of porcine circovirus type 2 from pigs with porcine Circovirus associated diseases in Argentina. ISRN Vet. Sci. http://dx.doi.org/10.5402/2011/560905.
Ramos, N., Mirazo, S., Castro, G., Arbiza, J., 2012. Detection and molecular characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) from piglets with exudative epidermitis in Uruguay. Res. Vet. Sci. 93, 1042–1045.
Ramos, N., Mirazo, S., Castro, G., Arbiza, J., 2013. Molecular analysis of Porcine Circovirus Type 2 strains from Uruguay: evidence for natural occurring recombination. Infect. Genet. Evol. 19, 23–31.
Ramos, N., Mirazo, S., Castro, G., Arbiza, J., 2015. First identification of Porcine Circovirus Type 2b mutant in pigs from Uruguay. Infect. Genet. Evol. 33, 320–323.
Rincón Monroy, M.A., Ramirez-Nieto, G.C., Vera, V.J., Correa, J.J., Mogollón-Galvis, J.D., 2014. Detection and molecular characterization of porcine circovirus type 2 from piglets with porcine circovirus associated diseases in Colombia. Virol. J. 11, 143–153.
Ruiz-Fons, F., Vicente, J., Vidal, D., Höfle, U., Villanúa, D., Gauss, C., Segalés, J., Almería, S., Montoro, V., Gortázar, C., 2006. Seroprevalence of six reproductive pathogens in European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: the effect on wild boar female reproductive performance. Theriogenology 65, 731–743.
Ruiz-Fons, F., Segalés, J., Gortázar, C., 2008. A review of viral diseases of the European wild boar: effects of population dynamics and reservoir role. Vet. J. 176, 158–169.
Salgado, R.L., Vidigal, P.M., de Souza, L., Onofre, T.S., Gonzaga, N.F., Eller, M.R., Bressan, G.C., Fietto, J.L., Almeida, M.R., Silva Júnior, A., 2014. Identification of an emergent Porcine Circovirus-2 in vaccinated pigs from a Brazilian farm during a postweaning multisystemic wasting syndrome outbreak. Genome Announc. 2 (2), 20.
Segalés, J., 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. Virus Res. 164, 10–19.
Seo, H.W., Park, C., Kang, I., Choi, K., Jeong, J., Park, S.J., Chae, C., 2014. Genetic and antigenic characterization of a newly emerging porcine circovirus type 2b mutant first isolated in cases of vaccine failure in Korea. Arch. Virol. 159, 3107–3111.
Ssemadaali, M.A., Ilha, M., Ramamoorthy, S., 2015. Genetic diversity of porcine circovirus type 2 and implications for detection and control. Res. Vet. Sci. 103, 179–186.
Vicente, J., Segalés, J., Höfle, U., Balasch, M., Plana-Durán, J., Domingo, M., Gortázar, C., 2004. Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (Sus scrofa). Vet. Res. 35, 243–245.
Vlasakova, M., Jackova, A., Vilcek, S., 2011. Genetic typing of porcine circovirus type 2 (PCV-2) isolates from Slovakia. Res. Vet. Sci. 90, 168–173.
Wattrang, E., McNeilly, F., Allan, G.M., Greko, C., Fossum, C., Wallgren, P., 2002. Exudative epidermitis and porcine circovirus-2 infection in a Swedish SPF-herd. Vet. Microbiol. 2325, 1–13.
Xiao, C.T., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2015. Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d. J. Gen. Virol. 96, 1830–1841.

Supplementary Material.

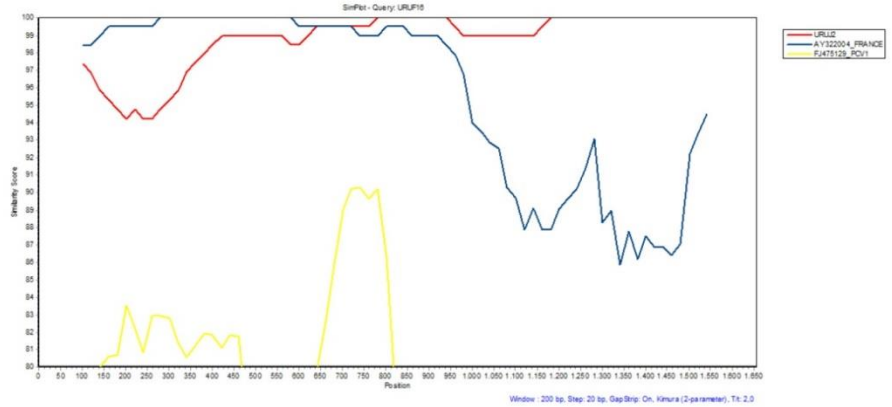
Recombination analysis performed with concatenated ORF1 and ORF2 genes of URUF16 (1), URU11 (2) and URU56 (3) as examples. A) RDP analysis showed putative breakpoints estimated and the potential parent sequences selected from the dataset. Only recombination events detected by more than one algorithm with a significance level lower than p-value < 0.01 were accepted. B) Similarity plot generated by SimPlot software using concatenated ORF1 and ORF2 genes of the query sequence (R) and representative parent sequences of genotypes PCV2b-1A (red) and PCV2a-2D (blue). A PCV1 isolate was used as outgroup (yellow).

A)

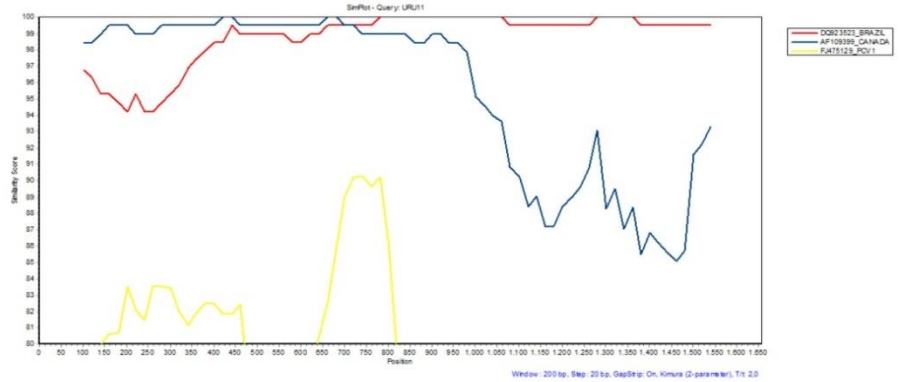


B)

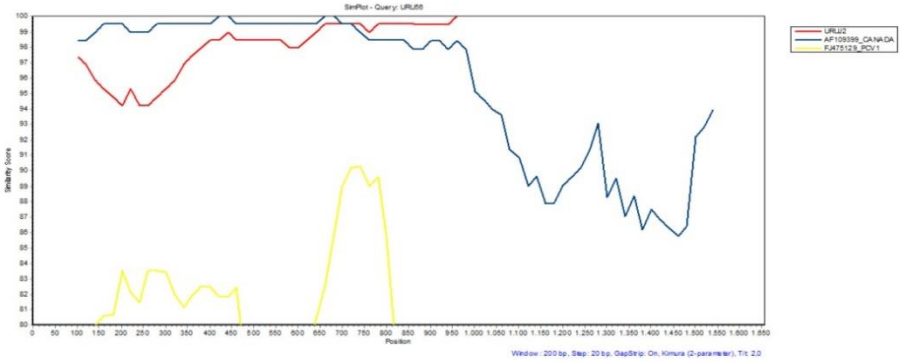
1


SimPlot - Query: URUF16
URU2
AY322004_FRANCE
FJ475129_PCV1
Similarity Score
Position
Window : 200 bp, Step: 20 bp, GapStrip: On, Kimura (2-parameter), T/t: 2.0

2


SimPlot - Query: URU11
DQ923523_BRAZIL
AF109399_CANADA
FJ475129_PCV1
Similarity Score
Position
Window : 200 bp, Step: 20 bp, GapStrip: On, Kimura (2-parameter), T/t: 2.0

3


SimPlot - Query: URU56
URU2
AF109399_CANADA
FJ475129_PCV1
Similarity Score
Position
Window : 200 bp, Step: 20 bp, GapStrip: On, Kimura (2-parameter), T/t: 2.0

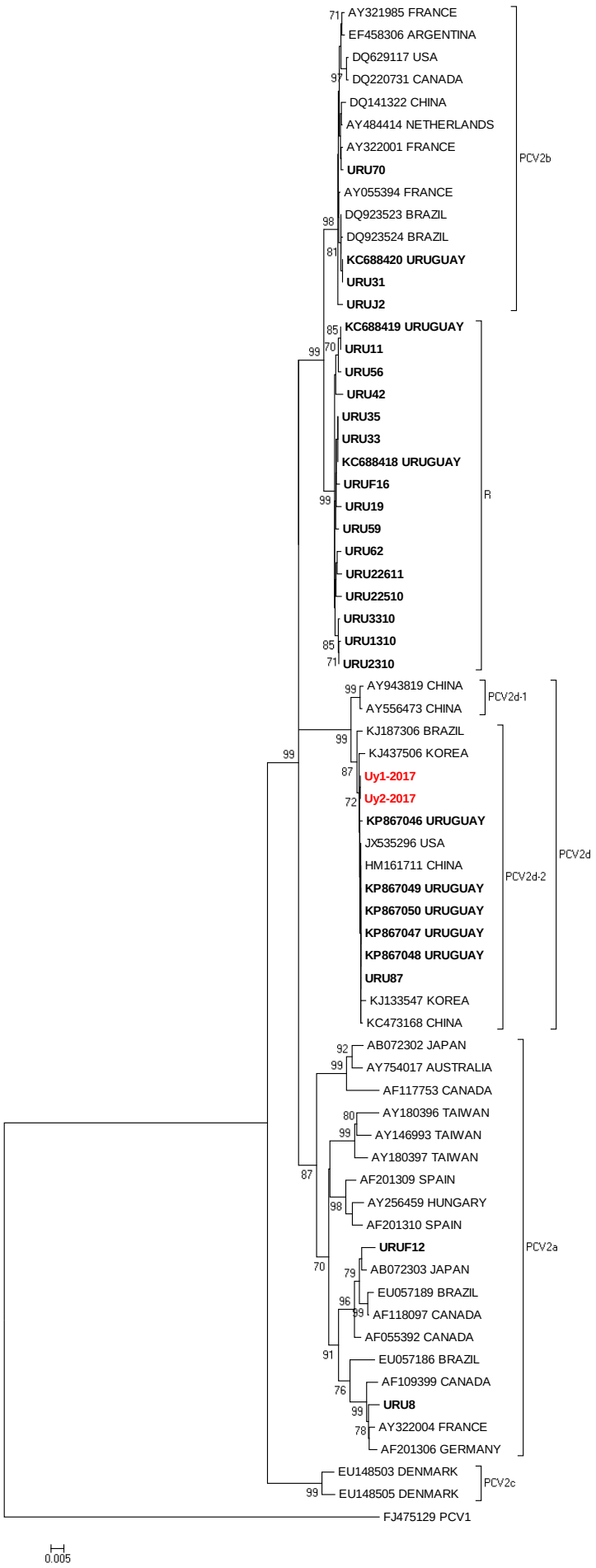


Fig.4.7.1.complementaria. Análisis filogenético realizado con genes concatenados de PCV2 incluyendo cepas Uruguayas del año 2017.

Árbol filogenético construido por el método de neighbor joining basado en la secuencia del gen *rep* y *cap* concatenados. Se incluyeron cepas de los 4 genotipos con su número de acceso al GenBank y país de origen. Los genotipos se indican con corchetes. Una cepa de PCV1 fue incluida como grupo externo del análisis. Las cepas Uruguayas descriptas en el artículo se indican en negro y las cepas detectadas en el año 2017 se muestran en rojo. El grupo de secuencias recombinantes Uruguayas se indican con la letra R. Se muestran valores de soporte de bootstrap superiores al 70%.

4.8. Anexo 1 capítulo 4. Detección molecular de PCV2 en pecarí (*Pecari tajacu*) en Uruguay

4.8.1. Introducción

Durante la ejecución de esta tesis también se evaluó la presencia de PCV2 en pecarí (especie *Pecari tajacu*), el cual es un mamífero ungulado emparentado con el cerdo y el jabalí, ya que pertenece al mismo orden, *Artiodáctilo*, pero a diferente familia, *Tayassuidae*. Se estima que en nuestro país el pecarí es un animal extinto desde finales del siglo XIX y principios del siglo XX, existiendo algunos ejemplares en los parques o reservas naturales. En el año 2017 se decidió reintroducirlo en su hábitat natural y 100 pecaríes fueron liberados en el Departamento de Río Negro (Montevideo Portal, 2017).

Se conoce sólo un reporte de detección molecular de PCV2 en pecarí que describe la presencia de ADN del virus en dos especies distintas (*Tayassu pecari* y *Pecari tajacu)* pertenecientes a dos estados Brasileros. Se observó una muy alta frecuencia de infección de PCV2 en estos animales, ya que el genoma del virus fue detectado en todas las muestras de órganos (pulmón y bazo) analizadas de la especie *Tayassu pecari* y en 9 de las 10 muestras obtenidas de *Pecari tajacu* (de Castro et al., 2014). Si bien en este trabajo se obtuvieron secuencias de PCV2 de 100 pb, la información no es mostrada en el artículo y no se encuentra disponible en la base de datos. Por otro lado, en otro trabajo también realizado en Brasil, se testearon 22 sueros de pecarí y no se encontró ADN de PCV2 en ningún caso (Ullmann et al., 2016).

4.8.2. Muestras y metodología

En este trabajo se analizaron 2 muestras de órgano (hígado) del año 2015 y 20 sueros del año 2016 de la especie *Pecari tajacu* del parque zoológico Lecocq, cedidas por la directora Carmen Leyzagoyen (Fig. 4.8.1). Las muestras se procesaron de acuerdo a lo establecido en el capítulo 4 y se utilizó el mismo sistema de detección molecular de PCV2 que el empleado en muestras de cerdo y jabalí. La secuenciación fue realizada por el Servicio de Secuenciación Macrogen, Korea. Para el análisis de la secuencia nucleotídica se utilizó el mismo procedimiento que en el capítulo 4 (ver sección 4.7).

4.8.3. Resultados y discusión.

Se amplificó por PCR anidada (Nested PCR, en inglés) el fragmento del gen *cap* de 225 pb esperado en 1 muestra de órgano y en 1 muestra de suero. Únicamente fue posible obtener la secuencia del fragmento amplificado a partir de la muestra de órgano. Efectivamente, se pudo comprobar mediante el uso de la herramienta BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) que se trataba de ADN de PCV2 y se la denominó Uy_PECARÍ. El análisis de matrices de identidad permitió observar que posee un porcentaje de identidad de secuencia más alto con cepas del genotipo PCV2b (99.4-100%). De hecho, el árbol filogenético mostró que la cepa identificada en pecarí agrupó dentro de este genotipo con un buen soporte estadístico (valor de bootstrap de 98%) (Fig.4.8.2).

Sólo hay disponible dos estudios basados en la detección molecular de PCV2 en pecarí y los dos provienen de Brasil. Aunque ambos analizan un número de muestras pequeño (entre 3 y 22), el primero sugiere que el virus es muy prevalente en los órganos de este animal mientras que el otro sostiene que difícilmente puede encontrarse ADN de PCV2 en el suero (de Castro et al., 2014; Ullmann et al., 2016).

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten evidenciar una vez más la presencia de ADN de PCV2 en pecarí, lo que sugiere que además del jabalí estos animales podrían actuar como potenciales reservorios de la enfermedad para el cerdo doméstico. A pesar de que el número de muestras incluido en este trabajo es muy bajo, se pudo detectar al virus en el 50% de las muestras de órgano y en el 5% de las muestras de suero analizadas, lo que concuerda con los datos obtenidos por estudios anteriores (de Castro et al., 2014; Ullmann et al., 2016). Sin embargo, sólo pudo obtenerse la secuencia de PCV2 a partir de la muestra de órgano. Como hecho destacado, en este trabajo se caracterizó a nivel genético por primera vez una cepa del virus identificada en pecarí y esta resultó ser del genotipo PCV2b. A su vez, si bien es un fragmento muy pequeño y una zona muy conservada dentro de este genotipo, resultó ser idéntica a las detectadas en cerdo doméstico y jabalí. Cabe resaltar, que si bien se intentó amplificar regiones más extensas del genoma viral de Uy_PECARí utilizando la metodología descrita en el capítulo 4 (sección 4.7), no pudo obtenerse más información de la secuencia. Sin embargo, el análisis del resto del genoma es necesario para confirmar la caracterización molecular de esta cepa y descartar potenciales eventos de recombinación. Al igual que lo

planteado para las muestras de jabalí, inconvenientes en la preservación de las muestras y/o bajas cargas virales, podrían ser la causa de una ineficiente caracterización genética. Por otro lado, también podría ser que los cebadores utilizados para amplificar el genoma completo de PCV2 a partir de muestras de cerdo doméstico y jabalí no sean los adecuados para obtener secuencias del virus en muestras de pecarí. En ese caso, sería interesante la utilización de técnicas de secuenciación masiva.

Por último, de acuerdo a lo reportado por Ullmann et al., (2016), la posibilidad de detectar ADN de PCV2 en muestras de suero de pecarí es mucho menor a la observada en órganos, por lo cual se sugiere que el virus difícilmente se transmita con eficiencia. De hecho, en las muestras de suero analizadas en este trabajo si bien se pudo amplificar un fragmento del tamaño esperado no se logró obtener la secuencia. De todas formas, debido a que se ha evidenciado una alta frecuencia de detección del virus en órgano de pecarí, el monitoreo del estatus sanitario de estos animales con respecto a la infección de PCV2 es de suma importancia para contribuir al control de una posible transmisión de la enfermedad al cerdo doméstico. Esto particularmente adquiere relevancia en nuestro país, ya que recientemente el pecarí se ha reintroducido en el Uruguay y la circulación en estos animales de virus emergentes de gran importancia para el sector porcino, significa una potencial amenaza para la salud animal.



Figura 4.8.1. Pecari (*Pecari tajacu)* del parque Lecocq. Imágenes cedidas por el Dr. Santiago Mirazo.



Figura 4.8.2. Análisis filogenético basado en un fragmento de 174 pb que corresponden al gen *cap*. Se incluyeron cepas de los 4 genotipos con su número de acceso al GenBank y país de origen. Los genotipos se indican con corchetes. Una cepa de PCV1 fue incluida como grupo externo del análisis. Se incluyeron cepas Uruguayas identificadas en cerdo y jabalí las cuales se indican en negro. Se seleccionaron algunas cepas representativas de cada genotipo circulante en Uruguay. La cepa identificada en pecarí se muestra en rojo. Se muestran valores de soporte de bootstrap superiores al 60%.

4.9. Anexo 2 capítulo 4. Identificación de deleción en el gen *rep* de una cepa de PCV2 detectada en jabalí

4.9.1. Introducción

Varios trabajos han reportado deleciones en el genoma de PCV2. En particular, se han identificados variantes con una deleción de base única y genomas completos de 1766 nt de longitud. Generalmente, estas deleciones se localizaron en regiones inter-génicas o en el gen *cap* (Guo et al., 2010; Yang et al., 2012). A su vez, también se han descubierto genomas truncos de 800-900 pb, pero la relevancia de estas cepas es todavía desconocida (Luo et al., 2013; Wen et al., 2012). En este trabajo se describe el hallazgo de una deleción de 2 bases (TT) en el gen *rep* en una cepa de PCV2 detectada en una muestra de jabalí.

4.9.2. Muestras y metodología

Se obtuvieron muestras de un caso aislado de caza de jabalí con fines deportivos en el Departamento de Rocha en el año 2011. Se trató de un animal hembra gestante. Se realizó la toma de muestras de hígado, riñón y corazón de la madre e hígado del feto y a su vez, muestras del cordón umbilical. Las muestras se procesaron de acuerdo a lo previamente establecido. Asimismo, el sistema de detección molecular y la caracterización genética fueron realizadas de acuerdo a lo establecido en el capítulo 4 (sección 4.7). El análisis de la secuencia aminoacídica fue realizado utilizando el programa BioEdit v. 7.0.5. La secuenciación fue realizada por el Servicio de Secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo.

4.9.3. Resultados y discusión

Mediante el sistema de detección molecular empleado se detectó ADN de PCV2 en el hígado y riñón de la madre, hígado del feto y cordón umbilical. Si bien la principal vía de transmisión del virus es la oro-nasal, la transmisión vertical de PCV2 ha sido extensamente estudiada en cerdo doméstico y ha sido detectado ADN viral en fetos en todas las etapas de gestación (revisado por Rose et al., 2012). Por lo tanto, estos resultados son una evidencia adicional de que la transmisión vertical ocurre frecuentemente y se sugiere que también es común en las poblaciones de jabalí.

En cuanto a la caracterización molecular de las cepas detectadas, únicamente se logró amplificar una región extensa del genoma viral (1000pb) de la cepa identificada en el riñón de

la madre, denominada Uy_J2011D. Esta región contiene secuencias parciales de los genes *rep* y *cap* e incluye la región inter-génica larga. Lamentablemente, no pudo obtenerse el genoma completo, debido a que algunos fragmentos del genoma no pudieron ser amplificados utilizando la técnica descrita en el capítulo 4 (sección 4.7).

Mediante el análisis filogenético basado en la región secuenciada se pudo observar que la cepa identificada en el jabalí agrupa dentro del *cluster* de cepas recombinantes Uruguayas (Fig.4.9.1). Particularmente, comparte un 99.5% con la cepa recombinante detectada en los casos de EE en el Departamento de Canelones (PCV2_Uy1), siendo una evidencia adicional de la extensa distribución de esta cepa en el país desde el año 2011. Sorprendentemente, al analizar detenidamente el alineamiento de las secuencias nucleotídicas se pudo evidenciar una deleción de 2 nt en la posición 701 y 702 del genoma viral, la cual corresponde a la posición 651 y 652 del gen *rep* (Fig.4.9.2). Por este motivo, la región se amplificó y secuenció nuevamente lo que permitió confirmar la mutación. Como se especificó anteriormente, la metodología utilizada para la caracterización genética de esta cepa no fue suficiente para obtener la secuencia completa del gen *rep*, lo cual es esencial para sacar conclusiones certeras sobre el efecto de esta deleción y por lo tanto, otros métodos de secuenciación serían necesarios. De todas formas, asumiendo que el principio del gen no posee ninguna otra mutación de este tipo, se analizó la secuencia aminoacídica de los 637 pb secuenciados del gen *rep* y se observó que esta deleción origina un codón *stop* que da como resultado una proteína trunca de 223 aa. Adicionalmente, al comparar la secuencia aminoacídica de Uy_J2011D con la de la cepa recombinante PCV2_Uy1 se observó que salvo dos cambios puntuales (posiciones 105 y 118) son 100% idénticas hasta el aa 216. Luego, el cambio en el marco de lectura originado por la deleción genera un péptido de 7aa (LWLAAVG) en el extremo C-terminal seguido de un codón *stop* (Fig.4.9.3). Cabe destacar que este péptido no está presente normalmente en la proteína *Rep* de PCV2.

Debido a que la deleción ocurre a la altura de la posición 700, los cuatro motivos conservados involucrados en el del mecanismo de RCR (R-I, R-II, R-III y p-loop), estarían presentes en la proteína *Rep* mutada. A su vez, esta mutación no produce un cambio en la otra proteína importante para la replicación, *Rep'*, debido a que la misma se origina a partir de un *splicing* alternativo del transcripto primario que empalma la posición 416 con la 800 (revisado por

Cheung, 2012). En trabajos basados en las proteínas *Rep* de PCV1, las cuales son muy similares a las de PCV2, se vio que estos 4 motivos y la presencia de ambas proteínas *Rep/Rep'* son indispensables para la replicación en cultivos celulares (revisado por Cheung, 2012), lo que indicaría que en principio la función de replicación de esta variedad mutante no estaría drásticamente alterada.

Por último, se profundizó en el análisis del péptido de 7aa localizado en el extremo C-terminal de la proteína *Rep* mutante y se buscó su homología con otros péptidos de la base de datos utilizando la herramienta BLASP del NCBI. Si bien no resultó ser homólogo a ningún dominio conservado conocido, se identificó que tiene un 100% de identidad aminoacídica con péptidos presentes en 250 organismos celulares de las cuales 228 proteínas son de origen bacteriano preferentemente del género *Streptomyces, Chlamydia*, *Yersina* y *Neisseira.* Las proteínas que contienen este péptido de 7 aa mostraron ser diversas, son ejemplos la policétido sintasa tipo I (sintetizan metabolitos secundarios con actividades biológicas y propiedades farmacológicas diversas), proteína de intercambio tiol-disulfuro (interactúa con proteínas plegadas incorrectamente para corregir los enlaces disulfuro no nativos), proteínas de la familia OmpA (presente en membrana externa de bacterias Gram-), entre otras. Si bien este péptido está presente en una gran variedad de proteínas de diferentes organismos, no se conoce una función asociada, lo cual no nos permite deducir su rol en el extremo C-terminal de la proteína mutante *Rep*, pero resulta interesante su estudio futuro.

En definitiva, esta descripción representa la primera identificación de una deleción en el gen *rep* de una cepa de campo de PCV2, generando una proteína más pequeña de 223 aa que según el análisis de secuencia no afectaría los motivos conservados esenciales para la replicación. La caracterización biológica de esta cepa sería de suma importancia para comprender más sobre la replicación de este virus.

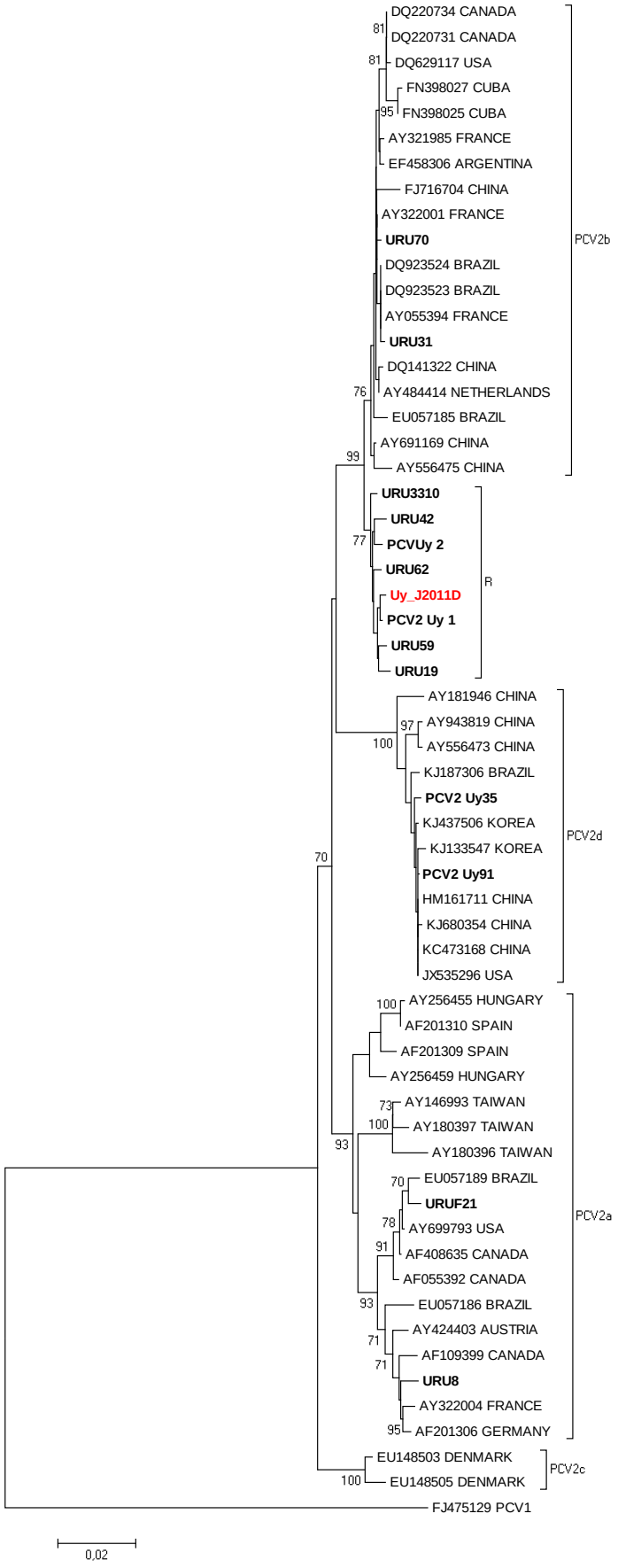


Figura 4.9.1. Análisis filogenético basado en un fragmento de 1000 pb del genoma de PCV2. Se incluyeron cepas de los 4 genotipos con su número de acceso al GenBank y país de origen. Los genotipos se indican con corchetes. Una cepa de PCV1 fue incluida como grupo externo del análisis. Se incluyeron cepas Uruguayas identificadas en cerdo y jabalí las cuales se indican en negro. Se seleccionaron algunas cepas representativas de cada genotipo circulante en Uruguay. La cepa identificada en este estudio se muestra en rojo. Se muestran valores de soporte de bootstrap superiores al 70%.



Figura 4.9.2. Alineamiento de secuencia nucleotídica de Uy_J2011D con PCV2_Uy1. Con la flecha se indica la deleción de 2 nt localizada en el gen *rep*. Las posiciones indicadas corresponden con la posición en el genoma.

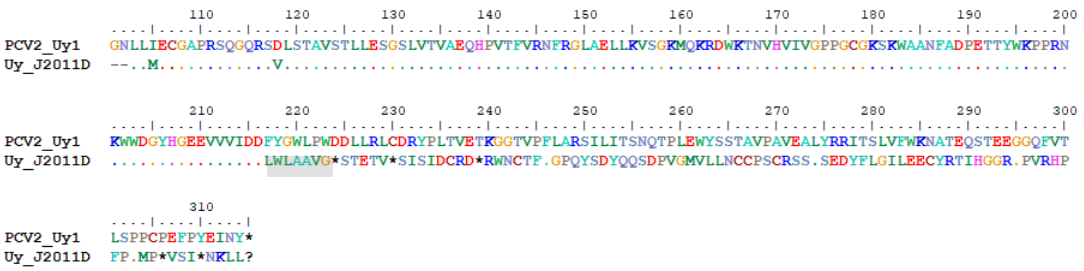


Figura 4.9.3. Análisis de la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia parcial del gen *rep* identificada en la muestra de jabalí. Se muestra el alineamiento de la secuencia de PCV2_Uy1 y Uy_J2011D. En gris se muestra péptido de 7aa en extremo C-terminal de Uy_J2011D. (*) codón *stop*.

4.10. Capítulo 5. Localización intracelular y función apoptótica *in vitro* de la proteína *ORF3* de una cepa PCV2d.

La identificación desde el año 2013 de la circulación en Uruguay de la cepa emergente a nivel mundial PCV2d (específicamente PCV2d-2), sumado a que se cree que es la cepa que predomina en cerdos del país en la actualidad (capítulos 3 y 4, ver secciones 4.6 y 4.7), este capítulo se centra en estudiar aspectos básicos de su biología en relación a cepas de los genotipos PCV2a y PCV2b. De hecho, si bien la vacunación ha reducido en parte el impacto de la infección en el país desde su identificación en 2011, aún se está muy lejos de poder controlarla en forma eficiente. Por lo tanto, avanzar en la comprensión de la biología de la cepa emergente PCV2d puede contribuir en un futuro a mejorar el diseño de estrategias de prevención y control de la enfermedad.

Como se ha detallado anteriormente, se ha reportado que PCV2d además de que ha aumentado rápidamente su prevalencia a nivel mundial, posee mayor virulencia *in vivo* comparado con las cepas clásicas PCV2a/PCV2b (Guo et al., 2012; Xiao et al., 2015). Asimismo, se ha demostrado que la proteína no estructural *ORF3* juega un papel principal en la apoptosis inducida por PCV2 y el estudio de su papel en la patogénesis viral se ha convertido en un tema de creciente interés (Liu et al., 2005; Liu et al., 2006). Por lo tanto, este capítulo de la tesis tuvo como objetivo investigar la proteína *ORF3* de la cepa PCV2d emergente, explorando su localización subcelular y la función apoptótica *in vitro* en comparación con las cepas clásicas.

Primeramente, el análisis de la secuencia aminoacídica de la *ORF3* de los tres genotipos, reveló la presencia de varios cambios en la *ORF3* del genotipo PCV2d en comparación con la proteína de las cepas de los genotipos PCV2a y PCV2b. Para evaluar el posible impacto de estos cambios en la localización y/o función de la proteína se clonó el gen ORF3 en un vector de expresión eucariota que contiene la proteína reportera fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés). Se obtuvieron vectores recombinantes para la *ORF3* de las cepas de los tres genotipos, los cuales fueron transfectados de manera independiente en líneas celulares generando una proteína de fusión con GFP. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que las tres proteínas *ORF3* de fusión con GFP se expresaron predominantemente en el citoplasma con un patrón de localización punteado y no se han observado diferencias en

la localización entre líneas celulares transformadas y no transformadas. Asimismo, no se encontraron diferencias significativas en la función apoptótica entre la proteína *ORF3* de la cepa PCV2d y las cepas clásicas. Por lo tanto, no está claro cuál es el efecto de los cambios aminoacídicos no conservativos observados en *ORF3*-PCV2d y asimismo, la relación de esta proteína con la patogenicidad de PCV2 todavía está bajo discusión.

Debido a que se ha sugerido que el gen ORF3 está bajo una fuerte selección positiva (Franzo et al., 2016a), los resultados obtenidos en este capítulo sugieren que los cambios observados en la proteína *ORF3* posiblemente son producto de la rápida evolución que ha demostrado tener PCV2 después de la introducción de vacunas comerciales y no necesariamente están relacionados a un aumento en la virulencia, sino a una forma que tiene el virus de evadir el sistema inmune del hospedero. Justamente, esta hipótesis es apoyada por varios reportes en los que se ha estudiado como la inmunidad inducida por la vacunación puede afectar a la evolución de PCV2 sobre todo a nivel de la cápside (Kekarainen et al., 2014; Franzo et al., 2016b).

Para la descripción de este capítulo a continuación se presenta un manuscrito que está siendo preparado para enviar a publicar en una revista arbitrada internacional.

ARTÍCULO V (en preparación)

Manuscript draft

Title

Sub-cellular localization and apoptotic function *in vitro* of eGFP-fused ORF3 protein of Porcine Circovirus Type 2d

Natalia Ramos[1]; Sabina Victoria[2]; Santiago Mirazo[1]; Mariela Bolatti[2] and Juan Arbiza[1].

1. Sección Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Iguá 4225, Montevideo, Uruguay. Postal Code 11400

2. Instituto Pasteur de Montevideo. Plataforma tecnológica Biología Celular. Mataojo 2020, Montevideo, Uruguay. Postal Code 11400.

Abstract

The non-structural protein ORF3 of Porcine Circovirus type 2 (PCV2) not shows similarities to any known protein. It is not essential for viral replication in culture cells but it plays a major role in virus-induced apoptosis. Since it is the only protein that differs in size and sequence between the non-pathogenic porcine circovirus type 1 (PCV1) and PCV2, the study of its role in PCV2 pathogenesis it has become a topic of growing interest. This work aims to investigate the ORF3 of the emerging and more virulent PCV2d strain, exploring its sub-cellular localization and *in vitro* apoptotic function comparing to classical strains PCV2a/b. Our results showed that all eGFP-fusion ORF3 proteins were expressed predominately into the cytoplasm with a punctate localization pattern. In addition, our findings suggested that nuclear localization of ORF3 is not necessary to induce apoptosis. Moreover, the induction of apoptosis in eGFP-ORF3 expressing cells is independent of the cell type (transformed and non-transformed cell lines). No significant differences in the apoptotic function between eGFP-fused ORF3 from PCV2d strain and classical strains were found. It remains unclear the importance of non-conservative changes observed in different positions of the ORF3-PCV2d. The relationship of this protein with pathogenicity of PCV2 is still under discussion.

Keywords: eGFP-PCV2-ORF3, PCV2d strain, cell transfection, subcellular localization, apoptosis

1. Introduction

Porcine Circovirus Type 2 (PCV2), a small non-enveloped virus classified into *Circoviridae* family, is an extensively distributed pathogen considered an important emerging virus related to several syndromes in pigs (Lv et al., 2014). PCV2 strains can be divided into five genotypes including PCV2a, PCV2b, PCV2c, PCV2d and the recently identified genotype, PCV2e. PCV2a, PCV2b and PCV2d have a worldwide distribution (with a predominance of PCV2d circulation) (Franzo et al., 2015a), while PCV2c and PCV2e have a very low prevalence. PCV2c was reported from Denmark in the 1980s (Dupont et al., 2008) and has recently been identified in the Brazilian Pantanal (Franzo et al., 2015b). PCV2e has been identified in Mexico, USA and China in samples collected between 2006-2017 (Davies et al., 2016; Xiao et al., 2016; Liu et al., 2018).

PCV2 genome consists in a single-strand ambisense circular DNA ranging from 1766 to 1777 nucleotides (nt) with three major open reading frames (ORFs): ORF1 (*rep* gene), ORF2 (*cap* gene) and ORF3 (Lv et al., 2014).

The ORF3 gene completely overlaps the ORF1 gene and is oriented in the opposite direction (genome position, 671-357 nt). The non-structural 11.9 kDa protein encodes by ORF3 gene is not essential for PCV2 replication in cultured PK-15 cells and does not show similarities to any known protein. However, it plays a major role in virus-induced apoptosis (Liu et al., 2005). This protein binds to the porcine homologue of Pirh2 (pPirh2) which regulates the ubiquitination of p53, leading to the decrease of cellular pPirh2 levels (Liu et al., 2007). In turn, amino acids 20 to 65 of the ORF3 protein competes with p53 in binding to pPirh2, contributing to the deregulation of p53 and the increase of its levels in PCV2-infected cells (Karuppannan et al., 2010). In addition, it has been shown that ORF3 initially localizes in the cytoplasm (dot distribution) and gradually moves to the nucleus of infected cells (Gu et al., 2016). Moreover, amino acid residues in the C-terminal of the protein are involved in its nuclear localization (Lin et al., 2011). On the other hand, ORF3 is the only protein that differs in size and sequence between non-pathogenic porcine circovirus type 1 (PCV1) and PCV2, which makes it an interesting research issue for the study of viral pathogenesis (Mankertz, 2012). Indeed, it has been reported that the abrogation of ORF3 expression attenuates viral pathogenesis in BALB / C mice and SPF (specific pathogen free) piglets (Liu et al., 2006; Karuppannan et al., 2009). In addition, the proapoptotic function of this protein plays a role in the systemic dissemination of the PCV2 infection, inducing an early release of the virus from the infected cell (Karuppannan and Kwang, 2011). This led to the hypothesis that if ORF3 is a determinant of virulence of PCV2 via its apoptotic capability, PCV1-ORF3 lacks the ability to induce cell death throw the apoptotic pathway. However, it has been observed that the expression of ORF3 of PCV1 produces more apoptosis than the ORF3 of PCV2 in different cell lines. Moreover, no changes

have been found between PCV2 strains with differences in virulence (ORF3-PCV2a and ORF3-PCV2b) (Chaiyakul et al., 2010).

The emergence of a mutant PCV2b, denominated PCV2d, has been linked to cases of suspected vaccine failure (Opriessnig et al., 2013; Seo et al., 2014). In recent years, the prevalence of PCV2d has been increasing worldwide (Xiao et al., 2015; Franzo et al., 2015a; Kwon et al., 2017). Interestingly, this emerging strain showed to have more virulence *in vivo* compared with classical PCV2a/b strains (Guo et al., 2012).

This work aims to investigate the ORF3 of a PCV2d strain, exploring its amino acid sequence, sub-cellular localization and *in vitro* apoptotic function comparing to classical strains PCV2a/b, in order to deepen our understanding about this protein and its likely pathogenic role.

2. Materials and methods

2.1. Cells and viruses strains

The carcinomic human alveolar basal epithelial lung A549 and swine testicular (ST) cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium nutrient mixture F12 (Gibco by Thermo Fisher Scientific, USA) and Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Capricorn Scientific, Germany), respectively, with stable glutamine, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100U/mL of Penicillin G and 100 µl/mL streptomycin at 37ºC in humidified 5% CO_2 incubator.

The PCV2 strains Uy1, URU31 and URU91 (accession numbers KC688418, MF616414 and KP867047, respectively) detected and characterized in our previous works (Ramos et al., 2013; Ramos et al., 2017) were used to obtain the ORF3 sequence from the different genotypes (Uy1 for PCV2a; URU31 for PCV2b and URU91 for PCV2d). Genomic DNA extracted from 200 µL of serum or 25mg of tissue as described (Ramos et al., 2017), were used as the PCR template for ORF3 amplification.

2.2. ORF3 sequence analysis

The ORF3 amino acid (aa) sequence of PCV2a, PCV2b and PCV2d strains were aligned and analysed using MEGA v.5.0 software. In the case of differences between genotypes, the properties of each amino acid were compared using the Amino Acid Explorer of the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

2.3. Generation of recombinant eukaryotic expression vectors

The following primers, designed specifically for this study and containing *XhoI* and *BamHI* restriction sites were used for the amplification of the full length ORF3 gene of PCV2a, PCV2b and PCV2d strains: eGFP-ORF3F 5'-TACTCAGATCTCGAGATGGTAACCATCCCACCACTT-3' and eGFP-ORF3R 5'-GGTGGATCCCGGGCCCGCGGTATGCAGTAAAGAAGGCAAC-3'.

PCR was performed in 50 µL reaction volume containing 1X PCR buffer, 2 mM MgCl2, 0,5 µM each primer, 0,2 mM of each dNTP and 1,5 U Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, USA) and 10 µL of DNA. Cycling conditions were: 94 º C for 5 min, followed by 37 cycles of 30s at 94ºC, 45s at 50ºC and 45s at 72ºC and a final extension cycle of 10 min at 72ºC. PCR products of the expected size were purified using a commercial kit (Zymoclean ™ Gel DNA recovery kit, USA). The purified PCR products of ORF3 genes of PCV2a, PCV2b and PCV2d strains were cloned into pEGFP-C3 (Clontech, USA) expression vector using *XhoI* and *BamHI* restriction enzymes (Thermo Fisher Scientific, USA), generating N-terminal enhanced green fluorescent protein (eGFP)-ORF3 fusion proteins under the control of a human cytomegalovirus promoter. Each DNA insert ligation into pEGFP-C3 was performed using a T4 DNA ligase (Thermo Fisher Scientific, USA) according to manufacturer's instructions. Ligation

products (2µL) were used to transform competent DH5-alpha *Escherichia coli* (New England, BioLabs, USA). High-quality and purified DNA plasmids were obtained using a commercial kit (Zyppy™ Plasmid Miniprep kit, USA). ORF3 sequences were verified by sequencing in both directions by Macrogen automatic sequencing service, Korea.

The coding sequence of the ORF2 of the Uy1 strain (702 bp) was also cloned into pEGFP-C3 by the same approach to that used for the ORF3 genes. The primers used for ORF2 PCR amplification were: eGFP-ORF2F 5'-TACTCAGATCTCGAGATGACGTATCCAAGGAGGCG-3' and eGFP-ORF2R 5'-GGTGGATCCCGGGCCCGCGGTATTAAGGGTTAAGTGGGGGG-3'.

2.4. Transient transfection

The A549 or ST cells were seeded in 6-well culture plates. When cells reached 70 to 80% confluent, 2.5 µg of DNA of eGFP alone (empty vector control), eGFP-ORF3/2a, eGFP-ORF3/2b, eGFP-ORF3/2d and eGFP-ORF2 (used as control to compare the subcellular localization among PCV2-viral proteins of different size cloned in the same expression vector), were separately transfected into the cells with 5µL of Lipofectamine ® LTX with Plus™ Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA) as described in the manufacturer's protocol. After 24 and 48 h post-transfection, the cells were fixed with methanol and then were incubated with DAPI (2.4-diamidino-2-phenylindole) (Sigma, USA) for 15 min at 37°C. The cells were observed and analysed in an Olympus IX81 Epifluorescence microscopy and Leica DMI6000 TCS SP5 confocal laser scanning microscopy (Institut Pasteur Montevideo microscopy service).

2.5. RT-PCR and western blot analysis

Total RNA was extracted from transfected cells by using Trizol ™ reagent (Thermo Fisher Scientific, USA) for reverse transcription-PCR (RT-PCR) of the ORF3. RNA samples were incubated with DNase I for 60 min at 37 ºC to remove any contaminating viral DNA. The primers used for ORF3 amplification were: ORF3F 5'-ATGGTAACCATCCC-3' and ORF3R 5'-TTACTKATDGARTGTGGAGC-3'.

Cells transfected with different plasmid were collected and lysed in lysis buffer containing PBS 1% v / v Triton X-100 and 1X proteases inhibitor (abcam, USA) on ice. Then the cell lysates were mixed with sample loading buffer and boiled for 5 min. The proteins were separated by 15% dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gel and transferred onto nitrocellulose membranes (pore size 0.22µm, BioRad, USA). The membrane was blocked with PBS containing 1% of bovine serum albumin (BSA) (blocking buffer) and then incubated with anti-GFP antibody (1:800) in blocking buffer for 1 h at room temperature. After washing three times, the membrane was incubated with HRP-conjugated anti mouse IgG secondary antibody (1:1000) for 1h at room temperature. The proteins were visualized with Super Signal West Pico

chemiluminescent substrate (Thermo Fisher Scientific, USA) and image was captured on a chemiluminescent imaging system.

The expression of ORF2 gene was confirmed by indirect immunofluorescence assay (IFA). IFA was performed using an anti-PCV2 capsid polyclonal antibody (abcam, USA) and an Alexa Fluor 555-conjugated anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific, USA).

2.6. Phosphatidylserine (PS) externalization detection assay

Both, detached and adherent cells were collected in tubes kept on ice and then centrifuged at 260g for 5 min. The supernatants were discarded and cells were resuspended in annexin V-binding buffer (10mM HEPES, 140mM NaCl and 2.5mM $CaCl_2$) at 1 x 10^6 cells/mL. Each sample was stained with 1.5 µL of Alexa Fluor 647 annexin V conjugate (Thermo Fisher Scientific, USA) for 15 min at room temperature in the dark. Subsequently, 300 µL of annexin V-binding buffer was added to each tube and samples were analysed by flow cytometry (BD Accuri™ C6 Biosciences, USA and Accuri C6 software). Propidium iodide (PI) working solution (250 µg/mL) was added before acquiring. Staurosporine (25µM) was used as a positive control in this assay. For the analysis of the percentage of apoptotic cells, 10.000 GFP positive events gated on FL1 vs FSC dot plot were recorded for each condition. Three independent trials were conducted for each experiment. Each independent trial was performed with three technical replicates of each condition.

2.7. Statistical analysis.

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism v.6 software.One-way analysis of variance (ANOVA) and Turkey's multiple comparison tests were performed when assumptions of normality and equal variance were met; otherwise, a nonparametric, Kruskal-Wallis pairwaise multiple-comparison (Dunn's) test was conducted . P Values < 0.05 were accepted as significant.

3. Results and discussion

3.1. ORF3 sequence analysis

In order to compare the ORF3 amino acid sequence of the emergent strain PCV2d with the ORF3 from classical strains PCV2a/b, an alignment among the ORF3 proteins was conducted which is shown in figure 1. The amino acid sequence analysis revealed that PCV2d strain presents amino acid changes in positions 29, 41, 89, 102 and 103 compared to the PCV2a and PCV2b strains and all of them are non-conservative substitutions (the side chain vary in size and belong to different physicochemical groups). These differential properties may lead to modifications in the forces of attraction between amino acids and their surrounding environment and as a result, differences in protein structure that could derive in a change of function. The differences in the characteristics between the amino acids in each position are summarized in table 1. Surprisingly, the non-conservative changes observed in PCV2d in amino acids 29 and 41 are found within the binding domain of pPirh2 (amino acids 20 to 65 of ORF3), which is directly related to the apoptotic function of the protein (Karuppannan et al., 2010). Moreover, the position 41 is located within an immunodominant T lymphocyte epitope region (aa 31-50 of ORF3) (Stevenson et al., 2007). Furthermore, amino acid changes were also observed in the C-terminal region of the protein, specifically in amino acids 89, 102 and 103. It has been reported that the C-terminal region in amino acids 53-68 and 85-104 could mediate the nuclear localization of ORF3 (Lin et al., 2011; Gu et al., 2016).

Interestingly, all of these non-synonymous substitutions on ORF3 resulted to be synonymous on the ORF1 (positions 108, 109, 119, 167 and 179 of ORF1 protein) (data not shown). According to Franzo et al. (2016), ORF3 gene is under strong diversifying selection even in regions that have not been reported to be the target of the immune response. Since ORF1 have a fundamental role in viral DNA replication and both overlapping ORFs coded in differ reading frames, probably only synonymous mutations in ORF1 (mainly non-synonymous on ORF3) are tolerated while synonymous mutations in ORF3 (mainly non-synonymous in ORF1) are highly deleterious (likely with lower fitness) and are purged by natural selection (Franzo et al., 2016).

3.2. eGFP-fused ORF3 protein expression in A549 and ST cells

The complete ORF3 gene (315 bp), was amplified by using RNA isolated from transfected cells with eGFP-ORF3/2a, eGFP-ORF3/2b and eGFP-ORF3/2d plasmids. In figure 2A is shown the expression of ORF3 gene at 48 h post-transfection in ST and A549 cells. In addition, the expression of the eGFP-fused ORF3 protein was observed by immunoblot using an anti-GFP antibody (Fig. 2B).

On the other hand, A549 and ST cells were also transfected with the recombinant vector eGFP-ORF2, used to compare the intracellular distribution of different PCV2 proteins cloned in the same vector. The expression of ORF2 in transfected cells was confirmed by IFA (Suppl. Fig. 1).

3.3. Subcellular localization of eGFP-ORF3 in transfected cells

As shown in figure 3, the expression of eGFP-ORF3 protein in A549 cells was observed using a confocal microscope at 24 and 48 h post-transfection and subcellular localization was compared to GFP alone. We observed that the eGFP-ORF3 protein was expressed predominantly in the cytoplasm of transfected cells with a distribution as spots. This localization pattern was clearly identified at both 24 h and 48 h post-transfection. However, at 48 h, a change in morphology of most of transfected cells with eGFP-ORF3 was identified (Fig. 3), consisting in a decreased cell size and a reduced volume of the nucleus. In addition, the nucleus became fragmented and localized at the periphery (Fig. 3A). The observation of cell shrinkage after 48 h of transfection with eGFP-ORF3 is in agreement with previous results obtained in PK-15 cells (Liu et al., 2005; He et al., 2012). Of note, all these morphological changes are involved in apoptotic processes, a form of cell death driven by genetically controlled mechanisms (Sgonc and Wick, 1994; Pfaffel-Schubart et al., 2008).

The localization of GFP-tagged ORF3 was evaluated in A549 (transformed cell line) (Fig. 4A) and ST (diploid cell line) cells (Fig. 4B) and epifluorescence microscope images revealed a punctate localization patterns that mostly accumulates in the cytoplasm of both cells types. However, it is possible to notice a variable distribution of the dots as well as differences in fluorescence intensity between transfected cells of the same cell line or between A549 and ST lines (Fig. 4). The distribution of eGFP-ORF3 as dots into the cytoplasm of transfected cells (Fig. 3 and 4) has previously been observed for homologue proteins of other members of the family *Circoviridae* such as porcine circovirus type 1 (PCV1) and chicken anemia virus (CAV). Both viruses also encode a third viral protein, designated VP3 and Apoptin for PCV1 and CAV, respectively, which also localize as spots in the cytoplasm, when transfected fused to GFP (Heilman et al., 2006; Hough et al., 2015). This distribution pattern has been shown to correlate with multimerization of the protein (Heilman et al., 2006).

Additionally, after performing three independent trials for each cell line, no substantial differences in sub-cellular localization between ORF3 of different genotypes were observed (Fig. 4). Therefore, in spite of the observed amino acidic differences in ORF3 protein between PCV2d and the classical strains (Fig.1), these would not imply an evident alteration in the sub-cellular localization of the proteins fused with GFP. On the other hand, results showed that the subcellular localization of eGFP-ORF2 protein is also independent of cell type, nevertheless, unlike ORF3, the capsid protein showed a nuclear localization in the transfected cells (Fig. 4). According to Gu et al. (2016), in PCV2-infected PK-15 cells, ORF3 localized in the cytoplasm with a dot distribution in the early stages of infection and then moved into nucleus at 24 hours post-infection. Otherwise, in transfected cells, eGFP-ORF3 fusion proteins (molecular weight <50 kDa) localized in the cytoplasm which is in agreement with the results obtained in this work. In fact, to identify why ORF3 enters into the nucleus in PCV2-infected cells they

constructed plasmids containing different ORF3 fragments fused to eGFP alone or eGFP+Glutathione S-transferase (GST) to predict potential NLS (nuclear localization signal) or NES (nuclear export signal). As previously described by Lin et al. (2011), they also showed that eGFP-53-68aa and eGFP-85-104aa (<50kDa) were distributed in the nucleus of transfected cells, suggesting that these two clusters of basic residues on the C-terminal half region could have a potential role as NLS. On the contrary, they observed that eGFP-GST-53-68aa, eGFP-GST-85-104aa, eGFP-GST (>50kDa) and eGFP-1-105aa, eGFP-1-35aa, eGFP-1-52aa and eGFP-1-70aa (<50 kDa) were localized into the cytoplasm, confirming that differences in subcellular localization are probably independent of the proteins size. In addition, eGFP-1-15aa and eGFP-36-70aa were diffused throughout the entire cell, indicating that a putative NES in ORF3 may localize at N-terminus of the protein in residues 1-35aa (Gu et al. 2016). On the other hand, Lin et al. (2011) used recombinant plasmid pcDNA/ORF3, pcDNA/ORF3 1-52aa and pcDNA/ORF3 53-104aa and after the transfection in PK-15 cells, analysed the intracellular distribution of ORF3 and deletion mutants by IFA with an antibody against ORF3. They showed that full-length and the C-terminal half of ORF3 dominantly localized in the nucleus and the N-terminal fragment ORF3 1-52aa localized in the cytoplasm (Lin et al., 2011). Altogether, these studies suggest that probably the previously identified NLS motif may be masked by the eGFP-ORF3 fused protein and for this reason ORF3 is imported into the nucleus in PCV2 infected cells but not in transfected cells with the GFP fused protein. Nevertheless, this does not occur with the capsid protein, since ORF2 or eGFP-ORF2 (>50kDa) were localized in the nucleus both in infected and transfected cells (Chen et al., 2011; Gu et al., 2016).

3.4. Apoptotic function of eGFP-ORF3 in transfected cells.

PS externalization was analysed in transfected cells with eGFP-ORF3 as an apoptotic marker. During apoptosis, PS molecules become externalized to the outer surface of the cell membrane (Martin et al., 1995). This externalization is important for macrophage recognition, phagocytosis, and clearance of apoptotic cells without causing an inflammatory response (Morris et al., 1984; Duvall et al., 1985). In apoptotic cells, annexin V binds with a high affinity to these externalized PS molecules while PI not penetrates these cells (early apoptosis) (Thiagarajan and Tait, 1990; Raynal et al., 1994; Pfaffel-Schubart et al., 2008). If the apoptotic cells do not clear rapidly by the phagocytes, the cell membrane becomes permeabilized and early apoptotic cells can become late apoptotic cells. With further loss of the membrane integrity, PI can penetrates and stains cells (Gregory and Devitt, 2004; Pfaffel-Schubart et al., 2008). In this work, the percentage of apoptotic cells of 10.000 GFP positive events was measured taking to account the early and late apoptotic cells (annexin V-Alexa Fluor 647 positive, PI negative and annexin V-Alexa Fluor 647 positive, PI positive) (Suppl. Fig. 2).

As shown in figure 5A eGFP-ORF3/2a, eGFP-ORF3/2b and eGFP-ORF3/2d induced higher percentage of apoptotic cells than GFP alone in A549 cells at 24 h and 48 h post-transfection, despite a two to four-fold lower percentage of eGFP-ORF3 transfected cells in comparison to eGFP alone (Suppl. Fig. 2A and 3). The difference in the percentage of apoptosis between eGFP-ORF3 from different strains and eGFP alone is more evident at 48 h post-transfection ($p<0.0001$) (Fig.5A). This result is in agreement with the typical morphological features of apoptotic cells observed by confocal microscopy after 48 h of transfection only in cells expressing eGFP-ORF3 (Fig. 3). The nuclear fragmentation was also observed by using epifluorescence microscopy in the ORF3-expressing cells by nuclear DAPI staining (figure 6A). By contrast, no obvious nuclear fragmentation was observed in cells transfected with eGFP alone or with eGFP-ORF2 (data not shown).

As previously observed by Chayakul et al. (2010), no significant difference in percentage of apoptotic A549 cells was observed between ORF3 from PCV2a and PCV2b genotypes. However, a small tendency to induce more percentage of apoptotic cells was observed in A549 cells expressing ORF3 from PCV2d genotype after 48 h of transfection. Indeed, eGFP-ORF3/2d induced significantly more apoptosis than eGFP-ORF3/2a ($p=0.025$) at 48h post-transfection (Fig. 5A), with similar percentage of transfection for eGFP-ORF3/2a and eGFP-ORF3/2d (10.5% and 11.2% of transfection, respectively) (Suppl. Fig. 3). In Figure 5B the results from three independent experiments at 48 h post-transfection are shown as fold changes relative to normalized GFP. Although the comparison of the median fold change over control is higher for ORF3 of the PCV2d strain (3.1), no significant difference between the three strains was observed (Fig. 5B).

On the other hand, the non-transformed ST cells resulted to be difficult to transfect and the percentage of transfections of the fusion proteins and eGFP were very low (Suppl. Fig. 2B). ST cells have been previously used for the propagation of PCV2 (Viancelli et al., 2012; Cruz and Araujo, 2014). However, to our knowledge, these cells have never been used for transfection. Despite the low efficiency of the assay, it was observed that GFP-ORF3/2a, eGFP-ORF3/2b and eGFP-ORF3/2d also induced higher percentage of apoptotic cells than eGFP alone but only at 48 h post-transfection (Fig. 5C). Indeed, it was observed a higher percentage of apoptosis than in A549 cells. This is consistent with the evident nuclear fragmentation that was observed by epifluorescence microscopy in ST cells expressing eGFP-ORF3 after 48 h of transfection (Fig. 6B). In addition, as in A549 cells, no significant difference was identified in the median fold change to induce apoptosis over control between the three strains. In contrast to the observed in A549 cells, eGFP-ORF3/2d showed a tendency to induce lower percentage of apoptotic cells (1.6 fold change over control) than eGFP-ORF3/2a (2.2 fold change over control) (Fig. 5D). In both cells lines, eGFP-ORF3/2b induced an intermediate percentage of apoptotic cells in comparison with the other two strains (Fig.5).

According to Chayakul et al. (2010), PCV1-ORF3 appeared to be a more potent inducer of apoptosis than PCV2-ORF3, suggesting that ORF3-mediated apoptosis may not be a major or the sole determinant of PCV2 pathogenicity. Furthermore, apoptotic rates in lymphoid tissues were correlated inversely with PCV2 viral load in serum and with severity of lesions (Resendes et al., 2004). In this sense, the observed tendency of eGFP-ORF3/2d to induce lower apoptosis in ST cells than ORF3 from less pathogenic strains is in agreement with that previous result. It remains unknown why in A549 cells an inverted tendency is observed.

The attenuation of PCV2 in SPF piglets by abrogation of ORF3 has been demonstrated (Karuppannan et al., 2009). This agrees with the fact that ORF3 is the only protein that extensively differs between the non-pathogenic PCV1 and PCV2. Furthermore, it was demonstrated that the apoptotic activity of the PCV2-ORF3 lends advantage to the spread of the virus playing an important role in its systemic dissemination (Karuppannan and Kwang, 2011). Thus, if ORF3 is a determinant of virulence of PCV2 via its apoptotic capability, a significant change in inducing apoptosis between strains of different virulence would be observed. Our results showed that the amino acid substitutions observed in ORF3 from the PCV2d strain (Table 1) not involved an evident change in induce apoptosis in comparison with classical PCV2 strains by using PS externalization detection assay in A549 and ST cells. Maybe, the role of ORF3 in pathogenesis not necessarily has to be related to its apoptotic function and perhaps it could be related to another function of ORF3 that is still unknown. By contrast, another possibility is that the differences in virulence between the PCV2 strains have not been well defined. The results of experimental studies have provided inconclusive support for the hypothesis that PCV2a and PCV2b differ in pathogenicity, but this conclusion does not adequately explain outbreaks of severe PCVAD that coincided with the appearance of PCV2b (Trible and Rowland, 2012). However, it is in agreement with the result obtained by Chayakul et al. (2010) about no difference in percentage of apoptotic cells between ORF3 from PCV2a and PCV2b genotypes. In addition, some researchers confirmed the enhanced virulence of the newly emerging PCV2b mutant, PCV2d (Guo et al., 2012), while others found no significant difference in virulence between PCV2 strains (Opriessnig et al., 2014).

Therefore, the effect of the amino acid changes observed in the ORF3-PCV2d and its relationship with pathogenicity remains uncertain. As stated above, ORF3 gene has been suggested to be under a strong positive selection (Franzo et al., 2016). Thus, the fixation of non-synonymous substitutions in ORF3 protein is very likely to occur. Certainly, the immune pressure associated with the use of vaccines may induce these kinds of substitutions that forces viral evolution. In fact, outbreaks of PCV2d strains have been associated to episodes of vaccine failure (Opriessnig et al., 2013; Seo et al., 2014; Xiao et al., 2012).

Finally, our results on the apoptotic function *in vitro* in combination with the subcellular localization information suggested that the nuclear localization of PCV2-ORF3 is not necessary

for induction of apoptosis and regardless of the transformation status of the cell. The independence between nuclear localization and apoptosis was also observed for PCV1-ORF3 but not for CAV-Apoptin (Heilman et al., 2006; Hough et al., 2015). In contrast to PCV2-ORF3, PCV1-ORF3 and CAV-Apoptin induce apoptosis selectively in transformed cell types (Hough et al., 2015).

4. Conclusions

In summary, we observed that eGFP-fusion ORF3 proteins were distributed as spots predominately into the cytoplasm of transfected cells and suggested that nuclear localization of ORF3, observed in PCV2 infected cells, is not necessary to induce apoptosis in transfected cells. Moreover, the induction of apoptosis in eGFP-ORF3 expressing cells is independent of the cell type (transformed and non-transformed cell lines). eGFP-ORF3 proteins from the three genotypes showed a similar pattern of intracellular distribution in transfected cells. No significant differences were observed in the apoptotic function of eGFP-fused ORF3 from the emerging PCV2d strain and classical strains. The effect of non-conservative amino acid changes observed in ORF3-PCV2d and the relationship of this protein with pathogenicity is still controversial. Conceivably, these changes have arisen from the rapid evolution of these viruses after the introduction of commercial vaccines.

Acknowledgments

Authors would like to thank to Embrapa Suinos e Aves for providing ST cells without contamination with PCV1. Authors are grateful to Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Agencia Nacional de Innovación e Investigación (ANII) and Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC).

References

Chaiyakul M, Hsu K, Dardari R, Marshall F, Czub M. (2010). Cytotoxicity of ORF3 proteins from a non-pathogenic and a pathogenic porcine circovirus. J Virol. 84, 11440-7.

Chen HC, Yang SH, Kuo TY, Lai SS. (2011). The studies on the transfection of EGFP-fused porcine circovirus Type 2 genome. J Vet Med Sci. 73, 1097-100.

Cruz TF and Araujo JP Jr. (2014). Cultivation of PCV2 in swine testicle cells using the shell vial technique and monitoring of viral replication by qPCR and RT-qPCR. J Virol Methods. 196, 82-5.

Davies B, Wang X, Dvorak CM, Marthaler D, Murtaugh MP. (2016). Diagnostic phylogenetics reveals a new porcine circovirus 2 cluster. Virus Res. 217, 32-7

Dupont K, Nielsen ED, Baeko P, Larsen LE. (2008). Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. Vet Microbiol. 128, 56-64.

Duvall E, Wyllie AH, Morris RG. (1985). Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). Immunology. 56, 351-8.

Franzo G, Cortey M, de Castro AM, Piovezan U, Szabo MP, Drigo M, Segalés J, Richtzenhain LJ, (2015b). Genetic characterisation of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from feral pigs in the Brazilian Pantanal: An opportunity to reconstruct the history of PCV2 evolution. Vet Microbiol. 178, 158-62.

Franzo G, Cortey M, Olvera A, Novosel D, Castro AM, Biagini P, Segalés J, Drigo M. (2015a). Revisiting the taxonomical classification of Porcine Circovirus type 2 (PCV2): still a real challenge. Virol J. 12, 131-8.

Franzo G, Cortey M, Segalés J, Hughes J, Drigo M. (2016). Phylodynamic analysis of porcine circovirus type 2 reveals global waves of emerging genotypes and the circulation of recombinant forms. Mol Phylogenet Evol. 100, 269-80.

Gregory CD and Devitt A. (2004). The macrophage and the apoptotic cell: an innate immune interaction viewed simplistically? Immunology. 113, 1-14.

Gu J, Wang L, Jin Y, Lin C, Wang H, Zhou N, Xing G, Liao M, Zhou J. (2016).Characterization of specific antigenic epitopes and the nuclear export signal of the Porcine circovirus 2 ORF3 protein. Vet Microbiol. 184, 40-50.

Guo L, Fu Y, Wang Y, Lu Y, Wei Y, Tang Q, Fan P, Liu J, Zhang L, Zhang F, Huang L, Liu D, Li S, Wu H, Liu C. (2012). A porcine circovirus type 2 (PCV2) mutant with 234 amino acids in capsid protein showed more virulence in vivo, compared with classical PCV2a/2b strain. PLoS One. 7, e41463

He JL, Dai D, Zhou N, Zhou JY. (2012). Analysis of putative ORF3 gene within porcine circovirus type 2. Hybridoma (Larchmt). 31, 180-7.

Heilman DW, Teodoro JG, Green MR. (2006). Apoptin nucleocytoplasmic shuttling is required for cell type-specific localization, apoptosis, and recruitment of the anaphase-promoting complex/cyclosome to PML bodies. J Virol 80, 7535-45.

Hough KP, Rogers AM, Zelic M, Paris M, Heilman DW. (2015). Transformed cell-specific induction of apoptosis by porcine circovirus type 1 viral protein 3. J Gen Virol. 96, 351-9.

Karuppannan AK and Kwang J. (2011). ORF3 of porcine circovirus 2 enhances the in vitro and in vivo spread of the of the virus. Virology. 410, 248-56.

Karuppannan AK, Liu S, Jia Q, Selvaraj M, Kwang J. (2010). Porcine circovirus type 2 ORF3 protein competes with p53 in binding to Pirh2 and mediates the deregulation of p53 homeostasis. Virology. 398, 1-11.

Karuppannan AK, Jong MH, Lee SH, Zhu Y, Selvaraj M, Lau J, Jia Q, Kwang J. (2009). Attenuation of porcine circovirus 2 in SPF piglets by abrogation of ORF3 function. Virology. 383, 338-47.

Kwon T, Lee DU, Yoo SJ, Je SH, Shin JY, Lyoo YS. (2017).Genotypic diversity of porcine circovirus type 2 (PCV2) and genotype shift to PCV2d in Korean pig population. Virus Res. 228, 24-29

Lin WL, Chien MS, Wu PC, Lai CL, Huang C. (2011). The porcine circovirus type2 nonstructural protein ORF3 induces apoptosis in porcine peripheral blood mononuclear cells. Open Virol J. 5, 148-53.

Liu J, Wei C, Dai A, Lin Z, Fan K, Fan J, Liu J, Luo M, Yang X. (2018). Detection of PCV2e strains in Southeast China. PeerJ. 6, e4476.

Liu J, Chen I, Kwang J. (2005). Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. J Virol. 79, 8262-74.

Liu J, Chen I, Du Q, Chua H, Kwang J. (2006). The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. J Virol. 80, 5065-73

Liu J, Zhu Y, Chen I, Lau J, He F, Lau A, Wang Z, Karuppannan AK, Kwang J. (2007). The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 interacts with porcine ubiquitin E3 ligase Pirh2 and facilitates p53 expression in viral infection. J Virol. 81, 9560-7.

Lv QZ, Guo KK, Zhang YM. (2014). Current understanding of genomic DNA of porcine circovirus type 2. Virus Genes. 49, 1-10.

Mankertz A. (2012). Molecular interactions of porcine circoviruses type 1 and type 2 with its host. Virus Res. 164, 54-60.

Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. J Exp Med. 182, 1545-56.

Morris RG, Hargreaves AD, Duvall E, Wyllie AH (1984). Hormone-induced cell death. 2. Surface changes in thymocytes undergoing apoptosis. Am J Pathol. 115, 426-36

Opriessnig T, Xiao CT, Gerber PF, Halbur PG, (2013). Emergence of a novel mutant PCV2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the U.S. concurrently infected with PPV2. Vet Microbiol. 163, 177-83

Opriessnig T, Xiao CT, Gerber PF, Halbur PG, Matzinger SR, Meng XJ. (2014). Mutant USA strain of porcine circovirus type 2 (mPCV2) exhibits similar virulence to the classical PCV2a and PCV2b strains in caesarean-derived, colostrum-deprived pigs. J Gen Virol. 95, 2495-503.

Pfaffel-Schubart G, Scalfi-Happ C, Ruck A. (2008). Early and late apoptotic events induced in human glioblastoma cells by Hypericin PDT. Med Laser Appl. 23, 25-30

Ramos N, Mirazo S, Castro G, Arbiza J. (2013). Molecular analysis of Porcine Circovirus Type 2 strains from Uruguay: evidence for natural occurring recombination. Infect Genet Evol. 19, 23-31.

Ramos N, Porley D, Mirazo S, Castro G, Cabrera K, Lozano A, Arbiza J. (2017). Molecular study of Porcine Circovirus type 2 in wild boars and domestic pigs in Uruguay from 2010 to 2014: Predominance of recombinant circulating strains. Gene. 637, 230-8.

Raynal P and Pollard HB. (1994). Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. Biochim Biophys Acta. 1197, 63-93.

Resendes AR, Majó N, Segalés J, Mateu E, Calsamiglia M, Domingo M. (2004). Apoptosis in lymphoid organs of pigs naturally infected by porcine circovirus type 2. Journal of General Virology. 85, 2837-44

Seo HW, Park C, Kang I, Choi K, Jeong J, Park SJ, Chae C. (2014). Genetic and antigenic characterization of a newly emerging porcine circovirus type 2b mutant first isolated in cases of vaccine failure in Korea. Arch Virol. 159, 3107-11

Sgonc R and Wick G. (1994). Methods for the detection of apoptosis. Int Arch Allergy Immunol. 105, 327-32.

Stevenson LS, Gilpin DF, Douglas A, McNeilly F, McNair I, Adair BM, Allan GM. (2007) T lymphocyte epitope mapping of porcine circovirus type 2. Viral Immunol. 20, 389-98.

Thiagarajan P and Tait JF. (1990). Binding of annexin V/placental anticoagulant protein I to platelets. Evidence for phosphatidylserine exposure in the procoagulant response of activated platelets. J Biol Chem. 265, 17420-3.

Trible BR and Rowland RR. (2012). Genetic variation of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its relevance to vaccination, pathogenesis and diagnosis. Virus Res. 164, 68-77.

Viancelli A, Garcia LA, Schiochet M, Kunz A, Steinmetz R, Ciacci-Zanella JR, Esteves PA, Barardi CR. (2002). Culturing and molecular methods to assess the infectivity of porcine circovirus from treated effluent of swine manure. Res Vet Sci. 93, 1520-4.

Xiao CT, Harmon KM, Halbur PG, Opriessnig T. (2016). PCV2d-2 is the predominant type of PCV2 DNA in pig samples collected in the U.S. during 2014-2016. Vet Microbiol. 197, 72-7.

Xiao CT, Halbur PG, Opriessnig T. (2012). Complete genome sequence of a novel porcine circovirus type 2b variant present in cases of vaccine failures in the United States. J Virol. 86, 12469.

Xiao CT, Halbur PG, Opriessnig T. (2015). Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d. J Gen Virol. 96, 1830-41.

Table 1. Physicochemical properties of amino acids at sites of variation in ORF3 among PCV2 strains

PCV2 strains	ORF3 Position/ Amino acid	Side chain properties	Residue molecular weight
	29		
PCV2a/2b	Theonine (T)	Polar (hydrophilic) Neutral Aliphatic	101
PCV2d	Alanine (A)	Non-polar (hydrophobic) Neutral Aliphatic	71
	41	Non-polar Neutral	
PCV2a	Glycine (G)	Aliphatic	57
PCV2b	Serine (S)	Polar Neutral Aliphatic	87
PCV2d	Arginine (R)	Polar Positive/Basic (strongly) Aliphatic	156
	89	Polar Neutral	
PCV2a/2b	Glutamine (Q)	Aliphatic	128
PCV2d	Glutamic acid (E)	Polar Negative/Acidic Aliphatic	129
	102	Non-polar Neutral	
PCV2a/2b	Leucine (L)	Aliphatic	113
PCV2d	Fenilalanine (F)	Non-polar Neutral Aromatic	147
	103	Polar Neutral	
PCV2a	Asparagine (N)	Aliphatic	114
PCV2b	Histidine (H)	Polar Positive/Basic (weakly) Aromatic	137
PCV2d	Tyrosine (Y)	Polar Neutral Aromatic	163

Figure captions

Figure 1. PCV2-ORF3 amino acid sequence analysis. Amino acid sequence alignment of ORF3 (104 aa) from PCV2a, PCV2b and PCV2d strains. Amino acid changes of ORF3/PCV2d compared with classical strains are shown in red. The binding domain to pPirh2 is shown with a blue line (aa 20-65).

Figure 2. Expression of ORF3 in transfected cells. A) Analysis of ORF3 gene expression by RT-PCR in ST (1-6) and A549 (7-12) cells at 48 h post-transfection. Lanes 1, 2 and 3: RT-PCR products of ORF3/2a, ORF3/2b and ORF3/2d, respectively in ST cells. Lanes 4, 5 and 6: PCR products amplified from the total RNA of transfected ST cells. Lanes 7, 8 and 9: RT-PCR products of ORF3/2a, ORF3/2b and ORF3/2d, respectively in A549 cells. Lanes 10, 11 and 12 PCR products amplified from the total RNA of transfected A549 cells. M: 100bp DNA ladder. B) Western blot analysis of eGFP-ORF3 fusion protein using an anti-GFP antibody (α-GFP).

Figure 3. Sub-cellular localization of eGFP-ORF3 in A549 cells by using confocal microscopy. A) After 48 h of transfection, eGFP-ORF3 was observed as dots in the cytoplasm of A549 cells. The nucleus of the cells are shown in blue (DAPI) and merged with bright field images. The cell shrinkage in transfected cells is observed. B) Comparison between A549 cells 24 and 48 h post-transfection with eGFP alone and eGFP-ORF3. For the different constructs, the merge pictures with GFP and DAPI fluorescence are shown. eGFP alone is localized in the entire cell. The rounding-up of cells and fragmentation of the nucleus is only observed in cells expressing eGFP-ORF3 after 48 h of transfection. The selected pictures showed the typical reactions for each condition. Original magnification 40X.

Figure 4. Sub-cellular distribution of eGFP-ORF3 from different PCV2 genotypes. The intra-cellular localization pattern of eGFP-ORF3/2a, eGFP-ORF3/2b and eGFP-ORF3/2d were compared to eGFP alone and eGFP-ORF2 in A549 (A) and ST (B) cells at 48 h post-transfection by using epifluorescence microscopy. Merged pictures with GFP and DAPI fluorescence are shown for each condition. Images were selected from three independent experiments for each cell line. Original magnification 20X.

Figure 5. Apoptotic function *in vitro* of ORF3 from different PCV2 genotypes. Percentage of apoptotic cells in A549 and ST cells transfected with different eGFP fusion ORF3 variants (eGFP-ORF3/2a/2b/2d). Data are mean ± SD (n = 3 technical replicates) from one representative experiment out of three independent experiments at 24 and 48 h post-transfection in A549 (A) and ST (C) cells. Values that are significantly different (*$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$, ****$p<0.0001$) from the values for the control (eGFP alone transfected cells) are indicate above the

bars. In B and C, data are presented as fold change over the control (line at median) from three independent experiments in A549 and ST cells, respectively.

Figure 6. Nuclear fragmentation observed in eGFP-ORF3 transfected cells. A549 (A) and ST (B) cells expressing eGFP-ORF3 proteins (from different strains) showed nuclear fragmentation (indicated by arrows) by DAPI staining at 48 h post-transfection (original magnification 20X).

Figure 1. PCV2-ORF3 amino acid sequence analysis

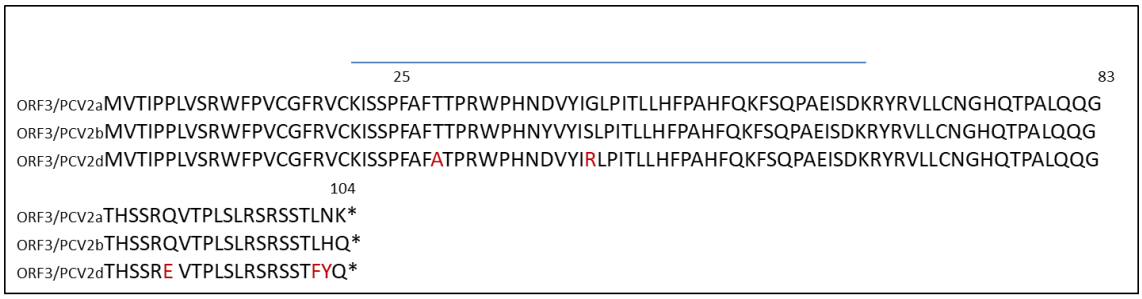


Figure 2. Expression of ORF3 in transfected cells.

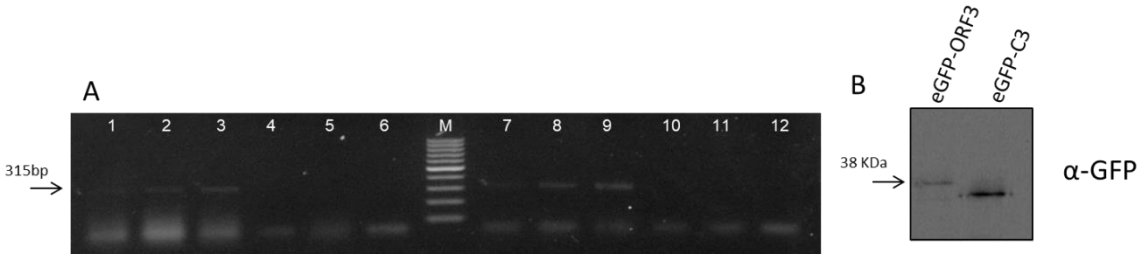


Figure 3. Sub-cellular localization of eGFP-ORF3 in A549 cells by using confocal microscopy.

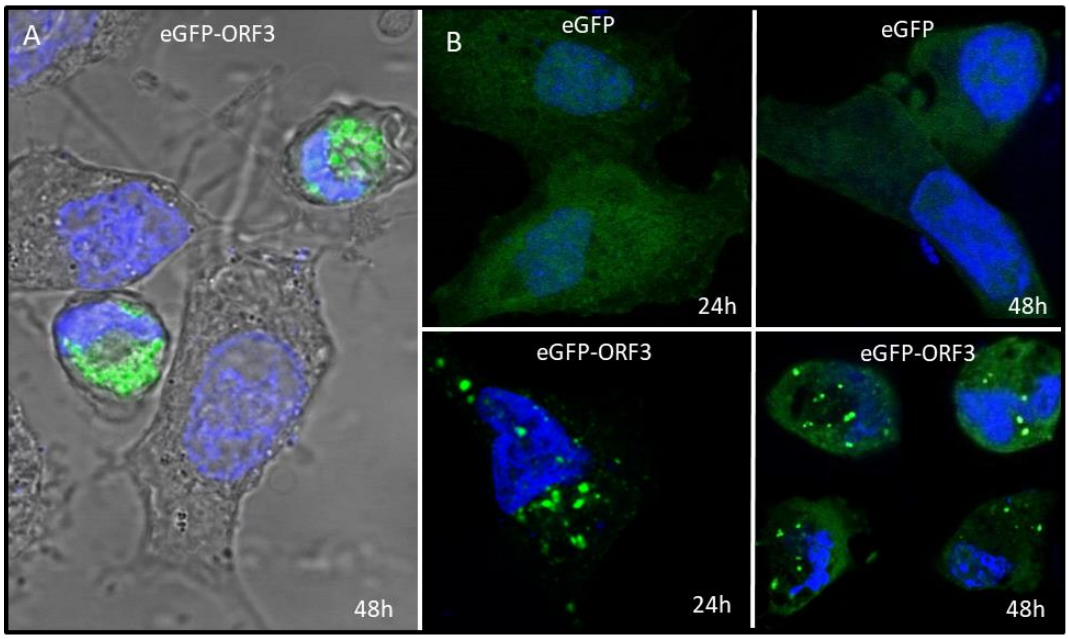


Figure 4. Sub-cellular distribution of eGFP-ORF3 from different PCV2 genotypes.

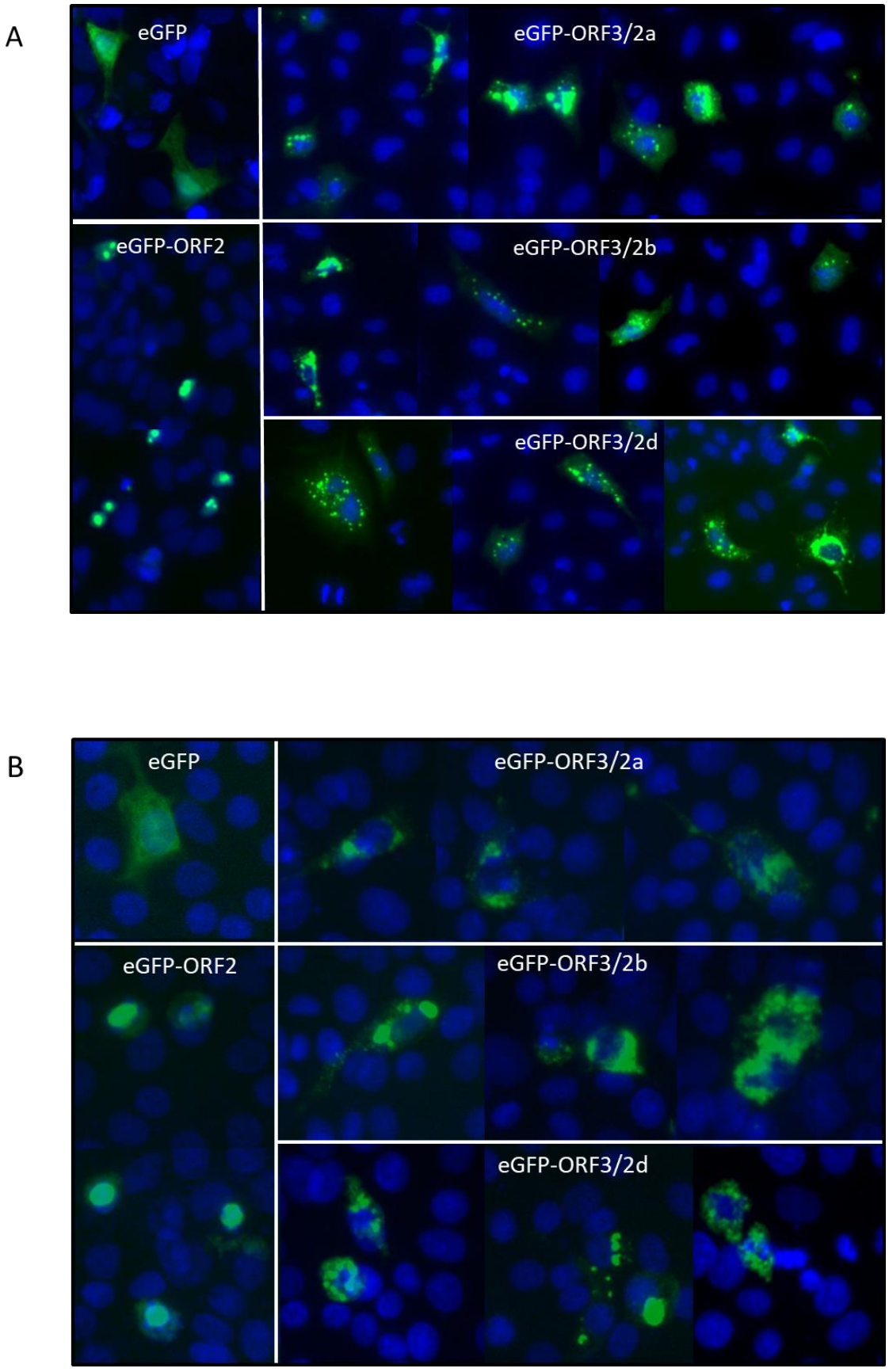


Figure 5. Apoptotic function *in vitro* of ORF3 from different PCV2 genotypes.

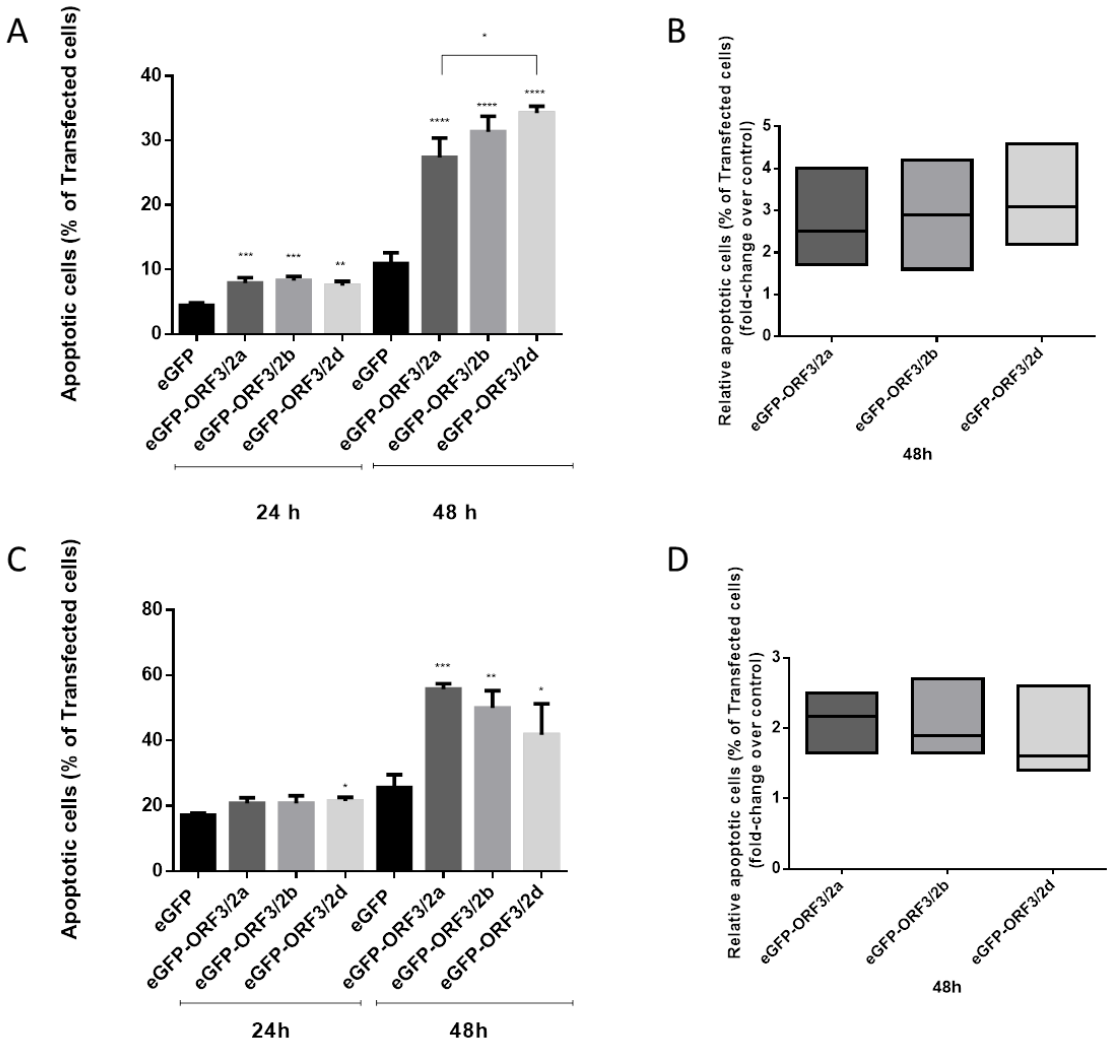
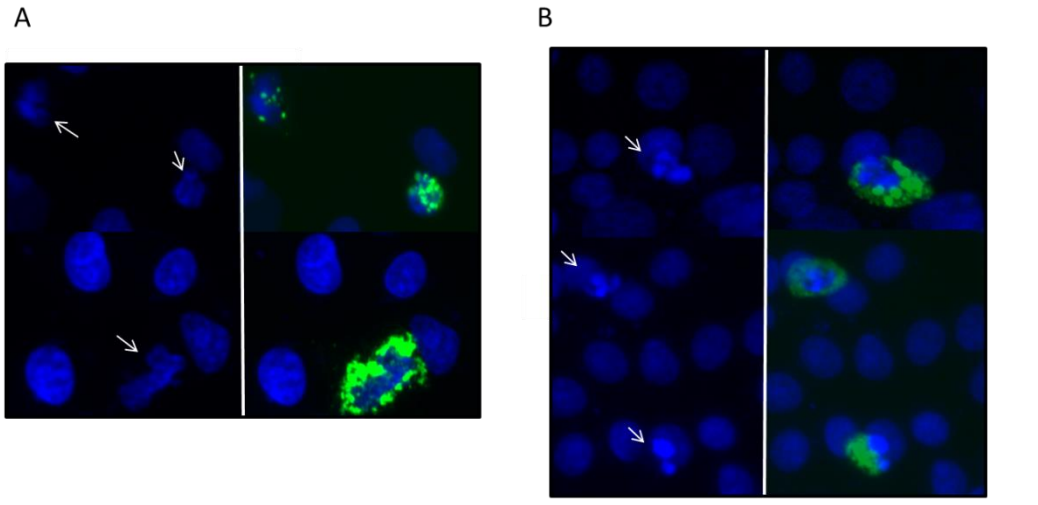
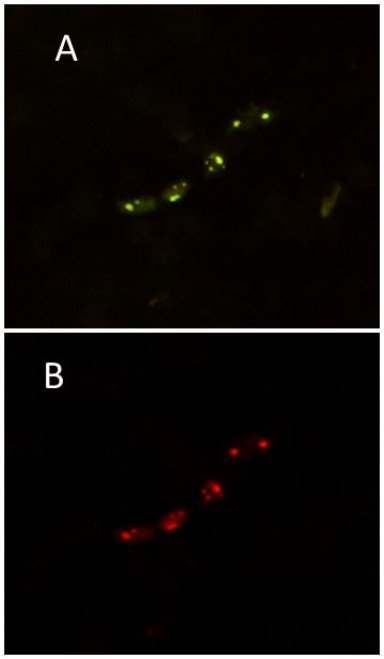


Figure 6. Nuclear fragmentation observed in eGFP-ORF3 transfected cell.

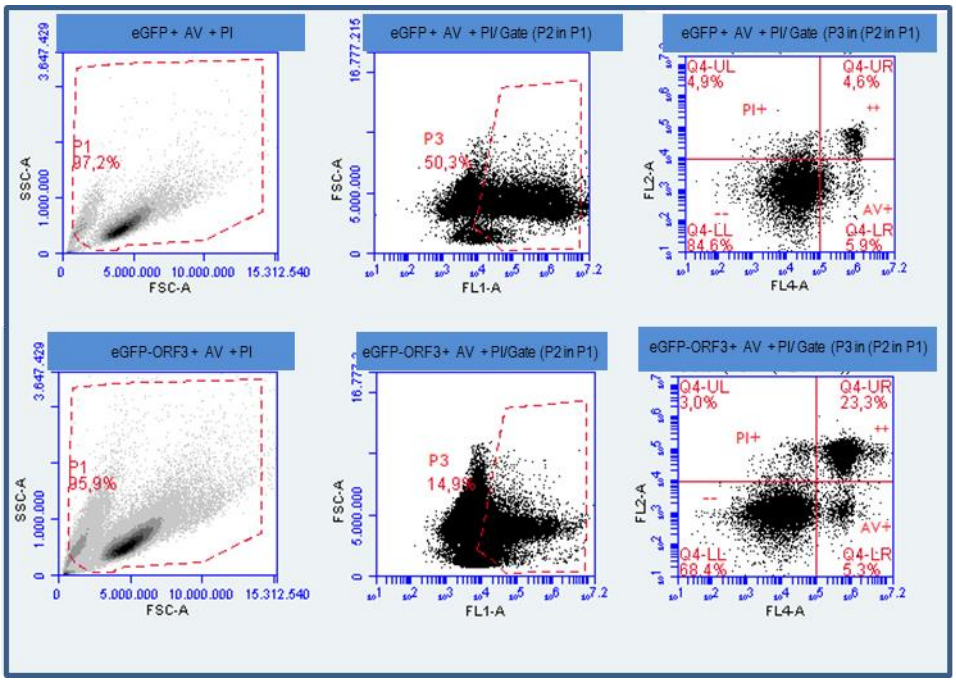


Supplementary figure 1. Expression of ORF2 in transfected cells with the recombinant plasmid eGFP-ORF2. A) GFP fluorescence (green) and B) IFA staining (red) are observed by using epifluorescence microscopy. Original magnification 10X.

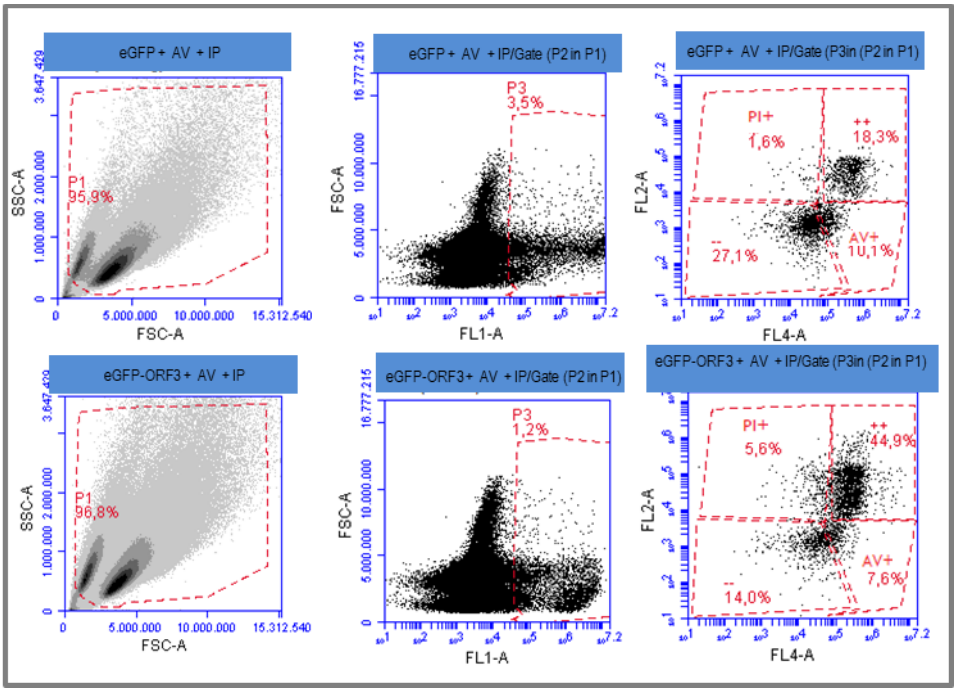


Supplementary figure 2. Detection of apoptosis by measurement of the exposure of PS by AV-Alexa 647/ PI staining at 48 h post-transfection using flow cytometer. A549 (A) and ST (B) transfected cells with eGFP alone and eGFP-ORF3 in early and late stages of apoptosis were detected. For each analysis, 10.000 GFP positive events gated on a FSC vs FL1 (*) dot plot were recorded. In gate P3 is shown the percentage of transfected cells. Four subpopulations were defined in the FL4 (**) vs FL2 (***) dot plot: Annexin V and PI negative (viable, or no measurable apoptosis) (AV−/PI−); Annexin V negative and PI positive (necrotic cells) (AV-/PI-); Annexin V positive and PI negative (early apoptosis with intact membranes) (AV+/PI−); Annexin V and PI positive (end stage apoptosis and death) (AV+/PI+). * Dye: GFP Detector: FL1; ** Dye: Alexa Fluor 647 Detector: FL4;*** Dye: PI Detector: FL2. FSC: Forward Scatter. SSC: Side Scatter.

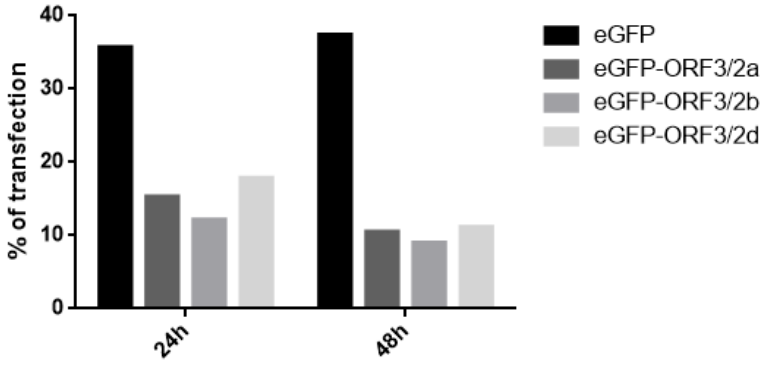
A



B



Supplementary figure 3. Percentage of transfected cells with eGFP-ORF3 and eGFP alone from the total A549 cells at 24 and 48 h after transfection. Values shown are means from three independent experiments.



4.11. Capítulo 6. Evaluación de diferentes estrategias para el aislamiento de una cepa de campo de PCV2 en cultivos celulares.

4.11.1. Introducción

El aislamiento viral *in vitro* implica inocular una línea celular establecida capaz de permitir la replicación viral y generar progenie. Esta técnica proporciona un banco de trabajo para investigar en profundidad las características biológicas de las cepas virales.

La línea celular que ha sido más utilizada para el aislamiento de PCV2 es la línea celular de riñón porcino, PK-15 (Ellis et al., 1998; Meerts et al., 2005a). Sin embargo, esta línea en general se encuentra persistentemente infectada con el virus no patogénico PCV1 (Tischer et al., 1974). Debido a esta característica, PCV2 se caracteriza por su lento crecimiento en cultivos celulares, alcanzando títulos virales no muy altos y no produce efecto citopático (Cruz y Araujo, 2014). De hecho, la línea comercial de ATCC® CCL-33™, es positiva para antígenos de PCV, no siendo la adecuada para el aislamiento de cepas de campo. Debido a este problema, algunos investigadores han desarrollado líneas celulares clonales de PK-15 descontaminadas de PCV1 e incluso han desarrollado líneas altamente permisivas en donde se ha visto que PCV2 produce efecto citopático (Chen et al., 2013). Otras líneas celulares utilizadas para la propagación de PCV2 han incluido SK (riñón de cerdo) (Rovira et al., 2002; Misinzo et al., 2009) y células ST (testículo de cerdo) (Misinzo et al., 2009; Viancelli et al., 2012; Cruz y Araujo, 2014). Asimismo, se conoce que el tratamiento de las células infectadas con D-glucosamina es importante para lograr una adecuada replicación del virus (Tischer et al., 1987).

Generalmente, los inóculos de virus utilizados en la mayoría de los estudios de aislamiento de PCV2 se han obtenido de homogeneizados tisulares correspondientes a cerdos afectados por PCV2-SD o cepas previamente aisladas y propagadas a través de varios pasajes celulares (Roca et al., 2004). De hecho, ciertamente no todas las muestras presentan altas cargas virales y a su vez, pueden estar contaminadas con otros virus porcinos ubicuos como TTSuV, lo cual no es adecuado para la adaptación de cepas de PCV2 al cultivo celular. Es por ello, que la construcción de un clon infeccioso de ADN mediante tecnologías moleculares puede ser una buena alternativa para la caracterización biológica de cepas de campo que no puedan propagarse en líneas celulares por métodos convencionales. Existen varios reportes que han

llevado a cabo diferentes estrategias para la construcción de clones infecciosos de PCV2 (Fenaux et al., 2002; Roca et al., 2004; Guo et al., 2011).

Este capítulo tuvo como objetivo adaptar una cepa de campo en cultivos celulares a partir de linfonódulos infectados con PCV2 y diseñar una estrategia para el desarrollo de un clon infeccioso de ADN a partir de la amplificación en un solo paso de su genoma completo.

4.11.2. Estrategia implementada y resultados obtenidos

4.11.2.1. Estudio preliminar sobre el aislamiento de una cepa de campo en una línea celular de cerdo

Se empleó la línea celular ST, de testículo de cerdo, no contaminada con PCV1 cedida por *Embrapa Suinos e Aves*. Fueron mantenidas en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI, por sus siglas en inglés) 1640 (Capricorn Scientific, Alemania), con glutamina estable, suplementada con suero fetal bovino al 10% (SFB), 100 U/mL de penicilina G y 100 µL/mL de estreptomicina a 37ºC en una estufa humidificada con 5% de CO_2.

El inóculo viral derivó de una muestra de linfonódulo mesentérico de cerdo infectado con PCV2 (caso EE del capítulo 1, sección 4.3). La cepa identificada en la muestra es la cepa recombinante, PCV2_Uy1 (caracterizada en el capítulo 2, sección 4.4). Para la preparación del inóculo se maceró 1 gr de linfonódulo y se lo resuspendió en 10 mL de solución tampón fosfato salino (buffer PBS, por sus siglas en inglés) 1X pH 7.4. Posteriormente, la suspensión se congeló en nitrógeno líquido y se descongeló a 37ºC, procedimiento que se repitió 3 veces. Por último, se centrifugó a 1200 rpm por 5 min y el sobrenadante fue filtrado con un filtro de 0.2 µm.

Por otro lado, se observó al microscopio óptico la citotoxicidad de diferentes concentraciones de D-glucosamina (300 mM, 100mM y 30mM) en cultivos confluentes de células ST y modificaciones en la morfología y confluencia de las células fueron comparadas con un control de células ST sin tratar. De este ensayo se observó que las concentraciones 100mM y 30mM no alteraban la morfología ni la confluencia después del tratamiento ni tampoco 24 horas post-tratamiento. Por lo tanto, se decidió utilizar una concentración de 100mM.

Placas de 6 wells con monocapas de células ST al 70% de confluencia fueron inoculadas con 0.5 mL de la suspensión previamente preparada diluida 10 veces y fue incluido un control de células sin infectar. Se dejó adsorber por 1 h a 37ºC. Posteriormente, fue retirado el inóculo, se lavó tres veces con PBS 1X y se colocó medio RPMI suplementado con 5% de SFB (medio de infección). A las 24 horas fueron tratadas con D-glucosamina por 20 min a 37ºC, fueron lavadas con PBS1X y se les colocó medio de infección nuevo. Las células se subcultivaron (1:2) cada 48 h y se realizaron 8 pasajes. Los tratamientos con D-glucosamina se realizaron 24 h después de cada pasaje. Se separaron alícuotas de células infectadas y del control sin infectar después de cada tripsinización y fueron almacenadas a -70ºC.

El primer inconveniente surgió con el tratamiento de D-glucosamina luego de los diferentes pasajes sucesivos. Si bien durante los 2 primeros pasajes la morfología de las células permanecía inalterada, en el tercer pasaje las células adoptaron un tamaño mayor. En el quinto pasaje, si bien se sembraba la misma cantidad de células, la confluencia disminuyó y se pudo observar la presencia de numerosas vacuolas (Fig.4.11.1). Esto ocurrió tanto con las células infectadas como con los controles sin infectar tratados con D-glucosamina y se decidió comenzar nuevamente pero con un tratamiento a una concentración de 30mM. Asimismo, debido a la gran citotoxicidad observada se decidió realizar en paralelo el aislamiento sin tratamiento.

Se realizó la extracción de ADN utilizando el método estándar con Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico ultra puro (25:24:1, v/v) (Thermo Fisher Scientific, EE.UU) a partir de 500 µL de las alícuotas almacenadas correspondientes a los diferentes pasajes celulares. Se llevó a cabo una PCR con los cebadores ORF3F y ORF3R (descritos en el capítulo 5, sección 4.10) del pasaje 3 y 4 de células tratadas con D-Glucosamina 30mM y del pasaje 4 y 5 de células sin tratamiento. Se pudo evidenciar la presencia de ADN viral en el pasaje 4 con tratamiento y en el pasaje 5 sin tratamiento (Fig.4.11.2).

Por otro lado, se realizó una PCR cuantitativa (qPCR) con SYBER green empleando los cebadores diseñados (basados en un fragmento del gen *cap*) y el protocolo descrito por Dezen et al. (2011). Fue utilizado el reactivo SYBR™ Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, EE.UU) y un termociclador Applied Biosystems™ 7500. La curva estándar empleada

fue previamente obtenida durante una pasantía realizada en el laboratorio de Virología del Instituto de Sanidad Animal FEPAGRO, en Porto Alegre, Brasil. El límite de detección de la misma fue de 100 copias por reacción. Los datos obtenidos de la curva estándar se muestran en la figura 4.11.3. Se cuantificó el ADN extraído de los pasajes 3, 4, 5, 6 y 7 tratados con D-Glucosamina y se incluyó el control sin infectar. Todas las muestras fueron realizadas por duplicado. Los datos de ciclo umbral (Ct, por sus siglas en inglés), las copias por reacción correspondientes y la concentración en copias por mL de medio de cultivo se muestran en la Tabla 4.11.1. En todos los casos fue verificada la temperatura de melting de la curva de disociación característica para el fragmento amplificado (entre 79.3 y 80.3).

Los datos de la qPCR permiten evidenciar, al igual que lo observado en la PCR en tiempo final, que se comienza a detectar ADN a partir del pasaje 4 con tratamiento. Se identificó que la cantidad de copias es baja cercana al límite inferior de la técnica empleada y a su vez, si bien se observó ADN viral en los pasajes sucesivos (5, 6 y 7), no se obtuvo un crecimiento notorio de copias del virus. Asimismo, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia (IFA, por sus siglas en inglés) del pasaje 8 tratado con D-Glucosamina utilizando un anticuerpo policlonal contra la cápside de PCV2 (abcam, EE.UU.) y un anticuerpo secundario IgG anti-conejo conjugado a Alexa 555 (Thermo Fisher Scientific, EE.UU). Las células fueron fijadas y permeabilizadas con metanol-acetona (80:20). Posteriormente, para evitar la unión inespecífica de anticuerpos se bloqueó con PBS-albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) 1% m/v durante toda la noche a 4ºC. Se incubó con el primer anticuerpo 1:500 diluido en PBS-BSA 0.1% durante 1 h y posteriormente, se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno. Se incubó con el anticuerpo secundario 1:1000 durante 1h y luego, se realizó el mismo procedimiento de lavado. Tras la visualización de la inmunofluorescencia mediante el sistema ZOE™ Fluorescent Cell Imager (BioRad, EE.UU.), no se observó señal positiva en comparación con la muestra control sin infectar.

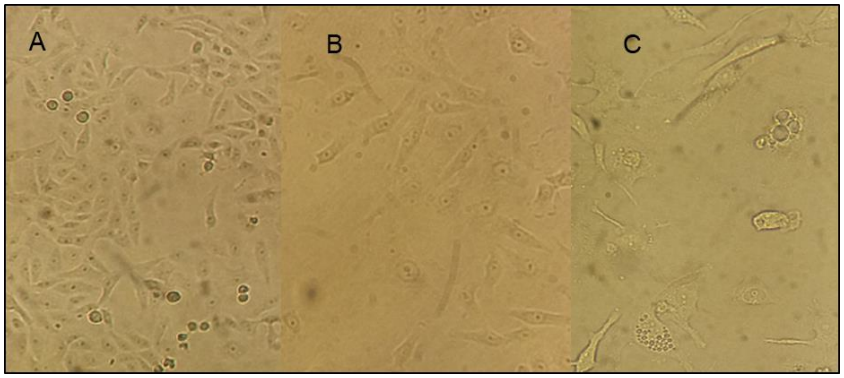


Fig.4.11.1. Citotoxicidad de D-Glucosamina 100mM en células ST luego de varios pasajes sucesivos. A) Se observan las células ST tratadas con D-Glucosamina durante los dos primeros pasajes celulares, no presentando cambios morfológicos evidentes en comparación a células sin tratar. B) A partir del tercer pasaje las células tratadas comenzaron a aumentar de tamaño y su crecimiento comenzó a ser más lento. C) Luego del pasaje 5, las células presentaban numerosas vacuolas con un gran aumento de tamaño y disminución drástica de la confluencia.

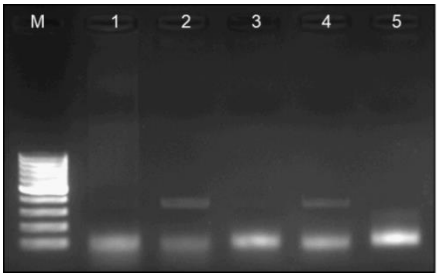


Fig.4.11.2. Detección de ADN de PCV2 en pasajes celulares. Gel de agarosa 1.5% que muestra el producto de amplificación del gen ORF3 de 314 pb en el 4º pasaje celular con tratamiento (carril 2) y en el 5º pasaje celular sin tratamiento (carril 4). Carril1: 3º pasaje celular con tratamiento. Carril 3: 4º pasaje celular sin tratamiento. Carril 5: control de células sin infectar. M: marcador de peso molecular de 100pb (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.).

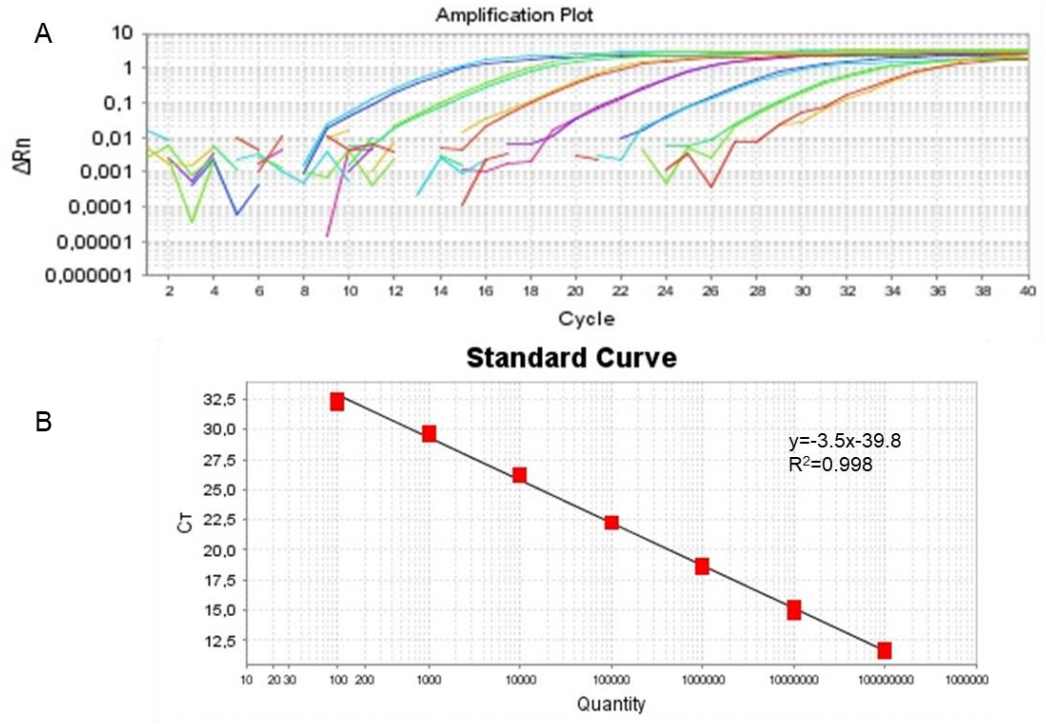


Fig.4.11.3. Curva estándar utilizada para la cuantificación de copias del genoma de PCV2. Se muestran las imágenes obtenidas del software Applied Biosystems™ 7500 v2.0.1. A) Se observa la curva de amplificación para cada uno de los plásmidos graficando la emisión de fluorescencia en función del número de ciclos. B) Se muestra la curva estándar la cual indica el Ct en función del logaritmo de la cantidad de copias. Se detalla la ecuación de la curva para interpolar el Ct de una muestra de concentración desconocida y determinar así su concentración.

Tabla 4.11.1 Datos obtenidos de la qPCR de diferentes pasajes celulares infectados con PCV2 tratados con D-Glucosamina.

Nº de pasaje celular con tratamiento*	Ct	log[ADN]	Copias por reacción	Copias/mL de medio
3	indeterminado	--	--	--
4	31,6	2,32	210	4200
5	31,5	2,35	224	4480
6	31,5	2,35	224	4480
7	31,4	2,37	239	4780
Control sin infectar	indeterminado	--	--	--

*Células infectadas tratadas con D-Glucosamina

4.11.2.2 Diseño y construcción de un potencial clon infeccioso de PCV2.

Si bien en un principio se contaba con un sistema de amplificación del genoma completo en 3 fragmentos utilizando la metodología descripta por Vlasakova et al. (2011) (empleada en el capítulo 2, sección 4.4) (Fig. 4.11.4), en este trabajo se diseñaron cebadores para amplificar los 1767 pb en un único fragmento de la cepa PCV2_Uy1. El diseño fue realizado de forma tal que la secuencia de los cebadores incluyera sitios para enzimas de restricción que permitan la liberación del genoma completo desde el vector de clonado y posterior re-circularización mediante la utilización de una T4 ADN ligasa. De esta forma podría usarse como clon infeccioso, tras la transfección del ADN doble cadena circularizado en una línea celular. Con este fin, se buscó un sitio de restricción que estuviera presente en el genoma de PCV2_Uy1 y que a su vez sea de corte único. Para ello, se utilizó el programa NEBcutter v 2.0 (Vincze et al., 2003) y fue seleccionado el sitio SacI. La enzima de restricción SacI genera un corte en la posición 377 del genoma viral (Fig. 4.11.5). Tomando esa secuencia como referencia fueron diseñados los cebadores, los cuales se detallan en la Fig. 4.11.6. Posteriormente, se optimizó la PCR, la cual se realizó en un volumen final de 50 µL conteniendo buffer de PCR 1X, MgCl2 1.5 mM, 0.5 µM de cada cebador, 0.2 mM de cada dNTP, 1.5 U de Taq ADN polimerasa (Thermo Fisher Scientific, EE.UU) y 10µL de ADN molde. El ciclado de la PCR se determinó en un paso inicial de 94ºC 5min con 40 ciclos de 94ºC 1min, 58ºC 1min 30 seg y 72ºC 1min 30seg, seguido de una extensión final de 10 min a 72ºC. Si bien se logró amplificar el genoma completo no pudo ser clonado utilizando el kit CloneJET PCR Cloning (Thermo Fisher Scientific, EE.UU).

Por lo tanto, el genoma fue clonado en el vector FastBac^{TM} (Therno Fisher Scientific, EE.UU) mediante el empleo de una técnica alternativa libre de enzimas de restricción, denominada RF Cloning, en inglés. Esta metodología se basa en la amplificación por PCR de un fragmento de ADN, que sirve como un megacebador para la amplificación lineal del vector y el inserto. El plásmido parental se digiere mediante la enzima DpnI, la cual cliva el ADN metilado. El tamaño total de la inserción y el vector está limitado a 15 kb, aunque se pueden realizar construcciones más largas con una eficiencia menor (van den Ent y Löwe, 2006).

Para el desarrollo de esta metodología se diseñaron nuevos cebadores los cuales contienen nucleótidos complementarios al vector (aproximadamente 30) seguido de la secuencia

previamente diseñada para la amplificación del genoma. Se denominaron FastBacPCV2F y FastBacPCV2R (Fig.4.11.7).

En una primera PCR se amplificó el megacebador, el cual contiene el genoma completo de PCV2_Uy1 flanqueado por secuencias homólogas al vector FastBac^{TM} utilizado. La PCR se realizó en un volumen final de 50 µL conteniendo buffer de PCR 1X, $MgCl_2$ 1.5 mM, 0,5 µM de cada cebador (FastBacPCV2F y FastBacPCV2R), 0.2 mM de cada dNTP, 2 U de Taq Platinum ADN polimerasa (Thermo Fisher Scientific, EE.UU) y 1µL de ADN molde. Las condiciones del ciclado fueron: 94ºC durante 2 min, seguidos por 35 ciclos de 30 seg a 94ºC, 30 seg a 50 ° C y 2 minuto a 72 ° C. Posteriormente, se observó el producto de amplificación en un gel de agarosa 1.5% (Fig. 4.11.8) y se purifica el megacebador desde el gel utilizando un kit comercial (Zymoclean ™ Gel DNA recovery kit, EE.UU). Por último, fue cuantificado en un NanoDrop ™ (Thermo Fisher Scientific, EE.UU).

En una segunda PCR se utilizó 200ng del megacebador purificado y 40 ng del vector utilizado como ADN molde, en un volumen final de 50 µL conteniendo a su vez buffer de PCR para Phusion HF 1X, 0.2 mM de cada dNTP y 1.5 U de Phusion High-Fidelity ADN polimerasa (Thermo Fisher Scientific, EE.UU). El ciclado utilizado fue: 98ºC durante 30 seg, seguido de 30 ciclos de 98ºC 10 seg, 62ºC 30 seg y 5 min a 72ºC. Por último, un paso de extensión final de 7min a 72ºC. El producto de esta PCR se muestra en Fig. 4.11.8. Posteriormente, para eliminar el plásmido parental metilado, 17 µL de la amplificación de la segunda PCR fueron digeridos por 1h a 37ºC con 1 µL de la enzima DpnI en 1X de buffer Tango (Thermo Fisher Scientific, EE.UU). Luego del periodo de incubación, la enzima fue inactivada a 80ºC durante 20 min. El producto digerido (2 µL) se utilizó para transformar DH5-alfa *Escherichia coli* químicamente competentes (New England, BioLabs, EE. UU.). Se utilizaron placas de LB (medio Luria-Bertani) agar con ampicilina 100 µg/mL. Las colonias obtenidas fueron testeadas mediante *PCR colony* (Fig.4.11.9). Los plásmidos con inserto fueron purificados utilizando un kit comercial (kit Zyppy ™ Plasmid Miniprep, EE.UU.) y fueron secuenciados mediante el Servicio de Secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo. Para la secuenciación se utilizaron los cebadores FastBacPCV2F y FastBacPCV2R, y otros cebadores internos a la secuencia clonada como capFw y capRw (descritos en el capítulo 3, sección 4.6). Se analizó la secuencia de 3 clones diferentes y se observó que sólo uno de ellos presentaba la secuencia 100%

idéntica a PCV2_Uy1 y se identificó la presencia de los sitios SacI a ambos extremos del inserto. Se muestra el diagrama esquemático de la contrucción que contiene el genoma completo (Fig.4.11.10).

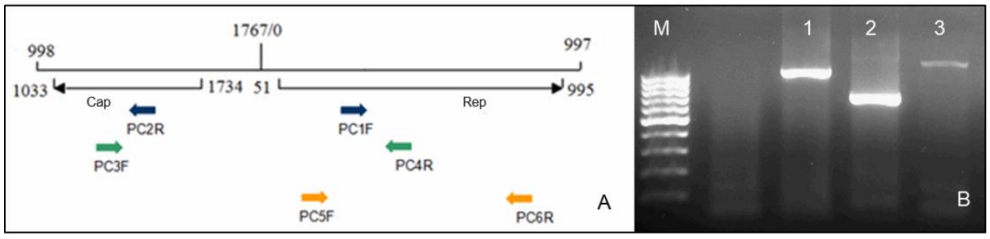


Fig.4.11.4. Amplificación por PCR del genoma completo en 3 fragmentos solapados. A) Esquema de la localización en el genoma linealizado de los cebadores diseñados por Vlasakova et al. (2011). B) Gel de agarosa 1.5% que muestra los fragmentos amplificados por PCR del genoma de PCV2_Uy1. En 1, 2 y 3 se muestran los fragmentos amplificados de 976 pb, 638pb y 1140pb utilizando los cebadores mostrados en A en verde, anaranjado y azul, respectivamente. M: marcador de peso molecular de 100pb (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.).

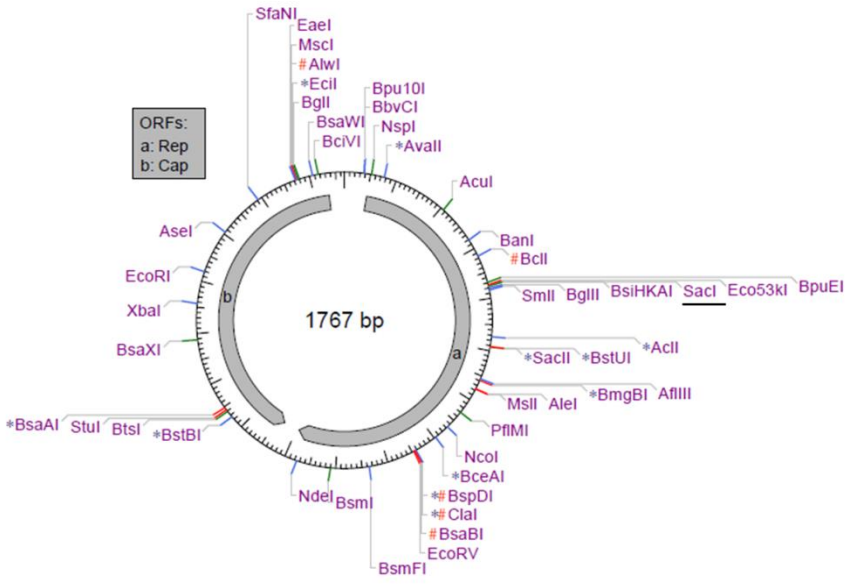


Fig.4.11.5. Análisis de los sitios de corte para enzimas de restricción en el genoma completo de PCV2_Uy1. Imagen obtenida con el programa NEBcutter v 2.0. Se indica el sitio SacI (delineado) que corta en la posición 377 del genoma.

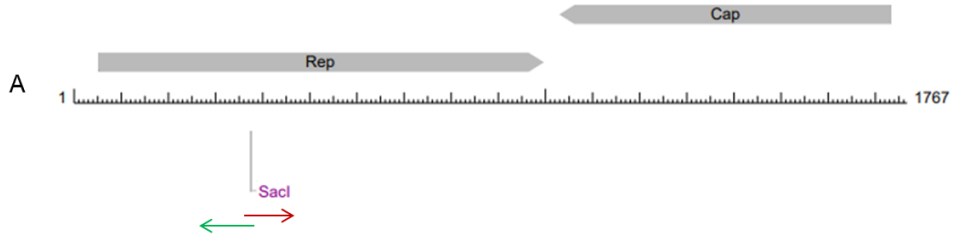


Fig.4.11.6. Cebadores diseñados para la amplificación por PCR del genoma completo de PCV2_Uy1. A) Imagen obtenida con el programa NEBcutter v 2.0 del genoma linealizado de PCV2_Uy1. Se indica el sitio de corte de SacI y la localización de los cebadores diseñados forward (rojo) y reverse (verde). B) se detalla la secuencia de cada uno de los cebadores y se indica el sitio de corte de la enzima.

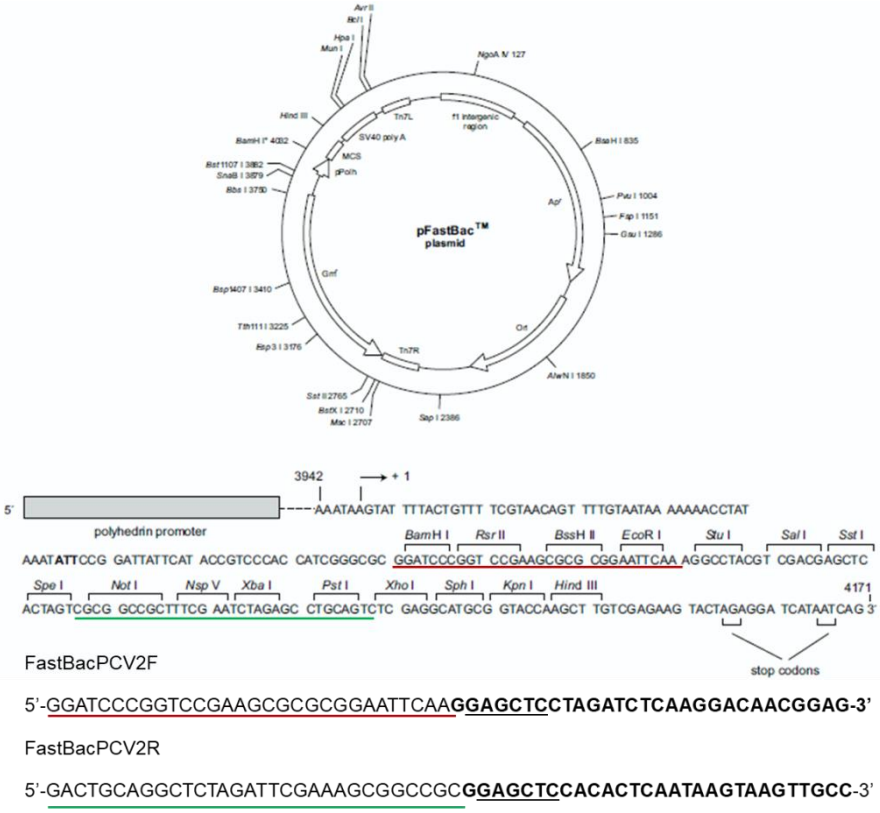


Fig.4.11.7. Cebadores diseñados para la técnica de RF Cloning. Se muestra el vector utilizado FastBac™ (Thermo Fisher Scientific, EE.UU). Se indica las secuencias complementarias al vector utilizadas para el diseño de los cebadores. En rojo se detalla la secuencia del cebador f*orward* y en verde la *reverse*. Cada cebador contiene a su vez la secuencia para amplificar el genoma completo de PCV2_Uy1 (en negrita). Se señala el sitio de restricción SacI. Cada cebador tiene una longitud aproximada de 60 nt, la mitad corresponde a secuencia del vector y la mitad a secuencia viral.

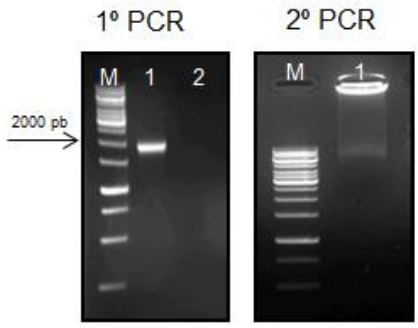


Fig.4.11.8. PCRs realizadas para RF Cloning. Se muestra el gel de agarosa 1.5% del producto de la primera PCR en donde se obtiene en el carril 1 el megacebador que consiste en el genoma completo de PCV2_Uy1 (1767pb) flanqueado de secuencias complementarias al vector (60 pb), lo que genera un fragmento total de 1827 pb. En el gel de la derecha se muestra el producto de la segunda PCR donde se utiliza como molde al vector y como cebadores al megacebador. En ambos geles se utilizó un marcador de peso molecular de 1kb (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.).

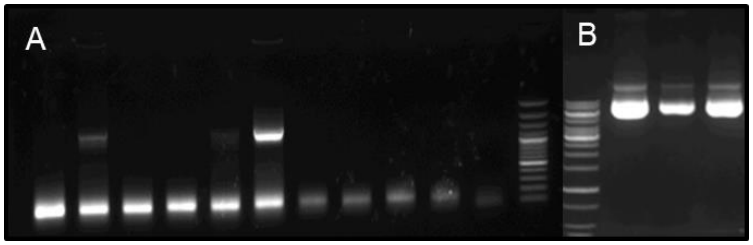


Fig.4.11.9. Identificación y purificación de plásmidos con inserto. A) Se muestra el gel de agarosa 1.5% del producto de la *PCR colony*, la cual permitió identificar 3 colonias que tenían el plasmido con el genoma completo de PCV2_Uy1. B) Se muestran los plásmidos purificados a partir de las colonias que fueron confirmadas por PCR colony. En gel A se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb plus y en B uno de 1kb (Thermo Fisher Scientific, EE.UU).

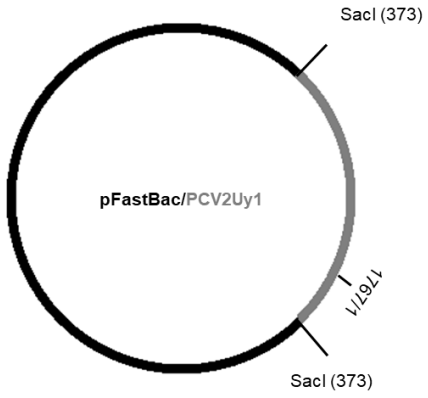


Fig.4.11.10. Diagrama esquemático de la construcción que contiene el genoma completo de PCV2_Uy1. Se muestra la localización del inserto (gris) en el vector pFastBac (negro). La secuencia del inserto incluye los sitios SacI en sus extremos y se indica la posición del genoma a la que corresponde. También se detalla la posición del primer y último nucleótido del genoma.

4.11.3. Discusión.

En este trabajo no se obtuvieron datos concluyentes sobre el aislamiento viral de una cepa de campo de PCV2. Si bien se pudo detectar ADN del virus a partir del 4º pasaje celular tratado con D-Glucosamina, los datos de la qPCR muestran que no hay un crecimiento del virus a través de los pasajes sucesivos. Se pudo observar una replicación basal del genoma sin producción evidente de partículas virales. Asimismo, la concentración de D-Glucosamina comúnmente empleada para el aislamiento en la línea celular PK-15 es de 300mM (Tischer et al., 1987). Sin embargo, esta concentración resultó muy tóxica para las células ST, incluso a una concentración de 100mM luego de pasajes sucesivos. De todas formas, se pudo observar ADN viral en pasajes celulares sin tratamiento, aunque la replicación viral resultó ser más lenta en comparación con las células tratadas con D-Glucosamina (Fig.4.11.2). Si bien algunos autores han reportaron el aislamiento del virus en células ST sin tratamiento con D-Glucosamina (Viancelli et al., 2012), en este caso ese procedimiento dificultaría aún más el aislamiento. De hecho, se debería optimizar la técnica realizando numerosos pasajes celulares con tratamiento de D-Glucosamina 30mM o con otros tratamientos, como el interferón, que se ha visto que pueden aumentar la replicación *in vitro* de PCV2 (Meerts et al., 2005b).

Cabe destacar que si bien la muestra empleada proviene de un linfonódulo infectado, muestra por excelencia para el aislamiento de PCV2, esta es de un lechón con EE. Como se mencionó anteriormente las muestras derivadas de animales con PCV2-SD son las más óptimas para el aislamiento de PCV2. En Uruguay, no contamos con la capacidad diagnóstica de la PCV2-SD. En esta tesis se investigaron dos de los tres requisitos necesarios para su diagnóstico. Por un lado, la identificación de los síntomas compatibles por parte de los profesionales veterinarios que colaboraron en el trabajo y por otro, la detección del agente viral. El tercer requerimiento es la histopatología de órganos del animal afectado que permitan determinar las lesiones microscópicas características (Segalés, 2012). Por lo tanto, debido a que se requiere de la participación multidisciplinaria de varios profesionales con especialidades diferentes interesados en una misma temática, es que muchas veces es muy difícil el diagnóstico de la enfermedad. De hecho, si bien PCV2 es un virus ubicuo, la enfermedad aún no ha sido descrita en muchos países. La identificación de muestras con PCV2-SD en Uruguay permitiría avanzar

con la optimización del aislamiento de cepas de PCV2 que circulan en el país, teniendo una mayor accesibilidad para emprender estudios de caracterización biológica.

De todos modos, de la revisión bibliográfica sobre PCV2 se puede observar, que el virus no es fácilmente cultivable y que incluso PCV1 replica más eficientemente en células PK-15 (Zhang et al., 2018). Tal vez, esto explique la falta de caracterización biológica de muchas cepas de PCV2 recombinantes que se han identificado o incluso de genomas con deleciones. Es por ello, que algunos investigadores han recurrido a la construcción de clones infecciosos (Guo et al., 2011).

De hecho en este trabajo, como alternativa, se diseñó un clon infeccioso basado en el clonado del genoma completo de la cepa PCV2_Uy1 en el sitio de restricción Sac I. Su liberación del vector y posterior re-circularización con una ligasa, permiten la obtención del genoma circular de 1767 pb. Resta probar la transfección del ADN circularizado en una línea celular. Como se describió en el capítulo 5 de esta tesis (sección 4.10), las células ST no son eficientes para la tansfección. Por lo tanto, otras líneas celulares que sean permisivas para la replicación de PCV2 y que a su vez, admitan una adecuada transfección deben ser utilizadas. Justamente, la línea celular PK-15 cumple con ambos requisitos, pero como se ha detallado anteriormente no se encuentra disponible sin contaminación con PCV1. Idealmente, la obtención del sub-clon PK-15 altamente permisivo reportado por Chen et al. (2013) sería lo deseable para avanzar en los estudios de biología básica del virus.

4.12. Capítulo 7. Expresión de un fragmento de la cápside de PCV2 en un sistema de presentación de antígeno al sistema inmune basado en las propiedades de auto-brotación de la proteína Z del virus Junin como plataforma para el desarrollo de una vacuna contra PCV2.

4.12.1. Introducción

Si bien las vacunas comerciales actuales basadas en el genotipo PCV2a han mostrado ser efectivas en reducir los signos clínicos de las PCVAD, los desafíos heterólogos no inhiben la carga viral a un 100% y a su vez, se ha reportado la emergencia de nuevas cepas o variantes asociadas a la presión selectiva ocasionada por la vacunación (Karuppannan y Opriessnig, 2017). Por lo tanto, la situación actual justifica una mayor experimentación a largo plazo en el campo de las vacunas de PCV2 con el objetivo de controlar simultáneamente la emergencia y re-emergencia de genotipos, ya sea con vacunas homóloga o heterólogas e incluso con vacunas de genotipos múltiples (revisado por Karuppannan y Opriessnig, 2017).

En este capítulo se plantea expresar un fragmento de la proteína de cápside de PCV2 en un sistema de vehiculización y presentación de antígenos al sistema inmune, basado en las propiedades de auto-brotación de la proteína Z del virus Junin (JUNV, por sus siglas en inglés), con el fin de ser utilizado como plataforma para el desarrollo de una vacuna contra PCV2. Este sistema fue previamente descrito por Borio et al. (2012), y consistió en la construcción de un plásmido capaz de expresar la proteína Z del JUNV fusionada con la proteína GFP, que permite la producción, en células HEK293T, de vesículas pseudovirales (partículas de tipo viral o VLP) que contienen el antígeno en el interior (Fig.4.12.1A). A su vez, estas VLPs fueron purificadas del sobrenadante celular y se realizó la inmunización de ratones lo que produjo altos títulos de anticuerpos anti-GFP en comparación con los controles, incluso en ausencia de adyuvantes exógenos (Fig.4.12.1B).

En el marco de un proyecto CABBIO realizado en conjunto con investigadores de Argentina y Brasil, este sistema fue utilizado con diferentes proteínas inmunogénicas (o epítopes de las mismas) de distintos patógenos, entre ellos PCV2. La ejecución de este proyecto dio lugar a la patente titulada “Polypeptide comprising an epitope of the E protein of the dengue virus, polynucleotide and genetic construct encoding the same, Virus-Like Particles (VLPs) comprising said polypeptide, transgenic cell expressing the same, vaccines and method for treating

Dengue virus disease" con número de solicitud 62147274, provisionalmente enviado el 14 de abril de 2015 y marca registrada de los Estados Unidos.

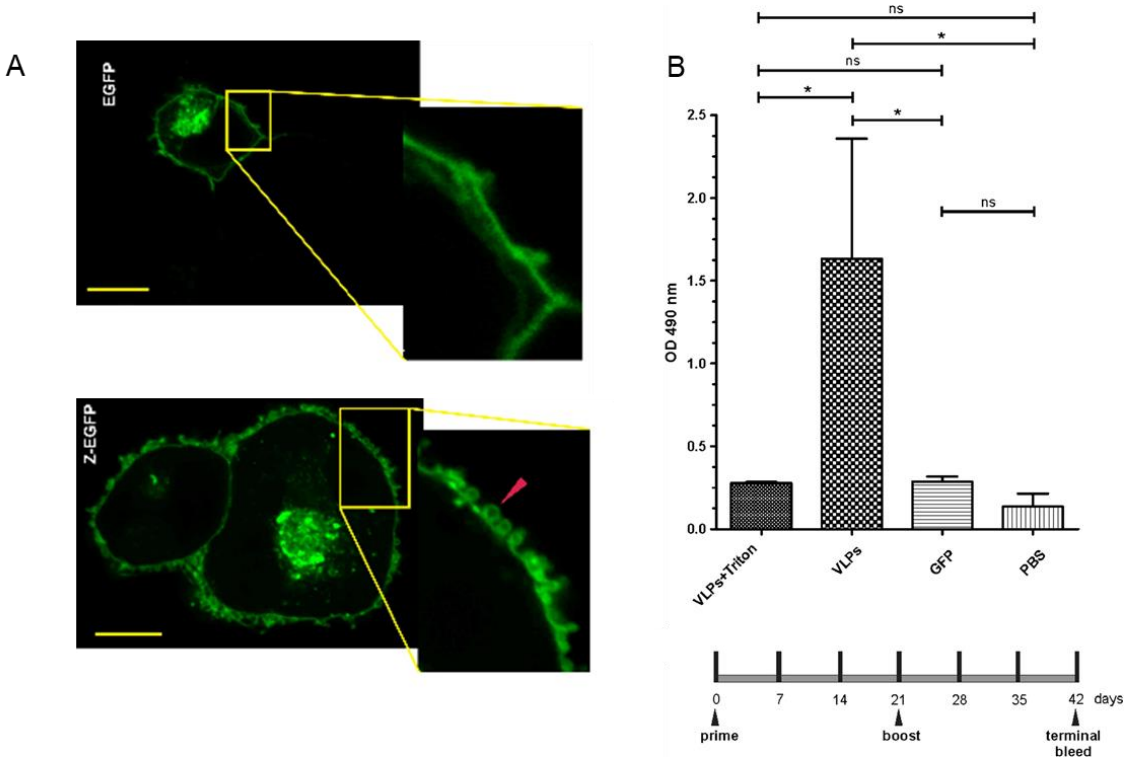


Figura 4.12.1 Sistema de presentación de antígeno al sistema inmune basado en las propiedades de auto-brotación de la proteína Z del virus Junin. A) Microscopía confocal de células HEK293T transfectadas con pGFP-N3 y pZ-GFP. Únicamente en las células transfectadas con pZ-GFP se observan pequeñas protuberancias en la membrana, que pueden indicar la formación de brotes (flecha). B) Respuesta IgG total específica contra GFP. Grupos de ratones Balb / C fueron inmunizados por vía intramuscular dos veces con VLPs Z-GFP, VLPs tratadas con Triton X-100, GFP y PBS. Debajo se detalla el cronograma de inmunización utilizado. Extraída con modificaciones de Borio et al. (2012).

4.12.2. Estrategia metodológica y resultados obtenidos.

4.12.2.1. Construcción del vector recombinante pZ-PCV2

Debido a que la proteína de la cápside de PCV2 se autoensambla y forma VLPs en sistemas de expresión procariota y eucariota (López-Vidal et al., 2015; Wu et al., 2016), se decidió no colocar la proteína completa fusionada a Z sino que un fragmento de la misma, de forma tal que se mantenga la estabilidad estructural del sistema diseñado. Por un lado, se eliminó el extremo N-terminal que contiene el sitio de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés) de la proteína (1-41aa). Recientemente, se ha demostrado que la *Cap* de PCV2 sin el NLS (ΔCP) puede expresarse en diferentes sistemas con mayor facilidad y a su vez, es capaz de inducir la producción de anticuerpos específicos en ratones lo que indica que puede usarse como candidato en vacunas (Xiao et al., 2018). Sin embargo, ΔCP tiene la habilidad de formar VLPs, por lo que se decidió remover otro fragmento de la cápside para evitar el auto-ensamblaje, en particular fueron eliminados 15 aa del extremo C-terminal. Justamente, se ha observado para otros virus, que la deleción de la región C-terminal de la proteína de cápside afecta la eficiencia de la formación de VLPs (Yamaguchi et al., 2014). Por lo tanto, fueron clonados 528 pb del gen *cap* de PCV2_Uy1 que corresponden a 176 aa de la proteína (aa 43-218). El vector utilizado fue el descrito en Borio et al. (2012) denominado pZ-GFP y para el clonado del fragmento se utilizó la técnica *RF Cloning* de acuerdo a lo detallado en el capítulo anterior. Debido a que GFP está flanqueada de los sitios de restricción BamHI y NotI, los cebadores se diseñaron de tal forma de incluir estos sitios pero de eliminar la secuencia de GFP, colocando la secuencia de la cápside en marco con la secuencia codificante de la proteína Z. Los cebadores diseñados se detallan en la figura 4.12.2. Utilizando estos cebadores y la muestra de ADN de PCV2_Uy1 se realiza la PCR 1. Posteriormente, se purifica el megacebador y se realiza la PCR 2 utilizando el vector pZ-GFP como molde. El producto obtenido de esta PCR se digiere con DpnI y luego de la inactivación de la enzima se procede a la transformación de bacterias competentes DH5-alfa (New England, BioLabs, EE. UU.). Se utilizaron placas de LB agar con kanamicina 50 µg/mL. Por PCR colony se identifican los plásmidos con el inserto de interés. Finalmente, estos fueron purificados y secuenciados por el Servicio de Secuenciación Macrogen, Korea. Se confirmó que la secuencia del inserto era 100% idéntica a PCV2_Uy1. Asimismo, se pudo corroborar que la misma estaba localizada en

la posición 3’ de la secuencia codificante de Z, en lugar de GFP. Los resultados del procedimiento se detallan en la figura 4.12.3.

pZPCV2CapF 5’-GCCAACAGCACCACCACCAGGATCCGGCATCTTCAACACCCGC-3’
pZPCV2CapR 5’-ATTATGATCTAGAGTCGCGGCCGCATACATGGTTACACGGATATTG-3’

Figura 4.12.2 Cebadores diseñados para la técnica de RF Cloning. Se indica las secuencias complementarias al vector pZ-GFP en gris. Se detallan los sitios de restricción BamHI (Forward) y NotI (Reverse) (delineado). La zona no coloreada corresponde a la secuencia para amplificar 528 pb del gen *cap*.

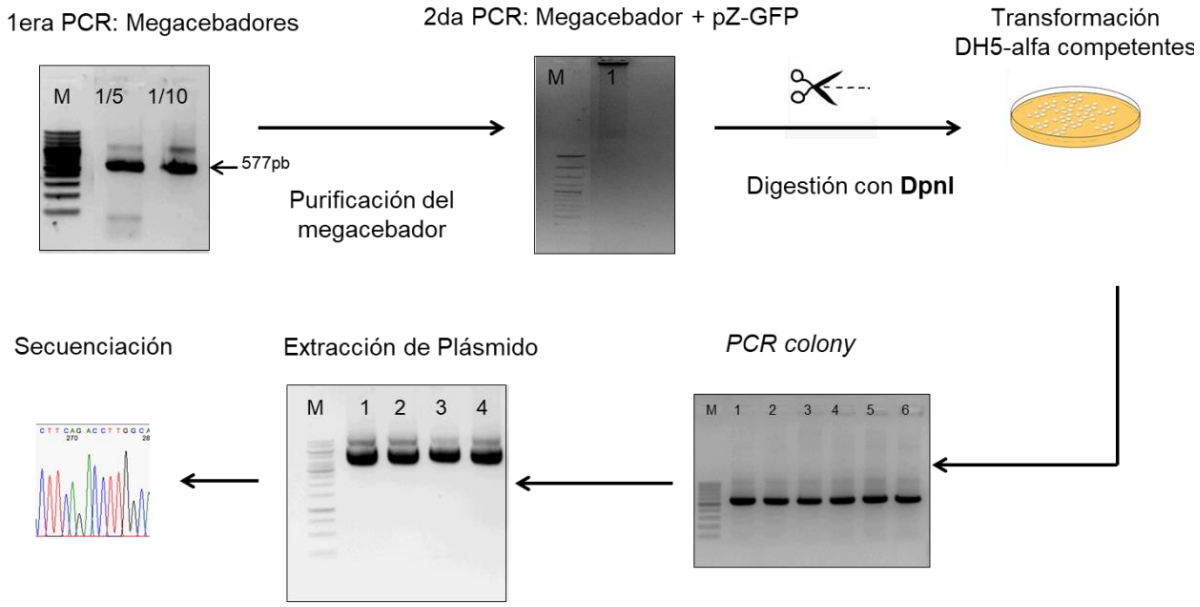


Figura 4.12.3 Procedimiento de RF Cloning para el clonado del fragmento *cap* de PCV2_Uy en pZ-GFP. En la primera PCR se utilizaron diluciones (1:5 y 1:10) de la muestra y se obtuvieron los 577 pb esperados (528 + 49 de la secuencia correspondiente al vector). La segunda PCR se lleva a cabo con el megacebador purificado y el vector pZ-GFP. Luego se digiere el parental metilado y se transforman bacterias competentes. Se realiza la PCR colony a partir de colonias elegidas al azar y luego de observar la amplificación del inserto se lleva a cabo la extracción de los plásmidos correspondientes. Finalmente, se secuencian los plásmidos purificados. En los geles que muestran la amplificación del megacebador y los productos obtenidos en la PCR colony se utilizó un marcador de peso molecular (M) de 100pb. Por otro lado, en los geles que muestran el producto de la segunda PCR y la purificación de los plásmidos se incluyó un marcador de peso molecular de 1kb (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.).

4.12.2.2. Transfección transitoria y purificación de las VLPs

Previo a la transfección transitoria en las células, para obtener una alta concentración y pureza del plásmido, se utilizó el kit de maxiprep NucleoBond® Xtra Midi / Maxi (Macherey-Nagel, Alemania) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se obtuvo un rendimiento de concentración del plásmido con el inserto de 3.5 µg/µL y fue almacenado a -20ºC.

Al igual que en Borio et al. (2012), se utilizó la línea celular HEK293T (células de riñón embrionario humano transformadas con ADN de adenovirus tipo 5) las cuales fueron mantenidas en medio Dulbecco-Eagle (DMEM, por sus siglas en inglés) (Capricorn Scientific, Alemania), con glutamina estable, suplementada con 10% de SFB, 100 U/mL de penicilina G y 100 µL/mL de estreptomicina a 37ºC en una estufa humidificada con 5% de CO2.

Las células HEK293T se sembraron en botellas de 75 cm^2 y cuando alcanzaron un 80% de confluencia, 15 µg de ADN de pZ-GFP y pZ-PCV2 se transfectaron por separado con 30 µL de Lipofectamine® LTX con Plus ™ Reagent (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.), según las indicaciones del fabricante. También se incluyó un control sin transfectar. Después de 48 h las células se observaron por microscopía de epifluorescencia, y según lo esperable, se observó señal únicamente en las células transfectadas con pZ-GFP (Fig.4.12.4).

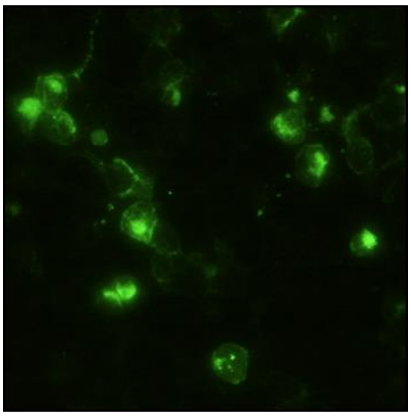


Fig.4.12.4 Microscopía de epifluorescencia de células HEK293T 48h post-transfección con pZ-GFP. Se observa la expresión de la proteína de fusión pZ-GFP. Se visualiza en algunas células una distribución punteada en el citoplasma celular. A su vez, se puede observar su localización a nivel de la membrana plasmática. Magnificación original 20X.

Luego de las 72 h de incubación se realizó el procedimiento de purificación a partir del sobrenadante del cultivo celular transfectado (pZ-PCV2 y pZ-GFP) y del control sin transfectar. Primeramente, para sedimentar los restos celulares, se centrifugó a 2800g 20min a temperatura ambiente (TA) y 12.5 mL fueron purificados en un gradiente de sacarosa 30% m/v a 96000g durante 2 h a 4ºC (Fig.4.12.5). Los pellet fueron resuspendidos en PBS 1X y almacenados a 4ºC.



Fig.4.12.5. Purificación de VLPs. Ultracentrifugación en colchón de sacarosa 30%. Tubos de 26.9mL.

4.12.2.3. Detección y caracterización de las VLPs

4.12.2.3.1. Microscopía electrónica de transmisión.

Para visualizar las VLPs al microscopio electrónico se realizó una tinción negativa. Para ello, se colocó 10 µL de la muestra en la grilla de Formvar-Carbon con 200 aperturas (mesh) durante 2 min. Luego, se sacó el exceso con papel de filtro y se colocó 10 µL de acetato de uranilo 2% acuoso por 2 min. Se dejó secar bien antes de colocar en el microscopio (Servicio de microscopía electrónica, Facultad de Ciencias, UdelaR). Se observó la presencia de estructuras electrón-densas de un diámetro aproximado entre 80-110 nm en las muestras transfectadas con pZ-PCV2 y pZ-GFP. Estas partículas estaban ausentes en el control sin transfectar. En la figura 4.12.6 se detallan las estructuras observadas para pZ-PCV2. A su vez, se muestran los resultados obtenidos para los controles (Fig. 4.12.7).

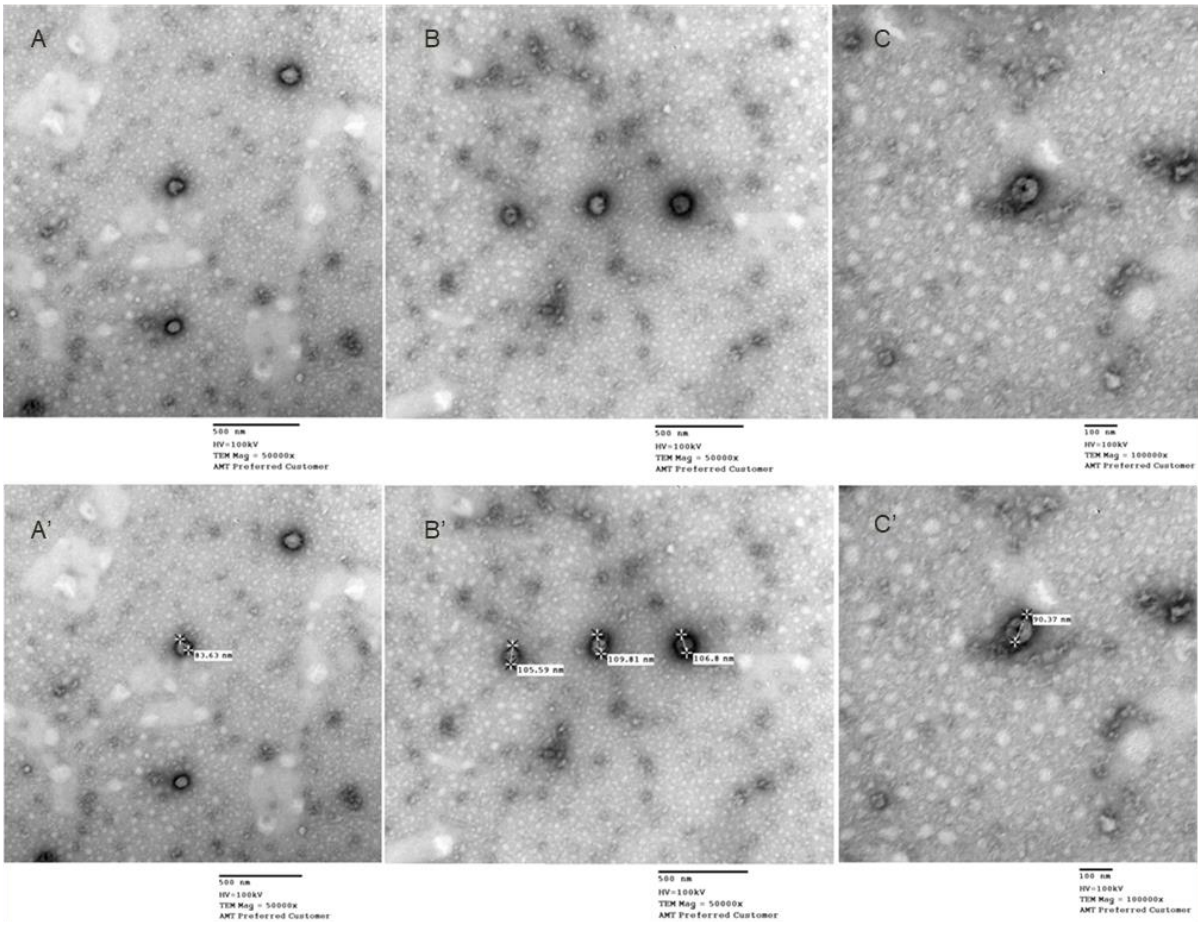


Figura 4.12.6 Microscopía electrónica de transmisión de VLPs Z-PCV2. Se observan varias estructuras electrón-densas por campo (A y B). En C se muestra una estructura aumentada 5 veces con respecto a las visualizadas en A y B. Debajo se muestran las mediciones correspondientes (A', B' y C').

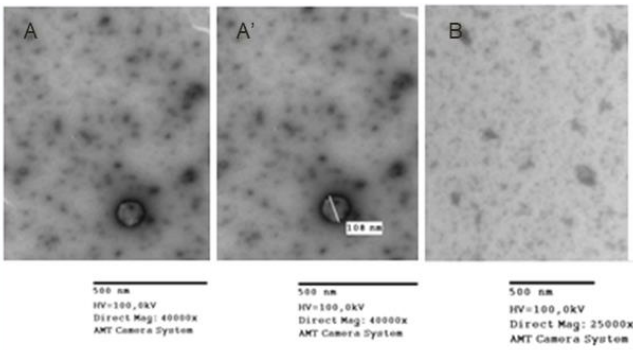


Figura 4.12.7 Microscopía electrónica de transmisión de las purificaciones realizadas para los controles. En el sobrenadante purificado de células transfectadas con pZ-GFP se observan estructuras electrón-densas similares a las observadas para Z-PCV2. En A se muestra un ejemplo y en A' la medición de su diámetro (108nm). No se observan estructuras con esas características en los diferentes campos observados de la purificación del sobrenadante del control de células sin transfectar (B).

4.12.2.3.2. Caracterización de las VLPs por dot plot y western blot

Con el fin de identificar la presencia de la proteína Z en las muestras purificadas se realizó primeramente la técnica de dot plot. Para ello, 2 µL de cada una de las muestras (Z-GFP, Z-PCV2 y control sin transfectar) fueron aplicados en una membrana de nitrocelulosa (BioRad, EE.UU.). La membrana fue bloqueada con buffer PBS-BSA 5% m/v durante 2 h a TA y posteriormente, lavada con PBS-Tween 0.05% v/v (PBS-T). Se colocó el anticuerpo primario policlonal específico contra la proteína Z diluido 1:1000 en PBS-T BSA 0.1% durante 1h a TA y luego, se lavó la membrana 3 veces con PBS-T. Se colocó un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina (1:5000 en PBS-T BSA 0.1%) durante 1h a TA (abcam, EE.UU.). Posteriormente, se lavó 2 veces con PBS-T y una vez con PBS. Por último, fue revelado con el kit de detección cromogénica de la fosfatasa NBT/BCIP (Thermo Fisher Scientific, EE.UU) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Este procedimiento permitió identificar la presencia de la proteína Z tanto en las VLPs Z-PCV2 como en las Z-GFP (Fig.4.12.8A) y se procedió a realizar la técnica de western blot para observar diferencia de tamaño entre ambas proteínas de fusión con Z. Para ello, primeramente las muestras se mezclaron con buffer de carga 4X (NuPAGE^{TM} LDS sample buffer, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) y ditiotreitol (DTT, concentración final 20mM), y se incubaron a 95ºC por 10 min. Luego, fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) en una concentración al 15%, junto a un marcador pre-teñido de 10-250 kDa (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). Se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa (BioRad, EE.UU) en buffer Tris-glicina (Tris base 25mM y glicina 200mM) con 20% v/v de metanol. Luego la membrana fue bloqueada con PBS-BSA 1% e incubada con los anticuerpos primario y secundario según el procedimiento detallado para el dot plot.

El resultado del western blot muestra los tamaños esperados para cada una de las proteínas de fusión no observándose señal en el control negativo. La proteína Z de JUNV y GFP tienen un tamaño de 11kDa y 26.9 kDa, respectivamente (Borio et al., 2012). Por lo tanto, se espera que la proteína de fusión Z con GFP sea de 37.9 kDa. En el caso de la proteína de fusión Z-PCV2, debido a que el fragmento de la cápside de PCV2 es de 176 aa lo que

aproximadamente corresponde a 19.5 kDa, se espera observar una proteína de fusión de 30.5 kDa (Fig.4.12.8B).

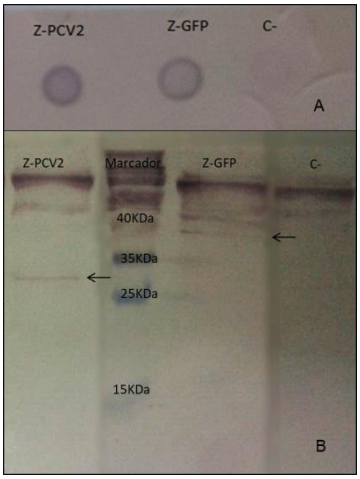


Figura 4.12.8 Caracterización de las VLPs. A) Se identificó por dot blot la presencia de la proteína Z en las VLPs Z-PCV2 y Z-GFP. B) Mediante la técnica de western blot se observaron los tamaños esperados para las proteínas de fusión con Z de JUNV. Z-PCV2 (30.5kDa) y Z-GFP (37.9 kDa). C-: control celular sin transfectar.

4.12.3. Discusión

La proteína Z de JUNV es una proteína de la matriz del virión que favorece la brotación. Se ha reportado para varios virus de la familia *Arenaviridae* que la expresión de esta proteína es suficiente para inducir la liberación de partículas envueltas que contienen Z (Strecker et al., 2003; Casabona et al., 2009; Urata et al., 2009; Shtanko et al., 2010). Asimismo, Borio et al. (2012) demostró que la fusión de esta proteína a una proteína heteróloga como GFP, no interfiere con su capacidad de auto-brotación. Debido a que ratones inmunizados con las VLPs que contienen Z-GFP generan anticuerpos específicos contra GFP, se plantea la utilización de la proteína Z como sistema de vehiculización de antígenos que puedan ser presentados al sistema inmune, sirviendo como plataforma para el desarrollo de nuevas vacunas.

Con el fin de expresar la proteína Z fusionada en su extremo C-terminal a un antígeno de PCV2, en este trabajo se clonó un fragmento del gen *cap* de PCV2 en un vector que contiene la secuencia codificante de la proteína Z de JUNV y este plásmido recombinante fue transfectado en células HEK293T. Se pudo evidenciar en el sobrenadante purificado de las

mismas la presencia de estructuras electrón-densas de 80-110nm similares a las observadas para las células transfectadas con pZ-GFP utilizado como control del procedimiento de transfección y purificación. Estos resultados son acordes a lo reportado por Borio et al. (2012) los cuales observaron que las VLPs producidas por la proteína Z fusionada a GFP en células HEK293T tienen un tamaño que oscila entre 40-150nm lo cual es similar al tamaño del virión de JUNV (50-100nm). A su vez, la forma de las estructuras observadas es similar a la identificada por otros investigadores integrantes del proyecto en donde se utilizó el mismo sistema pero fusionado a antígenos de otros virus como Dengue y el virus de la Hepatitis E (Mirazo, 2014; Mareze et al., 2016; Ottonelli, 2016). Por otro lado, se pudo constatar la presencia de la proteína Z en los sobrenadantes purificados tanto para Z-GFP como para Z-PCV2. Asimismo, por la técnica de western blot fue posible evidenciar el tamaño esperado de la proteína de fusión Z-PCV2 y el de la proteína control Z-GFP. Sin embargo, se observó señal inespecífica a alturas superiores a 50kDa por lo que las condiciones de la técnica deberían ser mejoradas, por ejemplo la utilización de anticuerpos más diluidos o la realización de más lavados. La expresión de la proteína GFP también fue confirmada por la observación de la fluorescencia a las 48 h post-transfección. Sin embargo, en el caso de la *Cap* de PCV2 si bien se observaron los 30kDa correspondientes a la proteína de fusión, resta realizar la confirmación mediante la utilización de un anticuerpo anti-PCV2.

En el trabajo reportado por Borio et al. (2012) las VLPs producidas contenían a la proteína GFP dentro de la estructura. Esto fue comprobado debido a que el tratamiento con proteinasa K no tuvo efecto sobre la proteína Z-GFP, pero la adición previa de Triton X-100 destruyó la envoltura lipídica y permitió la degradación de Z-eGFP por la proteinasa K. A su vez, se observó una mejor respuesta de anticuerpos contra GFP en ratones inmunizados con las VLPs que contienen el antígeno protegido en el interior, que con las VLPs tratadas con Triton X-100 o con el antígeno solo (Fig 4.12.1B). Si bien en el artículo no se demuestra la causa por la cual esto ocurre, se sugiere que puede ocurrir la disrupción parcial de la membrana de las VLPs y la consecuente exposición del antígeno, el cual puede ser reconocido por las células B del sistema inmune. Por otro lado, también plantean que como se ha demostrado que los linfocitos B pueden ser activados en los ganglios linfáticos por antígenos en su forma nativa a través de células dendríticas (Le Roux et al., 2012), este podría ser otro mecanismo por el cual las VLPs

a pesar de tener el antígeno en su interior pueden generar una respuesta de anticuerpos. Sin embargo, se necesita una caracterización exhaustiva de la respuesta inmune producida por este tipo de VLPs para poder sacar conclusiones certeras.

Tomando esto en cuenta, una vez confirmada la presencia de la proteína *cap* en el interior de las VLPs construidas, como perspectiva se plantea inmunizar ratones y analizar la respuesta de anticuerpos contra PCV2, a modo de evaluar si este sistema puede utilizarse como posible estrategia inmunoprotectora contra el virus.

Cabe resaltar que el antígeno seleccionado para PCV2 comprende 3 de los 4 dominios imunogénicos de la proteína los cuales incluyen epítopes lineales y conformacionales. Sin embargo, al remover el extremo C-terminal no incluye el dominio antigénico conformacional comprendido entre los aa 230-233. Otro de los aspectos negativos de la construcción propuesta es que el epítope "señuelo", que abarca del aa169-180 de la proteína de la cápside (Trible y Rowland, 2012), está presente en el antígeno seleccionado y puede quedar expuesto, resultando en la producción de anticuerpos no neutralizantes. Por ello, al momento de evaluar la respuesta de anticuerpos producidos en ratones inmunizados con las VLPs quiméricas Z-PCV2 todos estos aspectos deberán tenerse en cuenta e incluso sería muy interesante evaluar la respuesta inmune celular producida por este tipo de VLPs.

Debido a que las vacunas actuales contra PCV2 no generan inmunidad esterilizante, es decir que no eliminan completamente la infección, sumado a la rápida evolución del virus y el surgimiento de cepas emergentes, la generación de nuevas estrategias de vacunación que reduzcan al máximo la viremia a través de la inducción de fuertes respuestas humorales y celulares, y/o la inclusión de múltiples genotipos en la formulación vacunal, es de creciente interés. Entre los nuevos enfoques experimentales estudiados para mejorar la cobertura de las vacunas de PCV2 están las vacunas vivas atenuadas PCV1-2a expresando un epítope protector de PRRSV en el extremo C-terminal de la proteína de cápside (Pineyro et al., 2015), vacunas de PCV2 expresando un epítope protector del virus de la enfermedad de manos, pies y boca (Huang et al., 2014) y vectores poxvirales porcinos que expresan una proteína de *Streptococcus zooepidemicus* y la *Cap* de PCV2 (Lin et al., 2014). Otros enfoques recientes incluyen la expresión de la proteína de cápside en fusión con flagelina bacteriana que mejora

las respuestas Th1 y Th2 (Zhu et al., 2016), la incorporación a la proteína de cápside de PCV2 de motivos CpG o del gen IL-18 porcino en una vacuna de ADN (Chen et al., 2014; Li et al., 2015) y vacunas de virus quimérico PCV1 con *Cap* de genotipos múltiples de PCV2 (Matzinger et al., 2016).

5. Parte II. Estudio de TTSuV en Uruguay

5.1. Revisión bibliográfica

5.1.1 Taxonomía viral y características generales

El Torque Teno virus (TTV) fue descubierto en Japón en el año 1997 en un paciente con hepatitis aguda post-transfusional de etiología desconocida (hepatitis no A-E) (Nishizawa et al., 1997). Desde entonces, han sido identificadas numerosas cepas de TTV que infectan no solo humanos (TTVh) sino que también a numerosas especies animales domésticas y salvajes, incluyendo cerdos (denominado TTSuV) (Okamoto et al., 2002; Okamoto, 2009). Los TTVs son virus pequeños no envueltos y presentan una simetría icosahédrica con diámetros de 30-50nm (Fig.5.1.1). El genoma es de ADN circular con una longitud variable de 2.1-3.9 kb. Si bien estructuralmente se asemejan mucho a los Circovirus, no tienen ninguna semejanza genética (Mushahwa et al., 1999; Kekarainen y Segalés, 2012). A partir del año 2009, fueron clasificados dentro de la familia *Anelloviridae*, la cual comprende 12 géneros diferentes (ICTV, 2017). Particularmente, dentro de los TTSuV se pueden distinguir dos géneros virales distintos: *Iotatorquevirus y Kappatorquevirus*, o TTSuV1 y TTSuVk2, respectivamente. A su vez, recientemente se ha definido que TTSuV1 incluye dos especies, TTSuV1a y TTSuV1b, y que TTSuVk2 comprende la especie TTSuVk2a y la especie recientemente identificada, TTSuVk2b (ICTV, 2017).

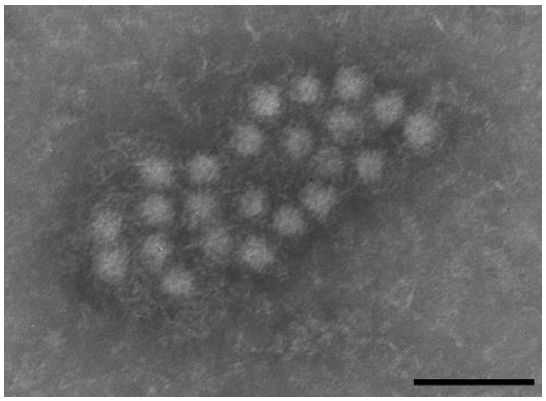


Figura 5.1.1. Microscopía electrónica de transmisión de partículas de TTV. Se observan partículas agregadas con un diámetro de 30-32 nm en muestras de suero con títulos de 10^8 copias/mL. La barra de escala representa 100 nm. Imagen extraída de Itoh et al., 2000.

5.1.2 Descubrimiento de TTSuV y distribución actual.

Si bien, la primera identificación de ADN de TTV en cerdos fue descrita por Leary et al. (1999), la primera caracterización genética y amplificación del genoma completo de TTSuV fue reportada por Okamoto et al. (2002). Sin embargo, un estudio retrospectivo realizado en España reveló que este virus ha estado infectado a los cerdos desde al menos el año 1985 (Segalés et al., 2009).

TTSuV ha sido identificado en suero porcino en varios países de todo el mundo con tasas de prevalencia que van del 24% al 100% (McKeown et al., 2004; Bigarré et al., 2005; Kekarainen et al., 2006; Taira et al., 2009; Gallei et al., 2010). Es un virus, al igual que PCV2, de distribución ubicua, ya que todas las granjas estudiadas hasta el momento tienen animales infectados con TTSuV (Kekarainen y Segalés, 2012). Asimismo, si bien existen pocos reportes, se ha identificado la presencia del virus en poblaciones de jabalí de Europa (Martínez et al., 2006; Cadar et al., 2013).

5.1.3. Asociación con la enfermedad en el cerdo y transmisión

El rol de los *anellovirus* en la manifestación de una enfermedad se encuentra actualmente en debate. Se ha sugerido que TTVh se asocia a diferentes patologías como las enfermedades reumáticas autoinmunes (Gergely et al., 2006), patologías hepáticas (Nishizawa et al., 1997; Kasirga et al., 2005) y enfermedades respiratorias (Biagini et al., 2003). Sin embargo, no hay datos definitivos que indiquen que TTV es el responsable de una enfermedad humana específica. En el caso del cerdo, el TTSuV infecta a una alta proporción de animales que son aparentemente sanos (Kekarainen y Segalés, 2009). Por lo tanto, actualmente se considera que no produce enfermedad por si solo en el cerdo, aunque la co-infección de TTSuV con otros patógenos porcinos puede resultar en la exacerbación de la enfermedad. Principalmente, ha sido asociado a PCV2 y el desarrollo de las PCVAD (Osorio, 2010). Se ha demostrado por ejemplo, que el TTSuV1 contribuye parcialmente a la inducción del PDNS asociado a PCV2 (Krakowka et al., 2008) y a la inducción de la PCV2-SD en modelos de cerdos gnotobióticos infectados con PCV2 (Ellis et al., 2008). Asimismo, se ha demostrado que los cerdos afectados por PCV2-SD poseen una mayor prevalencia o carga viral de TTSuVk2 (Kekarainen et al., 2006 Aramouni et al., 2011; Nieto et al., 2013). Estos resultados sugieren que TTSuV podría ser patogénico debido a un efecto sinérgico con otros virus. Sin embargo, otros estudios no han

encontrado asociación entre la PCV2-SD y la infección con TTSuV (Lee et al., 2010; Teixeira et al., 2015).

TTSuV ha sido detectado en muestras de suero, heces, saliva, semen y tejidos, lo que indica la existencia de diversas vías de transmisión incluyendo tanto la transmisión horizontal como vertical (Meng, 2012; Kekarainen y Segalés, 2012). De todos modos, la vía fecal-oral es considerada la principal ruta de transmisión del virus (Sibila et al., 2009).

5.1.4 Patogenia

La infección con TTSuV puede ocurrir en las primeras etapas de vida y conduce a una infección progresiva persistente. La mayoría de los tejidos y órganos del cerdo, si no todos (cerebro, pulmones, riñones, médula ósea, corazón, bazo y ganglios linfáticos), poseen ADN del virus a las cinco semanas de edad, siendo las cargas virales más altas en los animales con mayor edad (15 a 24 semanas) (Aramouni et al., 2010). En un estudio reciente, se ha sugerido que los tejidos linfoides, incluyendo los ganglios linfáticos inguinales y mesentéricos, las amígdalas, la lámina propia de la mucosa intestinal y las placas de Peyer, son considerados sitios blanco de TTSuV, y en particular, se especula que los linfocitos T son las principales células diana para estos virus (Lee et al., 2014).

Paralelamente, se ha demostrado que la producción de anticuerpos contra la proteína viral de la cápside de TTSuVk2, se asocia con una reducción de la viremia, pero estos anticuerpos parecen ser incapaces de erradicar la infección, lo que en parte podría explicar la persistencia del virus (Huang et al., 2011). Asimismo, los cerdos afectados por las PCVAD mostraron tener menor cantidad de anticuerpos que los cerdos sanos, y esta disminución podría estar dada por el estado de inmunosupresión resultante en este tipo de enfermedad (Huang et al., 2011). Por otro lado, la evidencia de infección persistente y la infección intrauterina del feto antes de la adquisición de una inmunocompetencia madura podrían sugerir un estado de inmunotolerancia contra TTSuV (Aramouni et al., 2010).

En relación al aislamiento *in vitro* de estos virus, no existe hasta la fecha un sistema que permita su propagación eficiente en cultivos celulares. De forma similar a los PCV, los TTV únicamente replican en células en división activa ya que precisan de la ADN polimerasa del hospedero para el mecanismo de RCR (Kekarainen y Segalés, 2009). En particular, se ha

reportado la liberación de partículas virales infectivas de TTV en cultivos de células mononucleares humanas de sangre periférica (PBMCs, por sus siglas en inglés) estimulados con mitógenos (Mariscal et al., 2002).

Cabe resaltar, que se ha observado que ciertas líneas celulares, medicamentos de uso humano y productos veterinarios comerciales están contaminados con TTSuV, pero aún no está claro el impacto de este hecho (Meng, 2012). Por ejemplo, tres vacunas contra *M. hyopneumoniae*, una de Parvovirus porcino y una de PRRSV resultaron positivas para ADN de TTSuV1 por PCR y cuatro vacunas contra M. hyopneumoniae resultaron tener ADN de TTSuVk2. Un medicamento de uso humano fue positivo para ADN de TTSuV1 y un producto de elastasa derivada de porcino fue positivo para TTSuV1 y TTSuV2 (Kekarainen et al., 2009). Por otro lado, otro estudio reportó que quince líneas celulares de trece orígenes distintos tenían ADN de TTSuV, y líneas celulares de origen porcino como ST y PK-15, presentaban tanto ADN de TTSuV1 como de TTSuVk2 (Teixeira et al., 2011). Finalmente, otros investigadores sostienen que la detección de ADN de TTSuV en dichos productos biológicos puede deberse a tripsina o suero de origen porcino contaminados (Huang et al., 2012b).

La falta de un sistema de cultivo susceptible y permisivo a la infección por TTSuV y la dificultad de obtener cerdos negativos para la infección, dificultan el desarrollo de investigaciones destinadas a comprender aspectos básicos de la biología molecular y patogenicidad de estos virus (Meng, 2012) y es por ello, que la mayoría de las investigaciones utilizan técnicas de PCR. Asimismo, la mayor parte de los trabajos existentes están basados en *anellovirus* humanos. En un intento de avanzar en el conocimiento de los TTSuV, se han realizado estudios de expresión de genes en sistemas de expresión eucariota (Martínez-Guinó et al., 2011; Huang et al., 2012a; Singh y Ramamoorthy, 2016a, b). Incluso, se ha llevado a cabo la construcción de un clon infeccioso de TTSuVk2 y tras su transfección en cultivos celulares, se ha evidenciado la expresión del ORF1 viral mediante IFA en 9 líneas celulares diferentes (Huang et al., 2012b).

5.1.5. Organización genómica

Según el sistema de clasificación basado en ácido nucleico viral ideado por David Baltimore, TTSuV se clasifica dentro del Grupo II (Baltimore, 1971), ya que posee un genoma de ADN monocatenario circular de polaridad negativa. Ambas géneros virales TTSuV1 y TTSuVk2 poseen un genoma de longitud variable de aproximadamente 2.8 kb. La organización genómica y los perfiles de transcripción propuestos son similares entre los TTVs, con una región codificante que contiene al marco abierto de lectura mayoritario denominado ORF1, varios ORFs solapados (los principales, ORF2 y ORF3) y una región no codificante (UTR, por sus siglas en inglés) (Biagini, 2009; Kekarainen y Segalés, 2012) (Fig. 5.1.2).

La UTR comprende el 28-29% del genoma y contiene secuencias altamente conservadas entre los TTV. Particularmente, abarca 838 a 844 nt en cepas de TTSuV1 y 793 a 797 nt en TTSuVk2 (Cortey et al., 2011a). Se caracteriza por presentar un tramo corto con alto contenido en GC que forma estructuras en horquilla (bucle y tallo) (Okamoto et al., 2002), que son importantes secuencias reguladoras para la replicación y transcripción (Mankertz et al., 2004). Asimismo, presenta elementos promotores y potenciadores que muestran diferentes actividades de transcripción dependiendo de la línea celular utilizada (Kamada et al., 2004; Suzuki et al., 2004).

Por otra parte, se cree que ORF1 codifica para la proteína estructural de la cápside y presenta motivos característicos de proteínas asociadas a la replicación por círculo rodante. A su vez, en su extremo N-terminal presenta una región rica en arginina (Martínez-Guinó et al., 2011). Esta proteína presenta una longitud variable, de 638-650 aa para TTSuV1 y de 625-628 aa para TTSuVk2 (Kekarainen et al., 2009; Cortey et al., 2011a). Se han determinado dos regiones conservadas hidrofílicas en esta proteína una ubicada en la región media y otra en el extremo C-terminal. A su vez, se vio que no existe reactividad cruzada antigénica entre TTSuV1 y TTSuVk2 (Huang et al., 2012a). El ORF2 codifica para una proteína más pequeña de 73-74 aa para TTSuV1 y de 69aa para TTSuVk2, que posee secuencias características de tirosina fosfatasa y a su vez, se cree que puede estar implicada en la supresión de la vía NF-kB (Zheng et al., 2007; Kekarainen et al., 2009; Cortey et al., 2011a). Se predice que el transcripto ORF3 se produce por empalme alternativo, en la región 5’ se solapa con ORF2 y la región 3’ comienza aproximadamente en la posición 2000 del genoma. ORF3 codifica para una proteína

no estructural de 221-232 aa para TTSuV1 y de 200-203 aa para TTSuVk2, cuya función todavía no se conoce (Kekarainen et al., 2009; Cortey et al., 2011a). En un estudio donde se expresaron las diferentes proteínas de TTSuV1 y TTSuVk2 en la línea celular PK-15, se observó que mientras ORF1 y ORF3, se localizan en el nucléolo de las células, la ORF2 tiene una localización citoplasmática y nuclear (Martínez-Guinó et al., 2011) (Fig.5.1.3). A su vez, en este mismo trabajo se ha sugerido que por empalme alternativo de ORF1 y ORF3, el virus codifica una gran variedad de isoformas de proteínas (Martínez-Guinó et al., 2011) (Fig.5.1.2B).

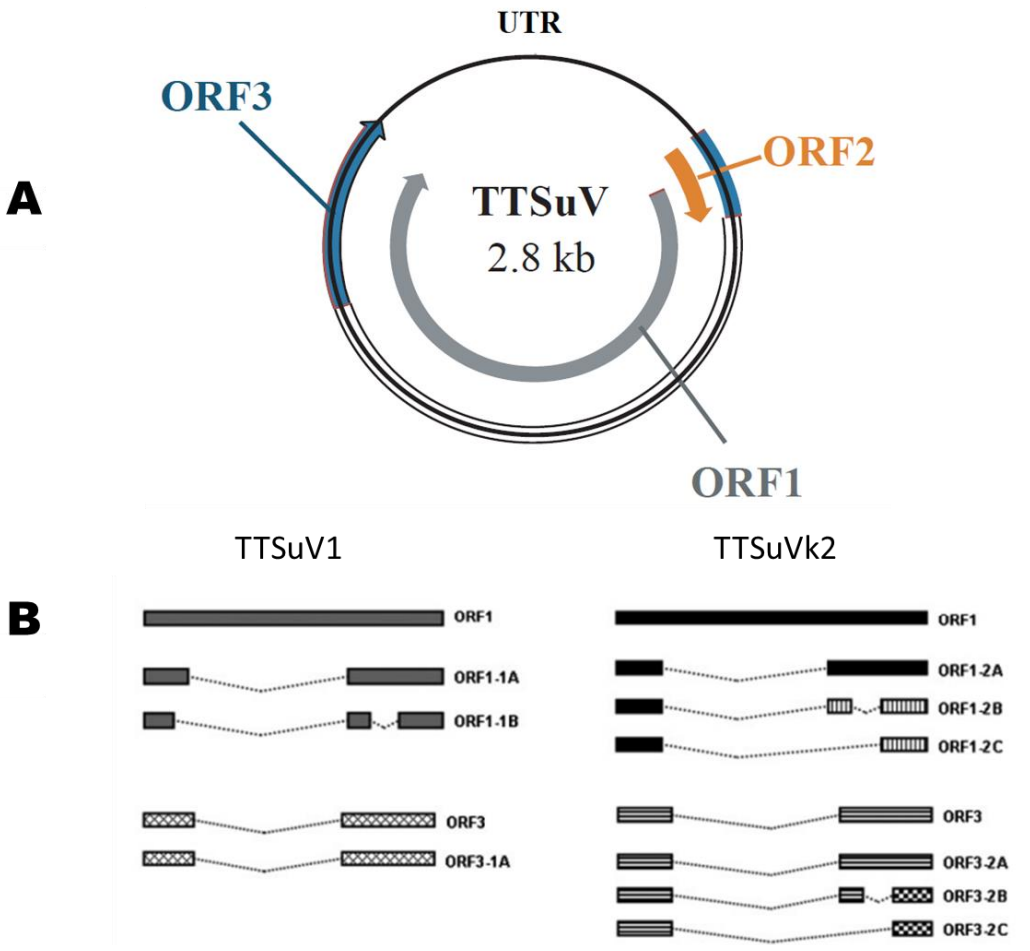


Figura 5.1.2. Organización genómica de TTSuV. A) Representación esquemática del genoma circular de TTSuV. Se indica la posición de los ORFs principales (ORF1, ORF2 y ORF3) y de la UTR. Se muestra que ORF3 surge por empalme alternativo. B) Se detallan las diferentes isoformas de proteínas producidas por empalme alternativo (línea de puntos) a partir de ORF1 y ORF3 para TTSuV1 (izquierda) y TTSuVk2 (derecha). Las proteínas codificadas se indican con rectángulos y los distintos patrones reflejan diferentes secuencias de aminoácidos entre las proteínas. Extraída con modificaciones de Kekarainen y Segalés, 2012 y Martínez-Guinó et al., 2011.

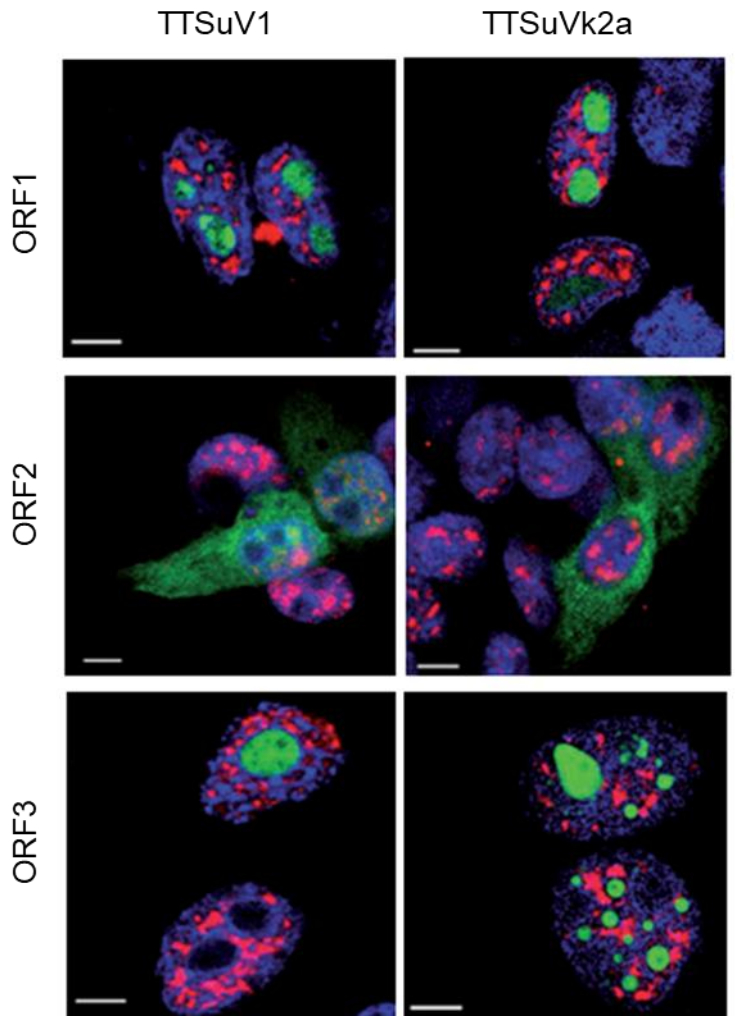


Figura 5.1.3. Localización sub-celular de las proteínas codificadas por ORF1, ORF2 y ORF3 de TTSuV1 y TTSuVk2a en la línea PK-15. Las proteínas correspondientes fusionadas a GFP se muestran en verde, en azul se muestra la tinción con DAPI y en rojo un marcador nuclear moteado SC-35. Extraída con modificaciones de Martínez-Guinó et al., 2011.

5.1.6. Variabilidad genómica

Los TTSuV presentan una gran diversidad genética con tasas de mutación estimadas de 5.29–5.51x10^{-4} s/s/a, observándose a su vez, una gran variabilidad en el tamaño de los genomas entre las diferentes cepas virales que se debe principalmente por mutaciones del tipo inserción y deleción (Cortey et al., 2011a; Cadar et al., 2013). Por otra parte, se ha observado que la variabilidad genética es mayor en las secuencias codificantes que en la UTR (Cortey et al., 2011a). TTSuV1 y TTSuVk2 comparten bajos porcentajes de identidad de secuencia nucleotídica de aproximadamente el 50% (Huang et al., 2010; Cortey et al., 2011a). Asimismo, TTSuV1 presenta una mayor variabilidad intra-género (> 30%) que TTSuVk2 (<15%). Debido al reciente descubrimiento de una nueva cepa de *anellovirus* porcinos, TTSuVk2b, el virus TTSuVk2 fue renombrado como TTSuVk2a y ambos fueron clasificados dentro del género *Kappatorquevirus* (Cornelissen-Keijsers et al., 2012; ICTV, 2017). Se ha demostrado que las co-infecciones entre TTSuV1 y TTSuVk2a son muy frecuentes en cerdos y que la prevalencia de TTSuVk2b es menor a la de las otras dos variantes (Cornelissen-Keijsers et al., 2012; Blois et al., 2014). A su vez, se ha observado que esta nueva especie, también presenta diferencias en el tamaño de las proteínas codificadas siendo ORF1 de 629-630 aa, la ORF2 de 81 aa y la ORF3 de 224 aa (Cornelissen-Keijsers et al., 2012).

La clasificación en genotipos es aún controversial y ha variado a lo largo de los años. Actualmente, el ICTV define dos especies para TTSuV1, 1a y 1b, una especie para TTSuVk2a y una para TTSuVk2b. Sin embargo, según un estudio realizado por Cortey et al. (2012), TTSuV1 podría dividirse en 4 genotipos virales distintos (1a-1d) y TTSuVk2a en 2 genotipos bien definidos (2a y 2b). En el caso de TTSuk2b, debido a su reciente identificación, hay pocas secuencias disponibles, pero al parecer presenta una menor variabilidad intra-especie en comparación a los otros virus. Se propone que para comprender la divergencia de estos virus es necesario seguir analizando un mayor número de secuencias de cepas virales de diferentes regiones geográficas (Cortey et al., 2012).

Por otra parte, no se observó evidencia de recombinación inter o intra-género en un estudio que incluyó 41 secuencias de TTSuVk2 y 29 secuencias de TTSuV1. A su vez, este mismo trabajo reportó que el uso de codones es similar para TTSuV1 y TTSuVk2 y que los codones más frecuentes poseen una A o C en la tercera posición del codón (Zhang et al., 2013).

5.1.7. Importancia de los TTV en la salud pública

La distribución en los tejidos de los TTV es similar tanto en humanos como en cerdos y como se detalló previamente, pueden causar infecciones crónicas sin desarrollar una patología. Se ha reportado que la viremia de TTV está inversamente correlacionada con el estado inmunológico y se ha sugerido que las cargas virales de ADN de estos virus pueden usarse como indicador de inmunosupresión. Por lo tanto, no se puede descartar la posibilidad de que en un individuo inmunocomprometido, TTV puede replicarse en altos niveles y facilitar el desencadenamiento de una patología (Touinssi et al., 2001; Ssemadaali et al., 2016). Por otra parte, la detección de ADN de TTV es muy común en fuentes de agua, aguas residuales y hospitales (Graffin et al., 2008; Vecchia et al., 2012; D'Arcy et al., 2014). También estos virus son potencialmente contaminantes de la sangre de donantes lo que implica un riesgo en la transmisión transfuncional (Bernardin et al., 2010). Paralelamente, como se ha indicado anteriormente, la contaminación de productos de uso veterinario y medicamentos humanos con TTSuV ha sido identificada (Kekarainen et al., 2009), e incluso es probable que los humanos ingieran TTSuV en agua o alimentos. De hecho, un estudio ha reportado la identificación de ADN de TTSuV en todas las muestras analizadas de carne de cerdo y productos derivados (jamón, jamón crudo, salame, chorizo) y en el 25% de las muestras estudiadas de materia fecal humana (Jiménez-Melsió et al., 2013).

Las investigaciones centradas en el estudio de la transmisión de TTV entre especies han adquirido una gran importancia en los últimos años, no solo por el riesgo en el consumo de alimentos o agua contaminada, sino también, debido a que el cerdo es un modelo biomédico interesante, existiendo un potencial crecimiento del uso de xenotransplantes basados en células, tejidos y órganos del cerdo (Osorio, 2010). Evidentemente, ello también implica un gran riesgo de transmisión de enfermedades a los seres humanos. Para analizar la posibilidad de una transmisión entre especies, en una reciente investigación se estudió la presencia de TTSuV y TTVh en sueros de humanos y de cerdo, respectivamente. Sorpresivamente, se identificó, en muy altos porcentajes, tanto ADN de TTSuV en muestras humanas como ADN de TTVh en muestras de cerdos. Esto se evidenció por qPCR y por la amplificación por PCR convencional de regiones más extensas y variables del genoma viral (Ssemadaali et al., 2016). A su vez, cabe resaltar que aunque los genomas de TTV de varias especies animales,

incluyendo a los humanos, están organizados de manera similar, cada TTV específico de cada especie es genéticamente muy distinto, por lo tanto, las técnicas utilizadas en dicho trabajo están diseñadas para detectar a cada TTV específico de forma independiente. Por otro lado, debido a que desde una perspectiva de salud pública, es especialmente crítico determinar si los TTSuV pueden establecer infecciones en humanos, estos investigadores mediante la transfección de un clon infeccioso de TTSuV1 en PBMCs demostraron que estos *anellovirus* porcinos pueden realizar una infección productiva luego de tres pasajes sucesivos en estas células humanas. A su vez, detectaron anticuerpos contra la ORF2 de TTSuV1 en el 40% de los sueros humanos testeados, por lo que en definitiva, sugieren que la transmisión de TTV entre especies es posible y específicamente, que TTSuV puede tener un potencial rol zoonótico (Ssemadaali et al., 2016). Sin embargo, es necesario confirmar si los TTSuV o los TTV de otras especies de mamíferos pueden efectivamente establecer infecciones o alterar las funciones inmunitarias en individuos inmunocomprometidos (Ssemadaali et al., 2016).

Recientemente, un estudio demostró que TTSuV a su vez puede infectar a otras 5 especies de mamíferos (caballos, vacas, ovejas, perros y alces) y plantean que el rango de hospedero de los TTV especie-específicos podría ser más amplio del que inicialmente se pensaba (Singh y Ramamoorthy, 2018).

Por lo tanto, si bien para evaluar el riesgo de los TTV para la salud humana y animal es necesario e importante explorar su potencial patogénico, su gran ubicuidad en el ambiente y la persistencia en la infección, sugiere cada vez más a estos virus como posibles componentes de la microbiota del hospedero o “viroma” y, como tales, no pueden causar la enfermedad directamente, sino que están disponibles para participar en procesos fisiológicos y modular la respuesta del organismo a otros patógenos (Manzin et al., 2015). Incluso, se plantea el rol de los TTV como marcadores de polución antrópica o animal y marcadores del estatus inmunológico (Focosi et al., 2016).

5.2. Objetivos específicos parte II

1. Optimizar e implementar una técnica de detección de TTSuV (TTSuV1 y TTSuVk2a) que permita evaluar la presencia de ADN viral en muestras de cerdos y jabalíes del Uruguay.

2. Caracterizar a nivel molecular las cepas detectadas de TTSuV, mediante el análisis de la variabilidad genética y la identificación de variantes o genotipos circulantes en el país.

3. Evaluar si existe una relación sinérgica entre la infección con PCV2 y TTSuV, mediante la identificación de las frecuencias de co-infección en cerdos con y sin sintomatología, y la determinación de una posible correlación entre las cargas virales de estos virus.

4. Secuenciar el genoma completo de cepas de TTSuV y construir un potencial clon infeccioso.

5.3. Identificación de una elevada frecuencia de infección y una gran heterogeneidad genética de TTSuV1 y TTSuVk2a en cerdos domésticos y jabalíes, infectados y no infectados con PCV2, en Uruguay.

5.3.1. Detección de TTSuV en Uruguay

Este capítulo describe la primera detección de TTSuV en el país y comprende un estudio molecular exhaustivo que aporta 14 secuencias de TTSuV1 y 13 de TTSuVk2a, las cuales fueron identificadas en muestras de jabalíes y cerdos domésticos de diferentes regiones del Uruguay. Al comienzo de esta tesis, se contaba con escasa información sobre la circulación de estos virus a nivel regional, existiendo solamente dos trabajos en Brasil (de Arruda Leme et al., 2012; de Castro et al., 2012; Teixeira et al., 2013) y ningún reporte de TTSuV en poblaciones de jabalí. TTSuV1 y TTSuVk2a fueron identificados en altas frecuencias de infección (70.5%) en cerdos pertenecientes a todas las granjas analizadas, observándose mayoritariamente la co-infección de ambos géneros virales. En el caso del jabalí, si bien se analizaron 31 muestras, este estudio constituyó la primera evidencia de la circulación de TTSuV en jabalíes en América, con una frecuencia de infección del 51% y una circulación predominante de TTSuV1.

5.3.2. Caracterización genética de TTSuV

En el periodo en el que comenzó esta investigación, recién surgían los primeros datos sobre la nueva especie TTSuVk2b y es por ello, que no fue incluida en este estudio. Asimismo, la clasificación de TTSuV en genotipos era debatida e incluso contradictoria. Por lo tanto, en este trabajo se propuso un criterio actualizado y más completo de clasificación en genotipos de TTSuV1 y TTSuVk2a, con el fin de contribuir en un futuro, mediante una caracterización unificada, a una mejor comprensión de la epidemiología molecular de estos virus a nivel mundial. Particularmente, se observó una gran heterogeneidad genética entre las cepas uruguayas y no se evidenció asociación entre las cepas detectadas en términos de origen geográfico o año de colecta de la muestra. A su vez, las cepas de TTSuV1 presentaron mayor variabilidad genética que las cepas de TTSuVk2a y se concluyó que el análisis de la secuencia UTR no es suficiente para diferenciar grupos filogenéticos intra-género, sobre todo para cepas de TTSuV1 (Fig.5.3.1 complementaria). Por lo tanto, se planteó que la amplificación por PCR

de un fragmento de 678 pb y 719 pb, para TTSuV1 y TTSuVk2a, respectivamente, con cebadores reportados previamente por Cortey et al. (2012), es necesaria y suficiente para una buena caracterización genética de estos virus. En cuanto a la distribución de las diferentes cepas detectadas en Uruguay, según el criterio de clasificación planteado en este trabajo, se identificó una predominancia de la circulación de TTSuV1a tipo 1a-I y TTSuVk2a tipo 2a-II. De acuerdo con Cortey et al. (2012), esta misma distribución de las variantes de TTSuV fue observada en otros países de América del Sur y en países de América del Norte y Europa. De hecho, estos investigadores sostienen que la estructura genética de las poblaciones de TTSuV probablemente refleje el comercio de animales entre países (Cortey et al., 2012).

Como dato complementario al artículo publicado, se observó que no solo es frecuente la co-infección de TTSuV1 y TTSuVk2a en un mismo animal, sino que también es probable la co-infección con diferentes cepas del mismo género. Se amplificó por PCR la UTR de muestras de hígado, ganglio, pulmón y riñón de un cerdo positivo para ambos géneros virales. Se observó la presencia de ADN de TTSuVk2a en el pulmón (URUTV2P) y en el riñón (URUTV2R) del animal y ADN de TTSuV1 en todos los órganos analizados. El análisis de las secuencias obtenidas mostró que mientras las cepas de TTSuVk2a eran idénticas en ambos órganos, las secuencias de las cepas de TTSuV1 eran diferentes. Particularmente, eran idénticas las secuencias en hígado (URUTV1H) y en ganglio (URUTV1G), pero diferente a la cepa detectada en pulmón (URUTV1P) y riñón (URUTV1R) (Fig.5.3.1 complementaria). Esto demuestra la co-existencia de múltiples cepas de TTSuV en diferentes órganos del mismo cerdo y reafirma la gran diversidad de TTSuV1 incluso en un mismo animal.

5.3.3. Frecuencia de infección y carga viral de TTSuV en animales infectados y no infectados con PCV2

Para evaluar una posible asociación entre las infecciones con PCV2 y TTSuV se analizó la frecuencia de co-infección y se realizó la cuantificación del ADN viral en muestras de suero. Las curvas estándar empleadas para cuantificar TTSuV1, TTSuVk2a y PCV2 (también utilizada en el capítulo 6 de la parte I, ver sección 4.11) fueron obtenidas, como se especificó anteriormente, durante una pasantía realizada en el laboratorio de Virología del Instituto de Sanidad Animal FEPAGRO, en Porto Alegre, Brasil. En primer lugar, no se observó ninguna correlación significativa entre las frecuencias de infección de TTSuV o las cargas virales de

estos virus y la infección con PCV2. En segundo lugar, tampoco se identificó una relación evidente entre las cargas virales de PCV2 y la infección con TTSuV1 o TTSuVk2a. Finalmente, no se identificó ninguna asociación significativa entre la frecuencia de infección o carga viral de TTSuV y la edad o estado de salud de los animales.

Como dato complementario al reportado en el artículo, incluso si se comparan las cargas virales de TTSuV1 y TTSuVk2a en muestras de cerdos con sintomatología e infectados con PCV2 y muestras de animales asintomáticos infectados con PCV2, tampoco se observan diferencias significativas entre los grupos (p-valor < 0.05). Cabe resaltar que la cantidad de muestras en un grupo y otro es asimétrico, siendo mucho mayor la cantidad de muestras de cerdos infectados con PCV2 con sintomatología. Para el análisis de estos datos fue aplicado el test t Student no pareado con corrección de Welch, utilizado el software GraphPad Prism v.6. En la figura 5.3.2 complementaria se observa la distribución de las cargas virales (expresadas en escala logarítmica) obtenidas para TTSuV1 y TTSuVk2a en cada uno de los grupos detallados. Por lo tanto, se sugiere que tampoco se observa una asociación entre la carga viral de los TTSuVs y los animales con PCVAD. Por otro lado, no se observó una diferencia significativa en las cargas virales de PCV2 en animales infectados con un solo género de TTSuV (TTSuV1 o TTSuVk2a) o ambos (TTSuV1+TTSuVk2a). No se pudo comparar las cargas virales de PCV2 en animales infectados y no infectados con TTSuV, debido a la falta de muestras de suero con estas características, ya que como se detalló previamente la frecuencia de infección de los TTSuV fue muy alta. Solo una muestra infectada únicamente con PCV2 fue cuantificada y se obtuvo para la misma una carga viral de $1.2x10^4$ copias/mL, lo cual está dentro del rango observado para las muestras co-infectadas con TTSuV (promedio $4x10^4$copias/mL, Min. $3.6x10^2$ copias/mL-Max.$5.3x10^6$ copias/mL).

Varios investigadores han sugerido una mayor prevalencia o carga viral de TTSuVk2a en animales con PCV2-SD (Aramouni et al., 2011; Nieto et al., 2013). Otros han reportado esta asociación pero solo en animales con PCV2-SD con lesiones severas (Kekarainen et al., 2006). Esto último, según Olvera et al. (2004), implica que las cargas virales de PCV2 sean muy altas, con un promedio de $5x10^8$ copias/mL. En este trabajo, las cargas virales de PCV2 más altas resultaron estar en el orden de 10^6 copias/mL y correspondieron a muestras de suero de un lechón con EE y desmedro (sección 4.3), un lechón con desmedro y problemas respiratorios

(sección 4.7) y una madre con problemas reproductivos (sección 4.6). De acuerdo a los signos clínicos y a la carga viral de PCV2 se puede sugerir que los dos primeros casos podrían haber presentado una PCV2-SD probablemente en la categoría de leve a moderada (según lo reportado por Olvera et al., 2004). Sin embargo, como se especificó en el capítulo 6 de la parte I (ver sección 4.11), en Uruguay no contamos con el diagnóstico histopatológico necesario para confirmar esta hipótesis. Por otro lado, el tercer caso podría corresponder a un animal con PCV2-RD. En definitiva, se requiere de un mejor diagnóstico de las enfermedades asociadas a PCV2 y es por ello, que en este trabajo no se relaciona a TTSuV con PCV2-SD como en otros trabajos sino a síntomas compatibles con las PCVAD en general. De todas formas, son varios los trabajos en los que también analizan la asociación entre TTSuV y PCVAD. Algunos de ellos no han encontrado una relación significativa en términos de frecuencia de infección o carga viral (Lee et al., 2010; Vargas-Ruiz et al., 2017), mientras que otros si la han identificado (de Menezes Cruz et al., 2016).

Los resultados obtenidos en este capítulo y la contradicción de los datos existentes sobre el análisis del potencial rol de TTSuV como desencadenante de las PCVAD, no descartan la hipótesis de que estos virus posiblemente sean componentes de la microbiota o mejor denominado “viroma” del hospedero. Incluso, debido a que se ha observado que la viremia de TTV está inversamente correlacionada con el estado inmunológico (Shibayama et al., 2001), en cerdos con PCV2-SD y más aún en casos de enfermedad severa, es probable encontrar altas cargas de TTSuV debido al estado de inmunosupresión de estos animales. Es por ello, que se puede pensar en los TTV más como reguladores y no tanto como potenciadores de una enfermedad, aunque su rol patogénico debe ser descartado y más aún por su aparente amplio rango de hospedero (Singh y Ramamoorthy, 2018).

5.3.4. Secuenciación del genoma completo de TTSuV y construcción de un potencial clon infeccioso

Si bien no se observaron diferencias significativas entre las cargas virales identificadas para cada uno de los géneros de TTSuV, las cargas virales más altas identificadas en este trabajo corresponden a TTSuVk2a. Casualmente, una de las muestras con mayor carga viral (URU59, $1.1x10^8$ copias/mL), fue la única muestra a partir de la cual se pudo obtener el genoma completo de TTSuVk2a por el método de amplificación por círculo rodante (RCA, por sus siglas

en inglés). Esta técnica implica la síntesis continua de una secuencia a partir de un cebador complementario a un molde de ADN circular. Es un proceso isotérmico que utiliza la ADN polimerasa del bacteriófago phi29, la cual es una enzima de alta fidelidad, alta procesividad y con actividad de corrección de errores. Los productos de la reacción son copias de alto peso molecular lineales con repeticiones en tándem del ADN circular utilizado como molde, que posteriormente puede ser digerido con endonucleasas de restricción (Niel et al., 2005).

Si bien se diseñaron cebadores para obtener el genoma completo de cepas seleccionadas de ambos géneros virales, no se logró su amplificación por PCR. Es por ello, que fue empleado el método RCA, en el cual se utilizan cebadores aleatorios hexaméricos. Debido a esta característica, se amplifican todos los ADN circulares presentes en la muestra y son utilizadas enzimas de restricción de sitio único en el genoma para obtener fragmentos del tamaño correspondiente al genoma completo del virus de interés. Para el genoma de TTSuV pueden utilizarse por ejemplo las enzimas BamHI y EcoRI. A su vez, la buena eficiencia de la técnica es dependiente de una buena calidad de la muestra de partida y en general es utilizado el ADN extraído de muestras de suero (Niel et al., 2005).

Particularmente, fueron seleccionadas 10 muestras de ADN positivas para TTSuV1 y/o TTSuVk2a, previamente caracterizadas a nivel genético. Como se detalló anteriormente, se pudo amplificar por RCA y posteriormente clonar y secuenciar una cepa de TTSuVk2a (URU59), pero no se pudo obtener un genoma completo de TTSuV1. Si bien, mediante el corte con enzimas de restricción se obtuvieron fragmentos del tamaño esperado para el genoma de TTSuV1 o TTSuVk2a en alguna de las muestras testeadas, ninguna de ellas pudo ser efectivamente clonada y secuenciada. Esto sugiere que posiblemente la carga viral es un factor importante para la efectividad del método RCA además de una buena pureza del ADN de la muestra.

Para el desarrollo de esta metodología se empleó 2 µL de ADN de URU59 y luego de su desnaturalización a 95ºC por 3 min, fue colocado en frío e incluido en una mezcla conteniendo 2 U de Phi29 ADN polimerasa (New England, BioLabs, EE. UU.), 1X del buffer para la enzima, 1X BSA, 1.4 mM de cada dNTP y 6 µM de Exo-Resistant Random primer (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) en un volumen final de 25 µL. Luego, fue incubado por 18h a 30ºC, inactivado a 65ºC durante 10min y 5 µL del producto de amplificación fue visualizado en un gel

de agarosa 1% (Fig.5.3.3A complementaria). Posteriormente, 5 µL de la amplificación fueron utilizados para la digestión por 1h a 37ºC con 1 µL de la enzima BamHI en 1X de buffer BamHI (Thermo Fisher Scientific, EE.UU) (Fig.5.3.3B complementaria). Una vez observado el tamaño del fragmento de interés, se vuelve a realizar la digestión pero con todo el volumen de la amplificación y luego es purificado del gel utilizando un kit comercial (Zymoclean ™ Gel DNA recovery kit, EE.UU). El producto purificado fue clonado en el sitio BamHI del vector pEGFP-C3 (Clontech, EE.UU.), utilizando la T4 ADN ligasa (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El producto de la ligación (2 µL) fue utilizado para transformar 40 µL de DH5-alfa *Escherichia coli* electro-competentes. Para la electroporación se utilizó el equipo GenPulser Xcell ™ (BioRad, EE.UU.). Se utilizaron placas de LB agar con kanamicina 50 µg/mL. Fueron seleccionadas 4 colonias al azar y los plásmidos fueron purificados utilizando un kit comercial (kit Zyppy ™ Plasmid Miniprep, EE.UU.) (Fig.5.3.3C complementaria). Para identificar los plásmidos con el inserto se realizó la digestión con la enzima BamHI (Fig.5.3.3D complementaria). Los tres plásmidos con el inserto de aproximadamente 2.8kb fueron secuenciados mediante el Servicio de Secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo y el Servicio de Secuenciación Macrogen, Korea. Para la secuenciación se utilizaron en primer lugar, dos cebadores complementarios a la secuencia del vector (EGFP-C3F y pBABE-3R). Una vez conocida la secuencia, fueron diseñados 4 cebadores internos para poder secuenciar y confirmar la totalidad de la secuencia del inserto. La secuencia del genoma completo se pudo obtener a partir de los 3 plásmidos obtenidos, la única diferencia es que en dos de los plásmidos el inserto está clonado en el mismo sentido mientras que en el restante esta clonado en el sentido inverso.

Uno de los objetivos de esta sección de la tesis fue la obtención de la secuencia del genoma completo de una cepa de TTSuV circulante en Uruguay. Existen relativamente pocos genomas completos de estos virus en la base de datos y es preciso conocer su genoma para comprender aspectos de su epidemiología molecular y su biología. A su vez, se planteó la posibilidad de diseñar un clon infeccioso, ya que la ausencia de un sistema de aislamiento *in vitro* de TTSuV limita ampliamente su estudio. Debido a que el genoma completo fue clonado en un vector a partir de un sitio de restricción incluido como sitio único en la secuencia, es que al igual que para PCV2 (capítulo 6 parte I, sección 4.11) este sistema puede utilizarse como

potencial clon infeccioso (Fig.5.3.4 complementaria). El corte del vector con la enzima BamHI, la purificación del inserto y la posterior re-circularización mediante la utilización de una T4 ADN ligasa da como resultado un ADN de doble cadena circular que puede ser transfectado en una línea celular. De hecho, el plásmido recombinante obtenido en este trabajo, comprende prácticamente el mismo diseño que el clon infeccioso de TTSuVk2a construido en un reporte reciente, el cual resultó infectivo en 9 líneas celulares diferente (Huang et al., 2012b). Sería interesante, contar con anticuerpos contra TTSuVk2a, que permitan identificar las proteínas virales, aunque estudios preliminares de la expresión de ARN mensajero podrían realizarse.

ARTÍCULO VI

Veterinary Microbiology 224 (2018) 78–87

Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic

High frequency and extensive genetic heterogeneity of TTSuV1 and TTSuVk2a in PCV2- infected and non-infected domestic pigs and wild boars from Uruguay

Natalia Ramos[a,*], Santiago Mirazo[a], German Botto[b,c], Thais Fumaco Teixeira[d], Samuel Paulo Cibulski[d], Gustavo Castro[e], Karina Cabrera[f], Paulo Michel Roehe[d], Juan Arbiza[a,*]

[a] Sección Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, Montevideo, 11400, Uruguay
[b] Departamento de Métodos Cuantitativos. Facultad de Medicina, Universidad de la República. Avenida General Flores 2125, Montevideo, 11800, Uruguay
[c] Department of Microbiology and Immunology, Montana State University, 109 Lewis Hall, Bozeman, 59717, United States
[d] Virology, FEPAGRO Animal Health, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, RS 92990-000, Brazil
[e] Área Suinos, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Alberto Lasplaces 1550, Montevideo, 11600 Uruguay
[f] Asociación Uruguaya de productores de cerdos. Treinta y tres 1525, Montevideo, 11000, Uruguay

ARTICLE INFO

Keywords:
Detection of TTSuV1 and TTSuVk2a
Uruguay
Genetic characterization
Association with PCV2 infection

ABSTRACT

Torque teno sus virus (TTSuV) infection is common worldwide in both healthy and diseased swine and a relationship between this virus and a particular disease in pigs has not been established. This work aimed to investigate the presence of TTSuV1 and TTSuVk2a in Porcine Circovirus type 2 (PCV2)-infected and non-infected domestic pigs and free-living wild boars from Uruguay. Our data evidenced a high frequency of detection and a wide circulation of TTSuV among pig herds and wild boar populations. Furthermore, TTSuV1 + TTSuVk2a co-infection was more frequent than single infections in domestic pigs. In addition, we thoroughly characterized at the molecular level TTSuV strains by extensive sequence data analysis. Our findings revealed an extremely high genetic heterogeneity among Uruguayan isolates. On the basis of detailed analyses, we proposed a more comprehensive criterion of TTSuV classification which would contribute to shedding light over the genetic diversity of these viruses worldwide. On the other hand, data obtained suggested that neither TTSuV1 nor TTSuVk2a frequency of infection or viral loads have any correlation with PCV2 infection, health status or age. The role of TTSuV during co-infection with other pathogens and the age-related dynamics of TTSuV infection are currently under debate. Therefore, taking into account the controversial epidemiological data regarding these viruses and their ubiquitous infection, a likely role as components of the host microbiota should be brought into discussion.

1. Introduction

Torque teno sus virus (TTSuV), a member of *Anelloviridae family*, is a small non-enveloped virus possessing a circular single-stranded negative sense DNA genome of variable size about 2.8 kb (Okamoto et al., 2002). The main characteristics of anelloviruses are their ubiquity and capacity to induce persistent infections, the transmission by several routes and particularly, a high genetic diversity, with nucleotide substitution rates on levels comparable to RNA viruses (Cortey et al., 2012; Jiménez-Melsió et al., 2013; Manzin et al., 2015). Moreover, despite the variability in nucleotide sequences and size, anelloviruses from different species share a similar genomic organization, with a short GC rich untranslated region (UTR) and a coding region containing a major open reading frame (ORF1) and two overlapping ORFs (ORF2-3) (Biagini, 2009; Okamoto, 2009).

Anelloviruses infecting swine and wild boards are classified into two genera, *Iotatorquevirus* and *Kappatorquevirus*, or Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and Torque teno sus virus k2 (TTSuVk2), respectively. TTSuV1 includes two species, TTSuV1a and TTSuV1b and TTSuVk2 comprises TTSuVk2a and the novel species TTSuVk2b (ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses, 2017). Low nucleotide identities of about 50% were reported between TTSuV1 and TTSuVk2 but rates greater than 70% were reported intra-genera (Huang et al., 2010; Cortey et al., 2011).

TTSuV1 and TTSuVk2a have been detected in pig populations worldwide with frequencies of infection ranging from 24 to 100% (McKeown et al., 2004; Kekarainen et al., 2006; Martelli et al., 2006; Taira et al., 2009; Gallei et al., 2010; Cornelissen-Keijsers et al., 2012;

* Corresponding authors.
E-mail addresses: nramos@fcien.edu.uy (N. Ramos), jarbiza@fcien.edu.uy (J. Arbiza).

https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.08.029
Received 18 June 2018; Received in revised form 28 August 2018; Accepted 29 August 2018
0378-1135/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Mei et al., 2013). In South America, the studies on TTSuV in domestic pigs are still scant (de Castro et al., 2012; Teixeira et al., 2013, 2015; de Menezes Cruz et al., 2016). Additionally, very little data is reported about TTSuV1 and TTSuVk2a infections in wild boars worldwide (Martínez et al., 2006; Gallei et al., 2010; Cadar et al., 2013). On the other hand, TTSuVk2b have been recently detected in pig sera from many countries, with infection rates varying from 0 to 100% (Cornelissen-Keijsers et al., 2012; Rogers et al., 2017).

TTSuV-infections are common in both healthy and diseased swine (Aramouni et al., 2010; Gallei et al., 2010; Teixeira et al., 2013; Zhang et al., 2014) and a relationship between these viruses and a given disease in pigs has not been established. Indeed, TTSuVs are considered non-pathogenic agents by themselves, involved as cofactors in certain diseases or even affecting their outcome, in particular, with regard to Porcine Circovirus type 2 (PCV2) (Kekarainen and Segalés, 2012).

PCV2 is the primary etiological agent of the Systemic Disease (PCV2-SD), the most economically important porcine circovirus associated disease (PCVAD) (Segalés, 2012). Associations between TTSuVs and the occurrence of PCVAD have been reported with controversial results. TTSuVk2a prevalence and viral load have been found to be significantly higher in PCV2-SD affected pigs than in healthy animals (Kekarainen et al., 2006; Aramouni et al., 2011; Nieto et al., 2013). Furthermore, experimental infection of gnotobiotic pigs with TTSuV1 and PCV2 has been shown to trigger PCV2-SD (Ellis et al., 2008). Moreover, a recently study showed that TTSuV species may have been involved in the development of PCV2-associated lymphoid lesions by affecting the host immune system (Lee et al., 2015). By contrast, other studies did not find any association between PCV2-SD affected pigs and TTSuVs (Lee et al., 2010; Teixeira et al., 2015; Vargas-Ruiz et al., 2017). Thus, the role of these viruses during co-infection with other pathogens is under debate. Actually, some even have proposed the possibility that these viruses can be part of the host commensal microbiota (Griffiths, 1999; Manzin et al., 2015).

This work aims several goals. First: to investigate the presence of TTSuV1 and TTSuVK2a in PCV2-infected and non-infected pigs in Uruguay, by molecular approaches and viral load quantification. Second: to survey for the first time in the Americas the circulation of TTSuV in free-living wild boars. And finally, we analyzed the genetic diversity of TTSuV strains detected, in order to shed light on the molecular epidemiology of this emergent infection.

2. Materials and methods

2.1. Samples

2.1.1. Domestic pigs

A total of 132 samples (lungs, livers, lymph nodes and/or sera) of domestic swine were included in this study, 53 correspond to young animals (< 6 months: weaned and piglets) and 79 to adults (> 6 months: fattener, sows and boars). Samples belonged to different commercial, medium and small-sized farms from 10 Departments of Uruguay (Fig. 1) and were obtained by trained veterinary personnel during the period 2010–2014 as part of a supporting plan of the official animal-health screening program for diseases in pigs (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, MGAP). Fifty-nine samples were collected from healthy animals and seventy-three from pigs with clinical signs associated with PCV2 infection (abortion, mummified fetuses, wasting, growth retardation, diarrhea, exudative epidermitis and respiratory disorders). All samples had been previously tested for the presence of PCV2 DNA, for which 43.2% (57 out of 132) were positive (Ramos et al., 2017).

2.1.2. Wild boards

In Uruguay, wild boars were officially declared as free-hunting animals in 1982 (Decree 463/982). This study included 31 animal samples (lymph nodes and sera) collected by hunters certified by MGAP in different Wild Boar festivals (2011–2014). Samples were collected in different hunting areas from departments of Cerro Largo, Maldonado and Rocha (Fig. 1). Molecular detection of PCV2 in these samples had been previously carried out and 20 out of 31 were infected with PCV2 (64.5%) (Ramos et al., 2017).

2.2. TSuV1 and TTSuVk2a detection

DNA was extracted from 200 µL of serum or 25 mg of tissue using a commercial kit (QIAmp DNA Mini Kit, Qiagen USA) according to manufacturer's instructions. TTSuV1 (both species TTSuV1a and 1b) and TTSuVk2a DNA were detected by PCR as previously described (Segalés et al., 2009).

2.3. Molecular analysis

In order to perform the molecular characterization of the TTSuV detected strains, a PCR-based genomic amplification of 678 bp (TTSuV1) and 719 bp fragments (TTSuVk2a) including the UTR, the complete ORF2 and a region of the ORF1 gene were carried out according to Cortey et al. (2012). PCR products of the expected size were purified in each case (Zymoclean ™ Gel DNA recovery kit, USA) and sequenced by Macrogen Sequencing Service, Korea and Institut Pasteur Montevideo sequencing service. Sequences were aligned using Muscle software and the degree of nucleotide identity among sequences was determined by using BioEdit v. 7.0.5. Phylogenetic tree was reconstructed by maximum likelihood method with the Kimura two-parameter + Gamma distribution model as the model of nucleotide substitution, using MEGA v.5.0 software. Evolutionary model that best fitted to the dataset was selected with ModelTest tool. Bootstrap values were determined with 1000 resampling of the dataset. Twenty-nine sequences of two TTSuV genera were included in the phylogenetic analysis. Furthermore, 10 of the TTSuV characterized strains were selected for full genome amplification by rolling circle amplification (RCA) using φ29 DNA polymerase according to Cornelissen-Keijsers et al. (2012). Phylogenetic tree based on complete genome were reconstructed by maximum likelihood method with General Time Reversible + Gamma distribution model as the model of nucleotide substitution, using MEGA v. 5.0 Bootstrap values were determined with 1000 replicates of the dataset. Nineteen complete sequences were included in the phylogenetic analysis.

2.4. Quantitative real time PCR

Selected swine serum samples were subjected to a SYBR Green real-time PCR (qPCR) to quantify the TTSuV1, TTSuV2k2a and PCV2 DNA viral loads as previously described by Teixeira et al. (2015). Detailed procedures for the construction of the positive controls and standard curves used herein are described in Teixeira et al. (2015) and Dezen et al. (2011).

2.5. Statistical analysis

Statistical analyses to assess independence were carried out using Chi-squared test and Fisher's exact test. Differences in means were evaluated using unpaired *t*-test with Welch's correction for differences in variances, using the *t*-test function from the stats package (R Core Team, 2016). Exact binomial confidence intervals for proportions were calculated using the binom.confint function from the binom package (Dorai-Raj, 2014). All tests and graphs were performed using R language v. 3.4.1 (R Core Team, 2016) in RStudio v. 1.0.153 (R Studio Team, 2012).

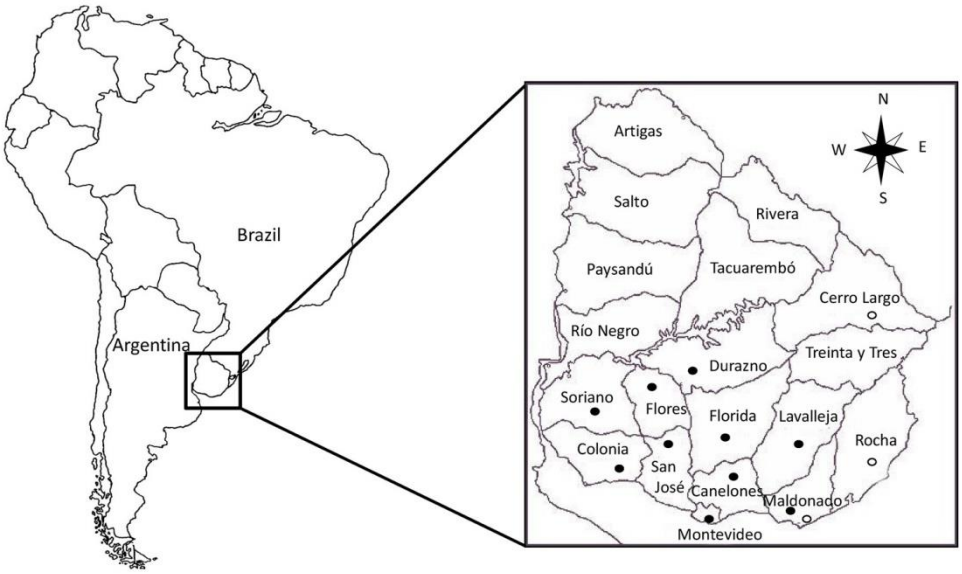


Fig. 1. Map of Uruguay, highlighting the Departments in which the domestic pig samples were collected (marked with full circles) and wild boar hunting areas (empty circles). TTSuV infections were identified in samples from all Departments where collections were made.

3. Results

3.1. High frequency of detection of TTSuVs among pig herds

TTSuV infection (TTSuV1 or TTSuV2ka) was identified in all the analyzed farms (Fig. 1). Overall, viral DNA was detected in 93 samples (frequency of infection, 70.5%). Mixed infections (56%, 52/93) were more frequent than TTSuV1 single infections (27%, 25/93), followed by TTSuV2ka single infections (17%, 16/93). Significant difference was found between co-infections with each single infection ($\chi 2 = 33.968$, p-value < 0.0001), but no difference between overall frequency of infection of TTSuV1 and TTSuVk2a was identified ($\chi 2 = 2.0024$, p-value = 0.1571), with rates of 58.3% (77/132) and 51.5% (68/132), respectively.

The proportion of animals infected with TTSuV1 and TTSuVk2a in the three groups of animals (PCV2 infection status, health status and age) are shown in Fig. 2. No significant association was evidenced between the infection with PCV2 and the TTSuV infection status, either considering single and mixed infections ($\chi 2 = 0.71556$, p-value = 0.6992) (Fig. 2A), or TTSuV-infected versus non-infected ($\chi 2 = 1.6556$, p-value = 0.1982) (Fig. 2B). In addition, an independence between presence of symptoms and the infection status of TTSuV was detected, either considering distribution of strains among the infected ($\chi 2 = 3.4645$, p-value = 0.1769) (Fig. 2C), or infected versus non-infected ($\chi 2 = 1.2655$, p-value = 0.2606) (Fig. 2D). Likewise, no significant difference was observed within age groups, either considering single and co-infections ($\chi 2 = 1.0814$, p-value = 0.5823) (Fig. 2E), or infected versus non-infected ($\chi 2 = 0.97872$, p-value = 0.3225) (Fig. 2F).

3.2. TTSuVs are highly frequent in free-living wild boars: first report in America

TTSuV DNA was detected in 16 samples (frequency of infection, 51%). Positive samples corresponded to animals belonging to hunting locations in Cerro Largo, Maldonado and Rocha Departments (east and southeast of Uruguay) (Fig. 1). A high frequency of TTSuV1 infection (15/16; 94%) was identified and no co-infections with TTSuVk2a were observed.

Fifty percent of the wild boar samples infected with PCV2 resulted co-infected with TTSuV. Similarly, 54.5% of the PCV2 negative samples resulted infected with TTSuV. Thus, no significant association between the infection with PCV2 and the infection with TTSuV (Fisher Exact Test, p-value ≈ 1) was observed in free-living wild boars.

3.3. Uruguayan TTSuV strains exhibited high genetic heterogeneity

Twenty-seven TTSuV strains were characterized at the molecular level (14 TTSuV1 and 13 TTSuVk2a), being all of them detected in pigs, excepting URUJ74 and URUJ25 that were obtained from wild boars (Table 1). The analysis of identity matrices showed that Uruguayan TTSuV1 isolates shared a nucleotide identity of 69.5–97.3% and Uruguayan TTSuVk2a strains exhibited a nucleotide sequence identity ranging from 70.7 to 96.7%. According to the phylogenetic reconstruction based in partial TTSuV1 and TTSuVk2a sequences, 12 strains grouped within TTSuV1a, 1 within TTSuV1b and 1 within TTSuV1c (Fig. 3). TTSuV1c was proposed in this study as a new species. In addition, the phylogenetic analysis showed that the TTSuV1a species could be divided into two different clades which were named in this work as 1a-I and 1a-II. Seven out of the 12 TTSuV1a strains grouped within 1a-I and 5 within 1a-II (Fig. 3). On the other hand, TTSuVk2a strains could be also divided into two groups named here as Clade 2a-I and 2a-II. Eleven out of 13 TTSuVk2a grouped within 2a-II and two clustered in 2a-I (Fig. 3). Therefore, our findings revealed a wide and predominant circulation of TTSuV1a clade 1a-I (50% of the TTSuV1 strains characterized) followed by TTSuV1a clade 1a-II (36%). TTSuV1b and TTSuV1c, in turn, were less frequent (7% each type). Additionally, within TTSuVk2a, the clade 2a-II was the most frequent (85%).

The molecular survey of wild boars enabled the characterization of only two strains, URUJ25 and URUJ74, which were collected in hunting season 2011 and 2012, respectively. Both of them were classified into the TTSuV1a clade 1a-I (Fig. 3).

Only one complete genome was obtained in this work, URU59, with 2796 nt genome- length. ORF1 comprised nucleotides 477–2360 (628aa); ORF2, 394–600 (69aa) and ORF3, 394–596 and 1944–2340 nt (200aa). The phylogenetic tree based on the complete genome also grouped this strain within TTSuVk2a species, clade 2a-II (Fig. 4). In turn, the sequence analysis revealed that URU59 shared a nucleotide identity of 71.3–87.5% with the TTSuVk2a isolates.

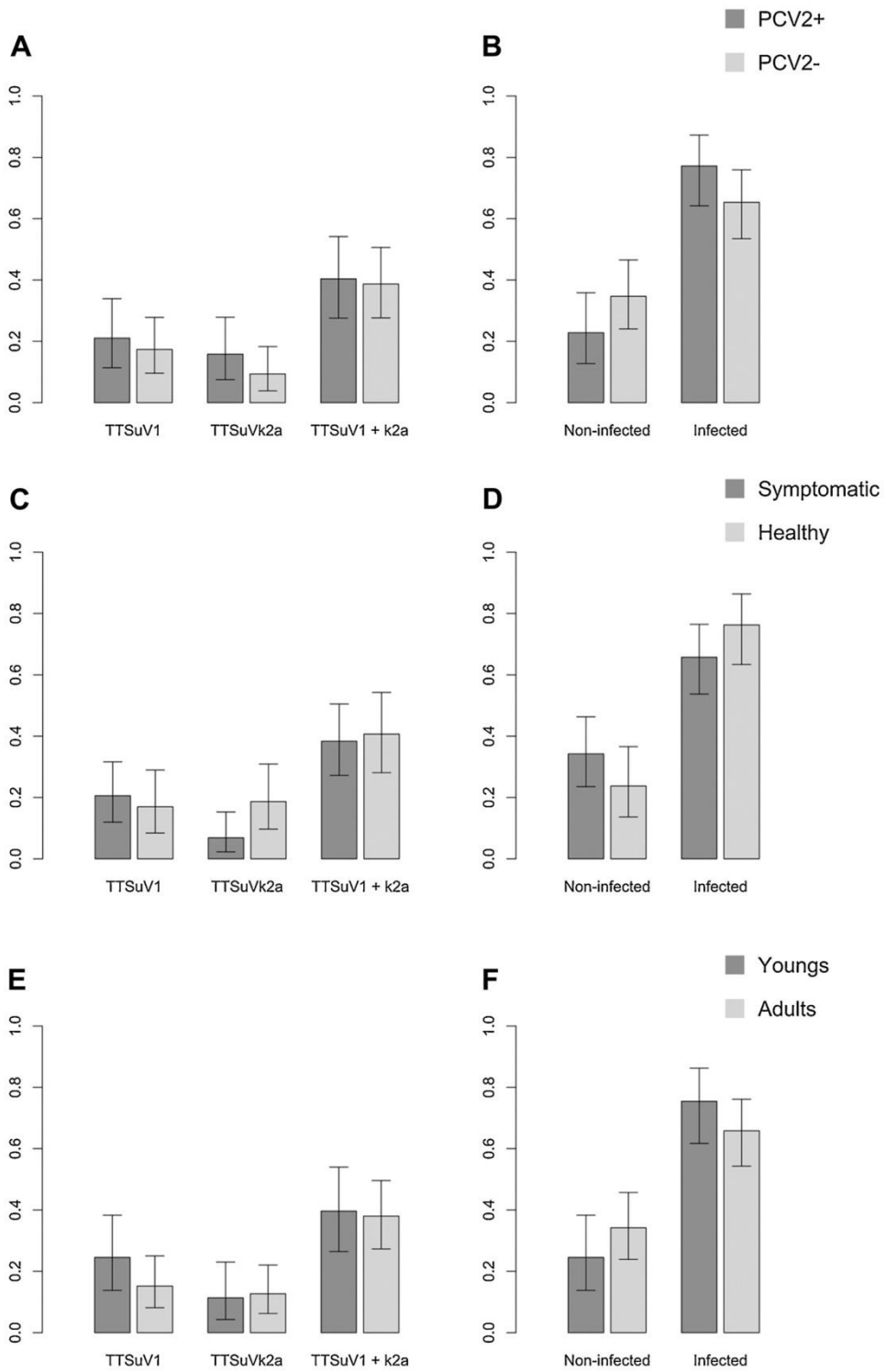


Fig. 2. Proportion of animals infected with TTSuV1 and TTSuVk2a in the three groups of domestic pigs: PCV2-positive (n = 57) vs PCV2-negative (n = 75) (A and B), symptomatic (n = 63) vs healthy (n = 59) (C and D) and young (n = 53) vs adults (n = 79) (E and F). A, C and E: distribution of strains among the TTSuV-infected (single and mixed infections); B, D and F: infected with TTSuV vs non-infected. The error bars represent 95% exact binomial confidence intervals.

3.4. TTSuV1 and TTSuVk2a viral loads have no correlation with PCV2 infection status

TTSuV1 and TTSuVk2a DNA viral loads were quantified in 34 and 35 samples, respectively. Viral load (DNA molecules/mL of serum) of TTSuV1 and TTSuVk2a were quantified by species-specific real time-qPCR. The detection limits of the assay were 10 and 100 copies of plasmid DNA per reaction for TTSuV1 and TTSuVk2a, respectively (Teixeira et al., 2015). Overall (considering both single and/or co-infections), viral DNA load ranged 3.10–7.63 (mean 5.55 SD 1.27) log10 DNA copies/mL for TTSuV1 and 4.34–8.13 (mean 5.61 SD 0.89) log10 for TTSuVk2a. Three TTSuVk2a-positive samples were under the range of quantification (data not shown). No significant differences were observed in the viral DNA loads between TTSuV1 and TTSuVk2a (t =

Table 1
TTSuV Uruguayan strains characterized in this study.

Sample name	Sample origin (Category)	Year of collection	Department origin	Clinical signs	PCV2+	Genetic Group*	Accession number
URU7	Swine (boar)	2010	Soriano	Non	No	TTSuV1a 1a-I	MH469964
						TTSuVk2a 2a-I	MH469978
URU8	Swine (sow)	2010	Soriano	Non	Yes	TTSuV1a 1a-II	MH469965
Uy1	Swine (weaner)	2011	Canelones	Exudative Epidermitis	Yes	TTSuVk2a 2a-II	MH469979
URU33	Swine (weaner)	2011	Canelones	Exudative Epidermitis	Yes	TTSuVk2a 2a-II	MH469980
URU57	Swine (weaner)	2011	San José	Wasting	No	TTSuVk2a 2a-II	MH469981
URU59	Swine (weaner)	2011	San José	Wasting	Yes	TTSuVk2a 2a-II	MH469990
URUJ74	Wild boar	2011	Maldonado	Unknown	No	TTSuV1a 1a-I	MH469966
URU73	Swine (weaner)	2012	Montevideo	Non	No	TTSuVk2a 2a-I	MH469982
URU78	Swine (sow)	2012	Canelones	Abortion and mummified fetuses	No	TTSuV1a 1a-II	MH469967
						TTSuVk2a 2a-II	MH469983
URUJ25	Wild boar	2012	Maldonado	Unknown	Yes	TTSuV1a 1a-I	MH469968
URU42	Swine (sow)	2013	Canelones	Abortion	Yes	TTSuV1a 1a-I	MH469969
URUG	Swine (weaner)	2013	Lavalleja	Diarrhea	Yes	TTSuV1b	MH469970
						TTSuVk2a 2a-II	MH469984
URU288	Swine (weaner)	2013	Canelones	Respiratory disorders, wasting	Yes	TTSuV1a 1a-I	MH469971
URU1310	Swine (weaner)	2013	Canelones	Respiratory disorders, wasting	Yes	TTSuV1a 1a-I	MH469972
						TTSuVk2a 2a-II	MH469985
URU4310	Swine (weaner)	2013	Canelones	Respiratory disorders, wasting	No	TTSuV1a 1a-II	MH469973
URU22510	Swine (sow)	2013	Canelones	Abortion	Yes	TTSuV1a 1a-II	MH469974
						TTSuVk2a 2a-II	MH469986
URU12611	Swine (weaner)	2013	Montevideo	Diarrhea	Yes	TTSuV1c	MH469975
URU32611	Swine (weaner)	2013	Montevideo	Diarrhea	Yes	TTSuV1a 1a-II	MH469976
URU87	Swine (sow)	2013	Durazno	Non	Yes	TTSuVk2a 2a-II	MH469987
URU4013	Swine (weaner)	2014	Canelones	Abortion	Yes	TTSuVk2a 2a-II	MH469988
URU125	Swine (sow)	2014	Canelones	Diarrhea	No	TTSuV1a 1a-I	MH469977
						TTSuVk2a 2a-II	MH469989

* Genetic groups defined in this study according to phylogenetic analysis.

-0.76975, p-value = 0.4445) (supplementary data).

Fifty percent of the samples quantified for TTSuV1 (17/34) and TTSuVk2a (16/32) were also infected with PCV2 (Ramos et al., 2017). No differences in TTSuV viral loads between animals infected and non-infected with PCV2 were observed; neither in TTSuV1 (t = 0.65171, p-value = 0.5193) nor in TTSuVk2a (t = 1.1414, p-value = 0.2627) groups (Fig. 5).

In addition, PCV2 DNA viral loads were quantified in 27 samples most of them co-infected with TTSuV1 and TTSuVk2a (16 co-infected with both TTSuVs, 7 infected with TTSuV1 alone, 3 infected with TTSuVk2a alone and only one non-infected with TTSuV). PCV2 DNA load ranged 2.55–6.7 (mean 4.6 SD 1.02) log10 copies/ mL of serum. The detection limit of the assay was 100 copies per reaction (data not shown). Again, no significant differences were identified in PCV2 viral load from the comparison of individuals infected with TTSuV1 or TTSuVk2a (t = -0.63976, p-value = 0.5262). In addition, no differences were found when comparing PCV2 viral load between animals with single or double TTSuV infections (t = -0.65271, p-value = 0.5208) (Fig. 6). Due to the small amount of sera from animals infected with PCV2 but not infected with TTSuV, we could not analyzed differences in the PCV2 viral loads of TTSuV-infected and non-infected pigs.

Finally, viral load quantification of TTSuV1 and TTSuVk2a showed no significant differences between adults and young pigs and presence or absence of symptomatology (TTSuV1: young vs adults, t = 0.586 p-value = 0.562 and symptomatic vs asymptomatic, t = 0.271 p-value = 0.794; TTSuVk2a: young vs adults, t = −1.243 p-value = 0.224 and symptomatic vs asymptomatic, t = −0.195 p-value = 0.849) (data not shown).

4. Discussion

TTSuVs are ubiquitous worldwide distributed agents found in both domestic pigs and wild boars (Kekarainen and Segalés, 2012). Our investigation showed a wide distribution of TTSuVs in Uruguayan swine herds and revealed that these viruses have been infecting pigs in this country at least since 2010. Positive samples were detected in all surveyed Departments, comprising the south, east and west of Uruguay where more than 90% of the farms and abattoir are located (Fig. 1). The elevated overall frequency of TTSuV infection detected in pigs in this study is in agreement with previous reports (frequencies of detection of 72%–83%) (Kekarainen et al., 2006; Gallei et al., 2010; Mei et al., 2013; Blois et al., 2014). In addition, TTSuV1 and TTSuVk2a infections were found to be significantly more frequent in co-infections than in single infections. This observation is not surprising since TTSuV co-infections seems to be very common (Taira et al., 2009; Gallei et al., 2010; Aramouni et al., 2011; de Castro et al., 2012; Mei et al., 2013; Teixeira et al., 2013; Blois et al., 2014). Moreover, the frequency of mixed infections observed in this work (56% of the TTSuV infected pigs) is higher than that reported by Taira et al. (2009); Gallei et al. (2010) and Mei et al. (2013) and similar to other previous study (Aramouni et al., 2011). Considering only single infections, TTSuV1 resulted to be more frequent (27%) than TTSuVk2a (17%), which has been previously reported in other works (Gallei et al., 2010; Blois et al., 2014). However, an inverted rate was also observed (Aramouni et al., 2011; Mei et al., 2013).

Presence of TTSuV was also studied in wild boar populations. Despite the low number of tested animals, we identified for the first time in the Americas the circulation of TTSuV among free-living wild boars, with a high frequency of infection (51%). In contrast to the observed in domestic pigs, no mixed infections were detected. In addition, while TTSuV1 was very frequently found, TTSuVk2a was scarcely identified (6%). To the best of our knowledge, only three previous works described the detection of TTSuV in wild boars, all of them from Europe (Martínez et al., 2006; Gallei et al., 2010; Cadar et al., 2013). These works comprised a higher number of samples than the reported herein, and they also observed a higher frequency of infection (68%–88%). However, by contrast to our findings, all these previous works demonstrated that TTSuV co-infections are common in wild boars (Martínez et al., 2006; Gallei et al., 2010; Cadar et al., 2013).



Fig. 3. Phylogenetic analysis performed with partial TTSuV genome regions. Tree was constructed by maximum likelihood method with the Kimura two-parameter + Gamma distribution model based on 678 nt (TTSuV1) and 719 nt (TTSuVk2a). Twenty-nine sequences of two TTSuV genera (accession numbers and country are specified) were included for comparison with TTSuV1 and TTSuVk2a isolates detected in this study (in bold). Genera and species are indicated with straight brackets. Bootstrap support values above 70% are shown. New species proposed in this study for TTSuV1, named TTSuV1c, is indicated (*). Proposed groups within species are named in this work as clade 1a-I and 1a-II for TTSuV1a and clade 2a-I and 2a-II for TTSuVk2a (**).

Additionally, in two works TTSuVk2a resulted more prevalent than TTSuV1 (Martínez et al., 2006; Gallei et al., 2010). The analysis of a more extensive number of samples is required to further investigate the distribution of TTSuV species in wild boars from Uruguay.

The molecular epidemiology of TTSuV strains has been poorly characterized, particularly in South America and other developing

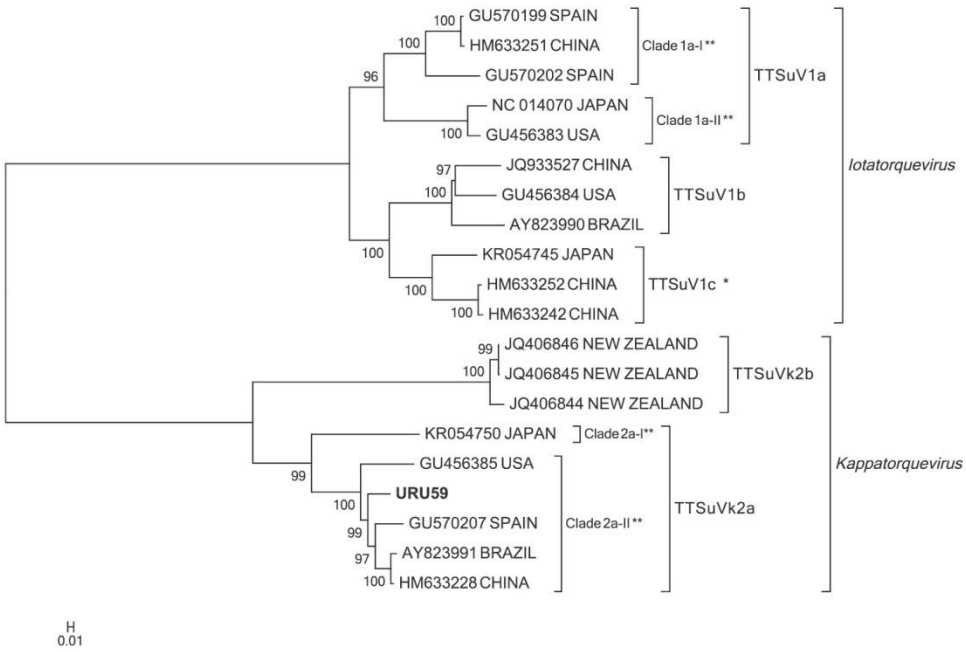


Fig. 4. Phylogenetic analysis performed with TTSuV complete genome. Tree was constructed by maximum likelihood method with General Time Reversible + Gamma distribution model as the model of nucleotide substitution. Nineteen complete sequences were included (accession numbers and country are specified). Complete genome of the TTSuVk2a isolate identified in this study is shown in bold. Genera and species are indicated with straight brackets. Bootstrap support values above 70% are shown. New species proposed in this study for TTSuV1, named TTSuV1c, is indicated (*). Proposed groups within species are named in this work as clade 1a-I and 1a-II for TTSuV1a and clade 2a-I and 2a-II for TTSuVk2a (**).

regions. Therefore, one of the main purposes of this work was to explore the genetic diversity of TTSuV1 and TTSuVk2a strains from Uruguay, thus providing an extensive and fully characterized sequence dataset (Table 1). High levels of genetic variability have been found among Uruguayan strains of TTSuV1 and TTSuVk2a. Indeed, it is well documented that these viruses exhibit nucleotide mutation rates on a level comparable to RNA viruses, likely due to an apparent lack of selective pressures (Cortey et al., 2012).

Phylogenetic analyses showed that TTSuV strains were not linked to geographic regions or year of sampling (Fig. 3; Table 1). Moreover, no association was observed between strains identified in samples from the same farm collected at the same time (data not shown). This observation sharply contrasts with our previous work involving PCV2 where viruses detected in samples obtained from a same herd tended to share a high nucleotide identity (Ramos et al., 2017). Altogether, these results suggests that although PCV2 and TTSuV are similar viruses, both with circular DNA genome and with high evolution rates (Firth et al., 2009; Cortey et al., 2012), they show differences in their molecular epidemiology, population dynamics and maybe in the mechanisms that rules the host–pathogen interactions and host-to-host transmission.

The current classification divides TTSuV into to two genera: *Iotatorquevirus* (TTSuV1) and *Kappatorquevirus* (TTSuV2k), with two species for TTSuV1 (TTSuV1a and TTSuV1b) and two for TTSuVk2 (TTSuVk2a and TTSuVk2b) (ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses, 2017). There are just a few works that deeper in the molecular characterization of TTSuV and the classification that had been used is often contradictory and ambiguous, and it frequently differs from the current accepted one (Huang et al., 2010; Cortey et al., 2011, 2012; Cadar et al., 2013; Li et al., 2013; Ozawa et al., 2015). Previous studies accounting for an exhaustive characterization of TTSuV strains have proposed four genetic groups for TTSuV1 (1a-1d) and two genetic groups for TTSuV2ka (2a and 2b) (Cortey et al., 2012; Cadar et al., 2013). Other researchers based their phylogenetic analyses on the current classification (Cornelissen-Keijsers et al., 2012; Rogers et al., 2017), but they focused on the identification of the new species TTSuV2kb, that seems to have less intra-specie variability than species studied in this work (Cornelissen-Keijsers et al., 2012; Rogers et al., 2017). Herein, we proposed a more comprehensive criterion of classification which could contributes to better describe the diversity of TTSuV1 and TTSuVk2a worldwide.

Taking to account the phylogenetic analysis based on partial (including UTR, complete ORF2 and a fragment of ORF1) and complete genome, we observed that the genus *Iotatorquevirus* comprised three main clusters: TTSuV1a, TTSuV1b and TTSuV1c (additional species proposed in this study). In addition, TTSuV1a could be divided into two monophyletic clades named in this work: 1a-I and 1a-II (Figs. 3 and 4).

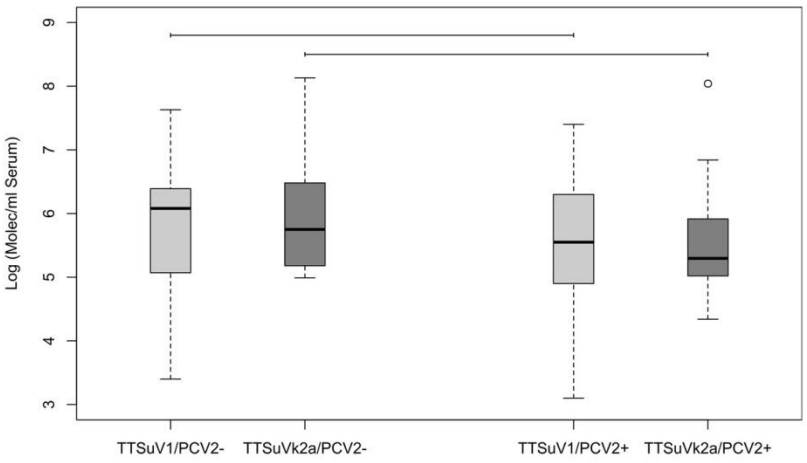


Fig. 5. Distribution of TTSuV viral loads (in molecules per milliliter of serum, log-scaled) in domestic pigs in the following groups: TTSuV1/PCV2-: Infected with TTSuV1 and non-infected with PCV2; TTSuVk2a/PCV2-: Infected with TTSuVk2a and non-infected with PCV2; TTSuV1/PCV2+: Infected with TTSuV1 and with PCV2; TTSuVk2a/PCV2-: Infected with TTSuVk2a and with PCV2. The horizontal lines at the top show which group means were compared.

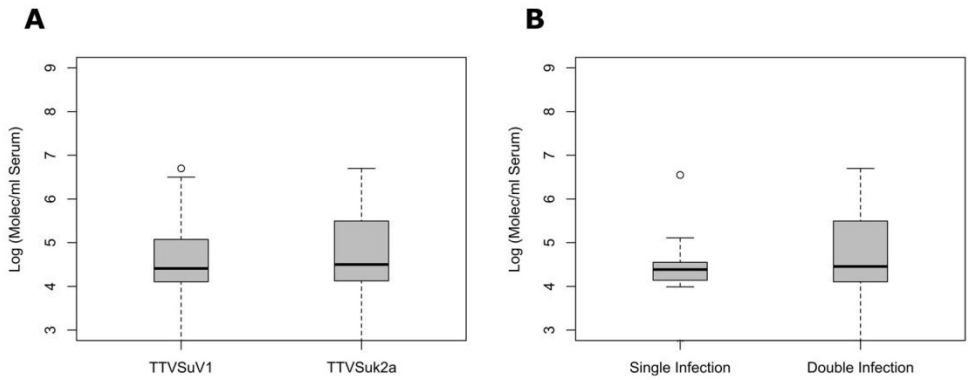


Fig. 6. Distribution of PCV2 viral loads (in molecules per milliliter of serum, log-scaled) in animals infected with TTSuV1 or TTSuVk2a (A) and infected with one (single infection) or two TTSuV genera (double infection) (B) (see text for more details).

In comparison with previous TTSuV classification, clades 1a-I and 1a-II correspond with type 1c and type 1a, respectively and species TTSuV1b and TTSuV1c correlate with types 1b and 1d, respectively (Cortey et al., 2012; Cadar et al., 2013; Ozawa et al., 2015). On the other hand, phylogenetic trees showed that *Kappatorquevirus* could be divided into two main groups or species TTSuVk2a and TTSuVk2b and in turn, TTSuVk2a comprise two clades named in this work: 2a-I and 2a-II (Figs. 3 and 4). These groups were named by previous studies as type 2b and 2a, respectively (Cortey et al., 2012; Cadar et al., 2013).

The whole genome of a single strain, URU59, was obtained using RCA. In fact, sequencing of TTSuV complete genomes is laborious and time-consuming, probably because of their high genetic heterogeneity which has been reflected in the low number of TTSuV complete genome sequences available at the GenBank database (137, to May 2018). Indeed, RCA approaches with random primers have been used for the study of the virus variability but it has been more effective for the detection of novel species than for the amplification of complete genomes from a large number of samples (Niel et al., 2005; Cornelissen-Keijsers et al., 2012).

No discrepancy in the definition of groups was observed comparing the phylogenetic trees performed with the partial and the whole genome (Figs. 3 and 4). Nevertheless, TTSuV1b resulted to be more closely related with TTSuV1a than TTSuV1c in the analysis based on the partial genome (Fig. 3). It is noteworthy that this feature was previously observed by other researchers which used the same region for the phylogenetic analysis (Cortey et al., 2012; Cadar et al., 2013). By contrast, the analysis of UTR alone revealed inconsistencies in the phylogenetic relationships between genetic groups especially within TTSuV1 (data not shown). These results suggest that the analysis of the genomic region proposed by Cortey et al., 2012 is necessary and sufficient to carry out the genetic characterization of TTSuV strains.

The epidemiological pattern observed in Uruguay (predominance of TTSuV1a and TTSuVk2a clade 2a-II) fully agrees with previous results for other countries from South America (Argentina and Chile), North America (Canada and USA) and Europe (Spain, Germany and United Kingdom) (Cortey et al., 2012). Although TTSuV1b is frequently found in many European countries, is not commonly reported in America (Cortey et al., 2012). In fact, only one TTSuV1b strain has been previously identified in Brazil (Niel et al., 2005). On the other hand, TTSuV1c is worldwide distributed (Cortey et al., 2012)

Only two strains of wild boards were characterized at molecular level. Probably, the low number of wild boars samples tested and the improper preservation of samples during long hunting sessions could have impeded a better characterization. Unfortunately data regarding viral load of these samples, which might explain this low sensitivity, is not available.

In view of the controversial information about the pathogenic role of TTSuV, this study was also conducted to evaluate the frequency of detection and viral loads of TTSuV in domestic pigs with different PCV2 infection status. Our data suggested independence between the infection with PCV2 and the infection with TTSuV in domestic pigs (Fig. 2A and B) and in free-living wild boars (data not shown). This result is consistent with data obtained by other researchers (Lee et al., 2010; Teixeira et al., 2015). Furthermore, no difference of TTSuV frequency of infection between healthy and sick domestic pigs was observed (Fig. 2C and D) which is in agreement with other results (Aramouni et al., 2011; Nieto et al., 2011, 2013; Teixeira et al., 2015; de Menezes Cruz et al., 2016). Moreover, no statically difference was observed in TTSuV1 and TTSuVk2a DNA loads per ml of serum between PCV2-infected and non-infected pigs (Fig. 5) and between healthy pigs and with PCVAD-associated clinical symptoms (data not shown). In agreement with these results, other authors have not found a remarkable difference in TTSuV loads between PCV2 negative and PCVAD-affected pigs (Lee et al., 2010; Vargas-Ruiz et al., 2017) or between healthy and PCV2-SD affected animals (Teixeira et al., 2015). On the contrary, other researchers showed that only TTSuVk2a loads were higher in PCV2-SD affected pigs (Aramouni et al., 2011; Nieto et al., 2013), however TTSuV loads were not statistically different between healthy and porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS)-affected animals (Aramouni et al., 2011). In addition, Kekarainen et al. (2006) showed higher TTSuVk2a prevalence in PCV2-SD affected animals but no TTSuV prevalence differences between healthy pigs and with mild PCV2-SD. Other recent study showed that only frequency of TTSuV1 detection was associated to clinical disease (multiple signs) (de Menezes Cruz et al., 2016). Comparisons with other works are complex due to the controversial results, number of samples studied and the groups of animals compared. Particularly, in this work were included animals with PCVAD-associated symptoms (Table 1) but not were identified pigs with PCV2-SD. Probably due to the fact that in our country, PCV2 is a relatively recent sanitary problem (Ramos et al., 2012) and the diagnosis of these syndromes associated to such infections has not yet become routine in veterinary practice. However, the PCV2 viral loads identified in the diseased animals included in this study suggested that none of them exhibited severe PCV2-SD (Olvera et al., 2004).

TTSuV frequency of infection did not vary with age (Fig. 2F and G) which has also been observed in other previous studies (Blois et al., 2014; Teixeira et al., 2015). In addition, no association was identified in TTSuV loads between adults and young pigs (data not shown). Although employing different methodological approaches, other authors observed that the prevalence of at least one genus of TTSuV was higher in nursery or young pigs (Blois et al., 2014; de Castro et al., 2015; de Menezes Cruz et al., 2016) whereas others provided evidence that the prevalence of TTSuV would increase with aging (Sibila et al., 2009; Nieto et al., 2011; Xiao et al., 2012; Teixeira et al., 2015).

5. Conclusions

In summary, the findings reported here reveal a ubiquitous distribution of TTSuV among pig herds and wild boars in Uruguay, with high detection rates. TTSuV1 and TTSuVk2a co-infections in domestic pigs were significantly more frequent than single infections. TTSuV Uruguayan strains exhibited extremely high genetic heterogeneity which was not associated with geographic origin or year of sample collection. Based in our findings and an extensive revision of published data, we propose a more comprehensive criterion of TTSuV classification that could contribute to better understand the phylogenetic relationships and the viral molecular epidemiology worldwide. The epidemiological picture of TTSuV1 in Uruguay reflects a clear predominance of TTSuV1a circulation, in particular type 1a-I, which was also observed in South-America, North-America and Europe. Besides, as in most reports worldwide, species TTSuVk2a clade 2a-II, formerly known as type 2a, was the most frequently detected type.

In addition, data presented here suggest that neither TTSuV1 nor TTSuVk2a frequencies of detection or viral loads seem to have any correlation with PCV2 infection, health status or age. The inconsistent data reported from many previous studies, maybe owing to the different approaches of investigation, leaves an open room for defining the role for TTSuV co-infections with other pathogens. Likewise, the age-related dynamics of TTSuV infections are far from being elucidated. Taking this into account and added to their high prevalence worldwide and their capacity to induce persistent infections, a likely role of these viruses as components of the host microbiota should not be ruled out.

Declaration of conflict of interest

None.

Acknowledgments

Authors are grateful to Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Agencia Nacional de Innovación e Investigación (ANII) and Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.08.029.

References

Aramouni, M., Segalés, J., Cortey, M., Kekarainen, T., 2010. Age-related tissue distribution of swine Torque teno sus virus 1 and 2. Vet. Microbiol. 146, 350–353.
Aramouni, M., Segales, J., Sibila, M., Martin-Valls, G.E., Nieto, D., Kekarainen, T., 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. Vet. Microbiol. 153, 377–381.
Biagini, P., 2009. Classification of TTV and related viruses (anelloviruses). Curr. Top. Microbiol. Immunol. 331, 21–33.
Blois, S., Mallus, F., Liciardi, M., Pilo, C., Camboni, T., Macera, L., Maggi, F., Manzin, A., 2014. High prevalence of co-infection with multiple Torque teno sus virus species in Italian pig herds. PLoS One 9 (11), e113720.
Cadar, D., Kiss, T., Ádám, D., Cságola, A., Novosel, D., Tuboly, T., 2013. Phylogeny, spatio-temporal phylodynamics and evolutionary scenario of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) in wild boars: fast dispersal and high genetic diversity. Vet. Microbiol. 166 (1-2), 200–213.
Cornelissen-Keijsers, V., Jimenez-Melsio, A., Sonnemans, D., Cortey, M., Segales, J., van den Born, E., Kekarainen, T., 2012. Discovery of a novel Torque teno sus virus species: genetic characterization, epidemiological assessment and disease association. J. Gen. Virol. 93, 2682–2691.
Cortey, M., Macera, L., Segales, J., et al., 2011. Genetic variability and phylogeny of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) based on complete genomes. Vet. Microbiol. 148, 125–131.
Cortey, M., Pileri, E., Segales, J., et al., 2012. Globalisation and global trade influence molecular viral population genetics of Torque Teno Sus Viruses 1 and 2 in pigs. Vet. Microbiol. 156, 81–87.
de Castro, A.M.M.G., Favero, C.M., Baldin, C.M., Borba, M., Castro Júnior, F.G., Miyashiro, S., Moura, J.C., Dias, R.A., Brandão, P.E., Richtzenhain, L.J., 2012. Preliminary study of Porcine circovirus type 2 and torque teno sus virus co-infection frequencies in Brazilian pig herds. Can. J. Vet. Res. 76, 174–179.
de Castro, A.M.M.G., Baldin, C.M., Favero, C.M., Gerber, P.F., Cipullo, R.I., Richtzenhain, L.J., 2015. Torque teno sus virus 1 and 2 viral loads in faeces of porcine circovirus 2-positive pigs. Acta Vet. Brno. 84, 91–95.
de Menezes Cruz, A.C., Silveira, R.L., Baez, C.F., Varella, R.B., de Castro, T., 2016. Clinical aspects and weight gain reduction in swine infected with porcine circovirus type 2 and torque teno sus virus in Brazil. Vet. Microbiol. 195, 154–157.
Dezen, D., Rijsewijk, F.A., Teixeira, T.F., et al., 2011. Comparative evaluation of a competitive polymerase chain reaction (PCR) and a SYBR Green-based real-time PCR to quantify Porcine circovirus-2 DNA in swine tissue samples. J. Vet. Diagn. Invest. 23, 1160–1167.
Dorai-Raj, S., 2014. Binom: Binomial Confidence Intervals for Several Parameterizations.
Ellis, J.A., Allan, G., Krakowka, S., 2008. Effect of coinfection with genogroup1 porcine Torque teno virus on porcine circovirus type 2- associated postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic pigs. Am. J. Vet. Res. 69, 1608–1614.
Firth, C., Charleston, M.A., Duffy, S., Shapiro, B., Holmes, E.C., 2009. Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: porcine circovirus 2. J. Virol. 83, 12813–12821.
Gallei, A., Pesch, S., Esking, W.S., Keller, C., Ohlinger, V.F., 2010. Porcine Torque teno virus: determinants of viral genomic loads by genogroup-specific multiplex RT-PCR, detection of frequent multiple infections with genogroups 1 or 2, and establishment of viral full-length sequences. Vet. Microbiol. 143, 202–212.
Griffiths, P., 1999. Time to consider the concept of a commensal virus? Rev. Med. Virol. 9 (2), 73–74.
Huang, Y.W., Ni, Y.Y., Dryman, B.A., Meng, X.J., 2010. Multiple infection of porcine Torque teno virus in a single pig and characterization of the full-length genomic sequences of four U.S. prototype PTTV strains: implication for genotyping of PTTV. Virology 396, 289–297.
ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses, 2017. ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses. Retrieved from. https://talk.ictvonline.org/taxonomy/.
Jiménez-Melsió, A., Parés, S., Segalés, J., Kekarainen, T., 2013. Detection of porcine anelloviruses in pork meat and human faeces. Virus Res. 178 (2), 522–524.
Kekarainen, T., Segalés, J., 2012. Torque teno sus virus in pigs: an emerging pathogen? Transbound. Emerg. Dis. 59, 103–108.
Kekarainen, T., Sibila, M., Segalés, J., 2006. Prevalence of swine Torque teno virus in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs in Spain. J. Gen. Virol. 87, 833–837.
Lee, Sung.-seok., Jung, Hokyung., Shin, Jungyeon., Lyoo, Young.S., 2010. Quantitative detection of porcine Torque teno virus in Porcine circovirus-2–negative and Porcine circovirus–associated disease-affected pigs. J. Vet. Diagn. Invest. 22, 261–264.
Lee, Y., Lin, C.M., Jeng, C.R., Chang, H.W., Chang, C.C., Pang, V.F., 2015. The pathogenic role of torque teno sus virus 1 and 2 and their correlations with various viral pathogens and host immunocytes in wasting pigs. Vet. Microbiol. 180 (3-4), 186–195.
Li, K., Wang, L.Q., Wu, Y.Y., Chao, A.J., Lu, Q.W., Wei, Z.Y., Cui, B.A., Chen, H.Y., 2013. Molecular detection and genomic characterization of Torque teno sus virus 1 and 2 from domestic pigs in central China. Virus Genes 46 (3), 479–486.
Manzin, A., Mallus, F., Macera, L., Maggi, F., Blois, S., 2015. Global impact of Torque teno virus infection in wild and domesticated animals. J. Infect. Dev. 9 (6), 562–570.
Martelli, F., Caprioli, A., Di Bartolo, I., Cibin, 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, L., Kekarainen, T., Sibila, M., Ruiz-Fons, F., Vidal, D., Gortázar, C., Segalés, J., 2006. Torque teno virus (TTV) is highly prevalent in the European wild boar (Sus scrofa). Vet. Microbiol. 118, 223–229.
McKeown, N.E., Fenaux, M., Halbur, P.G., et al., 2004. Molecular characterization of porcine TT virus, an orphan virus, in pigs from six different countries. Vet. Microbiol. 104 (1-2), 113–117.
Mei, M., Zhu, L., Xu, Z., Zhao, L., Zhou, Y., Wu, Y., Li, S., Wei, H., Guo, W., 2013. Molecular investigation of Torque teno sus virus in geographically distinct porcine breeding herds of Sichuan. China Virol J 10, 161.
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, 1343–1347.
Nieto, D., Aramouni, M., Grau-Roma, L., Segales, J., Kekarainen, T., 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. Microbiol. 152, 284–290.
Nieto, D., Kekarainen, T., Aramouni, M., Segales, J., 2013. Torque teno sus virus 1 and 2 distribution in tissues of porcine circovirus type 2-systemic disease affected and age-matched healthy pigs. Vet. Microbiol. 163, 364–367.
Okamoto, H., 2009. TT viruses in animals. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 331, 35–52.
Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., et al., 2002. Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaias. J. Gen. Virol. 83 (Pt 6), 1291–1297.
Olvera, A., Sibila, M., Calsamiglia, M., Segales, J., Domingo, M., 2004. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. J. Virol. Methods 117, 75–78.
Ozawa, M., Kawabata, T., Okuya, K., Nagano, K., Kanda, T., Kanazawa, N., Tsukiyama-Kohara, K., Taneno, A., Deguchi, E., 2015. Full genome sequences of torque teno sus virus strains that coinfected a pig with postweaning multisystemic wasting syndrome in Japan: implications for genetic diversity. Arch. Virol. 160 (12), 3067–3074.
R Core Team, 2016. R: a Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.

R Studio Team, 2012. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston.
Ramos, N., Mirazo, S., Castro, G., Arbiza, J., 2012. Detection and molecular characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) from piglets with exudative epidermitis in Uruguay. Res. Vet. Sci. 93, 1042–1045.
Ramos, N., Porley, D., Mirazo, S., Castro, G., Cabrera, K., Lozano, A., Arbiza, J., 2017. Molecular study of Porcine Circovirus type 2 in wild boars and domestic pigs in Uruguay from 2010 to 2014: predominance of recombinant circulating strains. Gene 637, 230–238.
Rogers, A.J., Huang, Y.W., Heffron, C.L., Opriessnig, T., Patterson, A.R., Meng, X.J., 2017. Prevalence of the novel torque teno sus virus species k2b from pigs in the United States and lack of association with post-weaning multisystemic wasting syndrome or mulberry heart disease. Transbound. Emerg. Dis. 64 (6), 1877–1883.
Segalés, J., 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. Virus Res. 164, 10–19.
Segalés, J., Martínez-Guinó, L., Cortey, M., Navarro, N., Huerta, E., et al., 2009. Retrospective study on swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 infection from 1985 to 2005 in Spain. Vet Mircobiol 134, 199–207.
Sibila, M., Martinez-Guino, L., Huerta, E., Llorens, A., Mora, M., Grau-Roma, L., Kekarainen, T., Segales, J., 2009. Swine torque teno virus (TTV) infection and excretion dynamics in conventional pig farms. Vet. Microbiol. 139, 213–218.
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), 347–350.
Teixeira, T.F., Dezen, D., Cibulski, S.P., et al., 2013. Torque teno sus virus (TTSuV) in tissues of pigs and its relation with the occurrence of postweaning multisystemic wasting syndrome. Virus Genes 47, 276–281.
Teixeira, T.F., Cibulski, S.P., dos Santos, H.F., Wendlant, A., de Sales Lima, F.E., Schmidt, C., Franco, A.C., Roehe, P.M., 2015. Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) viral loads in serum of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and healthy pigs in Brazil. Res. Vet. Sci. 101, 38–41.
Vargas-Ruiz, A., Ramírez-Álvarez, H., Sánchez-Betancourt, J.I., Quintero-Ramírez, V., Rangel-Rodríguez, I.C., Vázquez-Perez, J.A., García-Camacho, L.A., 2017. Retrospective study of the relationship of Torque teno sus virus 1a and Torque teno sus virus 1b with porcine circovirus associated disease. Can. J. Vet. Res. 81 (3), 178–185.
Xiao, C.T., Gimenez-Lirola, L., Huang, Y.W., Meng, X.J., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2012. The prevalence of Torque teno sus virus (TTSuV) is common and increases with the age of growing pigs in the United States. J. Virol. Methods 183, 40–44.
Zhang, Z., Wang, Y., Dai, W., Dai, D., 2014. Detection and distribution of torque teno sus virus 1 in porcine reproductive and respiratory syndrome virus positive/negative pigs. Vet. Microbiol. 172, 367–370.

Supplementary data. Distribution of TTSuV viral loads (in molecules per milliliter of serum, log-scaled) for animals infected with TTSuV1 or TTSuVk2a.

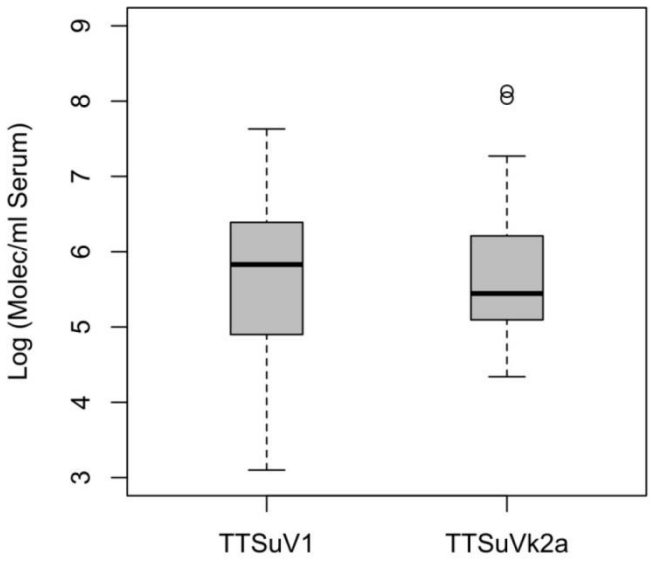




Figura 5.3.1 complementaria. Análisis filogenético basado en la secuencia UTR. Se incluyeron diferentes cepas de TTSuV1 y TTSuVk2a con su número de acceso al GenBank y país de origen. Una cepa de TTV humano fue incluida como grupo externo del análisis. Se incluyeron cepas Uruguayas de diferentes grupos genéticos, las cuales se indican en negro. Las cepas identificadas en diferentes órganos del mismo animal se muestran en rojo. Se muestran valores de soporte de bootstrap superiores al 70%.

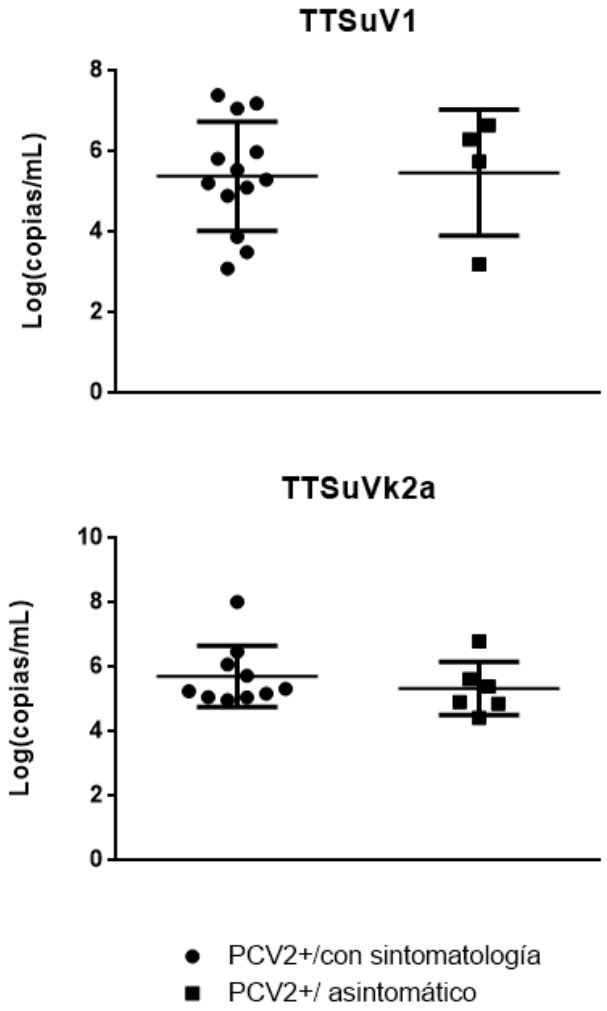


Figura 5.3.2 complementaria. Distribución de las cargas virales de TTSuV1 y TTSuVk2a en animales infectados con PCV2 con y sin sintomatología. Se indica el valor promedio y el desvío estándar para cada uno de los grupos. La carga viral se muestra en copias/mL en escala logarítmica. El punto atípico en la gráfica de TTSuVk2a en el grupo PCV2+/con sintomatología corresponde a la muestra URU59 con 8.03 log 10 copias/mL.

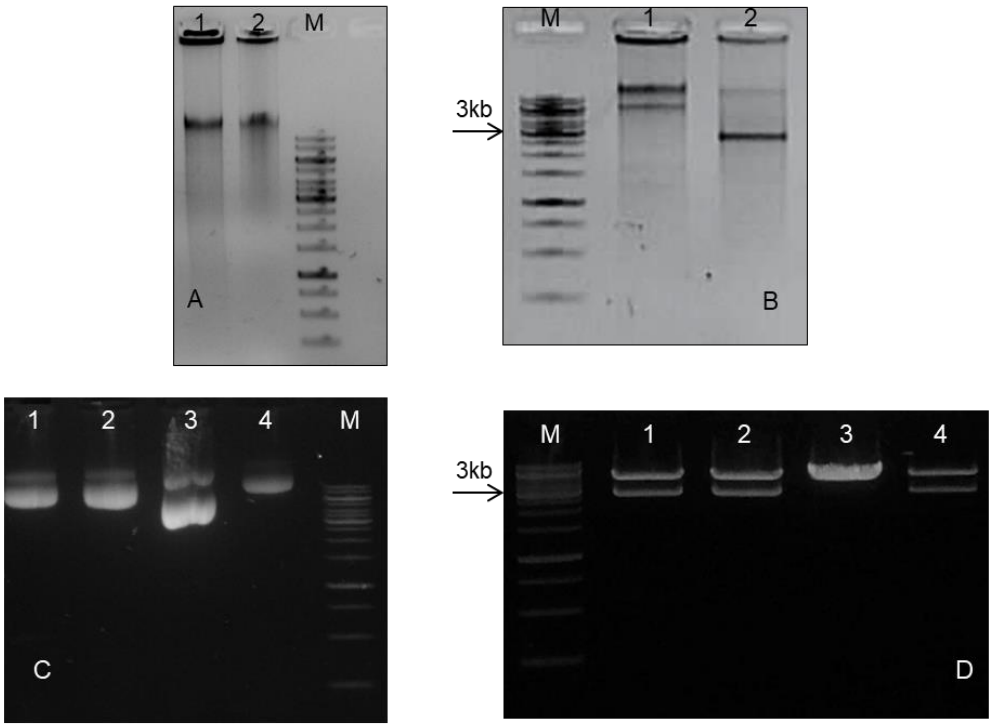


Figura 5.3.3 complementaria. Obtención del genoma completo de TTSuVk2a URU59 por RCA. A) Producto de amplificación de la ADN polimerasa Phi29. En 1 se observa una muestra negativa para TTSuV y en 2 se muestra URU59. B) En el carril 2 se observa el fragmento de aproximadamente 2.8kb obtenido luego de la digestión del producto de amplificación A con la enzima BamHI. C) Se observan los plásmidos purificados a partir de 4 colonias transformadas con el vector pEGFP-C3 conteniendo el fragmento de 2.8kb obtenido en B. D) Producto de la digestión de los plásmidos con BamHI. Sólo los plásmidos 1, 2 y 4 contienen el inserto de interés. M: marcador de peso molecular de 1kb (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.

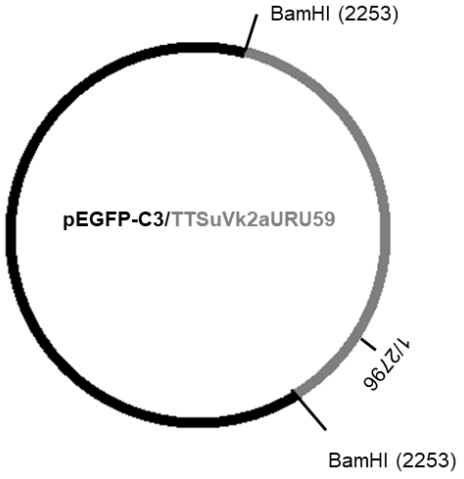


Figura 5.3.4 complementaria. Diagrama esquemático de la construcción que contiene el genoma completo de TTSuVk2a. Se muestra la localización del inserto (gris) clonado en los sitios BamHI del vector pEGFP-C3 (negro). Se indica la posición del genoma de TTSuVk2a de URU59 a la que corresponde. También se detalla la posición del primer y último nucleótido del genoma.

5.4. Trabajo complementario. Detección y caracterización molecular de TTVh en Uruguay.

A raíz del estudio sobre TTSuV en cerdos, resultó interesante comenzar a investigar la circulación de TTV en humanos. Particularmente, fueron analizadas muestras de pacientes con HIV-I, con hepatitis B, C y de etiología desconocida, observándose una alta frecuencia de infección (79%, 67/85) y una gran variabilidad genética entre las cepas detectadas. Este constituyó el primer reporte de la detección de TTVh en humanos en Uruguay y fue el trabajo de tesina de grado de la Lic. Florencia Cancela, el cual estuvo bajo mi tutoría y la del Dr. Juan Arbiza. La selección de la población de estudio estuvo basada en los numerosos reportes que asociaban una alta prevalencia de este virus en pacientes inmunocomprometidos o con hepatitis (Charlton, et al., 1998; Christensen et al., 2000). Sin embargo, al igual que ocurre con TTSuV, TTVh también ha sido identificado en la población sana con prevalencias del 46-69% (Devalle y Niel, 2004; Mazzola et al., 2015) y por lo tanto, sería interesante realizar este mismo trabajo pero en donantes de sangre. Por otro lado, ya que hay evidencia muy reciente de que tal vez los TTV no sean especie-específicos y que su rango de hospedero sea más amplio del que se cree (Singh y Ramamoorthy, 2018), también sería interesante evaluar la presencia de TTSuV en estas muestras humanas y viceversa.

Infection, Genetics and Evolution 44 (2016) 501–506

Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid

Research paper

Detection and molecular characterization of Torque Teno Virus (TTV) in Uruguay

Florencia Cancela [a,1], Natalia Ramos [a,1], Santiago Mirazo [a], Victoria Mainardi [b], Solange Gerona [b], Juan Arbiza [a,*]

[a] Sección Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay
[b] Servicio de Hepatología, Hospital Central de las Fuerzas Armadas, Ministerio de Defensa Nacional, Avenida 8 de Octubre 3060, 11800 Montevideo, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:
Received 29 April 2016
Received in revised form 5 August 2016
Accepted 6 August 2016
Available online 07 August 2016

Keywords:
Torque Teno Virus
Detection
Molecular characterization
Uruguay

ABSTRACT

Torque Teno Virus (TTV), member of *Anelloviridae* family, is considered a worldwide distributed emergent virus and is currently classified into seven genogroups.
Interestingly, the pathogenicity of TTV remains unclear. However, it has been constantly associated to hepatitis cases of unknown etiology (HUE) as well as extensively studied in concurrent infections with Hepatitis B Virus (HBV), Hepatitis C Virus (HCV) and Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1).
In South America, TTV epidemiological data is scant, involving some studies from Brazil, Venezuela, Colombia and Bolivia.
The aim of this work was to investigate for the first time in Uruguay the presence of TTV by a nested-PCR system in 85 human serum samples infected with HBV and/or HCV and/or HIV-1 and in HUE cases.
Overall, our results reported a TTV infection rate of 79% (67/85). Furthermore, the molecular characterization of Uruguayan strains revealed that one of them clustered in genogroup 1, while the remaining ones formed separate clusters closely related to genogroup 3, which should be confirmed by complete genome sequencing.
Further investigation about TTV circulation in Uruguayan population is needed in order to provide additional information about the genetic variability and TTV epidemiology in South America.
© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Torque Teno Virus (TTV) was identified for the first time in 1997 in the serum of a Japanese patient with post-transfusion hepatitis of unknown etiology (Nishizawa et al., 1997).

Since 2005, the TTVs are classified into the *Anelloviridae* family (Biagini et al., 2004), which comprises three human infecting viruses, TTV, Torque Teno Mini Virus (TTMV) (Takahashi et al., 2000) and Torque Teno Midi Virus (TTMDV) (Ninomiya et al., 2007), belonging to the genus *Alphatorquevirus*, *Betatorquevirus* and *Gammatorquevirus*, respectively (Biagini, 2009).

TTV is a singular small non-enveloped virus, with a single-stranded circular DNA genome of negative polarity and a genomic length of 3.6–3.9 kb (Miyata et al., 1999; Mushahwar et al., 1999). The genomic structure consists of an untranslated region (UTR) of 1.2 Kb, divided into UTR A and UTR B, located 3′ and 5′ to the GC-rich region, respectively (Okamoto et al., 1999).

Additionally, TTV genome contains a 2.6 Kb coding region with two main open reading frames (ORFs) and several shorter ORFs (Bendinelli et al., 2001; Erker et al., 1999; Hijikata et al., 1999a; Miyata et al., 1999; Mushahwar et al., 1999; Okamoto et al., 1998a). ORF1 the largest one, encodes the capsid protein (Takahashi et al., 1998), which is also suggested to be involved in rolling circle replication (Erker et al., 1999; Luo et al., 2002; Mushahwar et al., 1999; Tanaka et al., 2001a). In addition, ORF1 contains the N22 region that encodes the non-structural protein 22 (Nishizawa et al., 1997; Mushahwar et al., 1999). ORF2 produces a protein with a putative conserved motif (Hijikata et al., 1999a; Peng et al., 2002; Tanaka et al., 2001a) corresponding to the protein-tyrosine phosphatase, likely involved in the regulation of cellular and viral proteins during infection (Peters et al., 2002).

TTV has recently been classified into seven distinct phylogenetic groups (Hsiao et al., 2016). Even though TTV is a DNA virus, it exhibits a nucleotide sequence divergence greater than 50% between genogroups (Biagini et al., 2004; Biagini et al., 2006; Okamoto et al., 2004; Peng et al., 2002) and a variability range of 47% to 70% at the amino acid level among different strains (Biagini et al., 1999; Luo et al., 2002), distributed in at least 39 genotypes (Ninomiya et al., 2008). In fact, co-infection with several TTV genotypes and genogroups in the same individual is a very common event (Ball et al., 1999; Biagini et al., 1999; Chan et al., 2001; Forns et al., 1999; Gallian et al., 1999; Jelcic et al., 2004; Mushahwar et al., 1999; Niel et al., 2000; Ninomiya et al., 2008; Okamoto et al., 1999; Prescott et al., 1999; Takayama et al., 1999).

* Corresponding author.
E-mail address: jarbiza@fcien.edu.uy (J. Arbiza).
[1] Both authors contributed equally to this work.

http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.007
1567-1348/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Since the discovery and identification of TTV from a patient with hepatitis of unknown etiology (HUE) (Nishizawa et al., 1997), numerous studies have proposed its association with hepatic disorders such as acute, chronic and fulminant hepatitis (Charlton et al., 1998; Huang et al., 2000; Ikeda et al., 1999; Kanda and Yokosuka, 1999; Naoumov et al., 1998; Okamura et al., 2000; Tanaka et al., 1998a; Tuveri et al., 2000). On the other hand, co-infections of TTV with Hepatitis B (HBV) and Hepatitis C Virus (HCV) have been extensively examined (Spandole et al., 2015). Indeed, a study reported that TTV could be involved in the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic Hepatitis C (Tokita et al., 2002). In addition, a higher mortality rate has been observed in patients with HBV-TTV than in patients infected with HBV alone (Desai et al., 2005).

Likewise, TTV viral loads have been shown to increase in Human Immunodeficiency Virus (HIV-1) patients who are progressing towards AIDS (Christensen et al., 2000; Nasser et al., 2009; Sagir et al., 2005; Shibayama et al., 2001; Thom and Petrik, 2007; Touinssi et al., 2001) However, there still are conflicting opinions about the pathogenic potential of TTV because of its high prevalence in the general population worldwide (Abe et al., 1999; Okamoto et al., 1999; Prescott and Simmonds, 1998; Viazov et al., 1998a). Furthermore, it is suggested that only certain genotypes or genogroups may cause disease (Maggi et al., 2003; Maggi et al., 2007).

In South America, the epidemiological data of TTV is very scant. Studies regarding prevalence of the virus have been carried out in Brazilian blood donors, HBV chronic carriers and HIV-1 infected patients (Devalle and Niel, 2004), whereas in Venezuela, Bolivia and Colombia it has only been analyzed in blood donors (Abe et al., 1999; Pujol et al., 2005; Tanaka et al., 1999).

Herein, we report for the first time in Uruguay the detection and molecular characterization of TTV strains, providing an extensive viral sequence dataset. Moreover, in order to contribute to shed light over the epidemiological features of TTV in the region, we investigated the infection rate of TTV in several Uruguayan populations (HBV, HCV and HIV-1 infected patients and with HUE), where the virus appears to be more prevalent.

2. Materials and methods

2.1. Samples

Serum samples collected during the period 2012–2014, were obtained from a screening public health program for infectious diseases (SEIC-Ministry of Public Health and Army Force Hospital). Eighty-five serum samples were processed, classified as follows: 57 positive for HBV and/or HCV and/or HIV-1, 13 samples from patients with HUE and 15 samples without available relevant information. These populations were selected, based on their putative higher prevalence for TTV infection (Charlton et al., 1998; Christensen et al., 2000; Desai et al., 2005; Huang et al., 2000; Ikeda et al., 1999; Kanda and Yokosuka, 1999; Nasser et al., 2009; Naoumov et al., 1998; Okamura et al., 2000; Sagir et al., 2005; Shibayama et al., 2001; Spandole et al., 2015; Tanaka et al., 1998a; Thom and Petrik, 2007; Tokita et al., 2002; Touinssi et al., 2001; Tuveri et al., 2000).

2.2. TTV screening

For TTV detection, DNA was extracted from 200 μL of serum sample using a commercial kit (QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN) following manufacturer's instructions.

Viral DNA was amplified by a nested-PCR based on the conserved UTR A (Okamoto et al., 1999), which conditions are described in Table 1. PCR products were purified using a commercial kit (QIAquick Gel extraction, QIAGEN) and sequenced in both directions by Macrogen Sequencing Service, Korea.

2.3. Molecular characterization

In order to perform the molecular characterization of the detected TTV strains, a region of the UTR B and the partial N22 gene were selected for the analyses. The UTR B and N22 amplification were carried out according to Okamoto et al. (1999) (Table 1). PCR products of the expected size were purified in each case (QIAquick Gel extraction, QIAGEN) and sequenced by Macrogen Sequencing Service, Korea.

2.4. Phylogenetic analysis

With the aim to investigate the phylogenetic relationships of the TTV isolates, two phylogenetic trees were constructed based on the UTR B and the N22 coding region. Sequence analysis was performed with Clustal W software and identity matrices were constructed by BioEdit v7.0.5 software. Phylogenetic trees were reconstructed by the neighbor-joining and the maximum likelihood methods using MEGA v. 5.0 software. Bootstrap values were determined with 1000 replicates of the dataset. Sequences of the five main genomic groups were included in the analysis. Complete dataset is shown in Table 2.

3. Results

3.1. TTV detection

TTV DNA was detected in 67 out of 85 samples, with an infection rate of 79%, with variable detection rates among the different groups (Table 3).

The highest TTV infection rates corresponded to HBV infected patients and individuals with HUE, from which all the samples were TTV positive. On the other hand, in HIV-1 and HCV infected patients, 50% and 81% TTV infection rate was observed, respectively. In addition,

Table 1
Primer set specifications for the detection and molecular characterization of TTV strains.

Primer name	PCR round	Polarity	Nucleotide position[a]	Nucleotide sequence	PCR product	Annealing temp.
UTR A						
NG 133	1st	Sense	91–115	5′-GTA AGT GCA CTT CCG AAT GGC TGA G-3′	143 bp	60 °C
NG 147	1st	Antisense	211–233	5′-GCC AGT CCC GAG CCC GAA TTG CC-3′		
NG 134	2nd	Sense	114–136	5′-AGT TTT CCA CGC CCG TCC GCA GC-3′	110 bp	60 °C
NG 132	2nd	Antisense	204–223	5′-AGC CCG AAT TGC CCC TTG AC-3′		
UTR B[b]						
NG 148	1st	Sense	3337–3360	5′-CGA AAG TGA GTG GGG CCA GAC TTC-3′	403 bp	60 °C
NG 065	1st/2nd	Antisense	3713–3739	5′-GCC GAC GGT TTT TTG GCG CCT TTT TTC-3′	377 bp	60 °C
NG 149	2nd	Sense	3362–3385	5′-CCA TAA GGC CTT TAT CTT CTT GCC-3′		
N22						
NG 059	1st	Sense	1900–1923	5′-ACA GAC AGA GGA GAA GGC AAC ATG-3′	286 bp	60 °C
NG 063	1st/2nd	Antisense	2161–2185	5′-CTG GCA TTT TAC CAT TTC CAA AGT T-3′	271 bp	60 °C
NG 061	2nd	Sense	1915–1938	5′-GGC AAC ATG YTR TGG ATA GAC TGG-3′		

[a] Nucleotide positions are according to the TA278 isolate NCBI accession number AB008394.
[b] Seminested modified from the original nested-PCR assay proposed by Okamoto et al. (1999).

Table 2
TTV isolates incorporated in the phylogenetic analysis.

Reference isolate	Accession number	Genomic group	Country of origin
US35	AF122920	1	USA
JA2B	AF122918	1	USA
JA1	AF122916	1	USA
US32	AF122921	1	USA
tth10	AJ620213	2	Germany
tth18	AJ620215	2	Germany
tth20	AJ620216	2	Germany
tth21	AJ620217	2	Germany
TTV-HD16a	FR751476	3	Germany
TTV-HD16b	FR751478	3	Germany
TTV-HD16c	FR751477	3	Germany
TYM9	AB050448	3	Japan
2 h	AY823988	3	Brazil
JT03F	AB064599	4	Japan
JT05F	AB064600	4	Japan
JT14F	AB064601	4	Japan
JT19F	AB064602	4	Japan
JT41F	AB064603	4	Japan
JT33F	AB064606	5	Japan
JT34F	AB064607	5	Japan
CT39F	AB064604	5	Japan
CT44F	AB064605	5	Japan
RO-od18[a]	LN809950	–	Romania
RO-SVod[a]	LN809955	–	Romania
Ro-Slod[a]	LN809946	–	Romania

[a] Genogroup and genotype non reported.

rates of 69% (HIV-1/HCV) and 91% (HIV-1/HBV) were detected in co-infected samples. Patients infected with HIV-1/HBV/HCV and HCV/HBV showed the lowest TTV infection rate (33%).

3.2. Genetic characterization and phylogenetic studies

The UTR B region was satisfactorily amplified from 42 out of 67 TTV strains detected. However, several samples analyzed presented co-infection of different TTV isolates, which impeded more detailed studies. Subsequently, the phylogenetic tree based on UTR B was performed with 15 selected nucleotide sequences, named TTVH 1 UY to TTVH 15 UY corresponding to HBV and/or HCV and/or HIV-1 infected patients and one belonging to an individual with HUE. Reference isolates for TTV genogroups 1 to 5 were also included (Fig. 1). Identical tree topologies were observed with the maximum likelihood and the neighbor-joining methods (data not shown).

Construction of identity matrices revealed a nucleotide identity ranging from 61% to 100% among all Uruguayan isolates. The UTR B phylogenetic reconstruction showed that only one Uruguayan strain, TTVH 13 UY, clustered within genogroup 1, whereas the remaining sequences resulted to be more closely related to genogroup 3 strains with a nucleotide identity of 63%–77%. These sequences, with the exception of TTVH 8 UY, grouped in three different highly supported monophyletic groups, named Clades A, B and C. In particular, Clade C also comprised a

Table 3
TTV infection rates for the different groups of samples.

Sample	n	TTV Positive (%)
HBV	7	100
HCV	16	81
HIV-1	4	50
HIV-1 + HCV	13	69
HIV-1 + HBV	11	91
HCV + HBV	3	33
HIV-1 + HBV + HCV	3	33
HUE	13	100
N/D	15	73
Total	85	79

N/D, samples with no data available.
HUE, Hepatitis of unknown etiology.

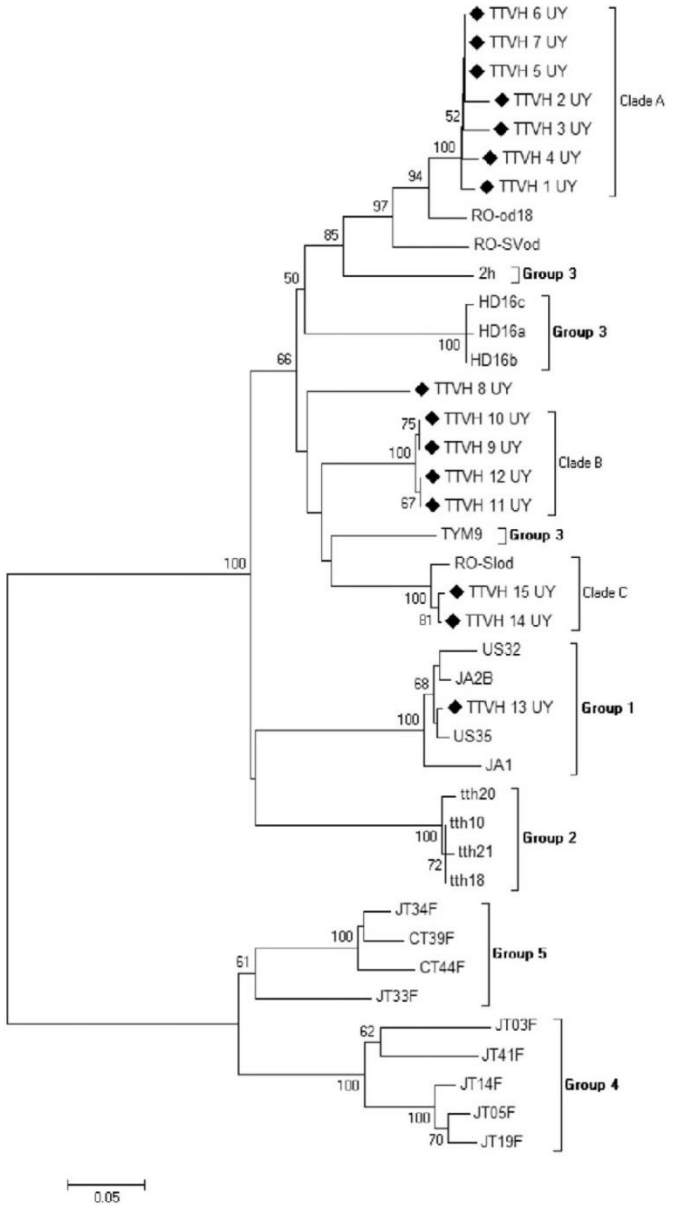


Fig. 1. Phylogenetic tree constructed by the neighbor-joining method based on a region of UTR B. TTV Uruguayan strains (♦) were compared with TTV isolates of genogroups 1–5 which were indicated with straight brackets.

Romanian strain (RO-Slod) with statistical support (Fig. 1). Furthermore, the phylogenetic tree showed that Clade A isolates clustered together with other two sequences from Romania named Ro-SVod and Ro-od18 (bootstrap value of 97%). These unclassified European isolates resulted to be the closest relatives identified for the Clade A, sharing a nucleotide identity of 80%–93%. In turn, these sequences together with Clade A strains resulted to be closely related to the Brazilian isolate 2 h (Fig. 1). On the other hand, isolate TTVH 8 UY together with Clade B and C strains showed a nucleotide identity of 75%–76.5% with the Japanese group 3 isolate TYM9.

Analysis of TTVH 13 strain, in turn, showed a percentage of identity ranging from 93% to 94% with strains of genogroup 1.

Overall nucleotide identity studies also revealed that the Uruguayan strains resulted to be more distantly related with isolates from genogroup 2 (58%–62%), 4 (23%–33%) and 5 (35%–48%).

By contrast to UTR B region, only the isolate TTVH-N22 13 UY could be properly amplified by N22 PCR method, and thus this single sequence was included in the analysis. Phylogenetic reconstruction of

the N22 genomic region showed that this strain grouped within genogroup 1 (Fig. 2), as observed with the UTR B. In fact, this N22 Uruguayan sequence shared a nucleotide identity of 96% with isolates of this genogroup.

The nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to Genbank under the accession numbers KU295003-KU295017 and KU670946.

4. Discussion

In the present study, we conducted for the first time in Uruguay a TTV molecular screening in a panel of 85 serum samples corresponding to HUE cases, HCV and/or HBV and/or HIV-1 samples, where TTV infection has been described as more prevalent (Charlton et al., 1998; Christensen et al., 2000; Desai et al., 2005; Huang et al., 2000; Ikeda et al., 1999; Kanda and Yokosuka, 1999; Nasser et al., 2009; Naoumov et al., 1998; Okamura et al., 2000; Sagir et al., 2005; Shibayama et al., 2001; Spandole et al., 2015; Tanaka et al., 1998a; Thom and Petrik, 2007; Tokita et al., 2002; Touinssi et al., 2001; Tuveri et al., 2000). Furthermore, with the aim to provide new insights on the viral epidemiology, molecular characterization and phylogenetic studies were carried out.

The UTR A-based PCR detection system employed (Okamoto et al., 1999) allowed to satisfactorily amplify TTV strains circulating in Uruguay, since it was designed based on the most conserved genomic region. Herein, with this approach we reported a high overall infection rate of 79% (67/85), which is in concordance with similar investigations reported worldwide (AbuOdeh et al., 2015; Devalle and Niel, 2004; Hussain et al., 2012; Koohi et al., 2012).

These high infection rates observed in almost all of the groups (particularly HBV and HCV single-infected and HUE patients) and its association to other hepatotropic viruses requires further investigation, taking into account other clinical conditions and including non-infected and blood donor samples. Obviously, the noteworthy global ubiquity of TTV and its high prevalence could be partially explained by the ease of transmission, since the virus is transmitted not only by blood transfusion (Forns et al., 1999; Maeda et al., 2000; Prati et al., 1999; Simmonds et al., 1998; Viazov et al., 1998b) but also by other routes such as fecal-oral (Okamoto et al., 1998b; Ross et al., 1999; Ukita et al., 1999), mother to child and by different body fluids (Deng et al., 2000; Gallian et al., 2000; Gerner et al., 2000; Inami et al., 2000; Iso et al., 2001; Martinez et al., 2000; Matsubara et al., 2001; Ohto et al., 2002; Schröter et al., 2000). Additionally, it can also be found in aquatic environments (Haramoto et al., 2005a) and in waste water (Haramoto et al., 2005b, Vaidya et al., 2002), which may act as infection sources.

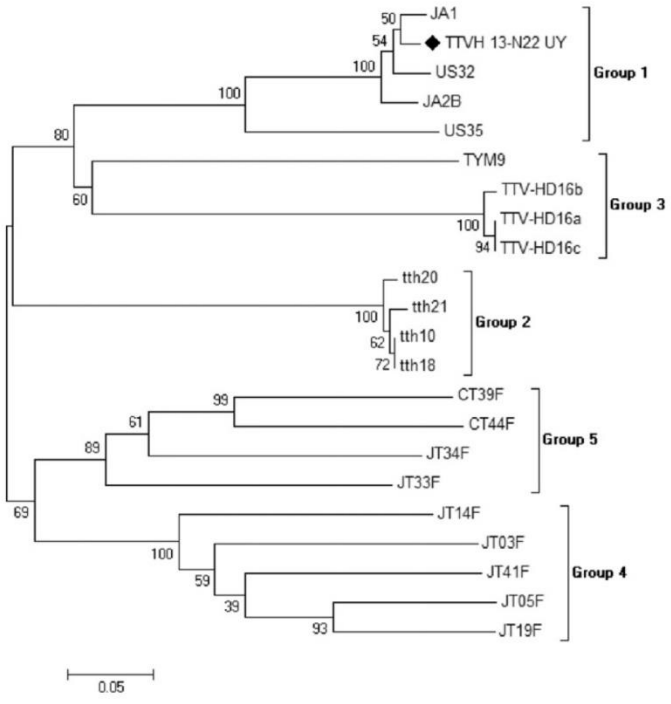


Fig. 2. Phylogenetic tree constructed by the neighbor-joining method for the N22 coding region fragment. TTV Uruguayan strain (TTVH-N22 13 UY ♦) was compared with TTV isolates of genogroups 1–5 which were indicated with straight brackets.

Genetic variability and sequence divergence among Uruguayan strains were investigated based on the analysis of UTR B and N22 region, since UTR A is not suitable for genetic studies as it is the most conserved region identified among strains. All genogroups were included in the analyses with the exception of the newly reported six and seven, since sequences are not available from both regions.

In particular, and partially due to the intrinsic variability of TTV strains, the UTR B region could be amplified in 42 out of the 67 TTV Uruguayan strains (63%). Additionally, several UTR B nucleotide sequences presented a mixture of multiple TTV strains, suggesting co-infection, an event that is frequently observed (Ball et al., 1999; Biagini et al., 1999; Chan et al., 2001; Forns et al., 1999; Gallian et al., 1999; Jelcic et al., 2004; Mushahwar et al., 1999; Niel et al., 2000; Ninomiya et al., 2008; Okamoto et al., 1999; Prescott et al., 1999; Takayama et al., 1999). In this sense, it has been suggested that only a minor fraction of TTVs have all the necessary elements to successfully infect hosts. Thus, the co-infection of multiple TTV isolates could contribute with the missing and required viral components (Luo et al., 2002, Khudyakov et al., 2000).

In order to perform a reliable molecular characterization, samples without co-infection were thoroughly selected. Phylogenetic reconstruction performed with this region for the 15 selected sequences, showed that most of TTV Uruguayan strains grouped in three monophyletic clusters closely related with strains of genogroup 3. Indeed, identity matrix results for TTVH 1–12 UY sequences exhibited a nucleotide identity of 63%–77% with genogroup 3 isolates, which fully agrees with other researches proposing differences of more than 30% in terms of genomic sequences among genotypes within genogroups (Heller et al., 2001; Hijikata et al., 1999a; Okamoto et al., 2001). In spite of that, further analyses by whole genome sequencing are needed in order to perform a complete characterization of Uruguayan strains.

Interestingly, a set of unclassified and newly submitted Romanian strains resulted to be the closest relatives for the Uruguayan strains. However, this is not a rare event, since none clear geographical association has been identified for TTV, and given the ubiquitous distribution of this pathogen (Gallian et al., 2000, Huang et al., 2001, Manni et al., 2002, Mushahwar et al., 1999, Pisani et al., 1999).

By contrast, a sole strain (TTVH 13 UY) corresponding to a HCV infected patient, clustered in genogroup 1, displaying a high nucleotide similarity (93% to 94%) with reference isolates from this genogroup. The fact that this sequence resulted to be more distantly related to the other Uruguayan isolates remains unclear.

On the other hand, the highly variable N22 segment of ORF 1 was amplified in only one of them (TTVH-N22 13 UY). Consistently with UTR B analysis, this sequence clustered in genogroup 1 in the N22 phylogenetic analysis, indicating a concordance between the two regions. In turn, TTVH-N22 13 UY exhibited a high nucleotide identity percentage (96%) with genogroup 1 reference isolates.

The unsuccessful amplification of the N22 region in the remaining isolates could be due to the extremely high variability observed in these Uruguayan strains, providing additional evidence that they might comprise new variants. Indeed, TTV has a wide range of sequence divergence and the number of recognized genotypes is continuously increasing. Actually, scientific efforts focused on the development of genotyping methods based on PCR-restriction fragment length polymorphism (Tanaka et al., 1998b, Tanaka et al., 2001b) or type-specific PCR (Hijikata et al., 1999b) have shown to be unreliable (Devalle and Niel, 2004).

Despite the challenges involving TTV molecular characterization and the intrinsic genetic variability of the virus, this study found that the TTV strains circulating in Uruguay resulted to be more closely related to genogroups 1 and 3. It is currently known that genogroup 3 contains the largest number of TTV isolates described, while groups 2 and 4 are presumed to be less prevalent (Biagini et al., 2006; Devalle and Niel, 2004; Hallett et al., 2000; Maggi et al., 2003; Pinho-Nascimento et al., 2011). Indeed, data presented above supports these assumptions, since groups 2, 4 and 5 were not detected, at least in the limited Uruguayan population analyzed.

In the context of South America, molecular characterization studies including analyses of different genome regions are still scant and further investigation is required for understanding the genetic heterogeneity of TTV in the region. On the other hand, given the lack of geographical association among the different TTV genogroups aforementioned, the results report herein are of interest from a regional point of view, by providing a large dataset of currently circulating South American strains, but also from a global scale by contributing to better understand the viral molecular epidemiology worldwide.

5. Conclusions

Our findings revealed for the first time the circulation of TTV strains among Uruguayan population with remarkably high infection rates in all the groups included in the investigation. Moreover, this research provided a large set of sequences, contributing to the expansion of the limited TTV sequence information in the region. Additionally, the Uruguayan isolates exhibited a high sequence heterogeneity resulting in yet more relevant and interesting data. Thus, information regarding TTV circulation in Uruguay, along with other reported investigations, represents a useful basis in order to start deepening the knowledge about the molecular epidemiology of TTV.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA) for administratival support and Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), for financial support of FC fellowship (INI_X_2013_1_100989). Authors are also grateful to Ignacio Mirazo from Departamento de Laboratorios del Servicio de Enfermedades Infecto-Contagiosas (SEIC), Ministerio de Salud Pública for technical support.

References

Abe, K., Inami, T., Asano, K., Miyoshi, C., Masaki, N., Hayashi, S., Ishikawa, K., Takebe, Y., Win, K.M., El-Zayadi, A.R., Han, K.H., Zhang, D.Y., 1999. TT virus infection is widespread in the general populations from different geographic regions. J. Clin. Microbiol. 37, 2703–2705.

AbuOdeh, R., Al-Mawlawi, N., Al-Qahtani, A.A., Bohol, M.F.F., Al-Ahdal, M., Hasan, H., AbuOdeh, L., Nasrallah, G.K., 2015. Detection and genotyping of torque teno virus (TTV) in healthy blood donors and patients infected with HBV or HCV in Qatar. J. Med. Virol. 87, 1184–1191.

Ball, J.K., Curran, R., Berridge, S., Grabowska, A.M., Jameson, C.L., Thomson, B.J., Irving, W.L., Sharp, P.M., 1999. TT virus sequence heterogeneity in vivo: evidence for co-infection with multiple genetic types. J. Gen. Virol. 80, 1759–1768.

Bendinelli, M., Pistello, M., Maggi, F., Fornai, C., 2001. Molecular properties, biology and clinical implications of TT virus, a recently identified widespread infectious agent of humans. Clin. Microbiol. Rev. 14, 98–113.

Biagini, P., 2009. Classification of TTV and related viruses (anelloviruses). Curr. Top. Microbiol. Immunol. 331, 21–33.

Biagini, P., Gallian, P., Cantaloube, J.F., Attoui, H., de Micco, P., de Lamballerie, X., 1999. Determination and phylogenetic analysis of partial sequences from TT virus isolates. J. Gen. Virol. 80, 419–424.

Biagini, P., Todd, D., Bendinelli, M., Hino, S., Mankertz, A., Mishiro, S., Niel, C., Okamoto, H., Raidal, S., Ritchie, B.W., Teo, G.C., 2004. Anellovirus in virus taxonomy (Eds.). Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, London, United Kingdom, pp. 335–341.

Biagini, P., Gallian, P., Cantaloube, J.F., Attoui, H., de Micco, P., de Lamballerie, X., 2006. Distribution and genetic analysis of TTV and TTMV major phylogenetic groups in French blood donors. J. Med. Virol. 78, 298–304.

Chan, P.K., Chik, K.W., Li, C.K., Tang, N.L., Ming, M.S., Cheung, J.L., K.C, N., Yuen, P.M., Cheng, A.F., 2001. Prevalence and genotype distribution of TT virus in various specimen types from thalassaemic patients. J. Viral Hepat. 8, 304–309.

Charlton, M., Adjei, P., Poterucha, J., Zein, N., Moore, B., Therneau, T., Krom, R., Wiesner, R., 1998. TT-virus infection in North American blood donors, patients with fulminant hepatic failure, and cryptogenic cirrhosis. Hepatology 28, 839–842.

Christensen, J.K., Eugen-Olsen, J., SLrensen, M., Ullum, H., Gjedde, S.B., Pedersen, B.K., Nielsen, J.O., Krogsgaard, K., 2000. Prevalence and prognostic significance of infection with TT virus in patients infected with human immunodeficiency virus. J. Infect. Dis. 181, 1796–1799.

Deng, X., Terunuma, H., Handema, R., Sakamoto, M., Kitamura, T., Ito, M., Akahane, Y., 2000. Higher prevalence and viral load of TT virus in saliva than in the corresponding serum: another possible transmission route and replication site of TT virus. J. Med. Virol. 62, 531–537.

Desai, M.M., Pal, R.B., Banker, D.D., 2005. Molecular epidemiology and clinical implications of TT virus (TTV) infection in Indian subjects. J. Clin. Gastroenterol. 39, 422–429.

Devalle, S., Niel, C., 2004. Distribution of TT virus genomic groups 1–5 in Brazilian blood donors, HBV carriers, and HIV-1-infected patients. J. Med. Virol. 72, 166–173.

Erker, J.C., Leary, T.P., Desai, S.M., Chalmers, M.L., Mushahwar, I.K., 1999. Analyses of TT virus full-length genomic sequences. J. Gen. Virol. 80, 1743–1750.

Forns, X., Hegerich, P., Darnell, A., Emerson, S.U., Purcell, R.H., Bukh, J., 1999. High prevalence of TT virus (TTV) infection in patients on maintenance hemodialysis: frequent mixed infections with different genotypes and lack of evidence of associated liver disease. J. Med. Virol. 59, 313–317.

Gallian, P., Berland, Y., Olmer, M., Raccah, D., de Micco, P., Biagini, P., Simon, S., Bouchouareb, D., Mourey, C., Roubicek, C., Touinssi, M., Cantaloube, J.F., Dussol, B., de Lamballeri, X., 1999. TT virus infection in French hemodialysis patients: study of prevalence and risk factors. J. Clin. Microbiol. 37, 2538–2542.

Gallian, P., Biagini, P., Zhong, S., Touinssi, M., Yeo, W., Cantaloube, J.F., Attoui, H., de Micco, P., Johnson, P.J., de Lamballerie, X., 2000. TT virus: a study of molecular epidemiology and transmission of genotypes 1, 2 and 3. J. Clin. Virol. 17, 43–49.

Gerner, P., Oettinger, R., Gerner, W., Falbrede, J., Wirth, S., 2000. Mother-to-infant transmission of TT virus: prevalence, extent and mechanism of vertical transmission. Pediatr. Infect. Dis. J. 19, 1074–1077.

Hallett, R.L., Clewley, J.P., Bobet, F., McKiernan, P.J., Teo, C.G., 2000. Characterization of a highly divergent TT virus genome. J. Gen. Virol. 81, 2273–2279.

Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K., Ohgaki, S., 2005a. Application of cation-coated filter method to detection of noroviruses, enteroviruses, adenoviruses, and torque teno viruses in the Tamagawa River in Japan. Appl. Environ. Microbiol. 71, 2403–2411.

Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K., Yamashita, H., Nakajima, E., Ohgaki, S., 2005b. One-year monthly monitoring of Torque teno virus (TTV) in wastewater treatment plants in Japan. Water Res. 39, 2008–2013.

Heller, F., Zachoval, R., Koelzer, A., Nitschko, H., Froesner, G.G., 2001. Isolate KAV: a new genotype of the TT-virus family. Biochem. Biophys. Res. Commun. 289, 937–941.

Hijikata, M., Takahashi, K., Mishiro, S., 1999a. Complete circular DNA genome of a TT virus variant (isolate name SANBAN) and 44 partial ORF2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes. Virology 260, 17–22.

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

Hsiao, K.L., Wang, L.Y., C.L, L., Liu, H.F., 2016. New phylogenetic groups of torque teno virus identified in eastern Taiwan indigenes. PLoS One http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0149901.

Huang, Y.H., Wu, J.C., Chiang, T.Y., Chan, Y.J., Huo, T.I., Huang, Y.S., Hwang, S.J., Chang, F.Y., Lee, S.D., 2000. Detection and viral nucleotide sequence analysis of transfusion-transmitted virus infection in acute fulminant and non-fulminant hepatitis. J. Viral Hepat. 7, 56–63.

Huang, Y.H., Oystein Jonassen, T., Hungnes, O., Grinde, B., 2001. High prevalence of TT virus-related DNA (90%) and diverse viral genotypes in Norwegian blood donors. J. Med. Virol. 64, 381–386.

Hussain, T., Manzoor, S., Waheed, Y., Tariq, H., Hanif, K., 2012. Phylogenetic analysis of torque teno virus genome from Pakistani isolate and incidence of co-infection among HBV/HCV infected patients. Virol. J. http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-9-320.

Ikeda, H., Takasu, M., Inoue, K., Okamoto, H., Miyakawa, Y., Mayumi, M., 1999. Infection with an unenveloped DNA virus (TTV) in patients with acute or chronic liver disease of unknown etiology and in those positive for hepatitis C virus RNA. J. Hepatol. 30, 205–212.

Inami, T., Konomi, N., Arakawa, Y., Abe, K., 2000. High prevalence of TT virus DNA in human saliva and semen. J. Clin. Microbiol. 38, 2407–2408.

Iso, K., Suzuki, Y., Takayama, M., 2001. Mother-to-infant transmission of TT virus in Japan. Int. J. Gynaecol. Obstet. 75, 11–19.

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.

Kanda, T., Yokosuka, O., 1999. Clinical feature of TTV-related hepatitis. Nihon. Rinsho. 57, 1330–1334.

Khudyakov, Y.E., Cong, M.E., Nichols, B., Reed, D., Dou, X.G., Viazov, S.O., Chang, J., Fried, M.W., Williams, I., Bower, W., Lambert, S., Purdy, M., Roggendorf, M., Fields, H.A.,

2000. Sequence heterogeneity of TT virus and closely related viruses. J. Virol. 74, 2990–3000.
Koohi, A.K., Ravanshad, M., Rasouli, M., Falahi, S., Baghban, A., 2012. Phylogenetic analysis of torque teno virus in hepatitis C virus infected patients in shiraz. Hepat. Mon. 12, 437–441.
Luo, K., He, H., Liu, Z., Liu, D., Xiao, H., Jiang, X., Liang, W., Zhang, L., 2002. Novel variants related to TT virus distributed widely in China. J. Med. Virol. 67, 118–126.
Maeda, M., Hamada, H., Tsuda, A., Kaneko, K., Fukunaga, Y., 2000. High rate of TTV infection in multitransfused patients with pediatric malignancy and hematological disorders. Am. J. Hematol. 65, 41–44.
Maggi, F., Pifferi, M., Fornai, C., Andreoli, E., Tempestini, E., Vatteroni, M., Presciuttini, S., Marchi, S., Pietrobelli, A., Boner, A., Pistello, M., Bendinelli, M., 2003. TT virus in the nasal secretions of children with acute respiratory diseases: relations to viremia and disease severity. J. Virol. 77, 2418–2425.
Maggi, F., Andreoli, E., Riente, L., Meschi, S., Rocchi, J., Delle Sedie, A., Vatteroni, M.L., Ceccherini-Nelli, L., Specter, S., Bendinelli, M., 2007. Torquetenovirus in patients with arthritis. Rheumatology 46, 885–886.
Manni, F., Rotola, A., Caselli, E., Bertorelle, G., Di Luca, D., 2002. Detecting recombination in TT virus: a phylogenetic approach. J. Mol. Evol. 55, 563–572.
Martinez, N.M., Garcia, F., Alvarez, M., Bernal, M.C., Piedrola, G., Hernandez, J., Maroto, M.C., 2000. TT virus DNA in serum, peripheral blood mononuclear cells and semen of patients infected by HIV. AIDS 14, 464–1466.
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. Hepatol. Res. 21, 280–287.
Miyata, H., Tsunoda, H., Kazi, A., Yamada, A., Khan, M.A., Murakami, J., Kamahora, T., Shiraki, K., Hino, S., 1999. Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus. J. Virol. 73, 3582–3586.
Mushahwar, I.K., Erker, J.C., Muerhoff, A.S., Leary, T.P., Simons, J.N., Birkenmeyer, L.G., Chalmers, M.L., Pilot-Matias, T.J., Dexai, S.M., 1999. Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 3177–3182.
Naoumov, N.V., Petrova, E.P., Thomas, M.G., Williams, R., 1998. Presence of a newly described human DNA virus (TTV) in patients with liver disease. Lancet 352, 195–197.
Nasser, T.F., Brajão de Oliveira, K., Reiche, E.M., Amarante, M.K., Pelegrinelli Fungaro, M.H., Watanabe, M.A., 2009. Detection of TT virus in HIV-1 exposed but uninfected individuals and in HIV-1 infected patients and its influence on CD4+ lymphocytes and viral load. Microb. Pathog. 47, 33–37.
Niel, C., Saback, F.L., Lampe, E., 2000. Coinfection with multiple TT virus strains belonging to different genotypes is a common event in healthy Brazilian adults. J. Clin. Microbiol. 38, 1926–1930.
Ninomiya, M., Nishizawa, T., Takahashi, M., Lorenzo, F.R., Shimosegawa, T., Okamoto, H., 2007. Identification and genomic characterization of a novel human torque teno virus of 3.2 kb. J. Gen. Virol. 88, 1939–1944.
Ninomiya, M., Takahashi, M., Nishizawa, T., Shimosegawa, T., Okamoto, H., 2008. Development of PCR assays with nested primers specific for differential detection of three human anelloviruses and early acquisition of dual or triple infection during infancy. J. Clin. Microbiol. 46, 507–514.
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.
Ohto, H., Ujiie, N., Takeuchi, C., Sato, A., Hayashi, A., Ishiko, H., Nishizawa, T., Okamoto, H., 2002. Vertical transmission of hepatitis viruses collaborative study group. TT virus infection during childhood. Transfusion 42, 892–898.
Okamoto, H., Nishizawa, T., Kato, N., Ukita, M., Ikeda, H., Iizuka, H., Miyakawa, Y., Mayumi, M., 1998a. Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. Hepatol. Res. 10, 1–16.
Okamoto, H., Akahane, Y., Ukita, M., Fukuda, M., Tsuda, F., Miyakawa, Y., Mayumi, M., 1998b. Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A–G hepatitis. J. Med. Virol. 56, 128–132.
Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Ukita, M., Fukuda, M., Tsuda, F., Miyakawa, Y., Mayumi, M., 1999. Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infection of TT virus demonstrated by PCR with primers from coding and noncoding regions. Virology 259, 428–436.
Okamoto, H., Nishizawa, T., Takahashi, M., Tawara, A., Peng, Y., Kishimoto, J., Wang, Y., 2001. Genomic and evolutionary characterization of TT virus (TTV) in tupaias and comparison with species-specific TTVs in humans and non-human primates. J. Gen. Virol. 82, 2041–2050.
Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., 2004. Torque teno virus (TTV) molecular virology and clinical implications. In: Mushahwar, I.K. (Ed.), Viral Hepatitis: Molecular Biology, Diagnosis, Epidemiology and Control. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 241–254.
Okamura, A., Yoshioka, M., Kikuta, H., Kubota, M., Ma, X., Hayashi, A., Ishiko, H., Kobayashi, K., 2000. Detection of TT virus sequences in children with liver disease of unknown etiology. J. Med. Virol. 62, 104–108.
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. Arch. Virol. 147, 21–41.
Peters, M.A., Jackson, D.C., Crabb, B.S., Browning, G.F., 2002. Chicken anemia virus VP2 is a novel dual specificity protein phosphatase. J. Biol. Chem. 277, 39566–39573.
Pinho-Nascimento, C.A., Leite, J.P., Neil, C., Diniz-Mendes, L., 2011. Torque Teno Virus in fecal samples of patients with gastroenteritis: prevalence, genogroup distribution and viral load. J. Med. Virol. 83, 1107–1111.
Pisani, G., Cristiano, K., Wirz, M., Bisso, G., Beneduce, F., Morace, G., Rapicetta, M., Gentili, G., 1999. Prevalence TT virus in plasma pools and blood products. Br. J. Haematol. 106, 431–435.
Prati, D., Lin, Y.H., De Mattei, C., Liu, J.K., Farma, E., Ramaswamy, L., Zanella, A., Lee, H., Rebulla, P., Allain, J.P., Sirchia, G., Chen, B., 1999. A prospective study on TT virus infection in transfusion-dependent patients with beta-thalassemia. Blood 93, 1502–1505.
Prescott, L.E., Simmonds, P., 1998. Global distribution of transfusion-transmitted virus. N. Engl. J. Med. 339, 776–777.
Prescott, L.E., MacDonald, D.M., Davidson, F., Mokili, J., Pritchard, D.I., Arnot, D.E., Riley, E.M., Greenwood, B.M., Hamid, S., Saeed, A.A., McClure, M.O., Smith, D.B., Simmonds, P., 1999. Sequence diversity of TT virus in geographically dispersed human populations. J. Gen. Virol. 80, 1751–1758.
Pujol, F.H., Mejías, E., Loureiro, C.L., Loudert, J.E., Liprandi, F., Pernalete, J.M., 2005. Infection with transfusion-transmitted virus (TTV) in humans and other primates in Venezuela. Ann. Trop. Med. Parasitol. 99, 173–180.
Ross, R.S., Viazov, S., Runde, V., Schaefer, U.W., Roggendorf, M., 1999. Detection of TT virus DNA in specimens other than blood. J. Clin. Virol. 13, 181–184.
Sagir, A., Adams, O., Antakyali, M., Oette, M., Erhardt, A., Heintges, T., Haussinger, D., 2005. SEN virus has an adverse effect on the survival of HIV-positive patients. AIDS 19, 1091–1096.
Schröter, M., Polywka, S., Zollner, B., Schafer, P., Laufs, R., Feucht, H.H., 2000. Detection of TT virus DNA and GB virus type C/hepatitis G virus RNA in serum and breast milk: determination of mother-to-child transmission. J. Clin. Microbiol. 38, 745–747.
Shibayama, T., Masuda, G., Ajisawa, A., Takahashi, M., Nishizawa, T., Tsuda, F., Okamoto, H., 2001. Inverse relationship between the titre of TT virus DNA and the CD4 cell count in patients infected with HIV. AIDS 15, 563–570.
Simmonds, P., Davidson, F., Lycett, C., Prescott, L.E., MacDonald, D.M., Ellender, J., Yap, P.L., Ludlam, C.A., Haydon, G.H., Gillon, J., Jarvis, L.M., 1998. Detection of a novel DNA virus (TTV) in blood donors and blood products. Lancet 352, 191–195.
Spandole, S., Cimponeriu, D., Berca, L.M., Mihaescu, G., 2015. Human anelloviruses: an update of molecular, epidemiological and clinical aspects. Arch. Virol. 60, 893–908.
Takahashi, K., Ohta, Y., Mishiro, S., 1998. Partial 2.4-kb sequences of TT virus (TTV) genome from eight Japanese isolates: diagnostic and phylogenetic implications. Hepatol. Res. 12, 111–120.
Takahashi, K., Iwasa, Y., Hijikata, M., Mishiro, S., 2000. Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemiavirus. Arch. Virol. 145, 979–993.
Takayama, S., Yamazaki, S., Matsuo, S., Sugii, S., 1999. Multiple infection of TT virus (TTV) with different genotypes in Japanese hemophiliacs. Biochem. Biophys. Res. Commun. 256, 208–211.
Tanaka, H., Okamoto, H., Luengrojanakul, P., Chainuvati, T., Tsuda, F., Tanaka, T., Miyakawa, Y., Mayumi, M., 1998a. Infection with a unenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A to G hepatitis in hepatitis patients and healthy blood donors in Thailand. J. Med. Virol. 56, 234–238.
Tanaka, Y., Mizokami, M., Orito, E., Ohno, T., Nakano, T., Kato, T., Kato, H., Mukaide, M., Park, Y.M., Kim, B.S., Ueda, R., 1998b. New genotypes of TT virus (TTV) and a genotyping assay based on restriction fragment length polymorphism. FEBS Lett. 437, 201–206.
Tanaka, Y., Mizokami, M., Orito, E., Nakano, T., Kato, T., Ding, X., Ohno, T., Ueda, R., Sonoda, S., Tajima, K., Miura, T., Hayami, M., 1999. A new genotype of TT virus (TTV) infection among Colombian native Indians. J. Med. Virol. 57, 264–268.
Tanaka, Y., Primi, D., Wang, R.Y., Umemura, T., Yeo, A.E., Mizokami, M., Alter, H.J., Shih, J.W., 2001a. Genomic and molecular evolutionary analysis of a newly identified infectious agent (SEN virus) and its relationship to the TT virus family. J. Infect. Dis. 183, 359–367.
Tanaka, T., Kuroda, K., Kobayashi, M., Sato, K., 2001b. Detection and typing of TT virus DNA genotype by the PCR-RFLP method. Mol. Cell. Probes 15, 195–200.
Thom, K., Petrik, J., 2007. Progression towards AIDS leads to increased Torque teno virus and Torque teno minivirus titers in tissues of HIV infected individuals. J. Med. Virol. 79, 1–7.
Tokita, H., Murai, S., Kamitsukasa, H., Yagura, M., Harada, H., Takahashi, M., Okamoto, H., 2002. High TT virus load as an independent factor associated with the occurrence of hepatocellular carcinoma among patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. J. Med. Virol. 67, 501–509.
Touinssi, M., Gallian, P., Biagini, P., Attoui, H., Vialettes, B., Berland, Y., Tamalet, C., Dhiver, C., Ravaux, I., De Micco, P., De Lamballerie, X., 2001. TT virus infection: prevalence of elevated viraemia and arguments for the immune control of viral load. J. Clin. Virol. 21, 135–141.
Tuveri, R., Jaffredo, F., Lunel, F., Nalpa, B., Pol, S., Feray, C., Marcellin, P., Thibault, V., Delagneau, J.F., Opolon, P., Scarpa, B., Brechot, C., Thiers, V., 2000. Impact of TT virus infection in acute and chronic, viral- and non viral-related liver diseases. J. Hepatol. 33, 121–127.
Ukita, M., Okamoto, H., Kato, N., Miyakawa, Y., Mayumi, M., 1999. Excretion into bile of a novel unenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic non-A–G hepatitis. J. Infect. Dis. 179, 1245–1248.
Vaidya, S.R., Chitambar, S.D., Arankalle, V.A., 2002. Polymerase chain reaction-based prevalence of hepatitis a, hepatitis E and TT viruses in sewage from an endemic area. J. Hepatol. 37, 131–136.
Viazov, S., Ross, R.S., Niel, C., de Oliveira, J.M., Varenholz, C., Da Villa, G., Roggendorf, M., 1998a. Sequence variability in the putative coding region of TT virus: evidence for two rather than several major types. J. Gen. Virol. 79, 3085–3089.
Viazov, S., Ross, R.S., Varenholz, C., Lange, R., Holtmann, M., Niel, C., Roggendorf, M., 1998b. Lack of evidence for an association between TTV infection and severe liver disease. J. Clin. Virol. 11, 183–187.

6. Parte III. Estudio de PRRSV en Uruguay

6.1. Revisión bibliográfica

6.1.1 Taxonomía viral y características generales

PRRSV es un virus envuelto con genoma ARN simple hebra de polaridad positiva (Snijder y Meulenberg, 1998). El diámetro del virión es de aproximadamente 45-60nm y contiene una nucleocápside de 30-39nm (Wensvoort et al., 1992; Snijder et al., 2013) (Fig.6.1.1). El virus es sensible a los solventes lipídicos y se inactiva completamente a 56ºC por 45 minutos. A su vez, los títulos del virus pueden disminuir en un 90% su infectividad a un pH <5 o >7 (Benfield et al., 1992). Según el ICTV del año 2017, PRRSV es miembro del género *Porartevirus*, familia *Arteriviridae*, orden *Nidovirales*, junto con el virus elevador de la lactato deshidrogenasa y el arterivirus de rata. A su vez, se ha definido que PRRSV comprende dos especies: PRRSV-1 y PRRSV-2.

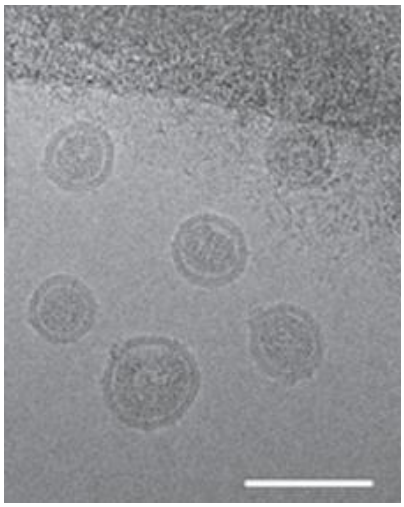


Figura 6.1.1. Criomicroscopía electrónica de partículas de PRRSV. Se observan partículas de forma ovalada. El genoma viral se encuentra empaquetado por las proteínas de la nucleocapside y rodeando a ésta se encuentras las glicoproteínas de superficie y las proteínas de membrana que están insertas en la envoltura lipídica. La barra de escala representa 100 nm. Imagen extraída con modificaciones de Lunney et al., 2016.

6.1.2. Descubrimiento y distribución actual

El PRRS fue reportado por primera vez en EE.UU. en 1987 (Keffaber, 1989), y posteriormente en Europa en 1990 (Wensvoort et al., 1991). Inicialmente, tuvo numerosas denominaciones: enfermedad misteriosa del cerdo, síndrome respiratorio e infertilidad porcina, enfermedad de la oreja azul, síndrome respiratorio y aborto epidémico porcino (Keffaber, 1989; Wensvoort et al., 1991). Desde su descubrimiento, esta enfermedad ha emergido rápidamente a nivel mundial, siendo en la actualidad una enfermedad endémica en muchos países productores (Rossow, 1998).

En 1991, un virus ARN denominado Lelystad o PRRSV tipo 1 fue aislado en Holanda e identificado como el agente etiológico del PRRS (Wensvoort et al., 1991). Subsecuentemente en 1992, un virus similar ATCC VR-2332 o PRRSV tipo 2 fue aislado y caracterizado en EE.UU. (Benfield et al., 1992; Collins et al., 1992). Posteriormente, la cepa VR2385, una cepa virulenta de PRRSV-2 fue identificada a mediados de la década de 1990, la cual divergió de VR2332 aproximadamente en un 8% de identidad nucleotídica (Meng et al., 1996). PRRSV-2 o tipo americano se encuentra distribuido principalmente en América del Norte y Asia, mientras que PRRSV-1 o tipo europeo está más restringido a países de Europa (Yoshii et al., 2004). Sin embargo, la coexistencia de los 2 tipos virales fue reportada en Dinamarca (Madsen et al., 1998) y en Canadá (Dewey et al., 2000).

Un estudio serológico con muestras retrospectivas realizado en Canadá ha detectado la presencia de anticuerpos contra PRRSV desde al menos el año 1979 (Carman et al., 1995). En Europa y Asia, también han evidenciado la circulación del virus previo a la emergencia del primer brote de PRRS (Zimmerman, 2003).

PRRS ha causado inmensas pérdidas económicas en la industria porcina y es considerada una de las enfermedades infecciosas en cerdos más importantes. De hecho, como ha sido mencionado anteriormente es una enfermedad de declaración obligatoria ante la OIE. En la figura 6.1.2 se muestra la distribución de la enfermedad y/o infección a nivel mundial en el año 2016 (OIE, 2018b).

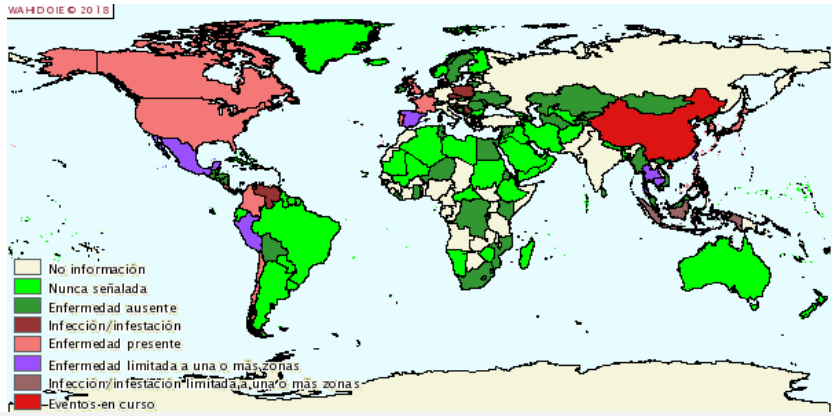


Figura 6.1.2. Distribución geográfica de PRRS. Información del año 2016. Se detalla en la leyenda con código de color los diferentes estatus de la enfermedad o la infección para cada país. Extraído de OIE, 2018b.

6.1.3. Enfermedades asociadas y transmisión.

PRRSV afecta a cerdos de todas las edades y causa aumento del número de abortos, disminución en las tasas de concepción y aumento de la mortalidad en cerdos neonatales y destetados (Keffaber, 1989; Wensvoort et al., 1991). Los síntomas clínicos típicos son problemas respiratorios moderados a severos en cerdos recién nacidos o en lechones en crecimiento, y fallo reproductivo en madres preñadas (abortos, muerte fetal, partos prematuros y fetos momificados) (Lunney et al., 2016).

Existen considerables diferencias de virulencia entre distintas cepas de PRRSV. Desde su emergencia, varias cepas altamente patogénicas han evolucionado causando numerosos brotes de la enfermedad en diferentes países. A finales de los años 90, surgió una cepa atípica de PRRSV que causó alta mortalidad y abortos en EE.UU. (Mengeling et al., 1998). Posteriormente, una cepa altamente virulenta denominada 1-8-4 fue reportada en el centro-norte de EE.UU. (Han et al., 2006). En China y el sudeste asiático, se informó que cepas de PRRSV-2 altamente patogénicas (HP-PRRSV) estaban asociadas a una alta mortalidad (20%) tanto en cerdos jóvenes como adultos, junto a una enfermedad respiratoria severa y fiebre elevada (Tian et al., 2007). Recientemente, en Europa del este fue reportada la circulación de una cepa de PRRSV-1 altamente patogénica, denominada Lena, la cual comparte una identidad de secuencia nucleotídica del 87% con la cepa de referencia PRRSV-1 Lelystad (Karniychuket al., 2010). A su vez, el estado inmune del hospedero también es un factor muy importante en el desarrollo de la enfermedad y mientras que algunas granjas pueden tener cerdos con infección subclínica de PRRSV, otras experimentan enfermedades reproductivas y/o respiratorias graves (Lunney et al., 2016). Por otro lado, se ha reportado que PRRSV como agente primario o en co-infección con otros patógenos pueden producir una complicación de la enfermedad del complejo respiratorio porcino (PRDC, por sus siglas en inglés) (Brockmeier et al., 2002). Ha sido observada una neumonía pulmonar más severa y de mayor duración en cerdos infectados con *Mycoplasma hyopneumoniae* y PRRSV (Thacker et al., 1999), y una sintomatología clínica más exacerbada en cerdos co-infectados con PRRSV y *Bordetella bronchiseptica* (Brockmeier et al., 2000). El PRRSV también desempeña un papel importante en las PCVAD. De hecho, la infección de los cerdos con PRRSV y PCV2 genera síntomas

clínicos y lesiones pulmonares más graves que las asociadas con la infección por cualquiera de los agentes por separado (Allan et al., 2000). Existe evidencia de interacción de PRRSV con otros patógenos porcinos, incluidos el coronavirus respiratorio porcino, SIV y *Haemophilus parasuis*, al alterar la respuesta típica del hospedero a la infección por un solo patógeno (Van Reeth et al., 1996; Solano et al., 1997).

El contacto directo entre cerdos enfermos y sanos es la ruta predominante de transmisión (Rossow, 1998). Los animales infectados comúnmente eliminan PRRSV en saliva, secreciones nasales, orina, semen y, ocasionalmente, en las heces. El virus puede eliminarse por estas vías en períodos variables de tiempo. En saliva el virus puede ser liberado hasta 42 días post-infección (dpi), en secreciones nasales hasta 21 dpi, en la orina hasta 28 dpi, en semen hasta 92 dpi y en heces hasta 38 dpi (Rossow, 1998).

La transmisión vertical se produce por vía transplacentaria, preferentemente en el último trimestre del embarazo y es independiente de la virulencia de las cepas de PRRSV. Si bien aún se desconoce el mecanismo por el cual esto ocurre, se cree que probablemente, la replicación viral en el endometrio y la placenta pueden originar la muerte fetal (Karniychuk y Nauwynck, 2013; Lunney et al., 2016).

6.1.4 Organización genómica y proteínas virales.

Según el sistema de clasificación basado en ácido nucleico viral ideado por David Baltimore, PRRSV se clasifica dentro del Grupo IV (Baltimore, 1971), ya que posee un genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva que contiene una caperuza y una cola poli A en los extremos 5' y 3', respectivamente. Posee una longitud de aproximadamente 15 kb y codifica para 11 ORFs flanqueados en ambos extremos por secuencias 5' y 3' UTR (Fig.6.1.3) (Kappes y Faaberg, 2015). ORF1a y ORF1b constituyen aproximadamente las tres cuartas partes del genoma viral policistrónico y codifican dos poli-proteínas grandes pp1a y pp1ab. La poli-proteína pp1a se escinde después de la traducción en 10 proteínas funcionales no estructurales (nsps) que incluyen nsp1α, nsp1β, nsp2, nsp3, nsp4, nsp5, nsp6, nsp7α, nsp7β y nsp8. El clivaje es producido por una compleja cascada proteolítica que está dirigida por 4 cascadas de dominios proteinasa codificados en ORF1a (nsp1α, nsp1β, nsp2 y nsp4).

Asimismo, la poli-proteína pp1ab se procesa en 4 nsps (nsp9, nsp10, nsp11 y nsp12). El ORF1a', codifica dos proteínas virales recientemente descubiertas, nsp2TF y nsp2N (revisado por Kappes y Faaberg, 2015; Lunney et al., 2016). Las proteínas no estructurales tienen funciones en la replicación viral siendo por ejemplo nsp9 la ARN polimerasa viral ARN dependiente, nsp10 una helicasa, nsp11 una endoribonucleasa, nsp2 y nsp3 proteínas transmembrana involucradas en la inducción de reordenamientos de membrana asociados a la replicación (Kappes y Faaberg, 2015). Algunas proteínas no estructurales, como nsp1α y nsp1β, actúan modulando la respuesta inmune del hospedero mediante la supresión del interferón de tipo I (IFN-I) (Lunney et al., 2016).

Los restantes 8 ORFs localizados en el extremo 3' del genoma codifican para proteínas estructurales (ORF2a, 2b, 3-7 y 5a). Cuatro de estas proteínas son glicoproteínas de membrana denominadas GP2a, GP3, GP4 y GP5, 3 proteínas son no glicosiladas asociadas a la membrana (E, ORF5a y M), y por último, la proteína N que constituye la nucleocápside del virus (Lunney et al., 2016) (Fig.6.1.3). Las glicoproteínas minoritarias GP2a, GP3 y GP4 forman un complejo trimérico fuertemente N-glicosilado necesario para la entrada del virus a la célula (Fig. 6.1.5A) (Das et al., 2010; Wissink et al., 2005). Las proteínas estructurales mayoritarias de la partícula viral son codificadas por ORF5, ORF6 y ORF7 (Kappes y Faaberg, 2015). ORF5 codifica para la glicoproteína estructural mayoritaria, GP5, la cual es la más variable a nivel genético y posee un número variable de sitios de N-glicosilación. ORF6 codifica para la proteína no glicosilada mayoritaria de matriz, M, la cual es altamente conservada y forma un heterodímero con la proteína GP5 (Fig.6.1.5A) (Lunney et al., 2016). Los heterodímeros formados por las proteínas principales GP5 y M son indispensables para la formación de partículas virales y, posteriormente, para la infectividad viral al interactuar con los receptores celulares (Dokland, 2010). Por otra parte, ORF7 codifica para la proteína N, la cual es la proteína viral estructural más abundante del virión y forma la nucleocápside que empaqueta el ARN viral. Recientemente, se ha sugerido que la nucleocápside de PRRSV constituye un core pleomórfico (Dokland, 2010) (Fig. 6.1.3B). La proteína N forma homodímeros y no posee dominios transmebrana. Es una proteína no glicosilada y está fosforilada (Kappes y Faaberg, 2015; Lunney et al., 2016). A su vez, al igual que nsp1α y nsp1β, la proteína N es un potencial antagonista de IFN-I (Lunney et al., 2016). En general, es la proteína utilizada para el

diagnóstico viral ya que es una región altamente antigénica y conservada (Guarino et al., 1999; Amosin et al., 2009). Finalmente, las proteínas minoritarias no glicosiladas e hidrofóbicas E y 5a, son codificadas por ORF2b y ORF5a, respectivamente. Se encuentran incorporadas en el virión como complejos multiméricos y son esenciales para la viabilidad del virus (Lunney et al., 2016). Si bien la función de ORF5a aún no se conoce, la proteína E parece ser importante para el desnudamiento viral (Lee y Yoo, 2006).

En cuanto a las regiones no codificantes, la UTR 5' y 3' son altamente conservadas entre los miembros de la familia *Arteriviridae* y se considera que son esenciales para la replicación viral, la transcripción y la síntesis de proteínas (Kappes y Faaberg, 2015). Ambas generan estructuras secundarias de ARN importantes para la regulación de dichas funciones. La UTR 5' contiene una estructura de caperuza y es genéticamente muy variable entre las dos especies de PRRSV. La UTR 3' se localiza luego de ORF7 (Fig. 6.1.3A), consiste en 150 nt sin incluir la cola poli A, y es variable entre las cepas de PRRSV pero menos que la UTR 5' (Kappes y Faaberg, 2015).

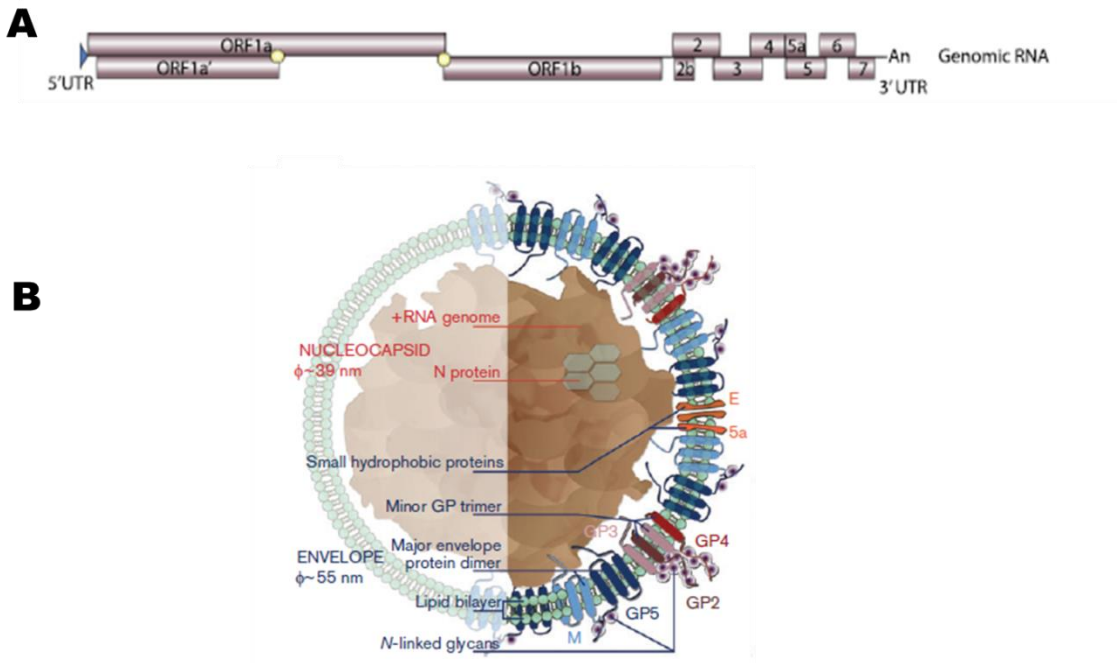


Figura 6.1.3. Organización genómica de PRRSV y estructura del virión. A) Representación esquemática del ARN genómico (genomic RNA, en inglés) de 15kb de PRRSV, donde se indican las regiones UTR y los 11 ORFs. B) Representación esquemática de la partícula viral, en la cual se detallan las glicoproteínas minoritarias de la envoltura (envelope, en inglés) de bicapa lipídica (lipid bilayer, en inglés): GP2a, GP3 y GP4 que forman un trímero (Minor GP trimer, en inglés), la glicoproteína mayoritaria GP5 que forma un heterodímero con la proteína M (Major envelope protein dimer, en inglés). Asimismo, se señalan las proteínas hidrofóbicas minoritarias E y 5a (small hydrophobic proteins, en inglés). La proteína N (N protein, en inglés) forma la nucleocápside (nucleocapsid, en inglés) que empaqueta al ARN genómico de cadena positiva (+RNA genomic, en inglés). Extraído con modificaciones de Kappes y Faaberg, 2015 y Snijder et al., 2013.

6.1.5. Patogenia y ciclo replicativo

El cerdo es el único hospedero natural conocido para PRRSV y tiene un tropismo restringido por células del linaje de monocitos/macrófagos. Los macrófagos alveolares porcinos (PAMs, por sus siglas en inglés) sirven como blanco primario para la infección del virus, el cual se propaga rápidamente por todo el cuerpo del animal por la vía linfática e infecta macrófagos en los tejidos linfoides (ganglios, amígdalas, bazo). Además, PRRSV también infecta macrófagos intra-vasculares de la placenta y el cordón umbilical; sin embargo, las PBMC y los macrófagos peritoneales no son permisivos a la infección por PRRSV (Duan et al., 1997a, b; Lawson et al., 1997; Thanawongnuwech et al., 2000). Por otro lado, se ha reportado que el virus puede replicar en células dendríticas diferenciadas a partir de monocitos (Loving et al., 2007).

La infección por PRRSV se puede dividir en al menos tres etapas distintas: infección aguda, persistencia y extinción (Fig. 6.1.4). En la primera etapa de infección aguda el pulmón es el principal sitio de infección y la replicación viral en macrófagos alveolares produce viremia a las 6-12 horas post-infección (hpi). Este periodo también se caracteriza por una alta carga viral en los tejidos linfoides y por viremia en suero, la cual puede durar varias semanas a pesar de la presencia de anticuerpos (Lopez y Osorio, 2004; Lunney et al., 2016). Durante la etapa de infección persistente, los animales no presentan signos evidentes de enfermedad y la replicación se localiza preferentemente en órganos linfoides como amígdalas y ganglios linfáticos. Asimismo, se ha sugerido que PRRSV persiste en un estado de replicación continua que va descendiendo a lo largo del tiempo (Allende et al., 2000). En la última etapa, el virus desaparece pero no se sabe con exactitud cuando esto ocurre. En general, la mayoría de los cerdos eliminan completamente el virus a los 3-4 meses de haberse infectado. Sin embargo, PRRSV tiene la capacidad de persistir en algunos animales durante largos períodos de tiempo. De hecho, se ha observado que animales con infección persistente el ARN viral del PRRSV puede ser identificado en suero hasta 251 dpi. Sin embargo, en este mismo trabajo el virus no pudo aislarse a partir de suero luego de los 56 dpi (Wills et al., 2003).

En términos generales, además de la sintomatología clínica descripta, PRRSV suprime la respuesta inmune del hospedero y puede permitir que patógenos oportunistas o secundarios establezcan infecciones, resultando en una enfermedad aún más grave (Lunney et al., 2016).

La infección por el virus genera una respuesta de anticuerpos a los 7-9 dpi pero sin evidencia de protección. Los anticuerpos neutralizantes (NAb) solo aparecen tardíamente, típicamente luego de los 28 dpi (Loving et al., 2015) (Fig.6.1.4). Los ensayos comerciales para la identificación de anticuerpos en suero, en general detectan anticuerpos contra la proteína N, los cuales aparecen más tempranamente pero no son neutralizantes ni protectores (Lopez y Osorio, 2004). A su vez, anticuerpos contra proteínas nsp también son identificados tempranamente luego de la infección (de Lima et al., 2006). Mientras que el título de anticuerpos contra N disminuye a los 126 dpi, la respuesta de anticuerpos contra nsp lo hace a los 202 dpi (Brown et al., 2009). Debido a ello y a las infecciones persistentes características de PRRSV, es que ensayos por inmuno-absorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) basados en la identificación de anticuerpos contra las proteínas N o nsp virales pueden

ser negativos pero aún puede detectarse ARN viral en suero o tejidos. Incluso, en esta situación el virus puede seguir transmitiéndose a cerdos sanos (Will et al., 2003). Por otra parte, la glicoproteína GP5 presenta un epítope señuelo inmunodominante con respecto al epitope neutralizante y los anticuerpos producidos tempranamente contra esta proteína de superficie tampoco son protectores de la infección (Ostrowski et al., 2002).

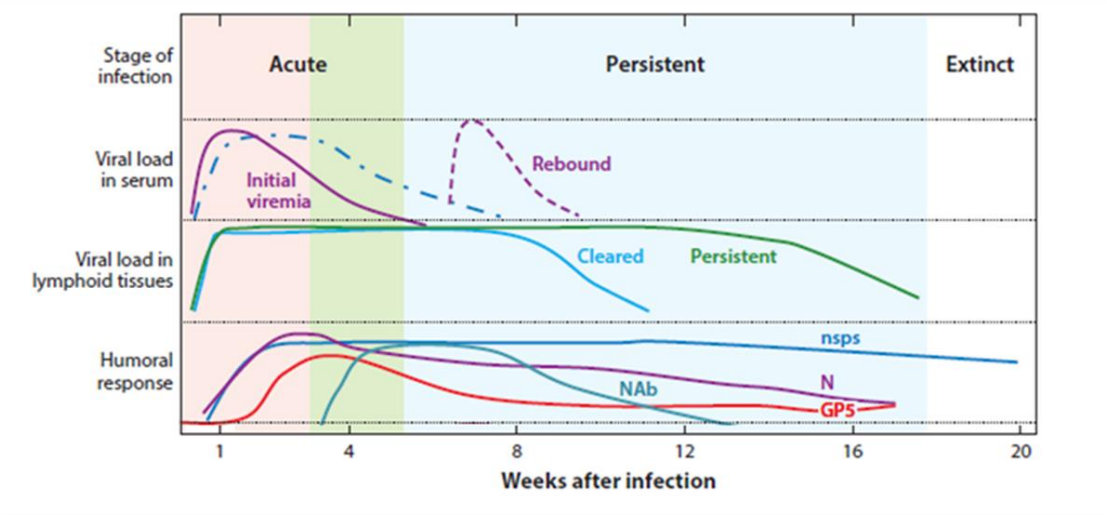


Figura 6.1.4. Carga viral y respuesta humoral en un cerdo infectado con PRRSV. Se detallan las tres etapas de infección: aguda, persistente y extinción (stage of infection: acute, persistent, extinct, repectivamente en inglés). Se señala la carga viral en el suero y en los tejidos linfoides según el tiempo post-infección en semanas (viral load in serum y lymphoid tissue respectivamente en inglés). La carga viral en el suero está indicada en un rango de respuestas: en línea continua violeta para una eliminación del virus rápida, en azul con línea punteada para una eliminación más lenta y en línea punteada violeta para virus persistentes o de rebote (rebound en inglés). Se especifica el tiempo de eliminación del virus en tejidos linfoides según el tipo de infección, aguda (celeste) o persistente (verde). Se muestra la respuesta humoral en relación al tiempo post-infección de anticuerpos neutralizantes (NAb) y anticuerpos contra diferentes proteínas de PRRSV (N, nsps y GP5). Extraído con modificaciones de Lunney et a., 2016.

En cuanto a su ciclo replicativo, se conoce que PRRSV ingresa a la célula hospedera mediante endocitosis mediada por clatrina. El genoma viral es liberado al citosol luego de la acidificación del endosoma y la fusión de la membrana (Nauwynck et al., 1999). Numerosos estudios han demostrado que la infección por PRRSV es mediada por diversos receptores o factores celulares (Shi et al., 2015) como el sulfato de heparina, vimentina, CD151, CD163 porcino (CD163), CD169, CD209 y MYH9. Sin embargo, solo CD163 es indispensable para la infección por PRRSV tanto *in vitro* e *in vivo* (revisado por Nan et al., 2017). Para su propagación en cultivos celulares, además de los PAMs, se utilizan sub-clones de la línea celular continua de

riñón de mono verde africano MA104, como las MARC-145 (Kim et al., 1993). Asimismo, varias líneas celulares de diversas especies como PK-15, CRL2843, HEK293T y BHK21 también han demostrado ser aptas para la replicación del virus pero luego de la introducción de ADN copia de CD163 (Nan et al., 2017). El suero o pulmón son las muestras por excelencia para el aislamiento viral en cultivos celulares (Van Alstine et al., 1993).

Dos proteínas estructurales minoritarias GP2a y GP4 han sido identificadas como las proteínas virales que median la entrada del virus en células susceptibles por la interacción con CD163 (Fig. 6.1.5A) (Das et al., 2010). La traducción del genoma produce las poli-proteínas replicasas que como se detalló previamente se escinden mediante proteinasas virales para generar proteínas no estructurales, que se ensamblan en un complejo de replicación y transcripción (RTC, por sus siglas en inglés) (Lunney et al., 2016). El ciclo replicativo del virus depende de la reorganización de las membranas celulares para formar vesículas de membrana doble (DMV, por sus siglas en inglés), que se cree que derivan del retículo endoplásmico (Dokland, 2010). En estos sitios de replicación, el RTC primero se involucra en la síntesis de ARN de cadena negativa para producir ARN de cadena negativa tanto de longitud completa como subgenómicos (sg). Posteriormente, los ARNm sg de cadena negativa sirven como plantillas para la síntesis de los ARNm sg de cadena positiva necesarios para expresar los genes de proteínas estructurales que residen en el extremo 3' del genoma (Lunney et al., 2016).

Esto es porque el PRRSV emplea un mecanismo de síntesis de ARN discontinuo que se asemeja a la recombinación de ARN de elección de copia. Durante este proceso, la cadena de ARN naciente se transfiere de un sitio en la plantilla a otro, durante la síntesis de la cadena positiva o negativa, para producir moléculas de ARN sg y este proceso depende de secuencias reguladoras de la transcripción (TRS, por sus siglas en inglés), que están presentes en ambos sitios de la plantilla y aseguran la fidelidad de la transferencia de cadenas (Pasternak et al., 2001).

Los genomas de ARN recién generados se empaquetan en nucleocápsides y adquieren la envoltura al brotar de membranas del retículo endoplásmico liso y/o el complejo de Golgi. Los nuevos viriones se liberan de la célula por exocitosis (Fig. 6.1.5B) (Lunney et al., 2016).

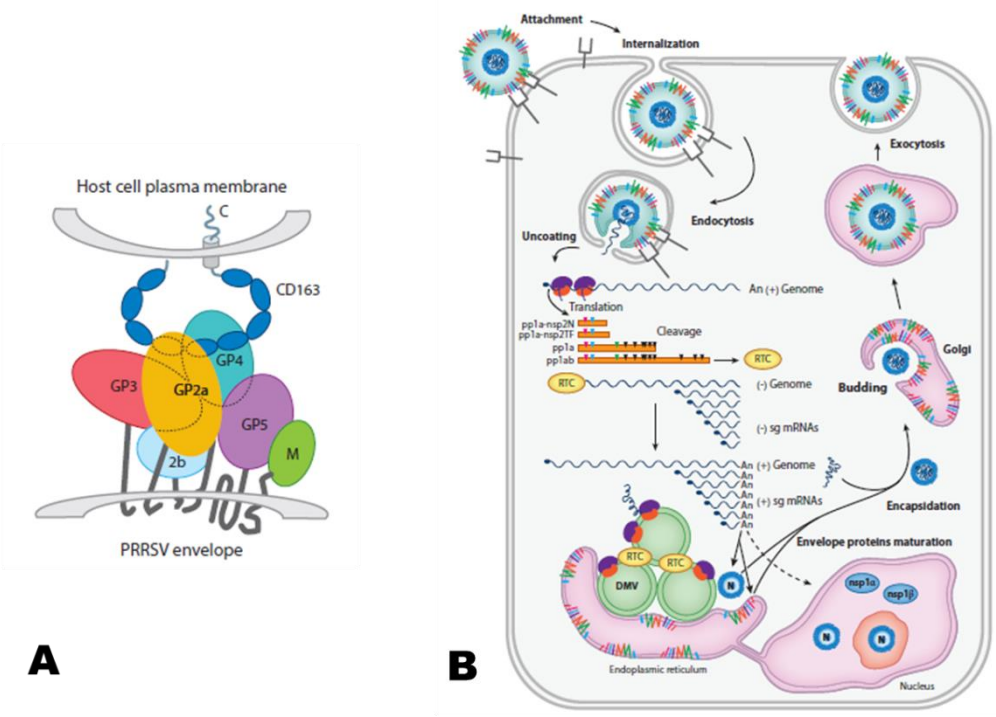


Figura 6.1.5. Ciclo replicativo de PRRSV. A) Diagrama de las proteínas de la envoltura de PRRSV (PRRSV envelope, en inglés) y su interacción con el receptor CD163 de la membrana celular del hospedero (host cell plama membrane, en inglés) en la etapa de adsorción viral (attachment en inglés). B) Internalización del virus por endocitosis (Internalization y endocitocys, repectivamente en inglés). Posteriormente se produce el desnudamiento (uncoating, en inglés) por acidificación del endosoma y se libera el ARN viral de polaridad positiva (+ genome, en inglés) al citoplasma. Se traducen (translation, en inglés) las poli-proteínas (pp1a-nsp2TF, pp1a-nsp2N, pp1a y pp1ab) que luego de su clivaje (cleavage, en inglés) forman el complejo de replicación y transcripción, RTC. Esto ocurre en sitios de replicación DMV formados por membranas del retículo endoplásmico (endoplasmic reticulum, en inglés). El genoma es encapsidado en la nucleocápside (encapsidation, en inglés) y la envoltura es adquirida por brotamiento a partir de membranas intracelulares (budding, en inglés). El virus sale de la célula por exocitosis (exocytosis, en inglés). Extraído con modificaciones de Lunney et a., 2016.

6.1.6. Variabilidad genética y vacunas actuales

Los dos tipos virales que fueron originalmente descubiertos en los dos continentes, Americano y Europeo, actualmente son clasificados como especies distintas denominadas PRRSV-1 y PRRSV-2 (ICTV, 2017), y son sorprendentemente diferentes a nivel genético, con aproximadamente un 60% de identidad nucleotídica (Nelsen et al., 1999), e incluso, presentan serotipos diferentes (van Woensel et al., 1998). De hecho, la distancia evolutiva entre los dos linajes ha llevado a la hipótesis de que han evolucionado por separado de un ancestro común muy lejano (Plagemann, 2003). Sin embargo, en general, los síntomas clínicos, la organización genómica y el año de emergencia son similares entre las dos especies (Kappes y Faaberg,

2015). A su vez, PRRSV-1 y PRRSV-2 poseen una gran diversidad genética intra-especie y los diferentes subtipos virales pueden variar hasta un 20% a nivel nucleotídico (Han et al., 2006).

PRRSV-1, según el análisis de las secuencias de ORF5 puede dividirse en 4 subtipos bien definidos. Dentro de estos, el subtipo 1, es el que presenta la mayoría de las secuencias ORF5 de varios países (Stadejek et al., 2006). Aunque la mayor parte de su diversidad se encuentra en Europa, esta especie de PRRSV se ha introducido en 5 países no europeos, incluidos EE.UU. (Fang et al., 2007; Ropp et al., 2004), Canadá (Dewey et al., 2000), Corea del Sur (Lee et al., 2010), China y Tailandia (Thanawongnuwech et al., 2004).

Paralelamente, en base a un estudio filogenético de aproximadamente 9.000 secuencias de ORF5, las cepas de PRRSV-2 pueden dividirse en 9 linajes diferentes (Shi et al., 2010). En cuanto a su distribución geográfica, las cepas Norteamericanas prevalecen en todos los linajes, excepto en dos linajes asiáticos específicos (linajes 3 y 4). Por otro lado, el linaje 1 contiene a su vez, varias secuencias Tailandesas, el linaje 8 contiene cepas Chinas altamente patogénicas, y los linajes 8 y 9, poseen varias cepas Italianas (Shi et al., 2010). Recientemente, cepas del linaje 1 y 2 han sido identificadas en el brote de PRRS del año 2013-2015 en Chile, mientras que las cepas del año 2000-2006 pertenecían al linaje 5 (Neira et al., 2017).

El alto grado de variabilidad observada sugiere que tanto PRRSV-1 y PRRSV-2 están en constante evolución para adaptarse a la inmunidad existente y emerger como nuevas variantes para causar nuevos brotes de manera continua (Morgan et al., 2013). Los datos epidemiológicos señalan que el momento de divergencia entre PRRSV-1 y PRRSV-2 fue aproximadamente en el año 1980. Si esta estimación es correcta, PRRSV ha evolucionado a la tasa evolutiva más alta (en el orden de 10^{-2} s/s/a) de todos los virus de ARN conocidos (con tasas que van desde 10^{-3} a 10^{-5} s/s/a (Hanada et al., 2005). Esto se debe no solamente a la falta de mecanismos de corrección de errores de la ARN polimerasa ARN dependiente, sino que también a la gran tasa de recombinación que tienen estos virus, mediante el mecanismo de *copy-choice*, que dan como resultado una gran diversidad de cepas con variedad en la patogenicidad (Kappes y Faaberg, 2015).

Esta característica de PRRSV significa un gran desafío para la obtención de vacunas eficaces que maximicen el control de la enfermedad. Las vacunas contra PRRSV están disponibles a

nivel comercial desde el año 1994. Actualmente hay dos tipos de vacunas: las vacunas con virus atenuado, resultantes del pasaje sucesivo en cultivos celulares, y las vacunas inactivadas. Se ha demostrado que las vacunas con virus atenuados provocan una respuesta inmune humoral relativamente débil pero una efectiva respuesta celular. Sin embargo, confieren protección contra cepas genéticamente homologas y una protección parcial o ninguna protección contra cepas heterólogas. Aunque los datos experimentales demuestran los efectos beneficiosos de este tipo de vacuna, su eficacia en el campo no es óptima. De hecho, se han producido brotes graves de PRRS en granjas vacunadas. Por otro lado, las vacunas inactivadas si bien son más seguras que las anteriores, proporcionan una eficacia muy limitada y se cree que incluso, son mucho menos efectivas que las vacunas atenuadas (revisado por Nan et al., 2017; Vu et al., 2017).

6.2. Objetivos específicos parte III

1. Realizar un relevamiento serológico de PRRSV en cerdos de diferentes regiones del país que permitan evaluar el estatus sanitario de esta virosis emergente de alto impacto en cerdos del Uruguay.

2. Optimizar e implementar herramientas de detección molecular y aislamiento en cultivos celulares que permitan investigar la presencia de la infección de PRRSV en el país.

6.3. Primer reporte de infección por PRRSV en cerdos del Uruguay

Este trabajo se desarrolló en el marco de un proyecto INIA-FPTA denominado “Relevamiento serológico de virus suinos de alto impacto sanitario/económico en establecimientos de producción porcina”. El objetivo del mismo fue investigar el estatus sanitario de diversas poblaciones de cerdos pertenecientes a diferentes criaderos pequeños, medianos y grandes del Uruguay mediante el relevamiento serológico de cuatro virosis emergentes de importancia en salud animal y/o humana: PRRSV, PPC, ADV y SIV. Como se detalló anteriormente, no se contaba con información actualizada en el país sobre la circulación de estas virosis emergentes desde el año 2000 y en el caso de SIV, nunca se había realizado un relevamiento serológico.

Fueron recolectados 524 sueros en un total de 8 muestreos diferentes en el periodo 2014-2016 y fueron empleados kits de ELISA comerciales para cada uno de los virus. Debido a que se trató de un relevamiento de enfermedades denunciables (PRRSV, CSFV y ADV según la lista de enfermedades denunciables ante la OIE del año 2014), las muestras fueron adquiridas en criaderos o en frigoríficos de faena con previo consentimiento informado.

Si bien no se identificó la presencia de anticuerpos contra ADV y CSFV, como resultado relevante de dicho proyecto, se destaca la primera detección de anticuerpos contra PRRSV en cerdos del Uruguay. Las muestras fueron evaluadas con un kit de ELISA indirecto comercial que detecta anticuerpos contra PRRSV-2 o de tipo americano (CIVTEST SUIS PRRS A/S, Hipra, España). El 9.9% de las muestras (52/524) resultaron presentar anticuerpos contra el virus y en todos los muestreos realizados (1-8) fueron identificados sueros positivos (En los Departamentos de Salto, Colonia y Canelones). Posteriormente, 311 muestras de las 524 fueron testeadas con otro kit de ELISA comercial, PrioCHECK® PRRSV Ab porcine (Thermo Fisher Scientific, EE.UU), que detecta anticuerpos contra las dos especies de PRRSV. El 7% de las muestras analizadas con este kit resultaron tener anticuerpos contra el virus. Si bien fueron incluidas las 52 muestras positivas previamente analizadas con el otro kit, fue posible confirmar por ambos un total de 12 positivos (Tabla 6.3.1 complementaria). Estos datos indican que los dos kits comerciales utilizados en este trabajo poseen diferente especificidad y/o sensibilidad. Esto ha sido previamente demostrado por otros investigadores (Sattler et al., 2014; Biernacka et al., 2018). De hecho, en un estudio muy reciente en donde se compararon 6 kits de ELISA comerciales para el diagnóstico de anticuerpos contra PRRSV, se ha observado

que solo los kit de ELISA de la marca IDEXX e Hipra tienen un 100% de especificidad. Sin embargo, el kit de la marca PrioCHECK® resultó ser el de menor especificidad. Por otro lado, la sensibilidad del kit de Hipra mostró ser inferior a la del kit PrioCHECK® (Biernacka et al., 2018). A su vez, estos autores afirman que no es posible realizar una adecuada comparación de los valores obtenidos en los diferentes kits debido a que presentan distintos *cut-off* (Biernacka et al., 2018). En el caso de los utilizados en este trabajo, la interpretación del ensayo con CIVTEST SUIS PRRS A/S de Hipra se basa en el índice relativo x100 (IRPC), el cual se calcula con la siguiente fórmula: ((densidad óptica (DO) de la muestra – OD del control negativo)/ (DO del control positivo-DO del control negativo)) x100. El *cut-off* de este test es 20%, siendo positivas las muestras mayores a este valor. Por otro lado, en el caso del kit PrioCHECK® PRRSV Ab porcine, el ensayo se basa en el porcentaje de positividad (PP) utilizando el mismo calculo que para el kit Hipra pero posee un *cut-off* de 30%, siendo positivas las muestras iguales o mayores a este valor.

Paralelamente, fueron testeadas 23 muestras pertenecientes a la seroteca utilizada en la parte I y II de esta tesis. Como se ha especificado, estas muestras corresponden al periodo 2010-2014 y en su mayoría provienen de cerdos infectados con PCV2 y/o con sintomatología compatible a las PCVAD. Para evaluar la presencia de anticuerpos contra PRRSV en estas muestras fue utilizado el kit CIVTEST SUIS PRRS A/S, Hipra, España. El 56.5% de las muestras de archivo analizadas resultaron tener anticuerpos contra el virus. En la Tabla 6.3.2 complementaria se detallan las muestras seropositivas y la información correspondiente al estatus de infección con PCV2, sintomatología, año de colecta y origen geográfico. Las 13 muestras positivas corresponden a 8 criaderos diferentes (denominados A-H) localizados en los Departamentos de Soriano, Canelones y Montevideo. A su vez, se detectaron anticuerpos contra PRRSV en todas las categorías de animales (padrillo, madres y lechones).

La identificación de anticuerpos contra PRRSV en granjas pertenecientes a distintos Departamentos y en los diferentes años de estudio, sugiere que los cerdos del Uruguay han estado en contacto continuo con el virus. Incluso, los datos obtenidos para las muestras de archivo, evidencian que probablemente su circulación esté ampliamente distribuida en el país desde al menos el año 2011. Se descarta la detección de anticuerpos inducidos por la vacunación, ya que la misma no se practica en el país debido a que no hay antecedentes de la

circulación del virus en Uruguay, ni en los países limítrofes. Con el fin de evidenciar la presencia de PRRSV en cerdos del país, paralelamente, se optimizó e implementó una técnica de detección molecular, pudiéndose detectar por transcripción reversa (RT)-Nested PCR (de acuerdo al protocolo reportado por Shin et al., 1997) la presencia de ARN viral en muestras tanto seropositivas como seronegativas del periodo 2014-2016 (Fig.6.3.1 complementaria). Fueron procesadas 86 muestras pertenecientes a las colectas 1-8, positivas (n=33) o negativas (n=53) para los kits de ELISA empleados, siendo detectadas 14 muestras positivas por RT-Nested PCR de las cuales 6 corresponden a muestras seropositivas y 8 a muestras seronegativas. Se ha reportado que en granjas no vacunadas la combinación de ensayos de ELISA y RT-PCR son necesarios para evaluar la circulación del virus ya que permite evidenciar también las infecciones tempranas y/o persistentes (Wills et al., 2003; Duinhof et al., 2011). De hecho, según el estudio reportado por Duinhof et al. (2011), en una selección aleatoria de muestras seronegativas en granjas no vacunadas y sin sintomatología clínica el 12.2% resultaron positivas por RT-PCR.

Asimismo, también fue identificada la presencia de ARN viral en las muestras de archivo. Las cuatro muestras analizadas resultaron positivas por RT-Nested PCR, las cuales corresponden a las muestras número 10, 11, 12 y 13 descriptas en la Tabla 6.3.2 complementaria. Con excepción de la número 11, todas son muestras con IRPC muy elevado con respecto al *cut off* del ensayo de ELISA empleado y provienen de criaderos con problemas sanitarios y/o presentan sintomatología clínica. Posiblemente, el alto porcentaje de seropositividad y de detección de ARN viral, esté relacionado a la sintomatología clínica compatible con el PRRS (problemas reproductivos en madres y respiratorios en lechones) observada en varias de las muestras de archivo analizadas. Sin embargo, en ningún caso puede afirmarse que PRRSV sea el único patógeno causante de la enfermedad, ya que la co-infección con PCV2 puede observarse en algunos casos (Tabla 6.3.2 complementaria). Diversos estudios han reportado que PRRSV potencia la replicación viral de PCV2 (Allan et al., 2000; Rovira et al., 2002) y se ha demostrado que el riesgo de desencadenar PCV2-SD es mucho más elevado si el animal es infectado simultáneamente por ambos virus (Pogranichniy et al., 2002). Por ejemplo, el criadero E señalado en la Tabla 6.3.2 complementaria, un establecimiento pequeño de 70 madres ubicado en Canelones, presentó graves problemas respiratorios y desmedro en lechones. Los

animales no habían recibido ningún tipo de vacuna y eran desparasitados cada 3 meses. Todas las muestras de suero analizadas del criadero E resultaron estar infectadas con PCV2 (capítulo 4 parte I, sección 4.7) y al menos una de ellas, resultó estar infectada también con PRRSV (número 10 Tabla 2 complementaria). A su vez, como se indicó en el capítulo de la parte II de esta tesis (sección 5.3), animales pertenecientes a este criadero resultaron tener una de las más altas cargas virales de PCV2 identificadas (3.2 $x10^6$ copias/mL de suero). Por lo tanto, esta situación es compatible tanto con PRRS como con una leve a moderada PCV2-SD y el hecho de que ambas sean enfermedades multifactoriales y compartan características clínicas, hace que el diagnóstico primario de las enfermedades sea complejo para el personal veterinario. Estas muestras provienen del año 2013, cuando se consideraba que PRRSV no circulaba en el país y es por ello que estas muestras solo fueron testeadas en su momento para PCV2. A raíz de esta investigación, se enfatiza la importancia de evaluar la circulación de ambos agentes virales, ya que la co-infección podría resultar en un agravante de la enfermedad.

El análisis de la secuencia de los 209 pb correspondientes a un fragmento del gen N mostró que todas las muestras eran idénticas a nivel genético. Si bien este gen que codifica para la proteína de la nucleocápside es muy conservado y más aún la región utilizada para el diagnóstico molecular, la poca variabilidad observada podría indicar un origen común y bastante reciente de la infección. Por otro lado, el análisis filogenético permitió observar, que las cepas detectadas resultaron estar más estrechamente relacionadas con cepas PRRSV-2 o tipo americano. De todas formas, es necesario continuar con el estudio de la caracterización molecular de las cepas identificadas para comprender cuales podrían haber sido las rutas de origen de la infección con PRRSV en Uruguay. Para ello, otros genes con mayor variabilidad como la ORF5 deberían de ser estudiados.

Por último, para confirmar la circulación de virus infectivo se llevó a cabo el aislamiento viral en cultivos celulares de 15 muestras de suero positivas para la RT-Nested PCR, 12 muestras del periodo 2014-2016 y 3 muestras de archivo. Se realizó un primer pasaje en PAMs y se las incubó por 4 días. Posteriormente, se realizó un segundo pasaje en células MARC-145 y a las 72 hs post-infección se observó efecto citopático de PRRSV en 6 muestras (Fig. 6.3.2 complementaria). El efecto citopático característico de este virus consiste en pequeños grupos

redondeados de células que parecen estar por encima de la monocapa no infectada. Este ha sido descrito en varios estudios (Benfield et al., 1992; Zheng et al., 2015; Zhu et al., 2018). Solamente dos muestras que presentaron efecto citopático en MARC-145 previamente ya habían generado un cambio en la morfología en los cultivos de PAMs (Fig.6.3.2 complementaria). Las muestras que presentaron efecto citopático en MARC-145 fueron colectadas en el año 2014 (3 muestras de 2 criaderos diferentes), en el año 2016 (2 muestras de diferentes criaderos) y en el año 2013 (muestra 10 Tabla 2 complementaria). Para confirmar el aislamiento viral se realizó una IFA con un anticuerpo contra la proteína N, la proteína más abundante del virus (Fig. 6.3.3 complementaria).

En definitiva, en este capítulo de la tesis se evidenció la circulación de PRRSV en Uruguay mediante la utilización de herramientas serológicas, moleculares y de aislamiento en cultivos celulares, lo que significó su notificación obligatoria ante la OIE y una alerta sanitaria de esta enfermedad emergente para la región.

ARTÍCULO VII

Received: 18 October 2017

DOI: 10.1111/tbed.12813

RAPID COMMUNICATION

WILEY Transboundary and Emerging Diseases

First-time detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in Uruguay

N. Ramos[1] | S. Mirazo[1] | G. Castro[2] | K. Cabrera[3] | F. Osorio[4] | J. Arbiza[1]

[1]Sección Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

[2]Área Suinos, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

[3]Asociación Uruguaya de productores de cerdos, Montevideo, Uruguay

[4]Nebraska Center for Virology & School of Veterinary & Biomedical Sciences, University of Nebraska-Lincoln 140 MOLR, Lincoln, NE, USA

Correspondence
N. Ramos and J. Arbiza, Sección Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
Emails: nramos@fcien.edu.uy (NR) and jarbiza@fcien.edu.uy (JA)

Funding information
Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria-Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria, Grant/Award Number: INIA-FPTA 321

Summary

Within the last two decades, several high-impact viruses have emerged in the global swine population, including porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). In Uruguay, the more recent serological survey for PRRSV and other notifiable diseases such as Aujeszky's disease virus (ADV) and classical swine fever virus (CSFV) dated from year 2000. The main purpose of this study was to update our information on the infection status of PRRSV, ADV and CSFV in Uruguayan pig herds, in order to keep informed about the epidemiological situation of these notifiable infections in the country. For serological testing, a total of 524 swine serum samples collected during the period 2014–2016 were assayed by commercial ELISAs. Our results revealed the (unexpected) presence of PRRSV antibodies in Uruguayan domestic swine herds and confirmed the absence of ADV and CSFV antibodies in all of the assessed samples. Following such initial finding, PRRSV antibodies were further investigated in 23 retrospective samples collected during 2010-2014. Thirteen of these 23 samples resulted seropositive. Subsequently, a molecular detection approach in frozen serum samples was implemented to confirm PRRSV infection, and viral RNA was identified by reverse transcription–nested polymerase chain reaction (RT-nPCR). Fourteen of 86 evaluated 2014–2016 samples resulted positive for viral RNA, while molecular analysis of four retrospective samples also revealed the presence of PRRSV type 2. Viral isolation of selected samples was carried out in porcine alveolar macrophages (PAM) and MARC 145 simian kidney cells, and the virus identity was confirmed by cytopathic effect (CPE) and immunofluorescence assay (IFA) using specific monoclonal antibodies for PRRSV nucleocapsid. Data reported here evidence for the first time the circulation of PRRSV type 2 in Uruguay, and retrospective serology results suggest that the virus has been infecting pigs in this country at least since 2011.

KEYWORDS
molecular detection, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, serology, uruguay, virus isolation

1 | INTRODUCTION

Emerging viral diseases in pigs are a major concern for swine health and have an important economic impact on the global swine industry (Meng, 2012). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is notifiable to the World Organization for Animal Health (OIE) and is considered to be one of the most costly viral diseases affecting pig production worldwide, which has stimulated the efforts to

 © 2018 Blackwell Verlag GmbH

control and eradicate the disease (Pileri & Mateu, 2016). Other notifiable diseases, swine viral diseases such as classical swine fever (CSF) and Aujeszky's disease (AD), have been eradicated in several countries. However, they remain important as transboundary viral diseases of swine worldwide (Blome, Staubach, Henke, Carlson, & Beer, 2017; Woźniakowski & Samorek-Salamonowicz, 2015).

Data regarding the circulation of viral pathogens in South American swine herds are still scant. In Uruguay, the most recent serological survey of PRRS virus (PRRSV) and other notifiable viruses such as AD virus (ADV) and CSF virus (CSFV) dated from year 2000, resulting seronegative for all tested farms and samples. In the region, PRRSV has been reported in Bolivia, Chile, Colombia, Peru, Venezuela and Ecuador (OIE, 2017a). On the other hand, CSF has been previously identified in Brazil, Uruguay, Argentina, Venezuela and Chile, and recently in Bolivia, Ecuador, Peru and Colombia. In the case of AD, only Chile, Uruguay and Ecuador have never reported the disease (OIE, World Organization of Animal Health, 2017a).

The main aim of this work was to investigate the circulation of PRRSV, ADV and CSFV among the Uruguayan pig population from different farms, in order to contribute to update the epidemiological status of these notifiable swine diseases in the country and to promote the implementation of appropriate animal health management policies.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Cells

MARC-145 cells (Kim, Kwang, Yoon, Joo, & Frey, 1993) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% foetal bovine serum (FBS) at 37°C with 5% CO_2. Porcine alveolar macrophage (PAM) cells were collected from pigs at 4 weeks of age and maintained in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium as described previously (Mengeling, Lager, & Vorwald, 1996).

2.2 | Samples

A total of 524 serum swine samples were included in this study. Specimens were obtained in eight different samplings events during the period 2014–2016. Animals belonged to commercial farms and slaughterhouses located in three departments (Canelones, Colonia and Salto) comprising the south-east, north and west regions of Uruguay. Sampling scheme is shown in Table 1.

In addition, a retrospective study was carried out with 23 serum samples (collected during 2010-2014 from different farms located in Montevideo, Canelones and Soriano), mostly from animals with porcine circovirus type 2 (PCV2)-associated symptoms that had been referenced to the laboratory for virologic diagnosis (Ramos et al., 2017).

2.3 | Serological testing

The presence of antibodies against PRRSV, CSFV and ADV was evaluated using commercial ELISA kits. Five hundred and 24 samples were tested for PRRSV antibodies using CIVTEST suis PRRS A/S (against PRRSV type 2) (Hipra, Spain), and 311 samples were also analysed with PrioCHECK® PRRSV Ab porcine (against PRRSV type 1 and 2) (Prionics, the Netherlands). Retrospective samples were tested by CIVTEST suis PRRS A/S. On the other hand, 524 samples were tested for ADV and CSFV antibodies using CIVTEST suis ADVgE and CIVTEST suis HC/PPC (Hipra, Spain), respectively. In all cases, these commercial kits were performed according to manufacturer's instructions.

TABLE 1 Sampling scheme. A total of 524 serum swine samples were collected during the period 2014–2016

Sampling	Date of collection	No. of samples	Department of origin
1	October 2014	71	Salto
2	November 2014	62	Salto
3	December 2014	67	Salto
4	October 2015	94	Salto
5	March 2016	46	Colonia
6	April 2016	81	Canelones
7	May 2016	61	Canelones
8	November 2016	42	Canelones
Total		524	

2.4 | RNA extraction and PRRSV detection

For PRRSV molecular detection, RNA was extracted from 140 μl of serum using a commercial kit (QIAamp RNA Mini Kit, Qiagen, USA) according to manufacturer's instructions. PRRSV type 2 RNA was detected by amplifying 209 bp within ORF7 region by reverse transcription–nested polymerase chain reaction (RT-nPCR) as previously described (Shin et al., 1997). Second-round PCR products of the expected size were purified with Zymoclean™ Gel DNA recovery kit (Zymo Research, USA), and DNA was sequenced directly in both directions by Institut Pasteur de Montevideo sequencing service. To confirm PRRSV sequence identity, a phylogenetic analysis was performed including reference PRRSV type 1 and type 2 strains. Phylogenetic tree was constructed by the neighbour-joining method with the Kimura two-parameter model as the model of nucleotide substitution using MEGA v. 5.0 software.

2.5 | Virus isolation

PAMs were seeded in 24-well microtiter plates, and each sample was inoculated using 0.2 ml of serum per well. After incubation at 37°C for 4 days, two cycles of freeze–thaw were performed at −80°C and cell supernatant was used for a second passage in MARC-145 cell monolayers. Uninoculated negative controls were also included. The plates were observed daily for the appearance of cytopathic effect (CPE), and to confirm the presence of the virus, an indirect immunofluorescence assay (IFA) was performed using anti-

nucleocapsid monoclonal antibody SDOW17 (National Veterinary Services Laboratories, Ames, IA) (Nelson et al., 1993) and an Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, USA). The plates were then incubated with DAPI (2,4-diamidino-2-phenylindole) (Sigma, USA) for 15 min at 37°C. IFA was observed and analysed in an Olympus IX81 Epifluorescence microscopy.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

Since the first episode of PRRSV emergence in the late 1980s, this persistent pathogen remains the most economically devastating disease of swine and has continued to frustrate efforts to eliminate infection of herds (Kappes & Faaberg, 2015).

Thus, control of PRRS is a complex issue and involves a combination of measures including monitoring, diagnosis, biosecurity, herd management and immunization (Pileri & Mateu, 2016).

In Uruguay, PRRSV had never been reported and no vaccination programme has ever been implemented. The epidemiological scenario of the virus in the region and the completely absence of information in our country since the year 2000 clearly reinforce the importance of updating the investigation about this important emerging pathogen.

Our findings revealed the circulation of PRRSV antibodies among Uruguayan domestic pigs (Table 2), while anti-ADV and anti-CSFV antibodies were not detected in any animal.

Fifty-two of 524 samples tested with CIVTEST suis PRRS A/S resulted seropositive, and PRRSV antibodies were identified in samples from pigs of all studied farms and slaughterhouses (See Figure S1). In addition to these 52 seropositive samples, randomly selected seronegative samples were also tested with PrioCHECK® PRRSV Ab. Overall, 22 of 311 samples presented antibodies against PRRSV while only 12 were seropositive with both ELISA kits.

Further molecular approach for detection of PRRSV was carried out in 86 samples (33 seropositive and 53 seronegative), and PRRSV type 2 RNA was identified by RT-nPCR in 14 samples (six seropositive and eight seronegative). Uruguayan isolates resulted to be identical at the ORF7 level, and a consensus sequence was included in the phylogenetic analysis and tree reconstruction (Figure 1).

TABLE 2 PRRSV seropositive samples using commercial ELISA kits

ELISA commercial kits	CIVTEST suis PRRS A/S No. of seropositive samples (%)	PrioCHECK® PRRSV Ab porcine
Samples 2014–2016	52/524 (9.9%)	22/311 (7.1%)
Samples 2010–2014	13/23 (56.5%)	—

PRRSV, porcine reproductive and respiratory syndrome virus.

These preliminary findings were communicated to Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca, which resulted in the notification to the OIE of PRRSV circulation for the first time in the country on 20 July 2017 (OIE, 2017b).

On the other hand, retrospective analysis showed that 13 of 23 samples (56.5%) had anti-PRRSV antibodies (Table 2). Positive animals came from three different geographical regions (Montevideo, Canelones and Soriano Departments) (See Figure S1). Seven seropositive samples were collected in 2011, two in 2012, two in 2013 and two in 2014. The elevated seropositivity observed among these samples, compared to the rest of the specimens collected for this study, is noteworthy. However, the samples included in the retrospective analysis mostly came from ill animals with PCV2-associated symptoms (Ramos et al., 2017). It remains unclear whether the observed clinical signs could have been also associated with an active PRRSV infection. Additionally, four of these seropositive samples (collected between October 2013 and March 2014) were also tested by RT-nPCR, and PRRSV type 2 RNA was detected in all of them. Sequences obtained were identical to the strains isolated from the samples collected in the period 2014-2016, which is not surprising since the ORF7, chosen for molecular detection, is a conserved region of the viral genome (Music & Gagnon, 2010).

For viral isolation, 15 RT-nPCR PRRSV-positive samples were selected and infection was identified by CPE, characterized by cell rounding and foci formation in cell monolayers. CPE was observed after the inoculation of six different serum samples collected in 2013, 2014 and 2016. PRRSV infection was confirmed by IFA (Figure 2).

Globalization, in terms of rapid and free movements of people, animals and food, has increased the risk of emerging pathogens outbreaks (Cortey, Pileri, Segalés, & Kekarainen, 2012). In fact, most PRRSV type 2 isolates from South America and Asia were introduced through the movement of porcine livestock or semen trade (OIE, 2015). Indeed, these routes of entry might be likely involved in the PRRSV outbreak in Chile in 2013 (Neira et al., 2017) and may also be responsible for the introduction of the virus into Uruguay. Since 2007, Uruguay has imported animals or semen from Brazil, Spain and the Netherlands. Precisely, PRRSV type 2 has been identified in these countries, except Brazil, where the disease has never been reported (OIE, World Organization of Animal Health, 2017a). On the other hand, Argentina, which shares geographical borders with Uruguay and Brazil, has also declared a disease-free status (OIE, World Organization of Animal Health, 2017a). Therefore, these data suggest that the PRRSV introduction into Uruguay could be more likely due to the international trade than to transboundary transmission events and subsequent dispersion. A detailed molecular characterization of the strains and the continuous surveillance of the circulating virus are further needed to better understand the epidemiological scenario of PRRSV infection in Uruguay.

Results presented here represent the first report of PRRSV type 2 (North American type) circulation in Uruguay that also evidences a

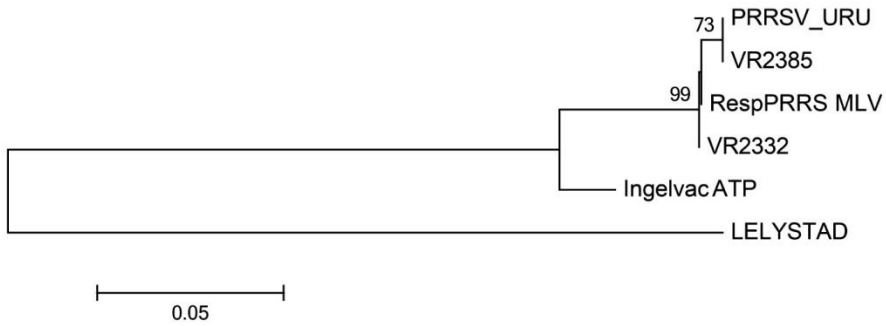


FIGURE 1 Phylogenetic tree constructed by the neighbour-joining method based on a 209-nt sequence of the ORF7 region. A PRRSV strain isolated in this study is shown as an example, and their GenBank accession number is MG207683. Reference strains were included for comparison: European PRRSV strain (Lelystad; M96262) and North American PRRSV strains (VR2332, Ingelvac ATP, RespPRRS MLV and VR2385; EF536003, DQ988080, AF066183 and JX044140, respectively). PRRSV, porcine reproductive and respiratory syndrome virus

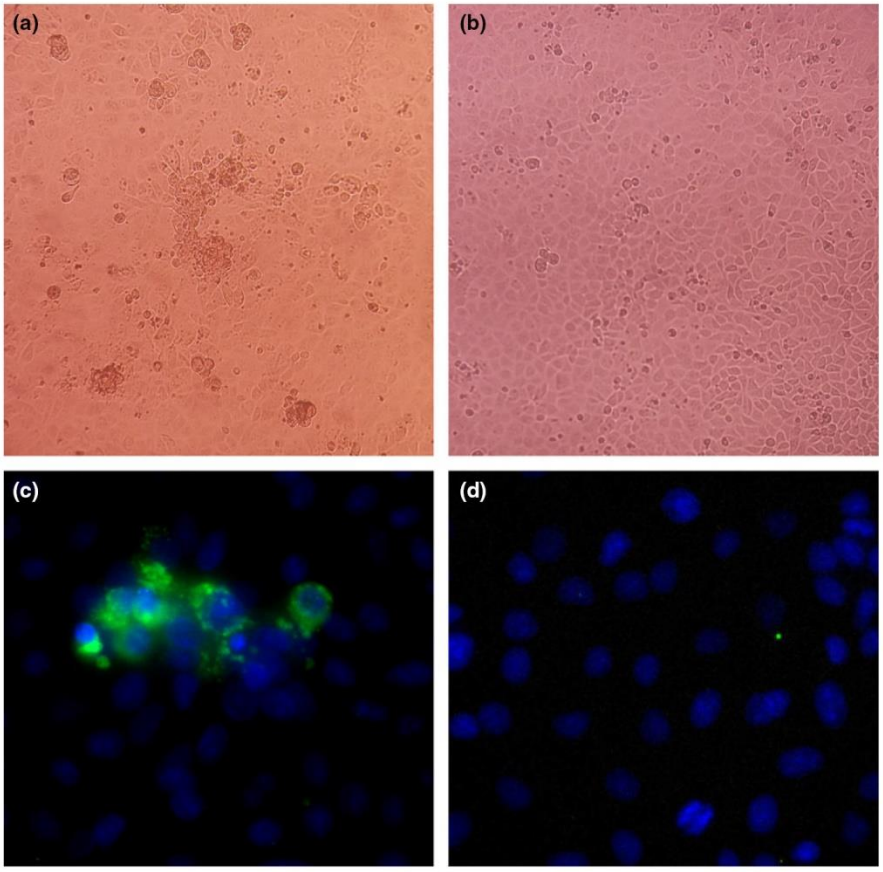


FIGURE 2 PRRSV isolation in MARC-145 cells. Monolayers were infected with selected serum samples, and 72 hr post-infection, a CPE consisting in cells rounding was observed (a). An uninoculated negative control is also shown (b). PRRSV was identified in infected cells by IFA using an antibody against the nucleoprotein ORF7 (c). A negative IFA control is shown in (d). (a) and (b), Original magnification 10X; (c) and (d), 20X. PRRSV, porcine reproductive and respiratory syndrome virus

widespread geographic distribution of the virus. Additionally, the findings suggest that pig population in our country has been exposed to the virus at least since 2011.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors would like to thank Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria-Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (INIA-FPTA 321, J. Arbiza) for financial support. Authors are grateful to Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Agencia Nacional de Innovación e Investigación (ANII) and Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC).

CONFLICT OF INTEREST

None.

ORCID

N. Ramos http://orcid.org/0000-0003-1355-9463

REFERENCES

Blome, S., Staubach, C., Henke, J., Carlson, J., & Beer, M. (2017). Classical swine fever-an updated review. *Viruses*, *9*, 86. https://doi.org/10.3390/v9040086

Cortey, M., Pileri, E., Segalés, J., & Kekarainen, T. (2012). Globalisation and global trade influence molecular viral population genetics of Torque Teno Sus Viruses 1 and 2 in pigs. *Veterinary Microbiology*, *156*, 81–87. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.10.026

Kappes, M. A., & Faaberg, K. S. (2015). PRRSV structure, replication and recombination: Origin of phenotype and genotype diversity. *Virology*, *479–480*, 475–486. https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.012

Kim, H. S., Kwang, J., Yoon, I. J., Joo, H. S., & Frey, M. L. (1993). Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Archives of Virology*, *133*, 477–483. https://doi.org/10.1007/BF01313785

Meng, X. J. (2012). Emerging and re-emerging swine viruses. *Transboundary and Emerging Diseases*, *59*, 85–102. https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01291.x

Mengeling, W. L., Lager, K. M., & Vorwald, A. C. (1996). Alveolar macrophages as a diagnostic sample for detecting natural infection of pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *8*, 238–240. https://doi.org/10.1177/104063879600800215

Music, N., & Gagnon, C. A. (2010). The role of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus structural and non-structural proteins in virus pathogenesis. *Animal Health Research Reviews*, *11*, 135–163. https://doi.org/10.1017/S1466252310000034

Neira, V., Brito, B., Mena, J., Culhane, M., Apel, M. I., Max, V., . . . Ortega, R. (2017). Epidemiological investigations of the introduction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Chile, 2013-2015. *PLoS ONE*, *12*, e0181569. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181569

Nelson, E. A., Christopher-Hennings, J., Drew, T., Wensvoort, G., Collins, J. E., & Benfield, D. A. (1993). Differentiation of U.S. and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, *31*, 3184–3189.

OIE, World Organization of Animal Health. (2015). Porcine respiratory and reproductive syndrome, Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2017. Retrieved from http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.08.06_PRRS.pdf

OIE, World Organization of Animal Health. (2017a). World Animal Health Information Database (WAHIS) Interface. Retrieved from http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statuslist

OIE, World Organization of Animal Health. (2017b). World Animal Health Information Database (WAHIS) Interface. Retrieved from: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/WI

Pileri, E., & Mateu, E. (2016). Review on the transmission porcine reproductive and respiratory syndrome virus between pigs and farms and impact on vaccination. *Veterinary Research*, *47*, 108. https://doi.org/10.1186/s13567-016-0391-4

Ramos, N., Porley, D., Mirazo, S., Castro, G., Cabrera, K., Lozano, A., & Arbiza, J. (2017). Molecular study of Porcine Circovirus type 2 in wild boars and domestic pigs in Uruguay from 2010 to 2014: Predominance of recombinant circulating strains. *Gene*, *637*, 230–238. https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.09.058

Shin, J., Torrison, J., Choi, C. S., Gonzalez, S. M., Crabo, B. G., & Molitor, T. W. (1997). Monitoring of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in boars. *Veterinary Microbiology*, *55*, 337–346. https://doi.org/10.1016/S0378-1135(96)01336-3

Woźniakowski, G., & Samorek-Salamonowicz, E. (2015). Animal herpesviruses and their zoonotic potential for cross-species infection. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, *22*, 191–194. https://doi.org/10.5604/12321966.1152063

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Ramos N, Mirazo S, Castro G, Cabrera K, Osorio F, Arbiza J. First-time detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in Uruguay. *Transbound Emerg Dis*, 2018;00:1–5. https://doi.org/10.1111/tbed.12813

Supporting information

Map of Uruguay. Sampled Departments were identified with stars. Seropositive samples were detected in all Departments analyzed.



Tabla 6.3.1 complementaria. Muestras seropositivas para PRRSV confirmadas por ambos kits

Nº de muestra	Nº de colecta	CIVTEST SUIS PRRS A/S (IRPC) *cut off* 20	PrioCHECK® PRRSV Ab porcine (PP) *cut off* 30
13	1	+(29)	+(45)
19	1	+(38)	+(108)
32	1	+(23)	+(35)
33	1	+(38)	+(132)
16	2	+(169)	+(79)
4	3	+(27)	+(75)
1	6	+(130)	+(69)
22	6	+(267)	+(43)
34	6	+(178)	+(82)
40	6	+(250)	+(123)
42	6	+(61)	+(44)
36	7	+(29)	+(36)

PP, porcentaje de positividad; IRPC, índice relativo x100

Tabla 6.3. 2 complementaria. Muestras de archivo seropositivas para PRRSV

Muestra (categoría)	Criadero (Departamento y año)	Sintomatología	PCV2	CIVTEST SUIS PRRS A/S (IRPC) *cut off* 20
1 (Madre)	A (Montevideo, Marzo 2011)	Aborto	+	+(225)
2 (Madre)	B (Soriano, Junio 2011)	Criadero con problemas reproductivos	-	+(44)
3 (Madre)	B (Soriano, Junio 2011)		-	+(24)
4 (Madre)	B (Soriano, Junio 2011)		-	+(34)
5 (Madre)	B (Soriano, Junio 2011)		-	+(57)
6 (Madre)	C (Canelones, Agosto 2011)	Sin sintomatología	-	+(68)
7 (Madre)	C (Canelones, Agosto 2011)		-	+(69)
8 (Padrillo)	D (Canelones, Febrero 2012)	Papilomas en escroto	-	+(127)
9 (Madre)	C (Canelones, Octubre 2012)	Criadero con problemas reproductivos	-	+(337)
10 (Lechón)	E (Canelones, Octubre 2013)	Desmedro y problemas respiratorios	+	+(163)
11 (Madre)	F (Canelones, Octubre 2013)	Sin sintomatología	+	+(59)
12 (Lechón)	G (Canelones, Febrero 2014)	Desmedro	+	+(104)
13 (Madre)	H (Canelones, Marzo 2014)	Criadero con problemas sanitarios. Mortalidad de lechones	-	+(181)

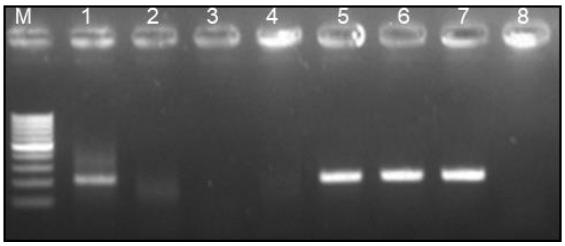


Figura 6.3.1 complementaria. Detección de ARN de PRRSV por RT-Nested PCR. Corrida electroforética en gel de agarosa 1.5%, en donde se observa la amplificación de 209 pb en muestras seropositivas o seronegativas (carriles 1, 5-7). En los carriles 2-4 se observan muestras negativas por RT-Nested PCR. Carril 8: Control negativo. M: Marcador de peso molecular de 100pb (Thermo Fisher, Scientific, EE.UU).

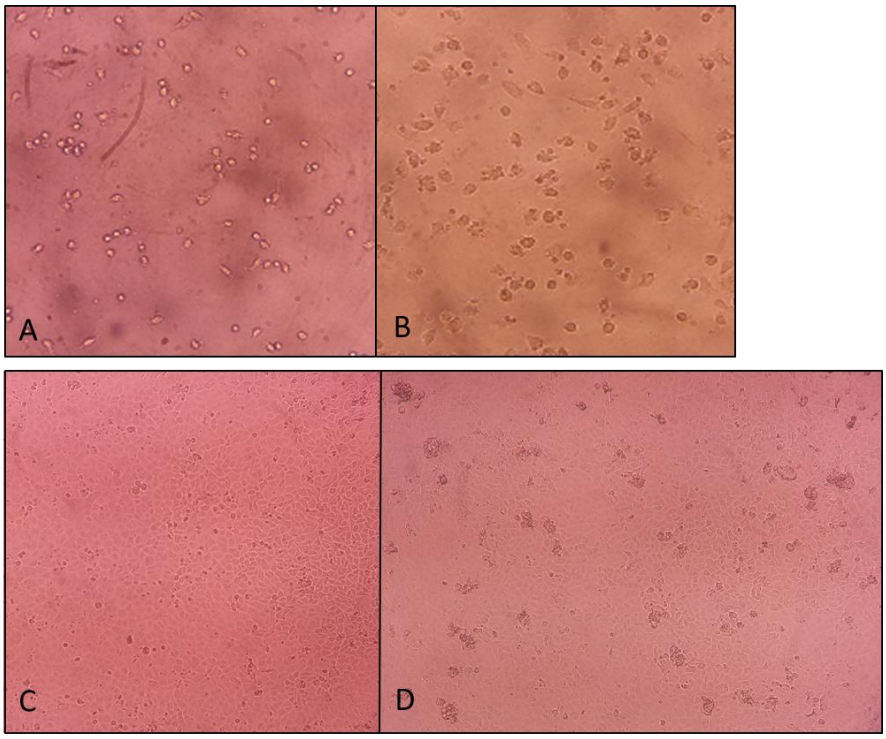


Figura 6.3.2 complementaria. Aislamiento en cultivos celulares de una cepa de campo de PRRSV. A) Cultivo de PAMs sin infectar. B) Cultivo de PAMs luego de 4 días post-infección con una muestra positiva por RT-Nested PCR. Se muestra un caso en donde se observó un cambio en la morfología de las células. No en todos los casos se evidenció este cambio en la morfología. C) Cultivo de MARC-145 sin infectar. D) Efecto citopático característico de PRRSV en células MARC-145. Se observan agrupamientos de células redondeadas por encima de la monocapa. Magnificación original 10X.

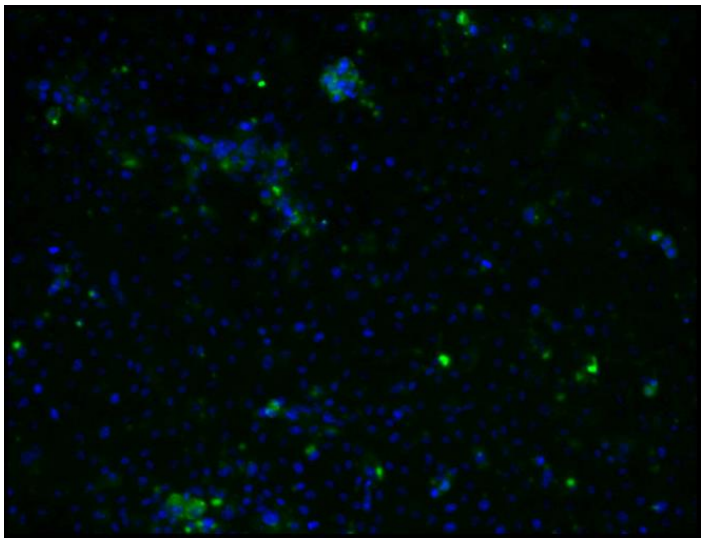


Figura 6.3.3 complementaria. IFA con un anticuerpo contra la proteína N de PRRSV. Se muestra los resultados de la IFA que confirman el aislamiento de una cepa de PRRSV identificada en Uruguay. Se observa como la proteína N (en verde) se localiza principalmente en los agrupamientos celulares observados en el microscopio de campo claro. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Magnificación original 10X.

6.4. Anexo. Evidencia serológica de SIV en cerdos del Uruguay

Otro resultado interesante obtenido en el marco del proyecto INIA-FPTA, fue la detección, por primera vez en el país, de anticuerpos contra SIV en 26 muestras de las 524 analizadas (5%). Las muestras positivas se encontraron distribuidas en las colectas 2, 5 y 6, observándose un mayor número, en la colecta 5 (22) (Tabla 6.4.1). Justamente, esta última fue realizada en el mes de mayo y se podría especular, que el alto porcentaje de muestras seropositivas en esta granja (48%) se debe a un efecto de la estacionalidad de la circulación de SIV. Sin embargo, si bien se ha identificado estacionalidad en la enfermedad producida por este virus, no se ha evidenciado un efecto de la estacionalidad en la circulación de anticuerpos contra SIV en las granjas de cerdos (Kyriakis et al., 2013; Poljak et al., 2014). Por lo tanto, probablemente los resultados obtenidos indican una alta circulación de anticuerpos contra el virus para esta granja en particular.

Para la detección de anticuerpos fue utilizado el kit de ELISA indirecto comercial CIVTEST SUIS INFLUENZA (Hipra, España), el cual está basado en una cepa de H1N1 que tiene reacción cruzada con las cepas H3N2 y H1N2. En cuanto al contexto regional, si bien los datos son escasos, relevamientos serológicos han revelado que los subtipos H3N2 y H1N1 se encuentran en circulación en Colombia, Brasil y Argentina (Piñeyro et al., 2010; Ramirez-Nieto et al., 2012; Rajão et al., 2013). En Argentina, se ha observado con ensayos de ELISA comerciales una seroprevalencia de 2.3 a 6.9% para H1N1 y de 9.7 a 48% para H3N2 (Piñeyro et al., 2010). Por otro lado, en Colombia se han observado seroprevalencias similares, de 0.4 a 6.5% para H1N1 y de 10 a 41% para H3N2 (Ramirez-Nieto et al., 2012). En Brasil, en cambio, ensayos de inhibición de la hemaglutinación han revelado mayores seroprevalencias para H1N1 (44.5%) que para H3N2 (10%) (Rajao et al., 2013). Si bien en este trabajo no se realizó un estudio de prevalencia en una muestra representativa, fueron identificados anticuerpos en el 5% de las muestras analizadas, lo cual se encuentra dentro del rango previamente identificado en otros países Sudamericanos. Sin embargo, el kit de ELISA utilizado no permite discriminar los subtipos circulantes. Otros estudios son necesarios para profundizar en la investigación en Uruguay de esta virosis re-emergente en cerdos, que a raíz de la pandemia del año 2009, ha recobrado mayor interés debido a su implicancia zoonótica e impacto en la salud pública humana.

Tabla 6.4.1. Muestras seropositivas para SIV

Nº de muestra	Nº de colecta	CIVTEST SUIS INFLUENZA, Hipra (IRPC) *cut off* 20
27	2	+(60)
43	2	+(21)
53	2	+(32)
2	5	+(22)
4	5	+(56)
6	5	+(41)
8	5	+(56)
10	5	+(26)
13	5	+(63)
19	5	+(63)
23	5	+(28)
24	5	+(38)
27	5	+(21)
28	5	+(67)
29	5	+(73)
32	5	+(76)
33	5	+(51)
34	5	+(84)
35	5	+(36)
36	5	+(24)
38	5	+(68)
39	5	+(21)
41	5	+(49)
42	5	+(73)
46	5	+(29)
41	6	+(21)

7. Conclusiones y perspectivas

En términos generales, esta tesis permitió conocer la presencia y amplia distribución de tres virus emergentes en cerdos del Uruguay: PCV2, TTSuV y PRRSV. Previo a esta investigación, el estatus sanitario de los cerdos del país en relación a la circulación de virus era completamente desconocido. Si bien en Uruguay se ha observado un gran aumento de la demanda de carne de cerdo y sus productos derivados, en los últimos años, se ha identificado una caída de la producción local de carne porcina. Por lo tanto, el crecimiento del consumo interno se sustenta principalmente de la importación desde otros países con una industria porcina desarrollada. Esta situación exige la existencia de un adecuado sistema de control y manejo sanitario que fomente la producción nacional. En este sentido, el estudio de las enfermedades virales que afectan a los cerdos es de gran importancia, ya que muchas veces son la causa encubierta de graves pérdidas en la producción. Justamente, la optimización y aplicación en esta tesis de una batería de metodologías adaptadas a estos virus, sirven como base para su futuro monitoreo y vigilancia en el país. Incluso, estas técnicas podrían ser transferidas con el fin de contribuir a un seguimiento rutinario y por lo tanto, a una mejora sanitaria que permita al menos en parte, potenciar al sector porcino en Uruguay. Por otro lado, la comercialización globalizada de animales y semen en la actualidad, significa un gran riesgo para la transmisión de enfermedades entre países, por lo que debería existir un control integral basado no solo en el monitoreo continuo del estatus sanitario de los cerdos, sino que también, en la selección criteriosa de reproductores y en el cuidado del ingreso de animales, personas y vehículos a los establecimientos.

Asimismo, la información generada en esta tesis permitió estar a la vanguardia del estudio de enfermedades emergentes porcinas importantes a nivel mundial, y contribuyó al desarrollo de estrategias de prevención y tratamiento, como ser el inicio de la vacunación contra PCV2 en Uruguay. En el caso de PRRSV, el conocimiento generado significó su notificación ante la OIE y un impacto muy importante a nivel regional. Si bien los países limítrofes no han reportado su presencia, el contexto Sudamericano en cuanto a la infección por este virus es crítico, siendo ya varios los países en los que se ha reportado su circulación: Chile, Perú, Venezuela, Bolivia, Colombia y en el año 2017, Ecuador. Es probable, que debido al previo desconocimiento de la presencia de este virus en Uruguay, la observación de problemas sanitarios basados en fallas

reproductivas o enfermedades respiratorias, no eran relacionados directamente con PRRSV. De hecho, en el inicio de esta investigación fueron asociados únicamente a PCV2. Sin embargo, los resultados obtenidos posteriormente, sugieren que ambos virus emergentes co-circulan en el país desde hace ya algunos años, y que debido al carácter multi-factorial de las enfermedades que estos producen, su diagnóstico es muy complejo. Se requiere de un enfoque multidisciplinario que comprenda el monitoreo del agente viral, el diagnóstico histopatológico correspondiente y la observación de sintomatología sospechosa. Se espera que a raíz del hallazgo de la infección con PRRSV y PCV2 en cerdos del Uruguay, motive un cambio de percepción ante la presentación de síntomas compatibles con PRRS o con PCV2-SD y se comience a realizar la vigilancia diagnóstica de ambos virus, la cual es un pilar fundamental para el control de estas enfermedades. A su vez, se considera imprescindible la concientización sobre las normas de bioseguridad y buenas prácticas de inmunización.

Paralelamente, la identificación de PCV2 y TTSuV en poblaciones de jabalí sugiere a estos animales salvajes como potenciales reservorios de estas infecciones para el cerdo doméstico. Debido a que en Uruguay la cruza o el contacto entre el cerdo doméstico y el jabalí son frecuentes, se plantea como perspectiva analizar también la presencia de PRRSV en la población salvaje con el objetivo de evaluar el riesgo de dispersión de la enfermedad tanto dentro del país como hacia los países fronterizos.

En cuanto al estudio de la caracterización molecular de PCV2 en Uruguay, se concluye que el escenario epidemiológico observado en el país en los años de estudio reflejó la dinámica poblacional del virus a nivel internacional. Concretamente, esto se refiere a un primer cambio a la circulación mayoritaria de PCV2b y posteriormente, un evento de reemplazo de esta última por la circulación predominante de PCV2d. En particular en Uruguay, la cepa mayoritaria en un inicio no era PCV2b, sino una cepa recombinante PCV2a/PCV2b. Sin embargo, debido a que esta cepa prácticamente resultó ser una “quimera” con un gen *rep* del genotipo PCV2a y un gen *cap* del genotipo PCV2b, las características antigénicas principales de las cepas recombinantes eran similares a cepas PCV2b. Cabe destacar, que es la primera vez que se reporta la circulación predominante de una cepa recombinante de PCV2 en un país, la cual circuló prolongadamente en el tiempo y a su vez, se distribuyó ampliamente en todo el Uruguay. Asimismo, es importante mencionar que en el trascurso de la ejecución de esta tesis

las bases de la clasificación genética de PCV2 han sido cambiantes e incluso, han surgido nuevos genotipos del virus. La investigación aquí realizada logró acompañar estos cambios y aportar evidencia a favor de la circulación globalizada de nuevas variantes como PCV2d. Evidentemente, la gran heterogeneidad de cepas de PCV2 observada en Uruguay apunta no solo a la rápida evolución de estos virus, sino que también a la importancia del comercio internacional como fuente de transmisión de PCV2. Probablemente, la co-existencia de diferentes genotipos y variantes refleje la existencia de diferentes orígenes de infección para el país. Si bien también fue observada una gran heterogeneidad genética de cepas de TTSuV en cerdos del Uruguay, aparentemente el caso de PRRSV es diferente. Aunque se analizó únicamente una región del genoma muy conservada y pequeña, no se observaron diferencias entre las cepas detectadas, por lo que probablemente, a diferencia de PCV2 y TTSuV, la fuente de infección de PRRSV podría estar más limitada a una sola región o país. De todas maneras, la caracterización genética de las cepas circulantes de PRRSV en Uruguay es fundamental para sacar conclusiones sobre posibles orígenes de infección. De hecho, esta es una de las perspectivas más importantes e inmediatas de esta tesis, por lo que se comenzará con el estudio de la epidemiología molecular de PRRSV en el contexto de un proyecto financiado también por INIA-FPTA.

Debido a que se ha propuesto que la estructura genética de las poblaciones de TTSuV posiblemente refleje el movimiento de animales entre países, los resultados de esta tesis sobre el patrón epidemiológico de TTSuV en Uruguay nos indican distribuciones similares a países de América del Sur, América del Norte y Europa, por lo que se podría especular que las posibles fuentes de infección de virus porcinos en nuestro país provienen de estas regiones. Justamente, son varios los países de estas regiones que han sido en los últimos años el origen de las importaciones de carne, animales en pie y/o semen para el Uruguay.

Por otro lado, debido a la idea creciente de que la emergencia de nuevas cepas de PCV2 es provocada por la rápida evolución del virus tras el incremento de la presión selectiva ejercida por las vacunas comerciales, es que no solo es importante el diagnóstico virológico, sino que también, es indispensable el continuo monitoreo y control de la epidemiología de PCV2. Conocer las cepas circulantes es fundamental para poder actuar rápidamente en respuesta a la aparición de posibles mutantes que escapan de la vacuna. Se cree que la capacidad evolutiva

del virus ha permitido cambios constantes y sustanciales sobre todo a nivel de la cápside, pudiendo escapar al reconocimiento inmunológico suministrado por la vacunación, lo que se traduce en fluctuaciones del predomino de genotipos de PCV2. Aparentemente, si bien se considera que cada cambio importante en la dinámica poblacional de PCV2 estuvo acompañado de un aumento en la severidad de las PCVAD, no existen evidencias consistentes sobre cambios en la virulencia entre distintos genotipos o mutantes del virus. En el caso de PCV2d, se sugiere que ha emergido en casos de fallo en la vacunación y se han observado cambios importantes a nivel de la cápside que se cree, le han permitido evadir la respuesta humoral del hospedero. A su vez, existen posiciones contradictorias sobre si esta cepa mutante es más virulenta que las cepas clásicas. Con el fin de conocer diferencias biológicas entre estas cepas, se estudió la proteína *ORF3* que se considera que puede estar implicada en la patogénesis de PCV2. A pesar de los cambios sustanciales observados a nivel de esta proteína en una cepa PCV2d en comparación a cepas PCV2a y PCV2b, en este trabajo no se evidenciaron diferencias significativas en la localización y función apoptótica *in vitro* de ORF3 de las diferentes cepas. Estos resultados permiten especular con la idea de que la gran variabilidad del virus, inducida posiblemente por la presión selectiva de la vacunación, no necesariamente significa un cambio, al menos *in vitro*, en la funcionalidad de la proteína potencialmente asociada a la virulencia. En esta tesis fue estudiada la función principal conocida hasta el momento para *ORF3*, la inducción de la apoptosis. Sin embargo, el rol de esta proteína u otras posibles funciones de la misma deberían ser más extensamente investigados para una mejor comprensión de la biología de PCV2. Asimismo, sería interesante realizar más estudios *in vivo* que permitan evaluar realmente si existen diferencias en la patogenicidad entre los diferentes genotipos virales.

Paralelamente, tanto la capacidad evolutiva de PCV2 como el hecho de que ninguna de las vacunas actuales produce una inmunidad esterilizante, justifican también una mayor experimentación a largo plazo sobre la actualización de vacunas en cuanto a sus características de protección y a la inclusión de múltiples genotipos en la formulación vacunal. De hecho, en esta tesis se realizó un trabajo preliminar sobre la expresión de un fragmento de la cápside de PCV2 en un sistema de presentación de antígenos basado en las propiedades de auto-brotación de la proteína Z de JUNV. Como perspectiva se plantea realizar la inmunización

en ratones con VLPs que contienen el antígeno del virus y evaluar la posibilidad de utilizar este sistema como plataforma para el desarrollo de una vacuna contra PCV2. Asimismo, en relación a este tema, durante la ejecución de esta tesis también se han realizado asesoramientos a empresas interesadas en el desarrollo de vacunas contra PCV2, lo que demuestra que la elaboración de nuevas vacunas para este virus es un campo de interés creciente.

Por otro lado, si bien fue optimizado el aislamiento en cultivos celulares para cepas de campo de PRRSV, lo cual permitió evidenciar fehacientemente la infección de este importante virus emergente en Uruguay, en el caso de PCV2, no se logró optimizar un sistema eficiente de crecimiento *in vitro*. De todas formas, es conocida la dificultad del aislamiento de cepas de campo de PCV2 y más aún, en casos donde la carga viral no es muy elevada. Con el fin de solucionar este problema, en esta tesis fue abordada la construcción de un potencial clon infeccioso de una cepa recombinante de PCV2 y como perspectiva se plantea evaluar esta estrategia como posible alternativa al aislamiento viral. Otras posibles soluciones son: una mayor cantidad de pasajes en ciego, inóculos derivados de muestras de animales con diagnóstico de PCV2-SD severa y/o la obtención de una línea celular PK-15 altamente permisiva. A su vez, debido a que es un virus que no produce efecto citopático, otras técnicas son estrictamente necesarias para monitorear su replicación y/o expresión de proteínas. Debido a que la disponibilidad de anticuerpos comerciales contra PCV2 es escasa, y los existentes son únicamente policlonales y no comúnmente utilizados para técnicas como IFA y western blot, el desarrollo de anticuerpos monoclonales contra el PCV2 sería de gran utilidad como herramienta en diferentes estudios de biología básica del virus. En definitiva, la dificultad de un sistema práctico de aislamiento viral para PCV2 conduce a un desconocimiento constante del impacto biológico de la circulación de cepas recombinantes y/o mutantes, e incluso de aspectos básicos de su ciclo replicativo. En el caso de TTSuV, la situación es aún más compleja ya que directamente no se conoce un sistema de aislamiento viral *in vitro*, por lo que la información actual sobre la biología del virus es realmente limitada y los pocos estudios existentes se basan fundamentalmente en clones infecciosos o modelos *in vivo*. Justamente, en este trabajo el genoma completo de una cepa de TTSuVk2a fue clonado en un vector a partir de un sitio de restricción incluido como sitio único en la secuencia y al igual que para PCV2, se plantea como perspectiva evaluar si este sistema puede utilizarse efectivamente

como clon infeccioso. Esto posibilitará el comienzo de una nueva línea de investigación más básica de este virus en el laboratorio.

Si bien PRRSV y PCV2 son ejemplos claros de virus emergentes de gran importancia económica en la industria porcina a nivel mundial, el impacto en la salud animal y en el sector productivo en el caso de TTSuV, no es tan evidente. De hecho, si bien estos virus han sido asociados a PCV2 y al desarrollo de las PCVAD, existen reportes contradictorios sobre el análisis del rol de los TTSuVs como desencadenantes de enfermedades del cerdo. En particular, en este trabajo se observó una alta frecuencia de infección de estos virus en los cerdos del país y no se evidenció ninguna correlación significativa entre las frecuencias de infección o las cargas virales de TTSuVs y la infección con PCV2, la edad o estado de salud de los animales. De todas maneras, más estudios sobre todo en modelos *in vivo* deberían realizarse para evaluar efectivamente si estos virus pueden ser potenciadores de enfermedades asociadas a PCV2 o a otros virus porcinos, y significar un riesgo real para la producción. Debido a que también hemos iniciado el estudio de TTV en humanos, como perspectiva se plantea continuar con esta investigación, sobre todo evaluar la infección de TTVh en donantes de sangre. A su vez, debido a que recientemente se ha propuesto que tal vez los TTV no son especie-específicos, sería muy interesante, evaluar la presencia y frecuencias de detección de TTSuV y TTVh, en muestras humanas y de cerdos, respectivamente. Este nuevo aspecto de los TTV, sumado a su gran ubicuidad en el ambiente y la persistencia en la infección sugieren cada vez más que su importancia puede no estar relacionada al desarrollo o favorecimiento de una patología en particular, sino que se plantea la posibilidad de su rol como componentes del “viroma” del hospedero y por tanto, su utilidad como marcadores de polución antrópica o animal, marcadores del estatus inmunológico del hospedero e incluso como modelo para evaluar la dinámica y el efecto del comercio internacional de animales en la heterogeneidad viral. Se desconocen las verdaderas implicancias del “viroma”, pero se cree que puede tener un papel importante tanto en el mantenimiento de la salud como la enfermedad. De hecho, se ha observado que el organismo humano tiene una alta diversidad viral incluso bajo condiciones no patológicas, siendo los anellovirus y los bacteriófagos los virus más frecuentemente detectados (Kourí, 2018). Este es

un campo de la virología muy reciente e incluso se están impulsando proyectos globales del conocimiento del viroma (Carroll et al., 2018).

Por último, se destaca el vínculo estrecho generado con veterinarios especializados del área suinos y la creación de un grupo porcino con integrantes de la Facultad de Veterinaria, Agronomía y Ciencias. Asimismo, la información obtenida en este trabajo ha sido divulgada en artículos científicos, seminarios y cursos en Facultad de Ciencias y Facultad de Veterinaria. Paralelamente, la ejecución de esta tesis permitió la vinculación con investigadores regionales (Chile y Brasil) tanto en el marco de publicación de artículos científicos como de pasantías. Otro de los aspectos importantes del desarrollo de esta línea de investigación es también la formación de recursos humanos. La actualización de la situación de virosis emergentes porcinas en Uruguay continúa siendo un propósito vigente y es por ello que se han comenzado a estudiar otros virus recientemente descubiertos a nivel mundial como el PCV3.

En definitiva, es necesario que productores, veterinarios, científicos y políticos trabajen en conjunto para prevenir y controlar las enfermedades virales emergentes porcinas, y la aplicación del nuevo concepto “un mundo, una salud” es fundamental para mejorar la producción porcina nacional.

8. Referencias

Abrahante JE, Martins K, Papas KK, Hering BJ, Schuurman HJ, Murtaugh MP. (2011). Microbiological safety of porcine islets: comparison with source pig. Xenotransplantation. 18, 88-93.

Allan G y Ellis J. (2000). Porcine circoviruses: A review. J Vet Diagn Invest. 12, 3-14.

Allan GM, McNeilly F, Kennedy S, Meehan B, Ellis J, Krakowka S. (2000). Immunostimulation, PCV-2 and PMWS. Vet Rec. 147, 170-171.

Allan G, Phenix K, Todd D, McNulty M. (1994). Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. Zentralbl Veterinarmed B. 41, 17-26.

Allende R, Laegreid WW, Kutish GF, Galeota JA, Wills RW, Osorio FA. (2000). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in individual pigs upon experimental infection. J Virol. 74, 10834-10837.

Amosin A, Kedkovis R, Puranaveja S, Wongyanin P, Suradhat S, Thanawongnuwech R. (2009). Comparative analysis of nucleotide sequence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in Thailand (US and EU genotypes). Virol J. 6,143.

Aramouni M, Segalés J, Cortey M, Kekarainen T. (2010). Age-related tissue distribution of swine Torque teno sus virus 1 and 2. Vet Microbiol. 146, 350-353.

Aramouni M, Segalés J, Sibila M, Martin-Valls GE, Nieto D, Kekarainen T. (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. Vet Microbiol. 153, 377-381.

Baltimore D. (1971). Expression of animal virus genomes. Bacteriol Rev. 35, 235-241.

Beach NM y Meng XJ. (2012). Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine Circovirus type 2 (PCV2). Virus Res. 164, 33-42.

Benfield D A, Nelson E, Collins J E, Harris L, Goyal S M, Robison D, Christianson W T, Morrison R B, Gorcyca D and Chladek D. (1992). Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). J Vet Diagn Invest. 4, 127-133.

Bernardin F, Operskalski E, Busch M, Delwart E. (2010). Transfusion transmission of highly prevalent commensal human viruses. Transfusion. 50, 2474-2483.

Biagini P. (2009). Classification of TTV and related viruses (anelloviruses). Curr Top Microbiol Immunol. 331, 21-33.

Biagini P, Charrel RN, de Micco P, de Lamballerie X. (2003). Association of TT virus primary infection with rhinitis in a newborn. Clin Infect Dis. 36, 128-129.

Biernacka K, Podgórska K, Tyszka A, Stadejek T. (2018). Comparison of six commercial ELISAs for the detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in field serum samples. Res Vet Sci. 121, 40-45.

Bigarré 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

Blois S, Mallus F, Liciardi M, Pilo C, Camboni T, Macera L, Maggi F, Manzin A. (2014). High prevalence of co-infection with multiple Torque teno sus virus species in Italian pig herds. PLoS One. 9, e113720.

Blomström AL. (2011). Viral metagenomics as an emerging and powerful tool in veterinary medicine. Vet Q. 31, 107-114.

Borio CS, Bilen MF, Argüelles MH, Goñi SE, Iserte JA, Glikmann G, Lozano ME. (2012). Antigen vehiculization particles based on the Z protein of Junin virus. BMC Biotechnol. 12, 80.

Brockmeier SL, Halbur PG, Thacker EL. (2002). Porcine respiratory disease complex. In Polymicrobial Diseases, ed. KA Brogden, JM Guthmiller, pp. 231–58. Washington, DC: ASM Press.

Brockmeier SL, Palmer MV, Bolin SR. (2000). Effects of intranasal inoculation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Bordetella bronchiseptica, or a combination of both organisms in pigs. Am J Vet Res. 61, 892-899.

Brown E, Lawson S, Welbon C, Gnanandarajah J, Li J, Murtaugh MP, Nelson EA, Molina RM, Zimmerman JJ, Rowland RR, Fang Y. (2009). Antibody response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) nonstructural proteins and implications for diagnostic detection and differentiation of PRRSV types I and II. Clin Vaccine Immunol. 16, 628-635.

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

Cai L, Han X, Ni J, Yu X, Zhou Z, Zhai X, Chen X, Tian K. (2011). Natural recombinants derived from different patterns of recombination between two PCV2b parental strains. Virus Res. 158, 281-288.

Cai L, Ni J, Xia Y, Zi Z, Ning K, Qiu P, Li X, Wang B, Liu Q, Hu D, Yu X, Zhou Z, Zhai X, Han X, Tian K. (2012). Identification of an emerging recombinant cluster in porcine circovirus type 2. Virus Res. 165, 95-102.

Carman S, Cai HY, DeLay J, Youssef SA, McEwen BJ, Gagnon CA, Tremblay D, Hazlett M, Lusis P, Fairles J, Alexander HS, van Dreumel T. (2008). The emergence of a new strain of porcine circovirus-2 in Ontario and Quebec swine and its association with severe porcine circovirus associated disease–2004–2006. Can J Vet Res. 72, 259-268.

Carman S, Sanford SE, Dea S. (1995). Assessment of seropositivity to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in swine herds in Ontario--1978 to 1982. Can Vet J. 36, 776-777.

Carroll D, Daszak P, Wolfe ND, Gao GF, Morel CM, Morzaria S, Pablos-Méndez A, Tomori O, Mazet JAK. (2018). The Global Virome Project. Science. 359, 872-874.

Casabona JC, Levingston Macleod JM, Loureiro ME, Gomez GA, Lopez N. (2009). The RING domain and the L79 residue of Z protein are involved in both the rescue of nucleocapsids and the incorporation of glycoproteins into infectious chimeric arenavirus-like particles. J Virol. 83, 7029-7039.

Chae C. (2005). A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. Vet J. 169, 326-336.

Charlton M, Adjei P, Poterucha J, Zein N, Moore B, Therneau T, Krom R, Wiesner R. (1998). TT-virus infection in North American blood donors, patients with fulminant hepatic failure, and cryptogenic cirrhosis. Hepatology. 28, 839-842.

Chen GL, Fu PF, Wang LQ, Li XS, Chen HY. (2014). Immune responses of piglets immunized by a recombinant plasmid containing porcine circovirus type 2 and porcine interleukin-18 genes. Viral Immunol. 27, 521-528.

Chen HCG, Kuo TY, Yang YC, Wu CC, Lai SS. (2013). Highly permissive subcloneof the porcine kidney cell line for porcine circovirus type 2 production. J Virol Methods. 187, 380-383.

Cheung AK. (2003).Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2. Virology. 305, 168-180.

Cheung AK. (2009). Homologous recombination within the capsid gene of porcine circovirus type 2 subgroup viruses via natural co-infection. Arch Virol. 154, 531-534.

Cheung AK. (2012). Porcine circovirus: transcription and DNA replication. Virus Res. 164, 46-53.

Chiarelli-Neto O, Yotoko KS, Vidigal PM, Silva FM, Castro LA, Fietto JL, Silva A Jr, Almeida MR. (2009). Classification and putative origins of Brazilian porcine circovirus 2 inferred through phylogenetic and phylogeographical approaches. Virus Res. 140, 57-63.

Christensen JK, Eugen-Olsen J, SLrensen M, Ullum H, Gjedde SB, Pedersen BK, Nielsen JO, Krogsgaard K. (2000). Prevalence and prognostic significance of infection with TT virus in patients infected with human immunodeficiency virus. J Infect Dis. 181, 1796-1799.

Ciacci-Zanella JRC y Mores N. (2000). Síndrome multisistêmica do definhamento do leitão desmamado (SMDLD) causada por circovírus suíno. In: Congreso Mercosur de Producción Porcina, Buenos Aires.

Ciacci-Zanella JRC, Morés N, Simon NL, et al. (2006). Identificação de Circovirus suíno tipo 2 (PCV2) em estudo retrospectivo em tecidos suínos arquivados desde 1988 no Brasil. Ciência Rural. 36, 1480-1485.

Clark EG. (1996). Pathology of the post-weaning multisystemic wasting syndrome of pigs. Proc West Can Assoc Swine Pract. 1996, 22-25.

Cleaveland S, Laurenson MK, Taylor LH. (2001). Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 356, 991-999.

Collins J E, Benfield D A, Christianson W T, Harris L, et al. (1992). Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the diseases in gnotobiotic pigs. J Vet Diagn Invest. 4, 117-126.

Constans M, Ssemadaali M, Kolyvushko O, Ramamoorthy S. (2015). Antigenic Determinants of Possible Vaccine Escape by Porcine Circovirus Subtype 2b Viruses. Bioinform Biol Insights. 9, 1-12.

Cornelissen-Keijsers V, Jimenez-Melsio A, Sonnemans D, Cortey M, Segales J, van den Born E, Kekarainen T. (2012). Discovery of a novel Torque teno sus virus species: genetic characterization, epidemiological assessment and disease association. J Gen Virol. 93, 2682-2691.

Cortey M, Macera L, Segalés J, Kekarainen T. (2011a). Genetic variability and phylogeny of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) based on complete genomes. Vet. Microbiol. 148, 125-131.

Cortey M, Olvera A, Grau-Roma L, Segales, J. (2011b). Further comments on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and nomenclature. Vet Microbiol. 149, 522-523.

Cortey M, Pileri E, Segalés J, Kekarainen T. (2012). Globalisation and global trade influence molecular viral population genetics of Torque Teno Sus Viruses 1 and 2 in pigs. Vet Microbiol. 156, 81-87.

Cruz TF y Araujo JP Jr. (2014). Cultivation of PCV2 in swine testicle cells using the shell vial technique and monitoring of viral replication by qPCR and RT-qPCR. J Virol Methods. 196, 82-85.

Cságola A, Kecskeméti S, Kardos G, Kiss I, Tuboly T. (2006). Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boar. Arch Virol. 151, 495-507.

D'Arcy N, Cloutman-Green E, Klein N, Spratt DA. (2014). Environmental viral contamination in a pediatric hospital outpatient waiting area: implications for infection control. Am J Infect Control. 42, 856-860.

Darwich L y Mateu E. (2012). Immunology of porcine circovirus type 2 (PCV2). Virus Res. 164, 61-67.

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.

Das PB, Dinh PX, Ansari IH, de Lima M, Osorio FA, Pattnaik AK. (2010). Theminor envelope glycoproteins GP2a and GP4 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus interact with the receptor CD163. J Virol. 84, 1731-1740.

Davies B, Wang X, Dvorak CM, Marthaler D, Murtaugh MP. (2016). Diagnostic phylogenetics reveals a new porcine circovirus 2 cluster. Virus Res. 217, 32-37.

de Arruda Leme R, Alfieri AF, Alfieri AA. (2012). Torque teno sus virus infection in suckling piglets from Brazilian pig herds. Trop Anim Health Prod. 44, 1885-1890.

de Castro AM, Brombila T, Bersano JG, Soares HS, Silva SO, Minervino AH, Ogata RA, Gennari SM, Richtzenhain LJ. (2014). Swine infectious agents in Tayassu pecari and Pecari tajacu tissue samples from Brazil. J Wildl Dis. 50, 205-209.

de Castro AM, Favero CM, Baldin CM, Borba M, de Castro FG Jr, Miyashiro S, de Moura JC, Dias RA, Brandão PE, Richtzenhain LJ. (2012). Preliminary study of Porcine circovirus type 2 and Torque teno sus virus coinfection frequencies in Brazilian pig herds. Can J Vet Res. 76, 174-179.

de Lima M, Pattnaik AK, Flores EF, Osorio FA. (2006). Serologic marker candidates identified among B-cell linear epitopes ofNsp2 and structural proteins of aNorth American strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Virology. 353, 410-421.

de Menezes Cruz AC, Silveira RL, Baez CF, Varella RB, de Castro T. (2016). Clinical aspects and weight gain reduction in swine infected with porcine circovirus type 2 and torque teno sus virus in Brazil. Vet Microbiol. 195, 154-157.

Devalle S y Niel C. (2004). Distribution of TT virus genomic groups 1–5 in Brazilian blood donors, HBV carriers, and HIV-1-infected patients. J Med Virol. 72, 166-173.

Dewey C, Charbonneau G, Carman S, Hamel A, Nayar G, Friendship R, Eernisse K, Swenson S.(2000). Lelystad-like strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) identified in Canadian swine. Can Vet J. 41, 493-494.

Dezen D, Rijsewijk FA, Teixeira TF, Holz CL, Varela AP, Cibulski SP, Gregianini TS, Batista HB, Franco AC, Roehe PM. (2011). Comparative evaluation of a competitive polymerase chain reaction (PCR) and a SYBR Green-based real-time PCR to quantify Porcine circovirus-2 DNA in swine tissue samples. J Vet Diagn Invest. 23,1160-1167.

DIEA, Dirección de Estadísticas Agropecuarias MGAP. (2011). Censo General Agropecuario 2011. Recuperado de: http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/multimedia/censo2011.pdf.

Dokland T. (2010). The structural biology of PRRSV. Virus Res. 154, 86-97.

Duan X, Nauwynck HJ, Pensaert MB. (1997a). Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes/macrophages on their susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Arch Virol. 142, 2483-2497.

Duan, X., Nauwynck, H. J. & Pensaert, M. B. (1997b). Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues of pigs at different time intervals after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Vet Microbiol. 56, 9-19.

Duffy S, Shackelton LA, Holmes EC. (2008). Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. Nat Rev Genet. 9, 267-276.

Duinhof TF, van Schaik G, van Esch EJ, Wellenberg GJ. (2011). Detection of PRRSV circulation in herds without clinical signs of PRRS: comparison of five age groups to assess the preferred age group and sample size. Vet Microbiol. 150, 180-184.

Dupont K, Nielsen EO, Baekbo P, Larsen LE. (2008). Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. Vet Microbiol. 128, 56-64.

Eddicks M, Fux R, Szikora F, Eddicks L, Majzoub-Altweck M, Hermanns W, Sutter G, Palzer A, Banholzer E, Ritzmann M. (2015). Detection of a new cluster of porcine circovirus type 2b strains in domestic pigs in Germany. Vet Microbiol. 176, 337-343.

Edwards S y Sands JJ. (1994). Evidence of circovirus infection in British pigs. Vet Rec. 134, 680-681.

Ellis J, Hassard L, Clark E, Harding J, Allan G, Willson P, Strokappe J, Martin K, McNeilly F, Meehan B, Todd D, Haines D. (1998). Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. Can Vet J. 39, 44-45.

Ellis JA, Allan G, Krakowka S. (2008). Effect of coinfection with genogroup1 porcine Torque teno virus on porcine circovirus type 2- associated postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic pigs. Am J Vet Res. 69, 1608-1614.

Fang Y, Schneider P, Zhang WP, Faaberg KS, Nelson EA, Rowland RR. (2007). Diversity and evolution of a newly emerged North American Type 1 porcine arterivirus: analysis of isolates collected between 1999 and 2004. Arch Virol. 152, 1009-1017.

Faurez F, Dory D, Grasland B, Jestin A. (2009). Replication of porcine circoviruses. Virol J. 6, 60.

Fenaux M, Halbur PG, Haqshenas G, Royer R, Thomas P, Nawagitgul P, Gill M, Toth TE, Meng XJ. (2002). Cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus is infectious when injected directly into the liver and lymph nodes of pigs: characterization of clinical disease, virus distribution, and pathologic lesions. J Virol. 76, 541-551.

Finsterbusch T y Mankertz (2009). A Porcine circoviruses-small but powerful. Virus Res. 143, 177-183.

Firth C, Charleston MA, Duffy S, Shapiro B, Holmes EC. (2009).Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: porcine circovirus 2. J Virol. 83, 12813-12821.

Focosi D, Antonelli G, Pistello M, Maggi F. (2016). Torquetenovirus: the human virome from bench to bedside. Clin Microbiol Infect. 22, 589-593.

Foster AP. (2012). Staphylococcal skin disease in livestock. Vet Dermatol. 23, 342-351.

Franzo G, Cortey M, de Castro AM, Piovezan U, Szabo MP, Drigo M, Segalés J, Richtzenhain LJ. (2015b). Genetic characterisation of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from feral pigs in the Brazilian Pantanal: An opportunity to reconstruct the history of PCV2 evolution. Vet Microbiol. 178, 158-162.

Franzo G, Cortey M, Olvera A, Novosel D, Castro AM, Biagini P, Segalés J, Drigo M. (2015a). Revisiting the taxonomical classification of Porcine Circovirus type 2 (PCV2): still a real challenge. Virol J. 12,131-138.

Franzo G, Tucciarone CM, Cecchinato M, Drigo M. (2016b). Porcine circovirus type 2 (PCV2) evolution before and after the vaccination introduction: A large scale epidemiological study. Sci Rep.6, 39458.

Franzo G, Cortey M, Segalés J, Hughes J, Drigo M. (2016a). Phylodynamic analysis of porcine circovirus type 2 reveals global waves of emerging genotypes and the circulation of recombinant forms. Mol Phylogenet Evol. 100, 269-280.

Franzo G, Legnardi M, Tucciarone CM, Drigo M, Klaumann F, Sohrmann M, Segalés J. (2018). Porcine circovirus type 3: a threat to the pig industry?. Vet Rec 182, 83.

Gagnon C A, Music N, Fontaine G, Tremblay D, Harel J. (2010). Emergence of a new type of porcine circovirus in swine (PCV): A type 1 and type 2 PCV recombinant. Vet Microbiol. 144, 18-23.

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

Gergely P, Perl A, Poor G. (2006). Possible pathogenic nature of the recently discovered TT virus: Does it play a role in autoimmune rheumatic diseases?. Autoimmun Rev. 6,5-9.

González A y Bauza R. (2009). Sistemas de producción porcina en Uruguay. Revista Computadorizada de Producción Porcina. 16, 225-232.

Gorga L y Quintans D. (2015). Análisis Sectorial y Cadenas Productivas en Uruguay. Anuario 2015. OPYPA MGAP. pp. 99-112.

Gorga L. (2017). Cadena de carne de cerdo: situación y perspectivas. Anuario 2017. OPYPA MGAP. pp. 99-109.

Griffin JS, Plummer J D, Long SC. (2008). Torque teno virus: an improved indicator for viral pathogens in drinking waters. Virol J. 5, 112.

Grau-Roma L, Frauke L, Segalés J. (2011). Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of disease caused by porcine circovirus type 2. Vet J. 187, 23-32.

Guarino H, Goyal S M, Murtaugh M P, Morrison R B, Kapur V. (1999). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by reverse transcription-polymerase chain reaction using different regions of the viral genome. J Vet Invest. 11, 27-33.

Guo L, Fu Y, Wang Y, Lu Y, Wei Y, Tang Q, Fan P, Liu J, Zhang L, Zhang F, Huang L, Liu D, Li S, Wu H, Liu C. (2012). A porcine circovirus type 2 (PCV2) mutant with 234 amino acids in capsid protein showed more virulence in vivo, compared with classical PCV2a/2b strain. PLoS One. 7, e41463.

Guo LJ, Lu YH, Huang LP, Wei YW, Wu HL, Liu CM. (2011). First construction of infectious clone for newly emerging mutation porcine circovirus type 2 (PCV2) followed by comparison with PCV2a and PCV2b genotypes in biological characteristics in vitro. Virol J. 8, 291.

Guo L, Lu Y, Wei Y, Huang L, Liu C. (2010). Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China. Virol J. 7, 27.

Han J, Wang Y, Faaberg KS. (2006). Complete genome analysis of RFLP 184 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Virus Res. 122, 175-182.

Hanada K, Suzuki Y, Nakane T, Hirose O, Gojobori T. (2005). The origin and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. Mol Biol Evol. 22, 1024-1031.

Hamel AL, Lin LL, Nayar GPS. (1998). Nucleotide sequence of porcine circoviruses associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. J Virol. 72, 5262-5267.

Harding JC. (1996). Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): preliminary epidemiology and clinical presentation. Proc West Can Assoc Swine Pract. 21.

He JL, Cao JJ, Zhou N, Jin YL, Wu JS, Zhou JY. (2013). Identification and functional analysis of the novel ORF4 protein encoded by porcine circovirus type 2. J Virol. 87, 1420-1429.

Herrero J y Fernández de Luco D. (2003). Wild boars (Sus scrofa L.) in Uruguay: Scavengers or predators? Mammalia. 67, 485-491.

Hesse R, Kerrigan M, Rowland RR. (2008). Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field. Virus Res. 132, 201-207.

Horlen KP, Schneider P, Anderson J, Nietfeld JC, Henry SC, Tokach LM, Rowland, RRR. (2007). A cluster of farms experiencing severe porcine circovirus associated

disease: clinical features and association with the PCV2b genotype. J. Swine Health Prod. 15, 270-278.

Huang YW, Harrall KK, Dryman BA, Beach NM, Kenney SP, Opriessnig T, Vaughn EM, Roof MB, Meng XJ. (2011). Expression of the putative ORF1 capsid protein of Torque teno sus virus 2 (TTSuV2) and development of Western blot and ELISA serodiagnostic assays: correlation between TTSuV2 viral load and IgG antibody level in pigs. Virus Res. 158, 79-88.

Huang YW, Harrall KK, Dryman BA, Opriessnig T, Vaughn EM, Roof MB, Meng XJ. (2012a). Serological profile of torque teno sus virus species 1 (TTSuV1) in pigs and antigenic relationships between two TTSuV1 genotypes (1a and 1b), between two species (TTSuV1 and -2), and between porcine and human anelloviruses. J Virol. 86, 10628-10639.

Huang YW, Ni YY, Dryman BA, Meng XJ. (2010). Multiple infection of porcine Torque teno virus in a single pig and characterization of the full-length genomic sequences of four U.S. prototype PTTV strains: implication for genotyping of PTTV. Virology. 396, 289-297.

Huang YW, Patterson AR, Opriessnig T, Dryman BA, Gallei A, Harrall KK, Vaughn EM, Roof MB, Meng XJ. (2012b). Rescue of a porcine anellovirus (torque teno sus virus 2) from cloned genomic DNA in pigs. J Virol. 86, 6042-6054.

Huang L, Zhang F, Tang Q, Wei Y, Wu H, Guo L, Fu Y, Liu C. (2014). A recombinant porcine circovirus type 2 expressing the VP1 epitope of the type O foot-and-mouth disease virus is infectious and induce both PCV2 and VP1 epitope antibodies. Appl Microbiol Biotechnol. 98, 9339-9350.

Hughes AL y Piontkivska H. (2008). Nucleotide sequence polymorphism in circoviruses. Infect Genet Evol. 8, 130-138.

ICTV. (2017). Comite Internacional de taxonomia viral. Recuperado de: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/.

Itoh Y, Takahashi M, Fukuda M, Shibayama T, Ishikawa T, Tsuda F, Tanaka T, Nishizawa T, Okamoto H. (2000). Visualization of TT virus particles recovered from the sera and feces of infected humans. Biochem Biophys Res Commun. 279, 718-724.

Jacobsen B, Krueger L, Seeliger F, Bruegmann M, Segalés J, Baumgaertner W. (2009). Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany. Vet Microbiol. 138, 27-33.

Jiménez-Melsió A, Parés S, Segalés J, Kekarainen, T. (2013). Detection of porcine anelloviruses in pork meat and human faeces. Virus Res. 178, 522-524.

Kappes MA y Faaberg KS. (2015). PRRSV structure, replication and recombination: Origin of phenotype and genotype diversity. Virology. 479-480, 475-486.

Karniychuk UU, Geldhof M, Vanhee M, Van Doorsselaere J, Saveleva TA, Nauwynck HJ. (2010). Pathogenesis and antigenic characterization of a new East European subtype 3 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate. BMC Vet Res. 6, 30.

Karniychuk UU y Nauwynck HJ. (2013). Pathogenesis and prevention of placental and transplacental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. Vet Res. 44, 95.

Karuppannan AK y Opriessnig T. (2017). Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Vaccines in the Context of Current Molecular Epidemiology. Viruses. 9 (5).

Karuppannan AK, Jong MH, Lee SH, Zhu Y, Selvaraj M, Lau J, Jia Q, Kwang J. (2009). Attenuation of porcine circovirus 2 in SPF piglets by abrogation of ORF3 function. Virology. 383, 338-347.

Kasirga E, Sanlidag T, Akçali S, Keskin S, Aktas E, Karakoç Z, Helvaci M, Sözen G, Kuzu M. (2005). Clinical significance of TT virus infection in children with chronic hepatitis B. Pediatr Int. 47, 300-304.

Keffaber KK. (1989). Reproductive failure of unknown etiology. Am Assoc Swine Pract Newsl. 1, 1-9.

Kekarainen T, Gonzalez A, Llorens A, Segalés J. (2014). Genetic variability of porcine circovirus 2 in vaccinating and non-vaccinating commercial farms. J Gen Virol. 95, 1734-1742.

Kekarainen T, Martínez-Guinó L, Segalés J. (2009). Swine torque teno virus detection in pig commercial vaccines, enzymes for laboratory use and human drugs containing components of porcine origin. J Gen Virol. 90, 648-653.

Kekarainen T, Segalés J. (2009). Torque teno virus infection in the pig and its potential role as a model of human infection. Vet J. 180,163-168.

Kekarainen T y Segalés J. (2012). Torque teno sus virus in pigs: an emerging pathogen?. Transbound Emerg Dis. 59,103-108.

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

Khayat R, Brunn N, Speir JA, Hardham JM, Ankenbauer RG, Schneemann A, Johnson JE. (2011). The 2.3-angstrom structure of porcine circovirus 2. J Virol. 85, 7856-7862.

Kim HS, Kwang J, Yoon IJ, Joo HS, Frey ML. (1993). Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. Arch Virol. 133, 477-483.

Kim HK, Luo Y, Moon HJ, Park SJ, Keum HO, Rho S, Park BK. (2009). Phylogenetic and recombination analysis of genomic sequences of PCV2 isolated in Korea. Virus Genes. 39, 352-358.

Knell S, Willems H, Hertrampf B, Reiner G. (2005). Comparative genetic characterization of Porcine Circovirus type 2 samples from German wild boar populations. Vet Microbiol. 109, 169-177.

Kourí ALA. (2018). El viroma humano. Implicaciones en la salud y enfermedad. Rev haban cienc méd. 17, 376-385.

Krakowka S, Hartunian C, Hamberg A, Shoup D, Rings M, Zhang Y, Allan G, Ellis JA. (2008). Evaluation of induction of porcine dermatitis and nephropathy syndrome in gnotobioticpigs with negative results for porcine circovirus type 2. Am J Vet Res. 69, 1615-1622.

Kyriakis CS, Rose N, Foni E, Maldonado J, Loeffen WL, Madec F, Simon G, Van Reeth K. (2013). Influenza A virus infection dynamics in swine farms in Belgium, France, Italy and Spain, 2006-2008. Vet Microbiol. 162, 543-550.

Larochelle R, Magar R, D'Allaire S. (2003). Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic syndrome. Can J Vet Res. 67, 114-120.

Lawson SR, Rossow KD, Collins JE, Benfield DA, Rowland RR. (1997). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of gnotobiotic pigs: sites of virus replication and co-localization with MAC-387 staining at 21 days post-infection. Virus Res. 51, 105-113.

Leary TP, Erker JC, Chalmers ML, Desai SM, Mushahwar IK. (1999). Improved detection systems for TT virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals. J Gen Virol. 80, 2115–2120.

Lee C, Kim H, Kang B, Yeom M, Han S, Moon H, Park S, Song D, Park B. (2010). Prevalence and phylogenetic analysis of the isolated type I porcine reproductive and respiratory syndrome virus from 2007 to 2008 in Korea. Virus Genes 40, 225-230.

Lee C y Yoo D. (2006). The small envelope protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus possesses ion channel protein-like properties. Virology. 355, 30-43.

Lee SS, Sunyoung S, Jung H, Shin J, Lyoo YS. (2010). Quantitative detection of porcine Torque teno virus in Porcine circovirus-2–negative and Porcine circovirus–associated disease-affected pigs. J Vet Diagn Invest. 22, 261-264.

Lee Y, Lin CM1, Jeng CR2, Pang VF3. (2014). Detection of torque teno sus virus 1 and 2 in porcine tissues by in situ hybridization using multi-strained pooled probes. Vet Microbiol.172, 390-399.

Le Roux D, Le Bon A, Dumas A, Taleb K, Sachse M, Sikora R, Julithe M, Benmerah A, Bismuth G, Niedergang F. (2012). Antigen stored in dendritic cells after macropinocytosis is released unprocessed from late endosomes to target B cells. Blood. 119, 95-105.

Li J, Shi JL, Wu XY, Fu F, Yu J, Yuan XY, Peng Z, Cong XY, Xu SJ, Sun WB, Cheng KH, Du YJ, Wu JQ, Wang JB, Huang BH. (2015). Improvement of the immunogenicity of porcine circovirus type 2 DNA vaccine by recombinant ORF2 gene and CpG motifs. Viral Immunol. 28, 290-296.

Lin WL, Chien MS, Wu PC, Lai CL, Huang C. (2011). The porcine circovirus type2 nonstructural protein ORF3 induces apoptosis in porcine peripheral blood mononuclear cells. Open Virol J. 5, 148-153.

Lin HX, Ma Z, Yang XQ, Fan HJ, Lu CP. (2014). A novel vaccine against Porcine circovirus type 2 (PCV2) and Streptococcus equi ssp. zooepidemicus (SEZ) coinfection. Vet Microbiol. 171, 198-205.

Liu J, Chen I, Du Q, Chua H, Kwang J. (2006). The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. J Virol. 80, 5065-5073.

Liu J, Chen I, Kwang J. (2005). Characterization of a previously unidentified viral protein inporcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus induced apoptosis. J Virol. 79, 8262-8274.

Lombardi R, Berrini R, Achaval F, Wayson C. (2007). El Jabalí en el Uruguay. Centro Interdisciplinario para el Desarrollo. Montevideo. ISBN: 978-9974-96-240-8.

Lopez OJ y Osorio FA. (2004). Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. Vet Immunol Immunopathol. 102, 155-163.

López-Vidal J, Gómez-Sebastián S, Bárcena J, Nuñez Mdel C, Martínez-Alonso D, Dudognon B, Guijarro E, Escribano JM. (2015). Improved Production Efficiency of Virus-Like Particles by the Baculovirus Expression Vector System. PLoS One. 10, e0140039.

Loving CL, Brockmeier SL, Sacco RE. (2007). Differential type I interferon activation and susceptibility of dendritic cell populations to porcine arterivirus. Immunology 120, 217-229.

Loving CL, Osorio FA, Murtaugh MP, Zuckermann FA. (2015). Innate and adaptive immunity against PRRSV. Vet. Immunol. Immunopathol. 167, 1-14.

Lunney JK, Fang Y, Ladinig A, Chen N, Li Y, Rowland B, Renukaradhya GJ. (2016). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System. Annu Rev Anim Biosci. 4, 129-154.

Luo W, Zhao D, Yu XL, Ge M, Li RC, Jiang DL. (2013). Small-sized circular genomes similar to genome of porcine circovirus 2. Genome Announc. 1, e0009313.

Lv Q, Guo K, Xu H, Wang T, Zhang Y. (2015) Identification of Putative ORF5 Protein of Porcine Circovirus Type 2 and Functional Analysis of GFP-Fused ORF5 Protein. PLoS One. 10, e0127859.

Lv QZ, Guo KK, Zhang YM. (2014). Current understanding of genomic DNA of porcine circovirus type 2. Virus Genes 49, 1-10.

Ma CM, Hon CC, Lam TY, Li VY, Wong CK, de Oliveira T, Leung FC. (2007). Evidence for recombination in natural populations of porcine circovirus type 2 in Hong Kong and mainland China. J Gen Virol. 88, 1733-1737.

Madsen KG, Hansen CM, Madsen ES, et al. (1998). Sequence analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus of the American type collected from Danish swine herds. Arch Virol. 143, 1683-1700.

Mankertz A, Caliskan R, Hattermann K, Hillenbrand B, Kurzendoerfer P, Mueller B, Schmitt C, Steinfeldt T, Finsterbusch T. (2004). Molecular biology of porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication. Vet Microbiol. 98, 81-88.

Manzin A, Mallus F, Macera L, Maggi F, Blois S. (2015). Global impact of Torque teno virus infection in wild and domesticated animals. J Infect Dev. 9, 562-570.

Mareze VA, Borio CS, Bilen MF, Fleith R, Mirazo S, Mansur DS, Arbiza J, Lozano ME, Bruña-Romero O. (2016). Tests in mice of a dengue vaccine candidate made of chimeric Junin virus-like particles and conserved dengue virus envelope sequences. Appl Microbiol Biotechnol. 100, 125-133.

Mariscal LF, López-Alcorocho JM, Rodríguez-Iñigo E, Ortiz-Movilla N, de Lucas S, Bartolomé J, Carreño V. (2002). TT virus replicates in stimulated but not in nonstimulated peripheral blood mononuclear cells. Virology. 301, 121-129.

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

Martínez-Guinó L, Ballester M, Segalés J, Kekarainen T. (2011). Expression profile and subcellular localization of Torque teno sus virus proteins. J Gen Virol. 92, 2446-2457.

Matzinger SR, Opriessnig T, Xiao CT, Catanzaro N, Beach NM, Slade DE, Nitzel GP, Meng XJ. (2016). A chimeric virus created by DNA shuffling of the capsid genes of different subtypes of porcine circovirus type 2 (PCV2) in the backbone of the non-pathogenic PCV1 induces protective immunity against the predominant PCV2b and the emerging PCV2d in pigs. Virology. 498, 82-93.

Mazzola JC, Saito PK, Yamakawa RH, Watanabe MA, da SilvaJunior WV, Matta AC, Borelli SD. (2015). Prevalence of torque teno virus inhealthy donors of Paraná State, southern Brazil. Rev Bras Hematol Hemoter. 37, 336-40.

McKeown NE, Fenaux M, Halbur PG, Meng XJ. (2004). Molecular characterization of porcine TT virus, an orphan virus, in pigs from six different countries. Vet Microbiol. 104, 113–117.

Meehan BM, McNeilly F, Todd D, Kennedy S, Jewhurst VA, Ellis JA, Hassard LE, Clark EG,Haines DM, Allan GM. (1998). Characterisation of novel circoviruses associated with wasting syndromes in pigs. J Gen Virol. 79, 2171-2179.

Meng XJ. (2012). Emerging and re-emerging swine viruses. Transbound Emerg Dis. 59 ,85-102.

Meng XJ, Paul PS, Halbur PG, Lum MA. (1996). Characterization of a high-virulence US isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a continuous cell line, ATCC CRL11171. J Vet Diagn Invest. 8, 374-381.

Mengeling WL, Lager KM, Vorwald AC. (1998). Clinical consequences of exposing pregnant gilts to strains of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus isolated from field cases of “atypical” PRRS. Am J Vet Res. 59, 1540-1544.

Meerts P, Misinzo G, McNeilly F, Nauwynck HJ. (2005a). Replication kinetics ofdifferent porcine circovirus 2 strains in PK-15 cells, fetal cardiomyocytes andmacrophages. Arch Virol. 150, 427-441.

Meerts P, Misinzo G, Nauwynck HJ. (2005b). Enhancement of porcine circovirus 2replication in porcine cell lines by IFN-(before and after treatment and by IFN-after treatment. J Interferon Cytokine Res. 25, 684-693.

Mirazo S. (2014). Caracterización molecular y variabilidad genética del virus de la Hepatitis E. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, UdelaR.

Misinzo G, Delputte PL, Lefebvre DJ, Nauwynck HJ. (2009). Porcine circovirus2 infection of epithelial cells is clathrin-, caveolae- and dynamin-independent,actin and Rho-GTPase-mediated, and enhanced by cholesterol depletion. VirusRes. 139, 1-9.

Misinzo G, Delputte PL, Meerts P, Lefebvre DJ, Nauwynck HJ. (2006) Porcine circovirus 2 uses heparan sulfate and chondroitin sulfate B glycosaminoglycans as receptors for its attachment to host cells. J Virol. 80, 3487-3494.

Montevideo Portal. (2017). Una especie extinta en Uruguay por más de un siglo vuelve a probar suerte en el territorio. Recuperado de: https://www.montevideo.com.uy/Ciencia-y-Tecnologia/Una-especie-extinta-en-Uruguay-por-mas-de-un-siglo-vuelve-a-probar-suerte-en-el-territorio-uc350052.

Morgan SB, Graham SP, Salguero FJ, Sánchez Cordón PJ, Mokhtar H, Rebel JM, Weesendorp E, Bodman-Smith KB, Steinbach F, Frossard JP. (2013). Increased pathogenicity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus is associated with enhanced adaptive responses and viral clearance. Vet Microbiol. 163, 13-22.

Mushahwar IK, Erker JC, Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, Birkenmeyer LG, Chalmers ML, Pilot-Matias TJ, Dexai SM. (1999). Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans. Proc Natl Acad Sci U S A. 96, 3177-3182.

Nan Y, Wu C, Gu G, Sun W, Zhang YJ, Zhou EM. (2017). Improved Vaccine against PRRSV: Current Progress and Future Perspective. Front Microbiol. 8, 1635.

Nauwynck HJ, Duan X, Favoreel HW, Van Oostveldt P, Pensaert MB. (1999). Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis. J Gen Virol. 80, 297-305.

Nauwynck HJ, Sanchez R, Meerts P, Lefebvre DJ, Saha D, Huang L, Misinzo G. (2012). Cell tropism and entry of porcine circovirus 2. Virus Res. 164, 43-45.

Neira V, Brito B, Mena J, Culhane M, Apel MI, Max V, Perez P, Moreno V, Mathieu C, Johow M, Badia C, Torremorell M, Medina R, Ortega R. (2017). Epidemiological investigations of the introduction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Chile, 2013-2015. PLoS One. 12, e0181569.

Nelsen, C.J., Murtaugh, M.P., Faaberg, K.S., 1999. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. J Virol. 73, 270-280.

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, 1343-1347.

Nieto D, Kekarainen T, Aramouni M, Segales J. (2013). Torque teno sus virus 1 and 2 distribution in tissues of porcine circovirus type 2-systemic disease affected and agematched healthy pigs. Vet Microbiol. 163, 364-367.

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.

Noriega J, Reyes P, Bucarey S. (2007). Circovirus porcino: un virus pequeño que genera un gran problema. Avances en ciencias veterinarias. 22: 62-71.

OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal. (2013). Base de datos del sistema mundial de información zoosanitaria (Wahid Interface) 2013. Recuperado de: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home.

OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal. (2018a). Enfermedades, infecciones e infestaciones de la Lista de la OIE en vigor en 2018. Recuperado de: http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-la-lista-de-la-oie-2018/.

OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal. (2018b). Wahis Interfase. Información sobre las enfermedades de los animales acuáticos y terrestres. Mapa de distribución de PRRSV 2016. Recuperado de: http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-los-animales/.

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 tupaias. J Gen Virol. 83, 1291-1297.

Okamoto H. (2009). TT viruses in animals. In: DeVilliers, E.M., ZurHausen, H. (Eds.), TT Viruses. The Still Elusive Human Pathogens. Springer- Verlag, Berlin.

Olvera A, Cortey M, Segales J. (2007). Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. Virology. 357, 175-185.

Olvera A, Sibila M, Calsamiglia M, Segales J, Domingo M. (2004). Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. J Virol Methods. 117, 75-78.

Opriessnig T, McKeown NE, Zhou EM, Meng XJ, Halbur PG. (2006). Genetic and experimental comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates from cases with and without PCV2-associated lesions provides evidence for differences in virulence. J Gen Virol. 87, 2923-2932.

Opriessnig T, Meng XJ, Halbur PG, (2007). Porcine Circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. J Vet Diagn Invest.19, 591-615.

Opriessnig T, Xiao CT, Gerber PF, Halbur PG. (2013a). Emergence of a novel mutant PCV2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the U.S. concurrently infected with PPV2. Vet Microbiol. 163, 177-183.

Osorio FA. (2010). Principales enfermedades virales porcinas emergentes y reemergentes a nivel mundial: estatus 2010. Memorias del X Congreso Nacional de Producción porcina, Mendoza, Argentina. pp 145-156.

Ostrowski M, Galeota JA, JarAM,PlattKB, OsorioFA, Lopez OJ. (2002). Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. J Virol. 76, 4241-4250.

Ottonelli F. (2016). Expresión del dominio antigénico minimo de ORF2 de HEV en un sistema de VLP basada en la proteína Z del virus Junin y caracterización preliminar. Tesina de grado. Facultad de Ciencias, UdelaR.

Palinski R, Piñeyro P, Shang P, Yuan F, Guo R, Fang Y, Byers E, Hause BM. (2016). A Novel Porcine Circovirus Distantly Related to Known Circoviruses Is Associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and Reproductive Failure. J Virol. 91, e01879-16.

Pasternak AO, van den Born E, Spaan WJ, Snijder EJ. (2001). Sequence requirements for RNA strand transfer during nidovirus discontinuous subgenomic RNA synthesis. EMBO J. 20, 7220-7228.

Pereda A, Piñeyro P, Bratanich A, et al. (2011). Genetic characterization of Porcine Circovirus type 2 from pigs with porcine Circovirus Associated Diseases in Argentina. ISRN Vet. Sci. http://dx.doi.org/ 10.5402/2011/560905.

Perez LJ, Arce HD, Frias MT, Perera CL, Ganges L, Núñez JI (2011). Molecular detection of Torque teno sus virus in lymphoid tissues in concomitant infections with other porcine viral pathogens. Res Vet Sci. 91, e154-7.

Piñeryro PE, Baumeister E, Cappuccio JA, Machuca MA, Quiroga MA, Tedoroff T, Perfumo CJ. (2010). Prevalencia serológica del virus de influenza A en cerdos en Argentina durante la temporada 2002: evaluación mediante inhibición de la hemaglutinación y ELISA. Revista Argentina de Microbiología. On-line version ISSN 1851-7617.

Pineyro PE, Kenney SP, Gimenez-Lirola LG, Heffron CL, Matzinger SR, Opriessnig T, Meng XJ. (2015). Expression of antigenic epitopes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in a modified liveattenuated porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccine virus (PCV1-2a) as a potential bivalent vaccine against both PCV2 and PRRSV. Virus Res. 210, 154-164.

Plagemann PG. (2003). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: origin hypothesis. Emerg Infect Dis. 9, 903-908.

Pogranichniy RM, Yoon KJ, Harms PA, Sorden SD, Daniels M. (2002). Case-control study on the association of porcine circovirus type 2 and other swine viral pathogens with postweaning multisystemic wasting syndrome. J Vet Diagn Invest. 14, 449-456.

Poljak Z, Carman S, McEwen B. (2014). Assessment of seasonality of influenza in swine using field submissions to a diagnostic laboratory in Ontario between 2007 and 2012. Influenza Other Respir Viruses. 8, 482-492.

Rajão DS, Alves F, Del Puerto HL, Braz GF, Oliveira FG, Ciacci-Zanella JR, Schaefer R, dos Reis JK, Guedes RM, Lobato ZI, Leite RC. (2013). Serological evidence of swine influenza in Brazil. Influenza Other Respi Viruses. 7, 109-112.

Ramírez-Mendoza H, Castillo-Juárez H, Hernández J, Correa P, Segalés J. (2009). Retrospective serological survey of Porcine circovirus-2 infection in Mexico. Can J Vet Res. 73, 21-24.

Ramirez-Nieto GC, Diaz CA, Vera VJ, Correa JJ, Mogollon JD. (2012). First isolation and identification of H1N1 swine influenza viruses in Colombian pig farms. Health. 4, 983-990.

Read AF, Baigent SJ, Powers C, Kgosana LB, Blackwell L, Smith LP., Kennedy, D.A., Walkden-Brown, S.W., Nair, V.K. (2015). Imperfect vaccination can enhance the transmission of highly virulent pathogens. PLoS Biol. 13, e1002198.

Reiner G, Bronnert B, Hohloch C, Fresen C, Haack I, Willems H, Reinacher M. (2010). Qualitative and quantitative distribution of PCV2 in wild boars and domestic pigs in Germany. Vet Microbiol. 145, 1-8.

Roca M, Balasch M, Segalés J, Calsamiglia M, Viaplana E, Urniza A, Hattermann K, Mankertz A, Plana-Durán J, Domingo M. (2004). In vitro and in vivo characterization of an infectious clone of a European strain of porcine circovirus type 2. J Gen Virol. 2004 85, 1259-1266.

Rodríguez-Cariño C, Duffy C, Sánchez-Chardi A, McNeilly F, Allan GM, Segalés J. (2011). Porcine circovirus type 2 morphogenesis in a clone derived from the l35 lymphoblastoid cell line. J Comp Pathol. 144, 91-102.

Roic B, Jemersic L, Terzic S, Keros T, Balatinec J, Florijancic T. (2012). Prevalence of antibodies to selected viral pathogens in wild boar (Sus scrofa) in Croatia in 2005-06 and 2009-10. J Wildl Dis. 48, 131-137.

Ropp SL, Wees CE, Fang Y, Nelson EA, Rossow KD, Bien M, Arndt B, Preszler S, Steen P, Christopher-Hennings J, Collins JE, Benfield DA, Faaberg KS. (2004). Characterization of emerging European-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the United States. J Virol. 78, 3684-3703.

Rose N, Opriessnig T, Grasland B, Jestin A. (2012). Epidemiology and transmission of porcine Circovirus type 2 (PCV2). Virus Res. 164, 78-89.

Rossow KD. (1998). Porcine reproductive and respiratory syndrome Vet Pathol. 35, 1-20.

Rovira A, Balasch M, Segalés J, García L, Plana-Durán J, Rosell C, Ellerbrok H, Mankertz A, Domingo M. (2002). Experimental inoculation of conventionalpigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcinecircovirus 2. J Virol. 76, 3232-3239.

Ruiz-Fons F, Vicente J, Vidal D, Höfle U, Villanúa D, Gauss C, Segalés J, Almería S, Montoro V, Gortázar C. (2006). Seroprevalence of six reproductive pathogens in European wild boar (Sus scrofa) from Spain: the effect on wild boar female reproductive performance. Theriogenolog. 65, 731-743.

Salgado RL, Vidigal PM, de Souza L, Onofre TS, Gonzaga NF, Eller MR, Bressan GC, Fietto JL, Almeida MR, Silva Júnior A. (2014). Identification of an Emergent Porcine Circovirus-2 in Vaccinated Pigs from a Brazilian Farm during a Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome Outbreak. Genome Announc. 20, 2(2).

Sánchez R, Nauwynck H, Pensaert M. (2001). Serological survey of porcine circovirus 2 antibodies in domestic and feral pig populations in Belgium. In: Proceedings of the European Society of Veterinary Virology, St. Malo, France, p. 122.

Sattler T, Sailer E, Wodak E, Schmoll F. (2012). Serological detection of emerging viral infections in wild boars from different hunting regions of Southern Germany. Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere. 40, 27-32.

Sattler T, Wodak E, Revilla-Fernández S, Schmoll F. (2014). Comparison of different commercial ELISAs for detection of antibodies against porcine respiratory and reproductive syndrome virus in serum. BMC Vet Res. 10, 300.

Schulze C, Neumann G, Grütze I, Engelhardt A, Mirle C, Ehlert F, Hlinak A. (2003). Porcine circovirus type 2-infection in an European wild boar (Sus scrofa) in the state of Brandenburg, Germany. Deutsc Tieärtzl Wochenschr. 110, 426-428.

Sedlak K, Bartova E, Machova J. (2008). Antibodies to selected viral disease agents in wild boars from the Czech Republic. J Wildl Dis. 44, 777-780.

Segalés J. (2012). Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. Virus Res. 164, 10-19.

Segalés J. (2013). The threat of emerging and re-emerging diseases in pigs. The Pig Journal. 69, 7-16.

Segales J. (2015). Best practice and future challenges for vaccination against porcine circovirus type 2. Expert Rev Vaccines. 14, 473-487.

Segalés J, Allan GM, Domingo M. (2005). Porcine circovirus diseases. Anim Health Res Rev. 6, 119-142.

Segalés J, Kekarainen T, Cortey M. (2013). The natural history of porcine circovirus type 2: from an inoffensive virus to a devastating swine disease? Vet Microbiol. 165, 13-20.

Segales J, Martínez-Guino L, Cortey M, Navarro N, Huerta E, Sibila M, Pujols J, Kekarainen T.. (2009). Retrospective study on swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 infection from 1985 to 2005 in Spain. Vet Microbiol. 134, 199-207.

Seo HW, Park C, Kang I, Choi K, Jeong J, Park SJ, Chae C. (2014). Genetic and antigenic characterization of a newly emerging porcine circovirus type 2b mutant first isolated in cases of vaccine failure in Korea. Arch Virol. 159, 3107-3111.

Shi M, Lam TT, Hon CC, Hui RK, Faaberg KS, Wennblom T, Murtaugh MP, Stadejek T, Leung FC. (2010). Molecular epidemiology of PRRSV: a phylogenetic perspective. Virus Res. 154, 7-17.

Shi C, Liu Y, Ding Y, Zhang Y, Zhang J. (2015). PRRSV receptors and their roles in virus infection. Arch Microbiol. 197, 503-512.

Shibayama T, Masuda G, Ajisawa A, Takahashi M, Nishizawa T, Tsuda F, Okamoto H. (2001). Inverse relationship between the titre of TT virus DNA and the CD4 cell count in patients infected with HIV. AIDS 15, 563-570.

Shin J, Torrison J, Choi CS, Gonzalez SM, Crabo BG, Molitor TW. (1997). Monitoring of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in boars.Vet Microbiol. 55, 337-346.

Shtanko O, Imai M, Goto H, Lukashevich IS, Neumann G, Watanabe T, Kawaoka Y. (2010). A role for the C terminus of Mopeia virus nucleoprotein in its incorporation into Z protein-induced virus-like particles. J Virol. 84, 5415-5422.

Sibila M, Martínez-Guinó L, Huerta E, Llorens A, Mora M, Grau-Roma L, Kekarainen T, Segalés J. (2009). Swine torque teno virus (TTV) infection and excretion dynamics in conventional pig farms. Vet. Microbiol. 139, 213–218

Singh G y Ramamoorthy S. (2018). Potential for the cross-species transmission of swine torque teno viruses. Vet Microbiol. 215, 66-70.

Singh P y Ramamoorthy S. (2016a) Immune gene expression in swine macrophages expressing the Torque Teno Sus Virus1 (TTSuV1) ORF-1 and 2 proteins. Virus Res. 220, 33-38.

Singh P y Ramamoorthy S. (2016b). Lack of strong anti-viral immune gene stimulation in Torque Teno Sus Virus1 infected macrophage cells. Virology. 495, 63-70.

Skovgaard N. (2007). New trenes in emerging pathogens. Int J Food Microbiol. 120, 217-224.

Snijder EJ, Kikkert M, Fang Y. (2013). Arterivirus molecular biology and pathogenesis. J Gen Virol. 94, 2141-2163

Snijder E J y Meulenberg J J. (1998). The molecular biology of arteriviruses. J Gen Virol. 79, 961-979

Solano GI, Segalés J, Collins JE, Molitor TW, Pijoan C. (1997). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) interaction with Haemophilus parasuis. Vet Microbiol. 55, 247-257

Ssemadaali MA, Effertz K, Singh P, Kolyvushko O, Ramamoorthy S. (2016). Identification of heterologous Torque Teno Viruses in humans and swine. Sci Rep. 6, 26655.

Ssemadaali MA, Ilha M, Ramamoorthy S. (2015). Genetic diversity of porcine circovirus type 2 and implications for detection and control. Res Vet Sci. 103,179-186.

Stadejek T, Oleksiewicz MB, Potapchuk D, Podgorska K. (2006). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. J Gen Virol. 87, 1835-1841.

Steiner E, Balmelli C, Herrmann B, Summerfield A, McCullough K. (2008). Porcine circovirus type 2 displays pluripotency in cell targeting. Virology. 378, 311-322.

Strecker T, Eichler R, Meulen Jt, Weissenhorn W, Dieter Klenk H, Garten W, Lenz O. (2003). Lassa virus Z protein is a matrix protein and sufficient for the release of virus-like particles. J Virol. 77, 10700-10705.

Suzuki T, Suzuki R, Li J, Hijikata M, Matsuda M, Li TC, Matsuura Y, Mishiro S, Miyamura T. (2004). Identification of basal promoter and enhancer elements in an untranslated region of the TT virus genome. J Virol. 78, 10820-10824.

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 postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine respiratory disease complex. Vet Microbiol. 139, 347-350.

Thacker EL, Halbur PG, Ross RF, Thanawongnuwech R, Thacker BJ. (1999). Mycoplasma hyopneumoniae potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. J Clin Microbiol. 37, 620-627

Thanawongnuwech R, Amonsin A, Tatsanakit A, Damrongwatanapokin S. (2004). Genetics and geographical variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. Vet Microbiol. 101, 9-21

Thanawongnuwech R, Halbur PG, Thacker EL. (2000). The role of pulmonary intravascular macrophages in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. Anim Health Res Rev. 1, 95-102.

Tian K, Yu X, Zhao T, Feng Y, Cao Z, et al. (2007). Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark. PloS One 2,e526.

Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, Koch MA. (1982). A very small porcine virus with circular single-strain DNA. Nature. 295, 64-66.

Tischer I, Mields W, Wolff D, Vagt M, Griem W. (1986). Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. Arch Virol . 91, 271-276.

Tischer I, Peters D, Rasch R, Pociuli S. (1987). Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. Arch Virol. 96, 39-57.

Tischer I, Rasch R, Tochtermann G. (1974). Characterization of papovavirus- and piconarvirus –like particles in permanent pig kidney cell lines. Zentralbl Bakteriol Org A. 226, 153-167.

Teixeira TF, Dezen D, Cibulski SP, Varela AP, Holz CL, Franco AC, Roehe PM. (2011). Torque teno sus virus (TTSuV) in cell cultures and trypsin. PLoS One. 6, e17501.

Teixeira TF, Dezen D, Cibulski SP, Varela AP, Sheffer CM, Holz CL, Dos Santos HF, Franco AC, Roehe PM. (2013). Torque teno sus virus (TTSuV) in tissues of pigs and its relation with the occurrence of postweaning multisystemic wasting syndrome. Virus Genes 47, 276-281.

Teixeira TF, Cibulski SP, dos Santos HF, Wendlant A, de Sales Lima FE, Schmidt C, Franco AC, Roehe PM. (2015). Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) viral loads in serum of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and healthy pigs in Brazil. Res Vet Sci. 101, 38-41.

Torremorell M, Allerson M, Corzo C, Diaz A, Gramer M. (2012). Transmission of Influenza A Virus in Pigs. Transbound Emerg Dis. 59, 68-84.

Touinssi M, Gallian P, Biagini P, Attoui H, Vialettes B, Berland Y, Tamalet C, Dhiver C, Ravaux I, De Micco P, De Lamballerie X. (2001). TT virus infection: prevalence of elevated viraemia and arguments for the immune control of viral load. J Clin Virol 21, 135-141.

Trible BR y Rowland RR. (2012). Genetic variation of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its relevance to vaccination, pathogenesis and diagnosis. Virus Res. 164, 68-77.

Truyen U. (2006). Evolution of canine parvovirus—a need for new vaccines? Vet Microbiol. 117, 9-13.

Ullmann LS, Gravinatti ML, Yamatogi RS et al. (2016). PCR and qPCR for detection of Porcine Circovirus type 2 (PCV2) in captive collared (Pecari tajacu) and white-lipped (Tayassu pecari) peccaries from Southern Brazil. Ciências Agrárias, Londrina. 37, 4167-4170.

Urata S, Yasuda J, de la Torre JC. (2009). The z protein of the new world arenavirus tacaribe virus has bona fide budding activity that does not depend on known late domain motifs. J Virol. 83, 12651-12655.

Uruguay XXI. (2013). Informe sobre sector porcino Uruguay. Recuperado de: http://www.ciap.org.ar/ciap/Sitio/Archivos/IndustriaPorcinaMayo2013URUGUAY.pdf

Van Alstine WG, Kanitz CL, Stevenson GW. (1993). Time and temperature survivability of PRRS virus in serum and tissues. J Vet Diagn Invest. 5, 621-622.

van den Ent F y Löwe J. (2006). RF cloning: a restriction-free method for inserting target genes into plasmids. J Biochem Biophys Methods. 67, 67-74.

Van Reeth K, Nauwynck H, PensaertM. (1996). Dual infections of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or swine influenza virus: a clinical and virological study. Vet Microbiol. 48, 325-335.

van Woensel PA, Liefkens K, Demaret S. (1998). European serotype PRRSV vaccine protects against European serotype challenge whereas an American serotype vaccine does not. Adv Exp Med Biol. 440,713-718.

Vargas-Ruiz A, Ramírez-Álvarez H, Sánchez-Betancourt JI, Quintero-Ramírez V, Rangel-Rodríguez IC, Vázquez-Perez JA, García-Camacho LA. (2017). Retrospective study of the relationship of Torque teno sus virus 1a and Torque teno sus virus 1b with porcine circovirus associated disease. Can J Vet Res. 81, 178-185.

Vecchia, AD. et al. (2012). First description of Adenovirus, Enterovirus, Rotavirus and Torque teno virus in water samples collected from the Arroio Diluvio, Porto Alegre, Brazil. Braz J Biol. 72, 323-329.

Viancelli A, Garcia LA, Schiochet M, Kunz A, Steinmetz R, Ciacci-Zanella JR, Esteves PA, Barardi CR. (2012). Culturing and molecular methods to assess the infectivity of

porcine circovirus from treated effluent of swine manure. Res Vet Sci. 93, 1520-1524.

Vicente J, Segalés J, Höfle U, Balasch M, Plana-Durán J, Domingo M, Gortázar C. (2004). Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (Sus scrofa). Vet Res. 35, 243-253.

Vincze, T., Posfai, J. and Roberts, R.J. (2003). NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. Nucleic Acids Res. 31, 3688-3691.

ViralZone. ssDNA Rolling circle. Recuperado de: https://viralzone.expasy.org/1941.

Vlasakova, M., Jackova, A., Vilcek, S. (2011). Genetic typing of porcine circovirus type 2 (PCV-2) isolates from Slovakia. Res Vet Sci. 90, 168-73.

Vu HLX, Pattnaik AK, Osorio FA. (2017). Strategies to broaden the cross-protective efficacy of vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet Microbiol. 206, 29-34.

Wang F, Guo X, Ge X, Wang Z, Chen Y, Cha Z, Yang H. (2009). Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2. Virus Res. 145, 151-156.

Wang L, Byrum B, Zhangcorresponding Y. (2014). Detection and Genetic Characterization of Deltacoronavirus in Pigs, Ohio, USA, 2014. Emerg Infect Dis. 20, 1227-1230.

Weingartl HM. (2002). Porcine circovirus structure and replication: a minireview. Agricultura. 1, 11-14.

Wen L, He K, Yu Z, Mao A, Ni Y, Zhang X, Guo R, Li B, Wang X, Zhou J, Lv L. (2012). Complete genome sequence of a novel porcine circovirus-like agent. J Virol. 86, 639.

Wensvoort G, de Kluyver EP, Pol JM, Wagenaar F, Moormann RJ, Hulst MM, Bloemraad R, den Besten A, Zetstra T, Terpstra C. (1992). Lelystad virus, the cause of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome: a review of mystery swine disease research at Lelystad. Vet Microbiol. 33, 185-193.

Wensvoort G, Terpstra C, Pol JM, ter Laak EA, Bloemraad M, et al. (1991). Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. Vet Q. 13, 121-130.

Wiederkehr DD, Sydler T, Buergi E, Haessig M, Zimmermann D, Pospischil A, Brugnera E, Sidler X. (2009). A new emerging genotype subgroup within PCV-2b dominates the PMWS epizooty in Switzerland. Vet Microbiol. 136, 27-35.

Wills RW, Zimmerman JJ, Yoon KJ, Swenson SL, McGinley MJ, et al. (1997). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection. Vet Microbiol. 55, 231-240.

Wissink EH, Kroese MV, van Wijk HA, Rijsewijk FA, Meulenberg JJ, Rottier PJ. (2005). Envelope protein requirements for the assembly of infectious virions of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Virol. 79, 12495-12506.

Wu PC, Chen TY, Chi JN, Chien MS, Huang C. (2016). Efficient expression and purification of porcine circovirus type 2 virus-like particles in Escherichia coli. J Biotechnol. 220, 78-85.

Xiao CT, Halbur PG, Opriessnig T. (2012). Complete genome sequence of a novel porcine circovirus type 2b variant present in cases of vaccine failures in the United States. J Virol. 86, 12469.

Xiao CT, Halbur PG, Opriessnig T. (2015). Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d. J Gen Virol. 96, 1830-1841.

Xiao CT, Harmon KM, Halbur PG, Opriessnig T. (2016). PCV2d-2 is the predominant type of PCV2 DNA in pig samples collected in the U.S. during 2014-2016. Vet Microbiol. 197, 72-77.

Xiao Y, Zhao P, Du J, Li X, Lu W, Hao X, Dong B, Yu Y, Wang L. (2018). High-level expression and immunogenicity of porcine circovirus type 2b capsid protein without nuclear localization signal expressed in Hansenula polymorpha. Biologicals. 51, 18-24.

Yamaguchi H, Kobayashi S, Maruyama J, Sasaki M, Takada A, Kimura T, Sawa H, Orba Y. (2014). Role of the C-terminal region of vervet monkey polyomavirus 1 VP1 in virion formation. J Vet Med Sci. 76, 637-644.

Yang X, Chen F, Cao Y, Pang D, Ouyang H, Ren L. (2012). Complete genome sequence of porcine circovirus 2b strain CC1. J Virol. 86, 9536.

Yoshii M, Kaku Y, Murakami Y, Shimizu M, Kato K, Ikeda H. (2004). Polymerase chain reaction-based genetic typing of Japanese porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. J Vet Diagn Invest. 16, 342-347.

Zhang Z, Dai W, Dai D. (2013). Synonymous codon usage in TTSuV2: analysis and comparison with TTSuV1. PLoS One. 8, e81469.

Zhang L, Wu X, Shi J, Peng Z, Zheng S, Xu S, Han H, Xin C, Liu Y, Gao M, Yu J, Sun W, Cong X, Li J, Xu S, Wang J. (2018).The correlation between the mutual deletions of amino acids within porcine circovirus rep protein and the discrepancy of replication. Microb Pathog. 117, 327-334.

Zheng L, Li X, Zhu L, Li W, Bi J, Yang G, Yin G, Liu J. (2015). Inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in vitro using DNA-based short antisense oligonucleotides. BMC Vet Res.11, 199.

Zheng H, Ye L, Fang X, Li B, Wang Y, Xiang X, Kong L, Wang W, Zeng Y, Ye L, Wu Z, She Y, Zhou X. (2007). Torque teno virus (SANBAN isolate) ORF2 protein suppresses NF-kappaB pathways via interaction with IkappaB kinases. J Virol. 81, 11917-11924.

Zhu L, Bi J, Zheng L, Zhao Q, Shu X, Guo G, Liu J, Yang G, Liu J, Yin G. (2018). In vitro inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication by short antisense oligonucleotides with locked nucleic acid modification. BMC Vet Res. 14, 109.

Zhu S, Zhang C, Wang J, Wei L, Quan R, Yang J, Yan X, Li Z, She R, Hu F, Liu J. (2016). Immunity elicited by an experimental vaccine based on recombinant flagellin-porcine circovirus type 2 cap fusion protein in piglets. PloS One. 11, e0147432.

Zimmerman, J. (2003). Historical overview. in 2003 PRRS Compendium. 2nd edition: p. 1-4.