



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



SECCIÓN
VIROLOGÍA
FCIEN | UDELAR

Detección y caracterización molecular de Circovirus Porcino tipo 3 (PCV3) en Uruguay

Tesina de grado - Licenciatura en Ciencias Biológicas

Axel Galiano

Orientadora: Dra. Natalia Ramos

Co-orientador: Dr. Juan Arbiza

Noviembre de 2023

Sección Virología.
Facultad de Ciencias, UdelAR

Índice:

1. Resumen	3
2. Introducción	4
2.1. Familia <i>Circoviridae</i>	4
2.2. Género <i>Circovirus</i>	7
2.3. <i>Circovirus</i> Porcinos	7
2.3.1. PCV1	8
2.3.2. PCV2	8
2.3.3. PCV3	10
2.3.4. PCV4	11
2.4. <i>Circovirus</i> porcino tipo 3	12
2.4.1. Historia del descubrimiento	12
2.4.2. Características genómicas y morfológicas	13
2.4.3. Clasificación	15
2.4.4. Patogenia y relevancia	16
2.4.5. Evolución de los reportes de detección de PCV3 en el mundo	19
3. Objetivos	21
3.1. Objetivo general	21
3.2. Objetivos específicos	21
4. Materiales y métodos	21
4.1. Muestras analizadas	21
4.2. Extracción de ADN	22
4.3. Detección de PCV3	22
4.4. Caracterización genética de PCV3	22
4.4.1. Amplificación de <i>Cap</i> y ORF1-3 por PCR.....	22
4.4.2. Análisis de secuencias	24
4.4.2.1. Análisis de secuencia aminoacídica	24
4.4.2.2. Análisis de secuencia nucleotídica y construcción de filogenia	24

5. Resultados	24
5.1. Detección molecular de PCV3	24
5.2. Caracterización molecular de PCV3	27
5.2.1. Caracterización basada en la secuencia aminoacídica	28
5.2.2. Caracterización basada en análisis de secuencia nucleotídica ..	29
5.2.2.1. Árboles filogenéticos	29
5.2.2.2. Matrices de identidad	32
6. Discusión	33
7. Conclusiones	38
8. Perspectivas	39
9. Bibliografía	40
Anexo	50
Agradecimientos	54

1. Resumen

Circovirus porcino tipo 3 (PCV3, por sus siglas en inglés) es un nuevo virus del género *Circovirus* reportado por primera vez a fines de 2016 en casos de síndrome de dermatitis y nefropatía porcina, miocarditis y fallo reproductivo en cerdas. Previamente, solo se conocían dos especies de Circovirus Porcinos, PCV1 y PCV2, siendo este último uno de los virus de mayor relevancia económica para la industria porcina. Dado su estrecho relacionamiento con PCV2 y su hallazgo en animales que presentaban patologías severas, PCV3 fue objeto de estudio de numerosas investigaciones desde su detección hasta la fecha. Las mismas no han logrado esclarecer completamente el posible rol patogénico de PCV3, pero han permitido identificarlo en un gran número de países. Adicionalmente, permitieron el acceso a las secuencias genómicas de PCV3, que junto con la importancia de una clasificación taxonómica precisa para un correcto análisis y comprensión de la epidemiología viral, impulsaron la aparición de diversos sistemas de clasificación para las cepas reportadas.

Este trabajo tiene como objetivo detectar ADN de PCV3 en muestras de cerdos domésticos y jabalíes provenientes de diferentes regiones del país, así como también caracterizar genéticamente las cepas detectadas. Para ello se puso a punto un ensayo para la detección específica de PCV3 basado en PCR convencional y un protocolo de caracterización molecular basado en Nested-PCR y PCR convencional, al que se sometieron las muestras positivas. El mismo consistió en la amplificación de porciones genómicas (ORF2 y ORF1-3) que contienen motivos de secuencia relevantes para la clasificación de las cepas virales, según se establece en la bibliografía previa.

De esta manera, de 54 muestras sometidas al protocolo de detección, se identificaron 10 positivas para PCV3 provenientes de cerdos domésticos (8), tanto asintomáticos como con sintomatología clínica, y jabalíes (2). Del total de muestras positivas, se logró caracterizar 8 a través los motivos presentes en su secuencia aminoacídica, identificándose 1 muestra del grupo PCV3a y 7 PCV3b (6 b1 y 1 b2). No se pudo determinar a qué subgrupo pertenece la muestra PCV3a.

La construcción de los árboles filogenéticos que representan las relaciones entre las cepas uruguayas y las provenientes de otros países, extraídas de GenBank, no reveló la presencia de dos grupos monofiléticos con buen soporte estadístico que puedan asociarse a PCV3a y PCV3b. No se apreciaron diferencias topológicas significativas al utilizarse distintos métodos de inferencia filogenética, ni al añadir o quitar información genética empleando sólo las secuencias parciales del ORF2 o su secuencia completa y la porción ORF1-3.

Este trabajo constituye el primer reporte de detección de PCV3 en muestras de cerdos domésticos y jabalíes de Uruguay, proporcionando evidencia acerca de su distribución globalizada y su identificación en especies salvajes que pueden funcionar como reservorio natural del virus. Asimismo, provee herramientas moleculares adaptadas y efectivas para la detección específica de PCV3 y su caracterización, que pueden ser empleadas en estudios posteriores, y aporta evidencia consistente con la bibliografía acerca de la clasificación de las cepas detectadas.

2. Introducción

Circovirus porcino tipo 3 (PCV3) es un nuevo virus del género *Circovirus* (familia *Circoviridae*) reportado por primera vez a fines de 2016, prácticamente en simultáneo, por dos grupos de investigadores en Estados Unidos (Palinski et al., 2016; Phan et al., 2016). A continuación, y a modo introductorio, se describirán las características principales de este virus, los factores que hacen relevante su estudio, y se relatará a grandes rasgos la evolución de los reportes de detección de PCV3 en el mundo desde su descubrimiento hasta la fecha, pasando por los inicios de la investigación sobre este virus en Uruguay.

2.1. Familia *Circoviridae*

Si nos proponemos conocer las características principales de PCV3, debido a que el estado actual del conocimiento sobre este microorganismo tiene todavía “vacíos”, es relevante comenzar describiendo la familia a la cual pertenece, ya que entre los miembros de la misma hay caracteres compartidos.

Circoviridae es una familia de virus pequeños con genoma ADN simple cadena, circular y covalentemente cerrada (**circo** - **circular conformation**). Dicho genoma tiene una longitud que varía según el representante de la familia que se analice, pero se encuentra en el rango de 1.7 a 2.1 kb. En el mismo encontramos dos marcos abiertos de lectura (ORFs) principales: ORF1, que codifica la proteína asociada a la replicación o replicasa (*Rep*); y ORF2, que codifica la proteína de cápside (*Cap*). La organización de estos ORFs en el genoma es ambisense, es decir, se orientan en direcciones opuestas. La hebra que está empaquetada en el virión es la codificante para una de las proteínas (*Rep* o *Cap*), mientras que la hebra sentido para la otra proteína se origina durante la replicación viral, cuando surge la forma replicativa del genoma (ADN doble hebra). De esta manera, los extremos 5' de los ORFs quedan próximos entre sí, separados por una región intergénica (IR). De igual forma, los extremos 3' de *Rep* y *Cap* quedan enfrentados, con diferencias significativas en la longitud de las IRs cuando comparamos los géneros de la familia, donde incluso en uno de ellos la mayor parte de sus integrantes carecen de región intergénica, es decir, los extremos 3' de los ORFs se solapan (Figura 1). Entre los extremos 5' se halla una estructura del tipo tallo-bucle (*stem-loop*) que contiene un motivo de nueve nucleótidos considerado el origen de replicación (*ori*). Este posee la secuencia consenso: "(T/n)A(G/t)TATTAC", donde n representa cualquier nucleótido, y en las posiciones 1 y 3 se encuentran frecuentemente T y G, respectivamente, mientras que en menor proporción n y T (Breitbart et al., 2017). La ubicación de este motivo respecto a las regiones codificantes cobra particular relevancia debido a que es el criterio que define la asignación de una especie viral a uno de los dos géneros que componen la familia *Circoviridae*. Son miembros del género *Circovirus* aquellos cuyo virión lleva la hebra codificante para *Rep* y en la misma se ubica el origen de replicación. En cambio, si el *ori* putativo se localiza en la hebra sentido de la proteína *Cap* y la misma se encuentra empaquetada en el virión, se asigna ese virus al género *Cyclovirus* (Rosario et al., 2017).

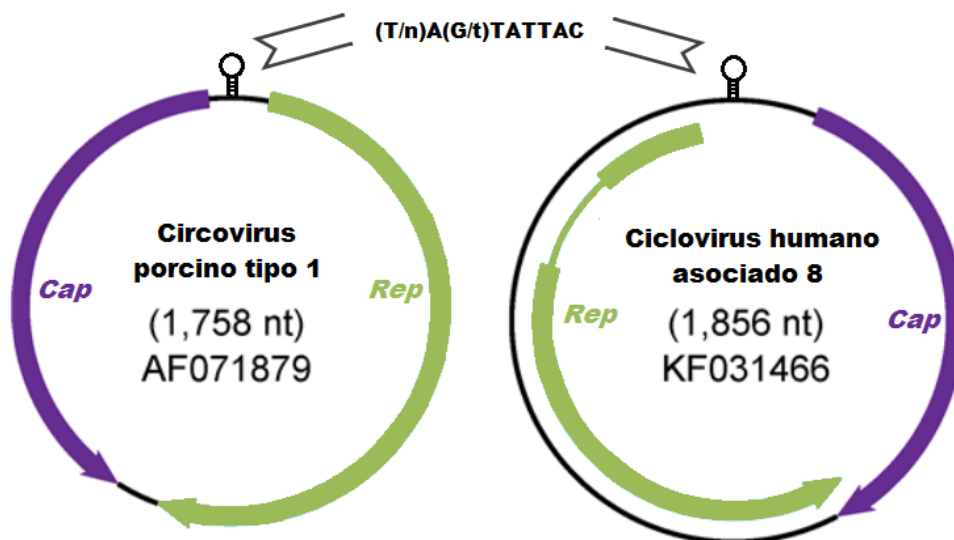


Figura 1. Organización genómica comparada de los miembros de la familia *Circoviridae*. (Izq) PCV1, representante del género *Circovirus*. (Der) Ciclovirus humano-asociado 8, representante del género *Cyclovirus*. En ambos casos se puede apreciar la organización *ambisense* del ORF1 y ORF2, además de la estructura *stem-loop* y su secuencia consenso. La hebra codificante que lleva el virión es la que se dispone en sentido horario. Extraído y adaptado de Breitbart et al., 2017.

Los productos génicos de estos ORFs han sido caracterizados para algunos miembros de la familia *Circoviridae*, más específicamente para algunos *Circovirus*.

Se sabe que *Rep* es la proteína más conservada y posee dominios helicasa y endonucleasa que son claves para la replicación. Esto, junto con otras características genómicas propias de la familia, sugiere que los integrantes de *Circoviridae* emplean una replicación de círculo rodante (RCR) (Cheung, 2006; Faurez et al., 2009; Mankertz et al., 1997; Steinfeldt et al., 2007). De hecho, *Rep*, mediante su dominio endonucleasa, daría inicio a la replicación cortando y abriendo, en el origen de replicación, la hebra circular covalentemente cerrada que lleva el virión (Cheung, 2004a; Steinfeldt et al., 2006). Está demostrado para *Circovirus* porcino tipo 1 (PCV1) que la replicación del genoma viral es llevada a cabo por las ADN polimerasas de la célula hospedera, y que, como se mencionó anteriormente, la misma produce una forma replicativa del genoma que es ADN doble hebra (Tischer et al., 1987).

Por otra parte, *Cap* es la proteína más divergente entre los miembros de la familia y esto se ve reflejado en las ampliamente conocidas propiedades antigénicas de las proteínas de cápside. Se sabe que miembros del género *Circovirus*, como los *Circovirus* porcinos (PCVs) tipo 1 y tipo 2 (PCV1 y PCV2), son antigénicamente distintos a nivel de esta proteína (Mahé et al., 2000). A su vez, la proteína de cápside de estos PCVs también difiere antigénicamente de la que exhibe el virus responsable de la enfermedad de pico y plumas (BFDV), con quien comparten género pero que afecta a otras especies. No se tiene conocimiento hasta el momento sobre las relaciones antigénicas entre otros *Circovirus*, y mucho menos entre los integrantes del género *Cyclovirus* (Breitbart et al., 2017).

La caracterización de la proteína *Cap* ha identificado un dominio que le permitiría unir el ADN viral, un proceso clave en el empaquetamiento del material genético dentro de las partículas virales (Crowther et al., 2003; Niagro et al., 1998).

A *Rep* y *Cap*, se suman otros ORFs que se han descrito en genomas de *Circovirus*, algunos putativos que darían origen a proteínas de funciones desconocidas, mientras que otros dan efectivamente productos génicos (ARNs y proteínas) que cumplen un rol regulatorio durante la infección de estos virus. Por ejemplo, PCV1 y PCV2 expresan una proteína no esencial para la replicación viral y con actividad apoptótica codificada en el ORF3 del genoma (Hough et al., 2015; Kiupel et al., 2005; Liu et al., 2005; Noteborn et al., 1994). Esta proteína participa en la activación de la caspasa 3, proteína clave en la inducción de la apoptosis, con la caspasa 8 como intermediaria (Liu et al., 2005).

La diversidad de productos génicos obtenida a partir de un genoma tan pequeño se debe, en gran parte, a la utilización de la maquinaria de *splicing* alternativo de la célula hospedera. En células PK-15 (línea celular de riñón porcino) infectadas con PCV1 y PCV2 se ha determinado la presencia de hasta 12 y 9 transcritos, respectivamente, producidos por *splicing* alternativo (Cheung, 2003, 2004b). A este mecanismo se añaden otras estrategias para decodificar la información que se encuentra en el genoma y que tienen lugar a diferentes niveles del proceso de expresión génica.

Respecto a la morfología de los viriones de la familia *Circoviridae*, no se conoce detalladamente. Sólo se ha determinado para algunos integrantes del género *Circovirus*, los cuales carecen de envoltura y exhiben una cápside icosaédrica pequeña, con un diámetro que oscila entre los 15 y 25 nm (Ritchie et al., 1989, 1990; Todd et al., 1991) (Figura 2). En el caso de PCV2 y BFDV, se sabe que 60 subunidades de la proteína *Cap* se arreglan formando 12 pentámeros, constituyendo así la cápside viral que tiene un número de triangulación $T = 1$ (Crowther et al., 2003). Por el momento no se tiene información estructural acerca de los integrantes del género *Cyclovirus* (Breitbart et al., 2017), mientras que existen algunos estudios que aportan datos adicionales sobre la morfología de otros *Circovirus*, como se verá más adelante.

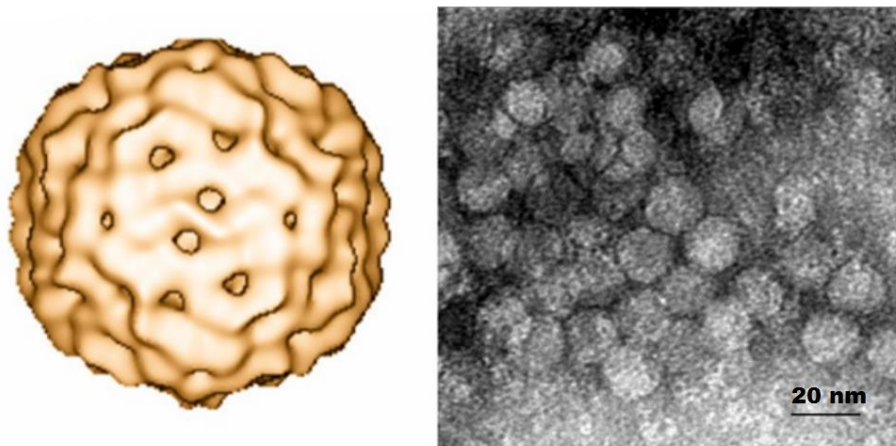


Figura 2. Morfología de los viriones de la familia *Circoviridae*. (Izq) Reconstrucción 3D de un virión de PCV2 usando criomicroscopía electrónica. (Der) Micrografía electrónica de transmisión con tinción negativa de viriones de PCV2. Tomado y adaptado de Breitbart et al., 2017.

2.2. Género *Circovirus*

Como se mencionó en la sección anterior, *Circovirus* es el género más estudiado de la familia y en él se encuentran los virus más pequeños que han demostrado ser capaces de replicar en células de mamífero (PCV1 y PCV2) (Rosario et al., 2017).

Un gran número de especies ha sido descrito para este género, y el mismo ha aumentado significativamente gracias a las tecnologías de secuenciación metagenómica que cada vez se hacen más comunes. De hecho, en el capítulo 48 de la última edición de *Veterinary Microbiology*, publicada a mediados de 2022, se mencionaba que habían unas 49 especies asignadas al género *Circovirus* (Piñeyro & Ramamoorthy, 2022), mientras que a la fecha de redacción de este trabajo (agosto de 2023) una revisión del sitio web del Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV) arroja un resultado de 60 especies (ICTV, 2023). El ICTV es el responsable de definir el criterio utilizado para añadir una especie al género y establece que, para considerarse una nueva especie de *Circovirus*, debe compartir al menos un 80% de identidad de secuencia nucleotídica cuando se compara el genoma completo (Breitbart et al., 2017). La denominación de las especies de circovirus se da de acuerdo a la especie animal que infecta o en la que se detecta por primera vez, como se puede apreciar en el Anexo I.

Los integrantes del género *Circovirus* infectan una cantidad importante de animales, entre ellos varios mamíferos, incluyendo cerdos (domésticos y salvajes), chimpancés, perros, visones, humanos, murciélagos, entre otros. Además, se han identificado circovirus en aves, como el ya mencionado BFDV que infecta más de 40 especies de aves psitaciformes, y en peces (Breitbart et al., 2017). Cabe destacar que existen reportes de circovirus en otras especies, inclusive de artrópodos, como mosquitos y garrapatas, pero en esos casos se han nombrado como circovirus asociados y no se tiene certeza de que los mismos puedan desarrollar una infección en dichos invertebrados. Tampoco se ha evidenciado hasta el momento que estos artrópodos se desempeñen como vectores.

Algunos miembros del género tienen importancia veterinaria dado que afectan animales de producción. Este es el caso de algunos PCVs que infectan cerdos domésticos (*Sus scrofa domestica*) causando un grupo de patologías denominadas enfermedades asociadas a circovirus porcino (PCVAD, por sus siglas en inglés) y generando pérdidas muy importantes para la industria. Como resultado, el foco de atención se ha puesto sobre estos virus y se han estudiado considerablemente, lo que implica que gran parte del conocimiento que se tiene sobre el género *Circovirus* provenga del estudio de los circovirus porcinos.

2.3. Circovirus Porcinos (PCVs)

Hasta la fecha se han identificado cuatro circovirus cuyo hospedero principal es el cerdo y fueron nombrados secuencialmente de acuerdo con su descubrimiento. De esta manera, los circovirus porcinos son: Circovirus porcino tipo 1 (PCV1), Circovirus porcino tipo 2 (PCV2), Circovirus porcino tipo 3 (PCV3) y Circovirus porcino tipo 4 (PCV4). Estos PCVs han circulado en los cerdos domésticos por un largo periodo de tiempo (Opriessnig et al., 2020) y están ampliamente distribuidos en las poblaciones

porcinas del mundo, a excepción de PCV4, del cual se desconoce actualmente su rango de distribución.

2.3.1. PCV1

En 1974, un grupo de investigación alemán que se encontraba trabajando con células en cultivo de la línea PK-15 identificó en ellas pequeñas partículas esféricas similares a virus y las reportó inicialmente como un posible virus de ARN (Tischer et al., 1974). Estudios posteriores determinaron que esas partículas eran realmente pequeños virus con cápsides icosaédricas de 17 nm de diámetro y que dentro de ellas se encontraba una única molécula de ADN simple hebra, circular y covalentemente cerrada. Además, se denominó a este virus como “Circovirus porcino (PCV)” debido a que se encontraron anticuerpos capaces de reconocerlo únicamente en cerdos (Tischer et al., 1982). Posteriormente adoptaría el nombre de Circovirus porcino tipo 1 (PCV1).

Con el transcurso del tiempo surgieron más reportes notificando la presencia de PCV1 en diferentes regiones del mundo y se identificó al virus en cerdos domésticos y salvajes que carecían de sintomatología clínica o enfermedad, por lo que tempranamente se lo clasificó como no patogénico. Diferentes trabajos fueron aportando información al respecto, y en ellos no se podía establecer una asociación entre la infección por el virus y el desarrollo de una enfermedad. Cabe destacar que estos estudios se basaban en observaciones de campo, donde se analizaba la población de cerdos en busca de PCV1, que efectivamente se encontraba, y se registraban los síntomas clínicos de los animales, típicamente inexistentes. Un paso muy importante para el esclarecimiento de la patogénesis viral fue el aislamiento viral a partir de las células PK-15 (Tischer et al., 1982, 1987). Este hecho permitió la producción del inóculo viral utilizado en los estudios de infección experimental, claves para dilucidar el rol patogénico de PCV1, en los cuales no se observó desarrollo de síntomas clínicos (Allan et al., 1995; Tischer et al., 1986).

En la actualidad, basados en la evidencia que proviene de estudios de infección natural o experimental, PCV1 sigue considerándose como un virus no patogénico. Adicionalmente, se sabe que, a pesar de encontrarse en la mayoría de las investigaciones que tienen como objetivo la detección de este virus, su prevalencia es baja (Cao et al., 2018; Opriessnig et al., 2020; Puvanendiran et al., 2011).

2.3.2. PCV2

Circovirus porcino tipo 2 (PCV2) fue identificado por primera vez a fines del siglo XX en cerdos que padecían síndrome de desmedro multisistémico posdestete (PMWS, por sus siglas en inglés), un conjunto de síntomas que afectan a los cerdos jóvenes y que incluyen debilitamiento, palidez de la piel, dificultad respiratoria, diarrea, entre otros (Segalés & Domingo, 2002).

Inicialmente, un grupo de investigadores canadienses reportaron la detección de un circovirus porcino distinto de PCV1 en cerdos que padecían PMWS, basándose en el análisis de los patrones de restricción del ADN viral (Nayar et al., 1997). Posteriormente, en Canadá, Estados Unidos y Europa, se realizaron diferentes

trabajos en donde rápidamente se asoció a este nuevo virus denominado “virus tipo PCV” (*PCV-like virus*) con el desarrollo de síntomas clínicos compatibles con PMWS y lesiones macro y microscópicas (Allan et al., 1998; Ellis et al., 1998; Kiupel et al., 1998). En ese mismo año, Morozov y cols. consiguieron secuenciar el genoma completo de PCV1 y del virus tipo PCV, y la comparación de ambos arrojó diferencias significativas. Ambos genomas compartían tan solo el 76% de identidad nucleotídica (Morozov et al., 1998). Más adelante, este nuevo virus se denominaría PCV2.

Ya entrado el siglo XXI, la investigación sobre PCV2 continuó, el número de reportes creció, y con él, la cantidad de secuencias disponibles. Esto permitió detectar la alta diversidad genética entre las diferentes cepas del virus (Fenaux et al., 2000; Hughes & Piontkivska, 2008; Kim et al., 2009). A pesar de esto, dicha diversidad no se ve reflejada en cambios antigénicos, y de hecho, los distintos grupos filogenéticos que se forman a causa de la notable diversidad genética son indistinguibles cuando se los analiza mediante serología convencional, por lo que se los denomina “genotipos” (Opriessnig et al., 2020). Hay 8 genotipos de PCV2 (PCV2a - PCV2h) (Franz & Segalés, 2018).

Como se mencionó anteriormente, PCV2 ha sido asociado tempranamente con síndromes que afectan seriamente a las poblaciones de cerdos. Esto lo ha colocado bajo la lupa de un gran número de investigaciones en todo el mundo, convirtiéndolo en uno de los virus de cerdos más importantes, y sin lugar a dudas, el más estudiado de los circovirus porcinos.

PCV2 se encuentra ampliamente distribuido a nivel global y es detectado en una gran proporción de los cerdos testeados, lo que refleja una alta prevalencia (Patterson & Opriessnig, 2010). Dentro del universo de animales positivos para PCV2, una porción exhibe síntomas clínicos asociados con la infección, mientras que un porcentaje relativamente alto, no lo hace. Es decir, una parte de los cerdos positivos cursa una infección subclínica (Opriessnig et al., 2020). Esta es una característica notable que comparten PCV2 y, como se verá más adelante, PCV3. Sin embargo, estudios de infección experimental confirmaron el rol patogénico de PCV2 (Allan et al., 1998; Ellis et al., 1998; Kiupel et al., 1998; Morozov et al., 1998). Estos estudios fueron posibles gracias a que se obtuvo fácilmente el inóculo para llevar a cabo los ensayos mediante el aislamiento del virus, a partir de tejidos infectados de cerdos con PMWS, y su propagación en cultivos celulares. En la actualidad, PCV2 es asociado con PMWS o enfermedad sistémica, enfermedad respiratoria, síndrome de nefropatía y dermatitis porcina (PDNS, por sus siglas en inglés), y otras manifestaciones clínicas (PCVAD). Es importante destacar que todas ellas pueden ser reproducidas experimentalmente en diferentes grados (Meng, 2013; Opriessnig et al., 2007; Opriessnig & Langohr, 2013; Segalés, 2012), aunque frecuentemente en una tasa más baja que la observada en campo (Opriessnig et al., 2020).

La naturaleza patogénica de PCV2, ampliamente confirmada por diversos estudios, tiene un notorio impacto en la industria porcina, el cual se considera alto en términos económicos cuando el patógeno no está controlado (Alarcon, Rushton, & Wieland, 2013; Alarcon, Rushton, Nathues, et al., 2013). Asimismo, y como se ha mencionado con anterioridad, PCV2 es un patógeno con una amplia distribución. De hecho, se ha

detectado su presencia en una vasta cantidad de países de prácticamente todos los continentes, dónde Uruguay no es la excepción, dado que en el país existen una serie de antecedentes sobre el estudio de este circovirus porcino (Ramos et al., 2012, 2013, 2015, 2017). Es importante notar que en muchas de estas regiones se ubican las principales áreas de producción de suinos, por lo que la combinación de ambos factores (ubicuidad y rol patogénico) puede tener consecuencias sumamente negativas. A causa de esto, se han desarrollado vacunas y esquemas de vacunación para proteger a las poblaciones de cerdos de las infecciones y enfermedades ocasionadas por este virus, que han resultado ser muy eficaces (Da Silva et al., 2014).

2.3.3. PCV3

El tercer circovirus porcino descubierto, denominado previsiblemente Circovirus porcino tipo 3, fue hallado tras la secuenciación metagenómica de muestras de tejido provenientes de cerdos que presentaban una serie de patologías, incluyendo miocarditis, inflamación multisistémica (Phan et al., 2016), PDNS y fallo reproductivo (Palinski et al., 2016), y que eran negativos para PCV2 y otros patógenos porcinos.

De todos modos, se demostró que PCV3, al igual que PCV2, está presente tanto en animales enfermos como en sanos (infecciones subclínicas). Además, ambos virus comparten el encontrarse en una alta prevalencia y ampliamente distribuidos, por lo que también se puede ubicar a PCV3 en prácticamente todos los continentes, como se verá más adelante (Opriessnig et al., 2020).

De forma similar a lo ocurrido con PCV2, pero a una velocidad superior debido a una mayor accesibilidad a tecnologías de secuenciación, se acumuló un número importante de secuencias de PCV3 en las bases de datos. Esto permitió analizar diferentes características del virus, entre ellas su diversidad genética, la cual se considera baja (Opriessnig et al., 2020). A pesar de ello, distintos grupos de investigadores han propuesto variados sistemas de clasificación, basándose en diversos criterios (p. ej. utilizando la secuencia nucleotídica del genoma completo o tan solo un fragmento, o analizando la secuencia aminoacídica resultante de los ORFs, etc.) (Franzo, et al., 2020; Fux et al., 2018; Vargas-Bermudez et al., 2019). Más detalles sobre la clasificación de PCV3 se verán posteriormente, en la sección 2.4.3. Clasificación.

Por otra parte, a pesar de las primeras asociaciones generadas a raíz de las observaciones de campo, es decir, el estado de salud de los cerdos en donde se detectó el virus por primera vez, el rol de PCV3 como patógeno permanece sin esclarecerse. En varias oportunidades fue asociado con el desarrollo de fallo reproductivo, PDNS, enfermedad entérica, temblores congénitos, enfermedad inflamatoria sistémica, etc. (Opriessnig et al., 2020), pero para establecer a PCV3 como el agente etiológico responsable de estas patologías, eran necesarios estudios basados en infecciones experimentales. A diferencia de PCV1 y PCV2 que se lograron aislar y propagar casi inmediatamente después de su descubrimiento, por varios años no fue posible realizar infecciones experimentales con PCV3 porque no se contaba con el inóculo viral, a causa del fracaso en los intentos de aislar y propagar el virus en cultivos celulares (Bera et al., 2020; Faccini et al., 2017; Ha et al., 2018; Palinski et al.,

2016). De hecho, la primera estrategia fructífera para conseguir el inóculo viral fue la producción de un clon infeccioso después de quince pasajes en células PK-15 por parte de un grupo de investigadores chinos (Jiang et al., 2019). Este mismo grupo realizó la primera infección experimental con PCV3 (Jiang et al., 2019). El aislamiento viral en cultivo celular se consiguió finalmente en 2020, utilizando un cultivo primario de células de riñón y, como fuente de virus, una muestra de nódulos linfáticos de un cerdo positivo para PCV3 (infección natural) y negativo para otros PCVs (Oh & Chae, 2020). A partir de estos logros, se realizaron algunos estudios en busca de dilucidar la asociación entre la infección por PCV3 y el desarrollo de patologías. Sin embargo, su rol como patógeno permanece controversial hasta la actualidad (Opriessnig et al., 2020). Se profundizará en estos aspectos en el apartado 2.4.4. Patogénesis y relevancia.

2.3.4. PCV4

PCV4 es el miembro más reciente de los circovirus porcinos. Su primer reporte data de 2019, donde fue detectado en cerdos con diferentes condiciones de salud (sanos y con síntomas clínicos) provenientes de dos granjas ubicadas en la provincia china de Hunan (H. Zhang et al., 2020).

A este reporte desde China sólo se añade el de Corea del Sur aproximadamente un año más tarde (Nguyen et al., 2021).

Cabe destacar que en 2020 se realizó un estudio en Europa, más específicamente en España e Italia, en donde no se obtuvieron muestras positivas para PCV4 de un total de 300 muestras analizadas aproximadamente (Franzo et al., 2020).

La evidencia presente hasta la fecha invita a pensar que PCV4 podría estar confinado al continente asiático, particularmente a China y Corea del Sur (D. Wang et al., 2022), pero se necesitan más investigaciones para dilucidar si estamos, o no, ante un patrón geográfico de distribución del virus.

Todas las características mencionadas en esta sección convierten a los circovirus porcinos en un grupo sumamente interesante para investigar, dada la ubicuidad de sus miembros, sus hospederos, las patologías asociadas que generan en ellos, y por ende, su importancia para la industria porcina. A esto hay que añadirle la capacidad para infectar otras especies, diferentes de los cerdos, que pueden ser afectadas directamente por la infección viral y/o servir de reservorio o funcionar como vectores y tener consecuencias en la epidemiología de los virus y las estrategias de control que buscan mitigar su impacto. Por ejemplo, PCV2 ha demostrado ser capaz de infectar y replicar en otras especies, aunque hay resultados contradictorios acerca de si sufren, o no, lesiones como consecuencia de la infección viral (Kiupel et al., 2001; Piñeyro & Ramamoorthy, 2022). Además, existen una vasta cantidad de estudios que reportan la detección de ADN de este virus en un número importante de especies (Blunt et al., 2011; Krog et al., 2014; Pinheiro et al., 2013; Song et al., 2019; Zhai et al., 2014). Lo mismo sucede con PCV3, quién ha sido detectado en varias especies animales. Su ADN fue encontrado en el suero de vacunos (W. Wang et al., 2019), algunas especies de cánidos (J. Zhang et al., 2018), cérvidos, bóvidos (Franzo, Grassi, et al., 2019),

entre otros. Curiosamente, ha sido detectado en artrópodos como garrapatas (Franzo, Grassi, et al., 2019) y mosquitos (Ha et al., 2020), los cuales no son considerados vectores, dado que no existe evidencia hasta el momento que haga posible dicha afirmación. Adicionalmente, se ha comprobado la transmisión de PCV3 en babuinos que recibieron un xenotrasplante de corazón. Dichos órganos provenían de cerdos modificados genéticamente para oficiar como donantes y estaban infectados con PCV3 (Krüger et al., 2019). Con todo esto en cuenta, y a pesar de que aún son necesarios más estudios que lo verifiquen, parecería que la infección por estos PCVs no está limitada exclusivamente a los cerdos (Opriessnig et al., 2020).

En conjunto, todos estos factores contribuyen a definir la investigación sobre los circovirus porcinos como necesaria y relevante, para llenar los vacíos en el conocimiento que permanecen hasta el día de hoy, lograr un entendimiento lo más completo posible de este grupo, y proceder, en caso de ser necesario, con estrategias preventivas y de control.

2.4. Circovirus Porcino tipo 3

2.4.1. Historia del descubrimiento

En mayo de 2015 se sometieron al Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Universidad de Minnesota (UMN-VDL) una serie de muestras de tejido de cerdo para diagnóstico virológico y bacteriológico. Las mismas correspondían a un animal de 3 semanas de edad que presentaba una variedad de lesiones y provenía de un criadero de Missouri en donde el 2% de los animales (20/1000) exhibían síntomas clínicos, como anorexia, pérdida de peso e hinchazón de las articulaciones, en la semana posterior al destete. Previamente, un examen patológico había podido atribuir las diferentes lesiones a agentes etiológicos comunes en las poblaciones de cerdos, pero la miocarditis observada era de causa desconocida. Esto último explica la derivación de las muestras al UMN-VDL, en donde se confirmó la naturaleza bacteriana de la patología articular. Sin embargo, las lesiones inflamatorias que afectaban el tejido cardíaco y las arterias no pudieron ser atribuidas a ningún agente causal testeado mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) o inmunohistoquímica (PCV2, Influenza A, virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino o PRRSV, entre otros virus, bacterias y parásitos). Además, resultaron negativos los cultivos de bacterias aeróbicas. Esto dirigió la investigación hacia la secuenciación metagenómica viral que identificó un nuevo circovirus porcino (PCV3), de acuerdo con los criterios definidos por el ICTV, y otros tres virus de cerdo presentes en las muestras de tejido lesionado. La hibridación in situ (ISH) sobre las mismas encontró únicamente ARNm de PCV3, lo que llevó a los investigadores a pensar que el daño tisular observado se podría deber a la infección y replicación del nuevo PCV en dichos tejidos (Phan et al., 2016). A este se sumaron otros dos casos independientes de cerdos que provenían de establecimientos ubicados en Minnesota y Dakota del Sur en mayo y agosto de 2016. Los animales presentaban diferentes patologías, pero ambos padecían miocarditis causada por la infiltración de células inflamatorias. Diferentes patógenos (virus y bacterias) fueron descartados por métodos específicos como agentes causales de los cambios histopatológicos observados en estos animales. En ambos casos permanecía sin esclarecerse la etiología de la

enfermedad, por lo que se optó nuevamente por el empleo de la secuenciación metagenómica viral, la cual identificó la presencia de dos nuevas secuencias de PCV3 que compartían aproximadamente un 99% de identidad nucleotídica con la detectada inicialmente, además de dos virus ARN (Astrovirus porcino tipo 4, o PAsTV4, y virus de la encefalomiелitis porcina) (Phan et al., 2016).

Por otro lado, en junio de 2015, un brote de PDNS estaba afectando una granja productora de cerdos en Carolina del Norte, generando una serie de problemas reproductivos. Los mismos incluían un aumento del 10.2% en la tasa de mortalidad de cerdas y una disminución de la tasa de concepción de un 0.6%, ambos comparados con el promedio histórico del establecimiento. Los animales también exhibían las lesiones y signos clínicos típicos de este síndrome, incluyendo anorexia, máculas y pápulas multifocales, y dermatitis superficial. También se evidenció un aumento en la cantidad de fetos momificados paridos en cada camada (1.19 veces superior a los registros previos), los cuales mostraban los mismos signos clínicos. Para determinar la causa de lo observado en esta granja, se sometieron muestras de tejido al análisis por parte del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Universidad del Estado de Iowa. En este caso, los investigadores apuntaron directamente al testeo de patógenos virales como PCV2 y PRRSV (también Influenza A y Parvovirus porcino o PPV), dado que los cambios histopatológicos, las lesiones macroscópicas, el aumento de la mortalidad, y los problemas reproductivos están dentro de las consecuencias que tiene la infección por estos agentes. Curiosamente, todas las muestras de tejido de cerdos adultos analizadas (riñón, nódulo linfático, pulmón y piel) fueron negativas para PCV2, PRRSV e Influenza A (por PCR cuantitativa, o qPCR, e inmunohistoquímica), mientras que las muestras de fetos momificados lo fueron para PCV2, PRRSV y PPV (qPCR). De esta manera, el agente causal de las patologías no era identificado y, por lo tanto, se procedió a la secuenciación metagenómica. La misma reveló la presencia de un nuevo PCV, genéticamente divergente de los ya reportados (PCV1 y PCV2), que fue denominado PCV3. Además, se detectó por inmunohistoquímica la presencia de antígeno de PCV3 en muestras de tejidos (piel, pulmones, nódulos linfáticos) con lesiones típicas de PDNS, por lo que se asoció al nuevo virus como un posible agente etiológico de las mismas (Palinski et al., 2016).

A fines de 2016, Phan, Palinski, y sus respectivos colaboradores, publicaron, con muy pocos meses de diferencia, la primera detección de PCV3. Desde entonces, un gran número de investigadores se han dedicado a identificar al virus en diferentes países y hospederos, describir sus características, organizar las cepas reportadas, profundizar sobre su posible rol patogénico, entre otras propiedades, de las cuales algunas se puntualizan a continuación.

2.4.2. Características genómicas y morfológicas

Circovirus porcino tipo 3 comparte sus características morfológicas y genómicas generales con otros miembros del género *Circovirus*. De hecho, poseer una organización genómica común es lo que define a los géneros de la familia, pero adicionalmente se cree que todos los circovirus porcinos tienen una morfología similar (Kroeger, 2022).

Como se mencionó anteriormente en este texto, el genoma del virus se encuentra empaquetado en una pequeña cápside icosaédrica conformada por 60 subunidades de la proteína *Cap*, constituyendo así el virión de PCV3. Hasta el momento se desconocen las dimensiones de las partículas virales. La mejor aproximación sobre las dimensiones de los viriones de PCV3 es un estudio que expresó de forma recombinante la proteína *Cap* y demostró su capacidad para autoensamblarse formando *virus-like particles* (VLPs, por sus siglas en inglés). El diámetro de las VLPs obtenidas se encontró dentro del rango esperado para el género *Circovirus* (15 - 25 nm), con un promedio de 17,6 nm (Bi et al., 2020).

Adicionalmente, el análisis de estas VLPs permitió conocer que la diversidad genética de PCV3, a nivel de esta proteína, no repercute en las propiedades estructurales de la misma, ni de la cápside en general. Es decir, no habría diferencias estructurales significativas entre las cápsides de distintos subtipos de PCV3. Esto apoya las observaciones realizadas por Huang et al. acerca de que los cambios a nivel de secuencia no derivan en alteraciones importantes de la estructura ni afectan el ensamblaje de la cápside viral, sino que modifican, casi exclusivamente, las propiedades antigénicas de la misma (Huang et al., 2011; Kroeger, 2022).

Por su parte, el genoma de PCV3 consiste en una hebra de ADN circular de 2000 nt, siendo el más grande entre los 4 PCVs descritos hasta la fecha. Entre ambos ORFs se ubica la región 5'-IR que contiene el *ori*, TAGTATTAC cuyo octavo nucleótido se define, por convención, como la posición número 1 del genoma (Palinski et al., 2016; Todd et al., 2001). De este modo, el ORF1 se ubica entre las posiciones 223 y 1113 del genoma, y da lugar a una proteína de 297 aminoácidos (aa), mientras que el ORF2 lo hace entre las posiciones 1343 y 1987, originando una proteína de cápside de 214 aa (Palinski et al., 2016). Se presume que el ORF3 codificaría una proteína de función desconocida de 177 o 231 aa, dependiendo del codón de inicio que se tenga en consideración. Si se toma el codón canónico ATG, el ORF3 codificaría una proteína de 177 aa y se ubicaría entre las posiciones 62 y 593. En cambio, si se tiene en cuenta un codón no canónico (TCG), este ORF estaría ubicado entre las posiciones 1900 y 593, y originaría una proteína de 231 aa (Fux et al., 2018; Palinski et al., 2016). Cabe destacar que el uso de codones no canónicos es frecuente en estos virus, e incluso es el caso del ORF1 de PCV3, que inicia con GTC (Palinski et al., 2016), por lo que cualquiera de las dos opciones es posible. Una representación esquemática de esta organización genómica se puede apreciar en la figura 3.

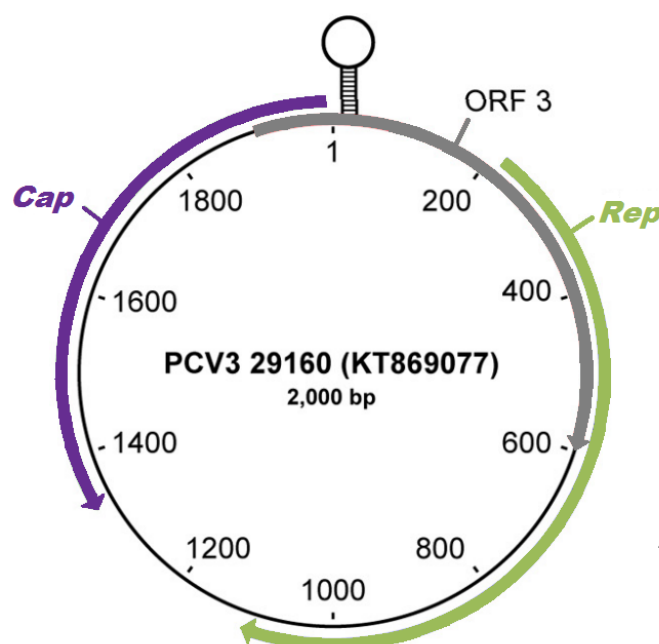


Figura 3. Organización genómica de PCV3. Se puede apreciar la organización *ambisense* de los 3 ORFs descritos para el virus, en un genoma de 2000 nt., además de la estructura *stem-loop* y su secuencia consenso. Tomado y adaptado de Palinski et al., 2016.

2.4.3. Clasificación

La diversidad genética de los PCVs es variable. Mientras que PCV2 presenta una alta diversidad, con una tasa evolutiva estimada de $1,2 \times 10^{-3}$ sustituciones/sitio/año (s/s/a) (Firth et al., 2009; Franzo et al., 2016), PCV1 y PCV3 se consideran típicamente virus de baja diversidad, con tasas evolutivas del orden de 10^{-5} s/s/a (Cortey & Segalés, 2012; Franzo et al., 2019). Sin embargo, algunos estudios estiman tasas mayores para PCV3, de $1,22 \times 10^{-4}$ s/s/a (Saraiva et al., 2018) o $1,69 \times 10^{-3}$ s/s/a (Li et al., 2018), que sugieren una mayor variabilidad en las cepas de este virus, incluso comparable a la exhibida por PCV2. Adicionalmente, se postuló que dichos cambios se acumularían mayoritariamente en el gen que codifica la proteína *Cap*, el cual estaría sometido a selección diversificadora, en comparación con el ORF1 (Franzo et al., 2019).

A pesar de no existir un consenso acerca de la variabilidad de PCV3, el estudio de su diversidad genética ha generado la aparición de diversos sistemas de clasificación propuestos por los investigadores. Dada la importancia de una clasificación taxonómica precisa y un correcto genotipado para comprender la epidemiología molecular del virus (Fux et al., 2018), se definieron criterios basándose en representaciones filogenéticas a partir de los genomas completos y/o en marcadores presentes en la secuencia nucleotídica o aminoacídica de las regiones codificantes.

En 2018, Fux y cols. detectaron la presencia de PCV3 en un conjunto de granjas alemanas y analizaron las secuencias genómicas obtenidas, junto con genomas completos reportados en otros países. El análisis filogenético, por dos métodos de inferencia distintos (*Neighbor-Joining* y *Maximum Likelihood*), mostró la presencia de dos grupos principales, denominados PCV3a y PCV3b, que presentaban a su vez algunas subdivisiones (Anexo II). Un procedimiento idéntico pero utilizando

exclusivamente la porción de secuencia correspondiente al ORF2 reflejó los mismos agrupamientos. Curiosamente, los grupos y subgrupos propuestos a causa de la topología observada en el árbol filogenético fueron sustentados por la identificación de motivos específicos en la secuencia aminoacídica de los ORFs del genoma viral. Esto motivó a los investigadores a proponer un sistema de clasificación preliminar basado en los residuos ubicados en posiciones concretas que, posteriormente, sería adoptado y ligeramente modificado por Vargas-Bermudez et al. tras haber analizado y clasificado una cantidad importante de cepas identificadas en territorio colombiano (Vargas-Bermudez et al., 2019). De esta manera, se estableció un sistema capaz de clasificar las cepas de PCV3 en donde los aminoácidos presentes en las posiciones 122 del ORF1, 24, 27, 77 y 150 del ORF2, y 1, 4 y 227 del ORF3 definen dos grupos principales, los ya mencionados PCV3a y PCV3b, cada uno con dos subdivisiones, a1 y a2, b1 y b2, respectivamente (Fux et al., 2018; Vargas-Bermudez et al., 2019).

Tabla 1. *Motivos indicadores de grupo.* Sitios y residuos de la secuencia aminoacídica de los ORFs de PCV3 que determinan la pertenencia de las cepas a un grupo determinado.

	ORF1	ORF2				ORF3		
	122	24	27	77	150	1	4	227
a1	A	V	K	S/N	I	F	D	G
a2	S	V/A	K	S	I/L	F	D/G	V
b1	S/A	A/V	R	S	I/L	S	G/D	V/G
b2	S	A	R	T	L/I	S	G	V

Extraído y adaptado de Vargas-Bermudez et al., 2019.

El carácter preliminar del sistema se debe a que la cantidad y calidad de las secuencias genómicas disponibles en las bases de datos son cruciales para establecer un sistema robusto, y se puede ver modificado al añadirse más datos desde otras investigaciones (Fux et al., 2018).

2.4.4. Patogenia y relevancia

Como se mencionó anteriormente, la obtención del inóculo viral (por aislamiento y propagación o mediante la obtención de clones infecciosos) fue clave para llevar a cabo una serie de investigaciones en busca de esclarecer el rol patogénico de PCV3 (Jiang et al., 2019; Mora-Díaz et al., 2020; Oh & Chae, 2020).

En una revisión reciente acerca de la patogénesis de este virus, Sirisereewan (2022) recopila una serie de estudios de infecciones experimentales que obtuvieron resultados interesantes sobre el rol de PCV3 en las presentaciones clínicas de los cerdos inoculados. En todos los casos, los animales fueron inoculados (únicamente con virus o con virus e inmunoestimulante) y posteriormente, siguiendo un cronograma

establecido, se registraron ciertos parámetros tales como: sintomatología, lesiones (macro y microscópicas), carga y/o replicación viral, anticuerpos contra PCV3, etc.

En uno de los casos, la infección de cerdos libres de patógenos específicos (SPF), de 4 y 8 semanas de edad, produjo síntomas clínicos en el 100% de los animales inoculados. Entre los mismos se encontraban: fiebre, estornudos, tos, diarrea, convulsiones, además de enrojecimiento de la piel, orejas, y pápulas, signos clínicos compatibles con PDNS. Adicionalmente, los cerdos presentaron lesiones macroscópicas, incluyendo adenomegalia, esplenomegalia y riñones inflamados con focos hemorrágicos, y microscópicas como miocarditis, nefritis, degeneración de células epiteliales del intestino delgado y afectación del sistema inmune (necrosis y depleción linfóide). Fue el caso más severo de los que se contemplan en este trabajo, donde incluso el 40% de los animales inoculados murieron, y los investigadores creen que dicha gravedad puede deberse, en parte, a la disminución de la respuesta inmune celular causada por la depleción linfóide en ciertos órganos del sistema, a una respuesta de anticuerpos tardía (21 días post-infección), y altos picos de viremia y un amplio tropismo celular, del cual se tienen indicios por la ubicación de antígeno viral en una variedad de tejidos mediante inmunohistoquímica (Jiang et al., 2019; Sirisereewan et al., 2022).

El otro estudio, de los recogidos por Sirisereewan, que consiguió reproducir efectivamente la enfermedad clínica fue una infección experimental realizada en cerdos de 3 semanas de edad. Todos los animales inoculados desarrollaron diarrea y presentaron lesiones macro y microscópicas, incluyendo miocarditis, nefritis y degeneración de las células epiteliales del intestino delgado, al igual que el caso mencionado anteriormente (F. Zhang et al., 2020).

Por otra parte, dos estudios fueron incapaces de reproducir sintomatología clínica en los cerdos inoculados. Es decir, los animales cursaron una infección subclínica, además de no exhibir lesiones macroscópicas. En cambio, sí se evidenció la presencia de lesiones microscópicas (miocarditis y nefritis) y viremia (Mora-Díaz et al., 2020; Temeeyasen et al., 2021). En ambos casos, la presencia de PCV3 y la ausencia de sintomatología puede deberse a diferentes factores, entre los cuales se puede destacar la incidencia de las variantes genéticas en la virulencia del virus (Sirisereewan et al., 2022). En otras palabras, diferentes cepas virales pueden generar infecciones de distinta gravedad, por lo que se resalta, nuevamente, la necesidad de caracterizar genéticamente las cepas de PCV3.

Adicionalmente, en uno de los casos se demostró un tropismo celular más reducido y, en ambos, la aparición de una respuesta temprana de anticuerpos a los 7 días post-infección (dpi) (Mora-Díaz et al., 2020; Temeeyasen et al., 2021). Una buena respuesta inmunológica podría explicar el desarrollo de una infección subclínica o de muy baja gravedad.

Recientemente (febrero de 2023), se publicó un nuevo estudio de infección experimental en cerdos SPF de 4 semanas de edad. Los animales del grupo inoculado experimentaron una reducción en el peso corporal y fiebre (40 °C en promedio), además de pérdida de apetito, depresión y diarrea en algunos casos. Sin embargo, no exhibieron signos clínicos de mayor severidad, como lesiones compatibles con PDNS u otras enfermedades graves. Una vez finalizado el estudio, el análisis de lesiones macroscópicas detectó alteraciones (hemorragia, hinchazón y/o necrosis) en hígado, bazo, pulmón y nódulos linfáticos, pero no evidenció afectación de corazón ni riñón. En

cambio, en todos esos órganos sí se detectaron lesiones microscópicas, en su mayoría vinculadas a la infiltración de líquido y células inflamatorias. En los órganos linfoides, como bazo y ganglios linfáticos, también se identificó un bajo número de linfocitos y necrosis (Deng et al., 2023). Todo esto es consistente con un síndrome inflamatorio multisistémico, como se ha reportado en observaciones de campo (Phan et al., 2016), y fue apoyado por la detección de un perfil de citoquinas pro-inflamatorias significativamente mayor en los cerdos infectados. Asimismo, se detectaron altas cargas virales en órganos como corazón, pulmones, hígado, riñón y nódulos linfáticos, mediante RT-qPCR (Deng et al., 2023).

Aunque no de forma categórica, estos estudios permitieron esclarecer, al menos en parte, la patogénesis asociada a PCV3. En todos los casos se evidenciaron lesiones microscópicas como nefritis y miocarditis de naturaleza inflamatoria y se vió que corazón y riñones parecen ser sitios importantes para la replicación viral. Por lo tanto, la infección por PCV3 afectaría a todos los cerdos, más allá de si el curso de la misma se da de manera sintomática o subclínica. Además, estos resultados son totalmente consistentes con lo observado en casos de infecciones naturales.

Muchos factores pueden contribuir al desarrollo de la enfermedad ante la infección por PCV3, y saber cuánto contribuye cada uno de ellos, e identificar algunos desconocidos, requiere de más investigaciones. Si bien el panorama general que se obtiene de los estudios de infección experimental es que la misma puede generar la aparición de enfermedad o transcurrir de forma asintomática, y que en el caso de ocasionar síntomas la entidad de los mismos es menor que en las infecciones naturales, cabe destacar que en dichos estudios la frecuencia con que se observan los cuadros clínicos es aparentemente menor que la apreciada en campo, como se ha sugerido que ocurre con PCV2 (Opriessnig et al., 2020). Esto está estrechamente relacionado con la naturaleza multifactorial de las enfermedades que afectan las poblaciones de cerdos, y no es una característica exclusiva de PCV3, ni de los PCVs, sino que es común a los diferentes patógenos que tienen a estas especies como hospederos. Entre los factores intervinientes podemos encontrar: virulencia de las cepas virales (variabilidad genética viral), títulos del inóculo, coinfecciones con otros patógenos (virus, bacterias, etc), especie y raza del hospedero (variabilidad genética del hospedero), estado inmune del animal (inmunocompetencia/inmunosupresión, inmunidad pasiva/activa, etc.), edad, colonización bacteriana (estado de la microbiota), etc. (Sirisereewan et al., 2022). Las notorias diferencias entre las condiciones en las que se producen las infecciones naturales y los estudios de laboratorio explican la variabilidad entre los resultados y observaciones, y la dificultad para establecer a PCV3 como el agente etiológico responsable de una enfermedad concreta. De todos modos, se demostró que este virus puede producir daño patológico, aunque sea leve, en múltiples órganos (Deng et al., 2023), lo que puede repercutir en la consideración del virus como agente patógeno de una especie económicamente relevante como *Sus scrofa domestica*.

Por otra parte, se desconoce el rol de PCV3 como agente causal de enfermedad en otros hospederos en los que ha sido detectado. Se ha identificado viremia en especies domésticas como bovinos y cánidos, sin desarrollo de enfermedad clínica (Kroeger, 2022). Entre las especies de hospederos salvajes, los cerdos ferales cobran particular relevancia. Desde los primeros reportes se ha advertido que estos animales podrían

funcionar como un reservorio natural muy importante para PCV3, y sus poblaciones han demostrado tener prevalencias más altas que las de animales domésticos (23 a 61,5%) (Kroeger, 2022). Esto hace relevante el estudio de la presencia del virus en dichos animales. En Uruguay, el jabalí está ampliamente distribuido, es una especie exótica invasora y declarada plaga nacional (Decreto 463/982), y sus poblaciones frecuentemente toman contacto con las de cerdos domésticos, por lo que sería factible la transmisión entre especies. En este sentido, es importante conocer el estado de la circulación de PCV3 en dichos animales salvajes para acercarnos al entendimiento de la epidemiología viral. Se necesitan más estudios que indaguen acerca de cómo la infección afecta a estos cerdos.

2.4.5. Evolución de los reportes de detección de PCV3 en el mundo

La posible asociación de PCV3 con diferentes enfermedades que afectan a animales de producción como los suinos, ya sea por su estrecho relacionamiento con un patógeno porcino comprobado e importante como PCV2, o por su detección en cerdos afectados con lesiones de etiología desconocida, impulsó la búsqueda de PCV3 por parte de investigadores de varias regiones, muchas de ellas implicadas fuertemente en la industria porcina. De este modo, desde los reportes iniciales a fines de 2016 (Palinski et al., 2016; Phan et al., 2016), PCV3 ha sido detectado en más de 35 países y en prácticamente todos los continentes (Figura 4), ya sea en *Sus scrofa domestica*, cerdos salvajes, u otras especies, como se ha mencionado anteriormente. En Sudamérica, fue primeramente reportado en Brasil (Tochetto et al., 2017), seguido por Colombia (Vargas-Bermudez et al., 2019) y Argentina (Serena et al., 2021). Adicionalmente, existe un *preprint* que reportaría la detección de PCV3 en Chile en el año 2020 (Rubilar et al., 2020).

En 2019 se inició la investigación sobre PCV3 en Uruguay en la Sección Virología de Facultad de Ciencias (Udelar) bajo la hipótesis de detectar efectivamente este virus en nuestro país, dado su carácter ubicuo, la presencia de sus hospederos naturales y los antecedentes del laboratorio en la detección del relacionado PCV2 (Ramos et al., 2012, 2013, 2015, 2017).

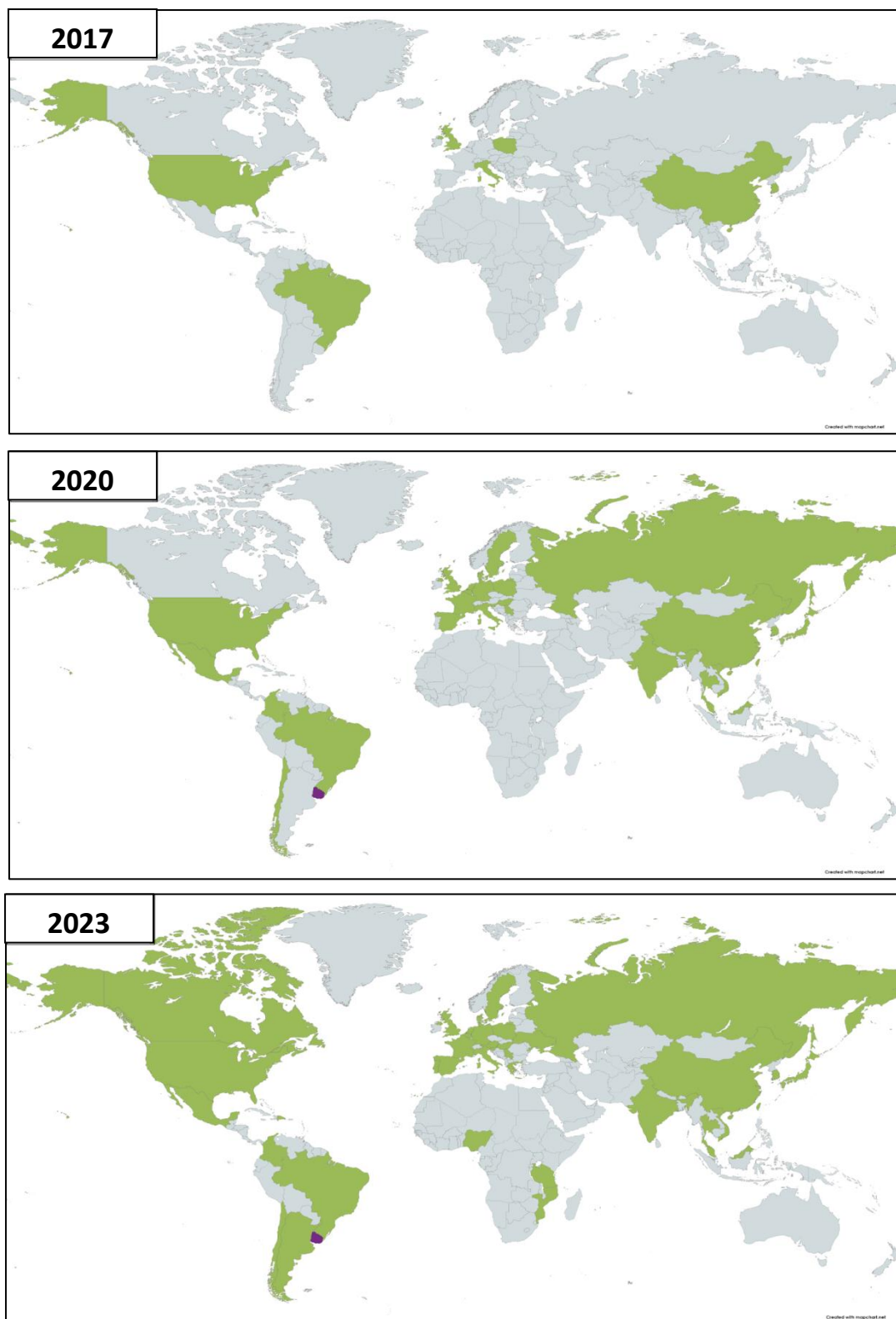


Figura 4. Evolución temporal de los reportes de PCV3 a nivel global. Representación gráfica de la evolución temporal trienal de los reportes de PCV3 en el mundo, desde su primera detección hasta la fecha. En verde: Países que han notificado al menos una detección de PCV3. Además, se destaca el comienzo de la investigación sobre PCV3 en Uruguay (violeta).

3. Objetivos

3.1. Objetivo general:

Este trabajo tiene como objetivo detectar y caracterizar genéticamente las cepas de PCV3 presentes en muestras de cerdos domésticos y jabalíes provenientes de diferentes regiones del Uruguay.

3.2. Objetivos específicos:

- Poner a punto una técnica basada en PCR convencional para la detección molecular de PCV3.
- Implementar dicha herramienta para identificar, por primera vez en Uruguay, la presencia del virus en muestras de cerdos y jabalíes.
- Optimizar protocolos basados en *Nested-PCR* (o PCR anidada) y PCR en tiempo final para la amplificación de diferentes regiones genómicas del virus
- Caracterizar genéticamente los virus detectados en las muestras analizadas mediante dos abordajes: análisis de los motivos indicadores de grupo presentes en la secuencia aminoacídica y análisis filogenéticos basados en las secuencias nucleotídicas obtenidas.

4. Materiales y métodos

4.1. Muestras analizadas

Para este estudio se procesaron un total 54 muestras de suero o tejido provenientes de animales de distintas regiones del país y que presentaban, o no, sintomatología compatible con las PCVAD. Cuarenta y ocho de ellas eran muestras de cerdo procedentes de diferentes establecimientos (granjas, frigoríficos, etc.), recolectadas en el periodo 2010-2017, de las cuales 45 derivan del trabajo de Ramos et al. (2017). Adicionalmente, se incluyeron 2 muestras de 2016 y 1 de 2017. Cabe destacar que el proceso de muestreo no fue aleatorio. El criterio de inclusión de la mayoría de las muestras para este análisis fue la presencia de signos clínicos sospechosos de la infección por PCV3.

Por otra parte, las 6 muestras restantes provienen también del estudio realizado por Ramos et al. (2017) y corresponden a muestras de jabalí del periodo 2011-2012.

Gran parte de las muestras analizadas corresponden a muestras de archivo de la Sección Virología (Fcién, Udelar), para las cuales ya se contaba con la extracción de

ADN, mientras que para una pequeña fracción del conjunto de muestras, se realizó la extracción pertinente.

4.2. Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN de las muestras de suero a analizar para su empleo como molde en los protocolos de detección y caracterización molecular. El material genético fue extraído utilizando un kit comercial (*Quick-DNA/RNA™ Viral Kit de Zymo Research*), siguiendo las indicaciones del fabricante.

4.3. Detección de PCV3

Se optimizó un protocolo para la detección molecular de PCV3 basado en PCR convencional (punto final) capaz de amplificar un fragmento conservado del ORF2 de 135 pb, ubicado entre las posiciones 1427 y 1561 del genoma viral. Para ello se empleó un juego de *primers* (Anexo III) reportado por Palinski et al. (2016), al cual denominamos PCV3DetF (*forward*) y PCV3DetR (*reverse*). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ L, por lo que a cada tubo se le añadió: 2 μ L de *Taq Buffer* 10X con KCl (Thermo Scientific™), 1.6 μ L de $MgCl_2$ 25 mM, 0.4 μ L de dNTPs 10 mM, 0.8 μ L de PCV3DetF 10 μ M, 0.8 μ L de PCV3DetR 10 μ M, 0.12 μ L de *Taq DNA Polymerase* (Thermo Scientific™) 5 U/ μ L, 10.28 μ L de agua ultra pura para PCR y 4 μ L de ADN molde de la muestra correspondiente.

Se adaptó el ciclado reportado por Palinski et al. (2016) resultando en: 5 min de desnaturalización inicial a 95°C, seguidos por 45 ciclos de desnaturalización, *annealing* y extensión, a 95°C (30 s), 60°C (30 s) y 72°C (30 s) respectivamente, y una extensión final a 72°C por 10 min. En el ensayo se implementaron dos controles: un control positivo (muestra positiva para PCV3 confirmada por secuenciación y análisis de secuencia), que permita verificar el correcto funcionamiento de la reacción, y un control negativo (reemplazo del volumen de ADN molde por agua ultra pura para PCR), que permita descartar la contaminación y atribuir los resultados positivos a la presencia de ADN molde viral en la muestra analizada. Posteriormente, los productos de PCR fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa (1,5%). Para la visualización de los fragmentos amplificados se utilizó el intercalante *SYBR™ Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen | Thermo Fisher Scientific™) y el marcador de peso molecular (MPM) *GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder* (Thermo Scientific™). Para confirmar que dicho amplicón correspondía efectivamente al fragmento genómico de PCV3, se enviaron a purificar y secuenciar los productos de PCR a Macrogen (Corea del Sur). Las secuencias obtenidas se analizaron utilizando la herramienta BLAST® (*Basic Local Alignment Search Tool*).

4.4. Caracterización genética de PCV3

4.4.1. Amplificación de Cap y ORF1-3 por PCR

Las muestras positivas para PCV3 fueron posteriormente sometidas a dos protocolos basados en PCR con el objetivo de obtener la información genética necesaria para caracterizar las cepas detectadas en Uruguay.

El primero de ellos consistió en una *Nested-PCR* capaz de amplificar, casi por completo, el gen *Cap* en la primera ronda, mediante la utilización del juego de cebadores CAPEF y CAPER reportados por Ku et al. (2017) (Anexo III). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL, por lo que a cada tubo se le añadió: 2 µL de *Taq Buffer* 10X con KCl (Thermo Scientific™), 1.6 µL de MgCl₂ 25 mM, 0.4 µL de dNTPs 10 mM, 0.8 µL de CAPEF 10 µM, 0.8 µL de CAPER 10 µM, 0.12 µL de *Taq DNA Polymerase* (Thermo Scientific™) 5 U/µL, 10.28 µL de agua ultra pura para PCR y 4 µL de ADN de la muestra positiva correspondiente. El ciclado consistió en: 5 min de desnaturalización inicial a 94 °C, seguidos por 35 ciclos de desnaturalización, *annealing* y extensión, a 94 °C (30 s), 48 °C (45 s) y 72 °C (45 s) respectivamente, y una extensión final a 72 °C por 10 min.

El producto de este *round* es un fragmento de 649 pb ubicado entre las posiciones 1343 y 1982 del genoma.

La segunda ronda estaba dirigida a amplificar un fragmento de 329 pb anidado dentro del producto anterior, empleando el juego de *primers* CAPIF y CAPIR previamente reportado por Palinski et al. (2016) (Anexo III). Nuevamente, la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL, por lo que a cada tubo se le añadieron los mismos reactivos en idénticos volúmenes que en el primer *round*, con las salvedades de utilizar en este caso los cebadores CAPIF y CAPIR y 4 µL de una dilución 1/5 del producto de PCR de la ronda anterior como molde. El ciclado consistió en: 5 min de desnaturalización inicial a 94 °C, seguidos por 35 ciclos de desnaturalización, *annealing* y extensión, a 94 °C (30 s), 53 °C (30 s) y 72 °C (30 s) respectivamente, y una extensión final a 72 °C por 10 min.

Con fines prácticos, en el resto del documento estos fragmentos se nombraron como: Cápside Completa (C) y Cápside Parcial (P), respectivamente.

Por otra parte, se optimizó otro ensayo basado en PCR, esta vez PCR en punto final, para la amplificación de un fragmento de 854 pb que contiene gran parte del ORF1 (*Rep*) y una porción del ORF3, ubicado entre las posiciones 74 y 927. Para ello se utilizó el juego de cebadores ORF1-3F y ORF1-3R reportado por Palinski et al. (2016) (Anexo III). La preparación de los tubos fue idéntica a la realizada en la primera ronda de amplificación del gen *Cap*, excepto por la utilización en este caso de los cebadores ORF1-3F y ORF1-3R. El ciclado empleado consistió en: 5 min de desnaturalización inicial a 94 °C, seguidos por 40 ciclos de desnaturalización, *annealing* y extensión, a 94 °C (35 s), 50 °C (35 s) y 72 °C (75 s) respectivamente, y una extensión final a 72 °C por 10 min.

Los productos de PCR de estos protocolos se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa, de características similares a la realizada en el ensayo de detección, que permitiría identificar las muestras en las que resultaron exitosos. Los amplicones obtenidos fueron enviados a purificar y secuenciar a MacroGen (Corea del Sur).

4.4.2. Análisis de secuencias

Una vez recibidos los cromatogramas provistos por Macrogen, se analizaron detenidamente para obtener la secuencia nucleotídica de los productos de PCR, la cual se empleó para la caracterización de las cepas virales. El *software* utilizado fue *BioEdit Sequence Alignment Editor* (BioEdit) en su versión 7.0.0.

4.4.2.1. Análisis de secuencia aminoacídica

Para la caracterización de las cepas basada en los motivos presentes en la secuencia aminoacídica (Fux et al., 2018; Vargas-Bermudez et al., 2019), se alinearon las secuencias nucleotídicas en MEGA 6.0. utilizando *ClustalW* y se tradujeron a aminoácidos respetando el marco abierto de lectura. Posteriormente, se visualizaron las posiciones de interés y se registraron los aminoácidos presentes.

4.4.2.2. Análisis de secuencia nucleotídica y construcción de filogenia

A partir de las secuencias nucleotídicas obtenidas, se realizó, empleando el programa MEGA 6.0. (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*), la construcción de árboles filogenéticos que representan las relaciones entre los virus detectados y cepas de referencia provenientes de distintos países, cuyas secuencias se encuentran disponibles en *GenBank*. El alineamiento de las mismas se llevó a cabo mediante *ClustalW* (en MEGA 6.0.). Con el objetivo de identificar si la clasificación mediante los motivos presentes en la secuencia aminoacídica se veía reflejada en las representaciones filogenéticas, se incluyeron cepas previamente asignadas a los diferentes subgrupos de PCV3, reportadas en los trabajos de Fux et al. (2018) y Vargas-Bermúdez et al. (2019).

Las representaciones filogenéticas se construyeron bajo los métodos de inferencia filogenética *Maximum Likelihood* o *Neighbor-Joining* y los modelos evolutivos *Kimura 2-parameter* y *p-distance*, respectivamente.

Adicionalmente, se construyeron las matrices de identidad que permiten conocer la similitud a nivel de secuencia nucleotídica de las cepas uruguayas entre sí, y con cepas detectadas en otros países. Para ello se utilizó el *software* BioEdit y secuencias de referencia extraídas de *GenBank*.

5. Resultados

5.1. Detección molecular de PCV3

Se consiguió efectivamente poner a punto un ensayo basado en PCR convencional para la detección molecular de PCV3, a partir del ADN molde extraído de muestras de suero y tejido de cerdos domésticos y jabalíes. Cabe resaltar que no se contaba con un control positivo para esta optimización, sino que se procesaron muestras hasta lograr identificar una muestra positiva (PCV3+), mediante la observación de un

amplicón del tamaño esperado (135 pb) (Figura 5) y posterior confirmación de la secuencia obtenida. Una vez optimizada la herramienta, se analizaron un total de 54 muestras.

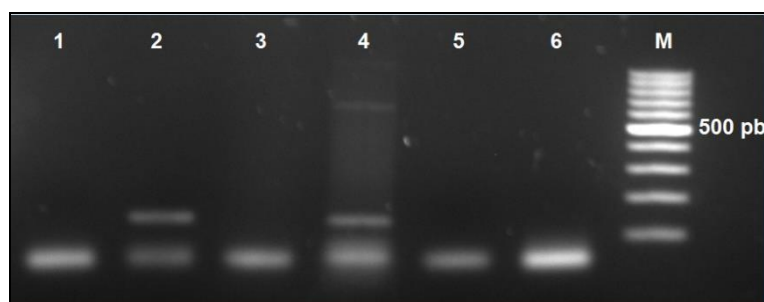


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa - Detección molecular de PCV3. Se observa el amplicón de 135 pb correspondiente al fragmento del ORF2. En los carriles: 1) URU-014, 2) URU-002, 3) URU-017, 4) URU-008, 5) URU-013, 6) C [-], M) GeneRuler 100 pb DNA Ladder.

Los resultados del procesamiento de las mismas dieron lugar a la primera detección del nuevo circovirus porcino PCV3 en Uruguay, tanto en cerdos domésticos como en salvajes (jabalíes). Se identificó la presencia del virus en el 18,52% de las muestras procesadas (10/54).

Se procesaron un total de 48 muestras de cerdo doméstico, de las cuales resultaron positivas un 16,67% (8/48). Se detectó la presencia de PCV3 en muestras de cerdos de diferentes edades (lechones, madres, padrillos y animales de engorde), que presentaban, o no, sintomatología clínica. El 75% de los cerdos PCV3+ mostraban algún tipo de síntoma (6/8). De estos 6 casos, 3 corresponden a madres que habían experimentado abortos y provenían de diferentes establecimientos (URU-003, URU-004 y URU-005). A su vez, URU-003 y URU-005 estaban infectadas también con PCV2 (Ramos et al., 2017), reconocido patógeno vinculado a problemas reproductivos. Adicionalmente, PCV3 fue identificado en 3 lechones de criaderos distintos (URU-006, URU-007 y URU-008). Dos de ellos, URU-007 y URU-008, exhibían síntomas respiratorios y desmedro, este último coinfectado con PCV2 (Ramos et al., 2017). El tercer animal, URU-006, presentaba diarrea.

Como se puede observar en la figura 6, las muestras de cerdo doméstico PCV3+ provenían de criaderos ubicados en los departamentos de Canelones, Durazno, Soriano y Montevideo.

Todas estas características de las muestras positivas, y otras adicionales, se detallan en la tabla 2.

Por otra parte, 2 de las 6 muestras de jabalíes resultaron positivas para PCV3 (33,33%) (Tabla 2). Tanto URU-009 como URU-010 provenían del departamento de Maldonado (Figura 6) y son ambas positivas para PCV2 (Ramos et al., 2017) (Tabla 2).

Tabla 2. Muestras positivas para PCV3. Se detalla la categoría del animal, año de recolección, departamento de origen, evaluación clínica, coinfección con PCV2, región del genoma obtenida para cada muestra.

Nombre de la muestra	Origen de la muestra	Año de recolección	Departamento de origen	Sintomatología	Cápside Completa o Parcial (C/P)	ORF1-3	PCV2 por <i>Nested-PCR</i> ^a
URU-001	Padrillo	2010	Soriano	Asintomático	C	+	-
URU-002	Engorde	2013	Canelones	Sin evaluar (frigorífico)	*		+
URU-003	Madre	2013	Durazno	Abortos	P		+
URU-004	Madre	2013	Canelones	Abortos	P		-
URU-005	Madre	2013	Canelones	Abortos	C	+	+
URU-006	Lechón	2013	Montevideo	Diarrea	*	+	-
URU-007	Lechón	2013	Canelones	Síntomas respiratorios, desmedro	P		-
URU-008	Lechón	2013	Canelones	Síntomas respiratorios, desmedro	P		+
URU-009	Jabalí	2011	Maldonado	--	P		+
URU-010	Jabalí	2012	Maldonado	--	P		+

* Solo detectado con PCR de detección (135).

a. Datos extraídos de Ramos et al. (2017).

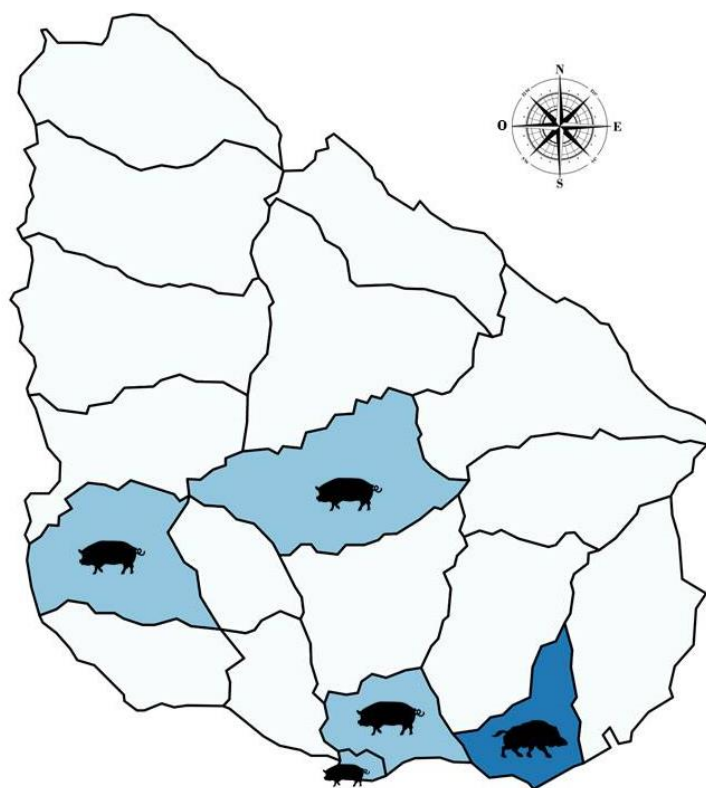


Figura 6. Distribución de las muestras positivas en Uruguay. Departamentos en donde se identificaron muestras positivas para PCV3.

5.2. Caracterización molecular de PCV3

Se logró poner a punto un protocolo para la caracterización molecular de los virus detectados amplificando fragmentos del genoma viral por *Nested-PCR* y PCR convencional, y analizando su secuencia nucleotídica y aminoacídica. Mediante el mismo se consiguió obtener la información genética, de al menos una región del genoma (ORF2 u ORF1-3), para 9 de las 10 muestras positivas (Tabla 2).

Por medio del ensayo basado en *Nested-PCR* se obtuvo exitosamente la secuencia nucleotídica del gen Cap en 8 de las 10 muestras positivas para PCV3 (80%), siendo 2 de ellas secuencias completas de 648 pb (URU-001 y URU-005), provenientes del primer round de PCR (Figura 7), y las 6 restantes secuencias parciales (329 pb), producto de la segunda ronda de amplificación (Figura 8). Del 20% restante (2 muestras de cerdo) sólo se obtuvo la secuencia de cápside correspondiente al fragmento de detección (Tabla 2).

Por otro lado, se logró amplificar la porción genómica de 853 pb (ORF1-3) mediante PCR convencional (Figura 9) y se obtuvo la secuencia nucleotídica del fragmento para 3 de las cepas detectadas (URU-001, URU-005 y URU-006), correspondiendo todas ellas a muestras de cerdo (Tabla 2).

Como se puede apreciar en la tabla 2, para 2 muestras se obtuvo la secuencia de ambas regiones genómicas (ORF2 y ORF1-3), por lo que se conoce, aproximadamente, el 75% del genoma viral de las mismas (URU-001 y URU-005).

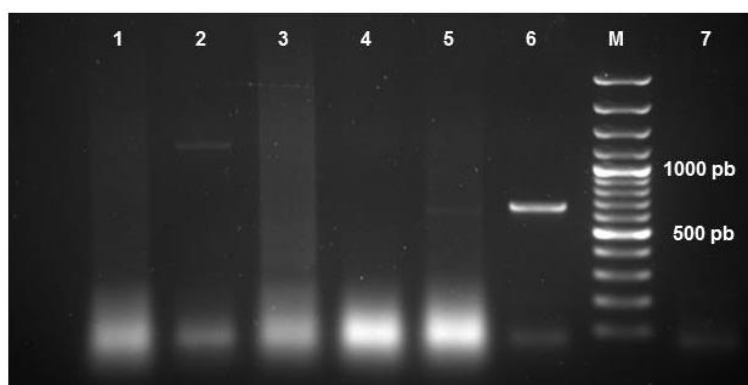


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa - Caracterización molecular de PCV3 (ORF2). Se observa el amplicón de 648 pb correspondiente al ORF2 completo resultante del primer round de la *Nested-PCR*. En los carriles: 1) URU-010, 2) URU-002, 3) URU-003, 4) URU-004, 5) URU-007, 6) URU-001, 7) C [-], M) GeneRuler 100 pb plus DNA Ladder.

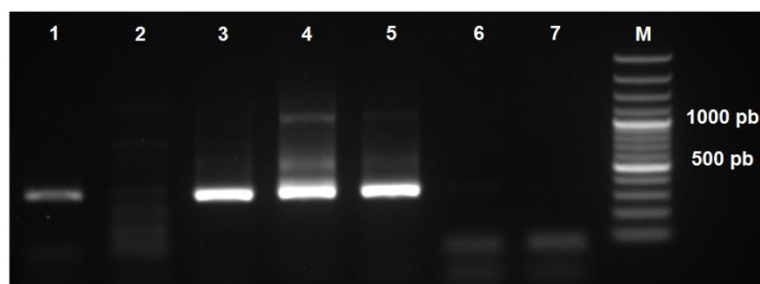


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa - Caracterización molecular de PCV3 (ORF2). Se observa el amplicón de 329 pb correspondiente al fragmento parcial del ORF2 resultante del segundo *round* de la *Nested-PCR*. En los carriles: 1) URU-010, 2) URU-002, 3) URU-003, 4) URU-001, 5) URU-007, 6) URU-006, 7) C [-], M) GeneRuler 100 pb plus DNA Ladder.

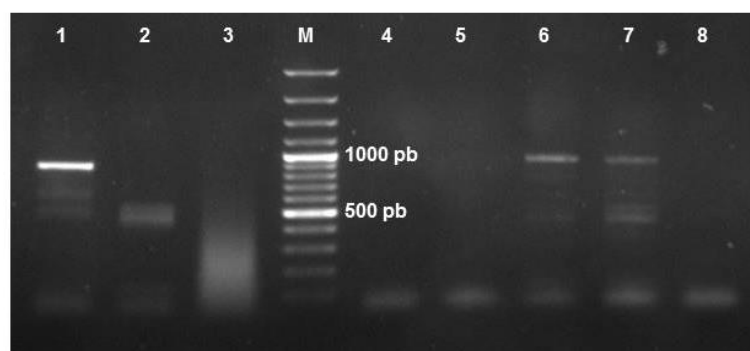


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa - Caracterización molecular de PCV3 (ORF1-3). Se observa el amplicón de 853 pb correspondiente a la región denominada ORF1-3. En los carriles: 1) URU-001, 2) URU-003, 3) URU-004, M) GeneRuler 100 pb plus DNA Ladder, 4) URU-007, 5) URU-008, 6) URU-005, 7) URU-006, 8) C [-].

5.2.1. Caracterización basada en la secuencia aminoacídica

Se logró caracterizar 8 de las 10 muestras positivas para PCV3, en base a los motivos presentes en la secuencia aminoacídica planteados por Fux et al. (2018) y Vargas-Bermúdez et al. (2019).

De esta manera, se identificaron cepas de ambos grupos de PCV3 en Uruguay, detectándose una única muestra correspondiente a PCV3a y 7 pertenecientes al grupo PCV3b (Tabla 3). De las dos muestras positivas restantes (URU-002 y URU-006), no se pudo determinar el grupo, dado que no se obtuvieron las porciones de secuencia que contienen los sitios informativos para su clasificación. En el caso de URU-002 se obtuvo únicamente la secuencia del fragmento correspondiente a la detección molecular, mientras que para URU-006 sólo se pudieron conocer algunas posiciones de la región denominada ORF1-3 que no definen a qué grupo pertenece (Tabla 3). Curiosamente, mientras que el total de cepas caracterizadas a partir de muestras de cerdo (6) pertenecen todas al mismo grupo (PCV3b), las 2 únicas cepas halladas en

muestras de jabalí pertenecen a grupos distintos, URU-010 a PCV3a y URU-009 a PCV3b.

A nivel de subgrupos, 6 de las 7 cepas PCV3b son del subgrupo b1 (URU-001, URU-003, URU-005, URU-007, URU-008 y URU-009), mientras que URU-004, resultó ser la única representante del subgrupo PCV3b2 (Tabla 3). En relación a URU-010, perteneciente al grupo PCV3a, no se logró determinar su subgrupo dado que las posiciones a las que pudimos acceder mediante la secuencia obtenida no permiten clasificarla a dicho nivel.

Tabla 3. Motivos indicadores de grupo y clasificación de las cepas uruguayas. Clasificación de las cepas uruguayas de PCV3 según indicadores en la secuencia de aminoácidos de cada ORF.

		ORF 1	ORF 2				ORF 3		
		122	24	27	77	150	1	4	227
PCV3a	a1	A	V	K	S/N	I	F	D	G
	a2	S	V/A	K	S	I/L	F	D/G	V
PCV3b	b1	S/A	A/V	R	S	I/L	S	G/D	V/G
	b2	S	A	R	T	L/I	S	G	V
Cepas uruguayas									
URU-001		S	A	R	S	I	-	-	V
URU-003		-	-	R	S	-	-	-	-
URU-004		-	-	R	T	-	-	-	-
URU-005		S	A	R	S	I	-	-	V
URU-006		S	-	-	-	-	-	-	V
URU-007		-	-	R	S	-	-	-	-
URU-008		-	-	R	S	-	-	-	-
URU-009		-	-	R	S	-	-	-	-
URU-010		-	-	K	S	-	-	-	-

A: Alanina, D: Ácido aspártico, F: Fenilalanina, G: Glicina, I: Isoleucina, K: Lisina, L: Leucina, N: Asparagina, R: Arginina, S: Serina, T: Treonina, V: Valina, [-] : sin información.

5.2.2. Caracterización basada en análisis de secuencia nucleotídica

5.2.2.1 Árboles filogenéticos

Las secuencias obtenidas se utilizaron para la construcción de árboles filogenéticos que representen las relaciones entre las cepas detectadas en este trabajo y las secuencias de referencia reportadas en otros países con las que comparten un alto porcentaje de identidad nucleotídica, y que en algunos casos se encuentran caracterizadas a nivel aminoacídico.

En la figura 10 se muestra el árbol filogenético construido a partir de la secuencia parcial del ORF2 de PCV3. En la parte superior del mismo podemos observar la cepa URU-010 agrupando exclusivamente con cepas extranjeras, de las cuales dos han sido categorizadas como PCV3a (MH327784 y MH327785) por Vargas-Bermudez et al. (2019). Por debajo se aprecia el grupo que conforman las cepas uruguayas URU-

001, URU-004 y URU-009 con cepas provenientes de diferentes países, entre las cuales se encuentra la cepa brasileña MF079253, representante del grupo PCV3b (Fux et al., 2018). Cabe destacar que ambos agrupamientos carecen de un soporte estadístico adecuado, el mismo se ubica por debajo del 50%. En otro de los *clusters* observados, se aprecia a las cepas URU-005, URU-007 y URU-008 junto con cepas extranjeras, dentro de las cuales se encuentra MF805723, una cepa danesa clasificada como PCV3b por Vargas-Bermudez et al. (2019). En este caso, el soporte estadístico es de apenas 50%. El agrupamiento restante es el compuesto por la cepa uruguaya URU-003 y dos españolas (MH579744 y MW167066). Este pequeño grupo tiene la particularidad de poseer un soporte estadístico muy fuerte (95% de *bootstrap*) y se encuentra separado de los demás agrupamientos. Como se verá a continuación en los resultados del análisis de identidad de secuencia, URU-003 es la cepa uruguaya más divergente, y esto explicaría la disposición observada en el árbol, junto con las cepas extranjeras más similares a ella.

La ausencia de dos grupos monofiléticos claros, que se correspondan con los planteados según la clasificación basada en los motivos aminoacídicos, y la falta de un soporte estadístico robusto para los agrupamientos observados, motivó la construcción de otra representación utilizando un método de inferencia filogenética diferente y otro modelo evolutivo. Fueron seleccionados *Neighbor-Joining* y *p-distance*, respectivamente, dado que son comúnmente utilizados para la construcción de filogenias de otros PCVs, como PCV2. Además, fueron empleados por Fux et al. (2018) y Vargas-Bermudez et al. (2019) en sus estudios sobre PCV3, dos trabajos de referencia para la presente investigación. En el árbol resultante (Anexo IV) no se observaron cambios sustanciales. Si bien se aprecian algunas diferencias topológicas, el soporte estadístico de las mismas tampoco es significativo, por lo que podrían deberse al azar. En este caso, tampoco se aprecia una división clara que represente los grupos definidos según la secuencia de aminoácidos y sustentada por un soporte estadístico fuerte.

Debido a que una mayor información del genoma viral podría contribuir a una mejor representación filogenética, se construyó un árbol con las cepas uruguayas para las cuales se cuenta con la secuencia nucleotídica completa del ORF2 y la porción denominada ORF1-3 (URU-001 y URU-005). Además se incluyeron cepas de referencia disponibles en GenBank, previamente caracterizadas en base a sus motivos aminoacídicos, representantes de los grupos de PCV3 planteados por Fux et al. (2018) y Vargas-Bermudez et al. (2019). Utilizando los mismos métodos y modelos que en la reconstrucción anterior, se obtuvo el árbol de la figura 11, en donde se aprecian dos agrupamientos claros. El *cluster* superior lo componen exclusivamente cepas del grupo PCV3a. En él no se aprecia la presencia de ninguna cepa uruguaya, dado que no se pudo obtener la secuencia del ORF2 completo ni la porción ORF1-3 para la única representante nacional de este grupo (URU-010). En el *cluster* inferior se ubican cepas PCV3b extranjeras y, consistentemente, URU-005, cepa uruguaya caracterizada como integrante de este grupo en el presente trabajo. La cepa, URU-001, se presenta separada del “*cluster* b”, grupo al cual pertenecería (Tabla 3). De todos modos, estaría relacionada de manera más cercana con este último que con el agrupamiento compuesto por las cepas PCV3a. Por otra parte, es importante señalar

que incluir más información genética no logró mejorar el soporte de los nodos de ambos grupos, los cuales permanecieron presentando valores por debajo del 50%.

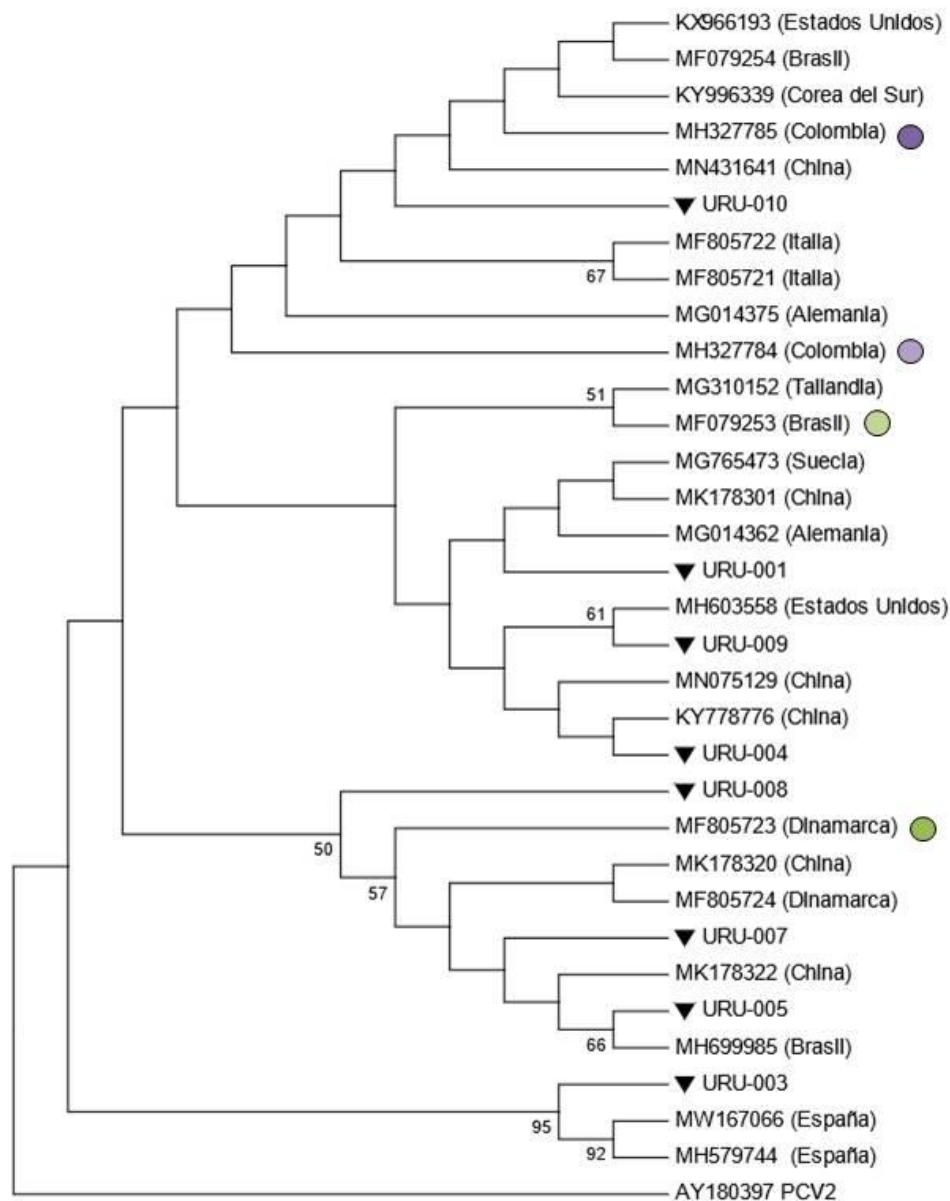


Figura 10. Árbol filogenético basado en la secuencia parcial del ORF2 (329 pb) de PCV3. Árbol filogenético realizado mediante máxima verosimilitud (*Maximum Likelihood*), modelo evolutivo Kimura 2-parámetros (K2) y 1000 réplicas de *bootstrap*. Se muestra el valor de *bootstrap* en los casos donde sea mayor o igual al 50%. Se pueden apreciar las cepas uruguayas de PCV3, marcadas con un triángulo, y cepas de referencia extraídas de GenBank con su número de acceso y país de origen. Además, se incluyó una secuencia de PCV2 como grupo externo. En violeta oscuro: PCV3a1, en violeta claro: PCV3a2, en verde oscuro: PCV3b1 y en verde claro: PCV3b2.

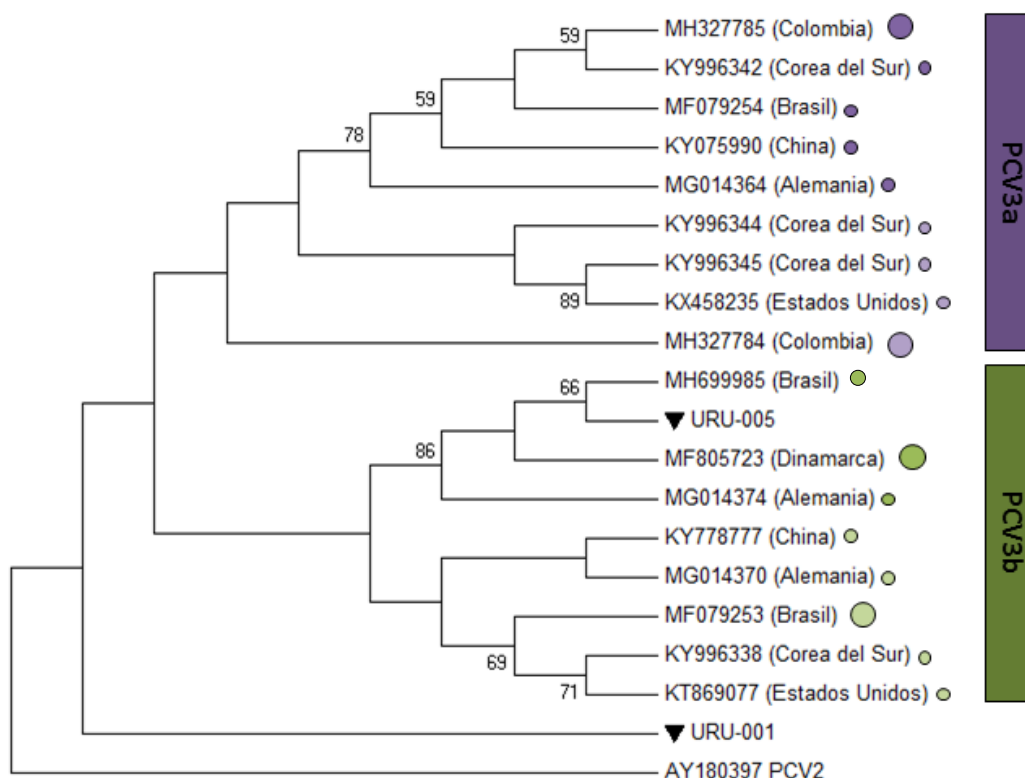


Figura 11. Árbol filogenético basado en la secuencia completa del ORF2 y la región ORF1-3 de PCV3. Árbol filogenético realizado mediante máxima verosimilitud (*Maximum Likelihood*), modelo evolutivo K2 y 1000 réplicas de *bootstrap*. El valor de *bootstrap* se muestra en los casos donde sea mayor o igual al 50%. Se observan las cepas uruguayas, marcadas con un triángulo, y cepas extranjeras de referencia, previamente caracterizadas, extraídas de GenBank, con su número de acceso y país de origen. Con círculos de colores se indica el subgrupo de PCV3. En violeta oscuro: PCV3a1, en violeta claro: PCV3a2, en verde oscuro: PCV3b1 y en verde claro: PCV3b2. Además, se incluyó una secuencia de PCV2 como grupo externo.

5.2.2.2 Matrices de identidad

A nivel del gen *Cap* (parcial), el análisis de identidad de secuencia nucleotídica (ID) entre las cepas uruguayas arrojó que el rango de la misma se ubica entre 95,5% y 99,6%. Las muestras URU-005 y URU-007 poseen las secuencias más parecidas, con un 99,6 % de ID, seguidas por URU-007 y URU-008 con un 99,3%. Por otro lado, URU-003 y URU-004 son las cepas más diferentes entre sí, con un 95,5%. Además, URU-003 es la cepa uruguaya más divergente. Es decir, cuando se analiza cuán parecida es cada cepa nacional respecto a sus pares, esta es la que presenta el valor de ID más bajo en todos los casos (95,5% - 96,5%).

Por otra parte, el análisis entre las cepas uruguayas y las reportadas en otros países permitió identificar que, URU-003 es la que exhibe la menor ID con su cepa de referencia más parecida (98,9%), mientras que las restantes comparten entre el 99,3% y el 100% de ID. Un ejemplo de esto son las secuencias de URU-005 y URU-007, que

comparten el 100% de identidad con las cepas brasileñas MH699985 y MN651454, respectivamente.

A nivel del ORF1-3, la ID entre las 3 secuencias obtenidas de esta porción genómica a partir de muestras uruguayas fue, en todos los casos, mayor al 99,0%. El rango de ID observado fue de 99,0% - 99,5%, siendo el extremo inferior el valor entre las cepas URU-001 y URU-005, y el superior entre la ya mencionada URU-005 y URU-006.

Respecto a la comparación con secuencias de referencia, provenientes de otros estudios, la identidad de secuencia nucleotídica se ubicó entre el 99,3% y el 99,8%. El extremo superior del rango surge de comparar la cepa URU-006 con la extranjera MN507536 (Taiwán), y el inferior de comparar esta última con URU-001.

6. Discusión

La optimización exitosa de un protocolo de detección molecular basado en PCR convencional permitió detectar la presencia del virus en muestras de suero y tejido de cerdos y jabalíes provenientes de diferentes regiones del territorio nacional. Partiendo de extracciones de ADN de las muestras a analizar, y mediante un ensayo simple como una PCR en tiempo final, se puede identificar de manera específica la presencia del ácido nucleico de PCV3. La aplicación de este protocolo a un total de 54 muestras permitió la detección del virus en 10 de ellas. Las mismas fueron recogidas en el periodo 2010 - 2013 y provienen de los departamentos de Canelones (5), Durazno (1), Maldonado (2), Montevideo (1) y Soriano (1). Este trabajo reporta la primera detección del virus en el país, y los resultados obtenidos en esta tesina serían los primeros indicios acerca de la circulación de PCV3 en Uruguay, al menos en el periodo mencionado. De todos modos, es muy probable que el virus haya estado circulando en las poblaciones de cerdos de nuestro país con anterioridad, como sugiere la amplia distribución de PCV3 y los estudios retrospectivos realizados en otros países (Kroeger, 2022; Opriessnig et al., 2020; Rodrigues et al., 2020). Un 16,67% de las muestras de cerdo doméstico procesadas fueron positivas, mientras que este porcentaje asciende al 33,33% en las muestras de jabalíes. Esto podría indicar una mayor frecuencia de detección, o una mayor circulación, en cerdos salvajes que en domésticos, pero es necesario precisar que el número de muestras procesadas de cada especie no es comparable, por lo que no se pueden extraer conclusiones determinantes al respecto. Este mayor porcentaje de positivos en las muestras de jabalíes podría deberse al azar. De todos modos, una mayor presencia de PCV3 en poblaciones de cerdos salvajes respecto a las poblaciones domésticas sería lo esperado de acuerdo a lo reportado en la bibliografía. La prevalencia del virus en cerdos ferales se ha ubicado siempre por encima de la registrada en sus pares domésticos, en el rango de 23% a 62% aproximadamente (Kroeger, 2022). Otro estudio ubica la prevalencia molecular de PCV3 en poblaciones de jabalíes entre el 33,15% y 50% (Tan et al., 2021). A su vez, cabe destacar que la detección se dio exclusivamente en animales del departamento de Maldonado, pero muy probablemente esto se deba a que las muestras de cerdos salvajes procesadas en este estudio provenían de allí, y no se incluyeron muestras de otros departamentos. En este sentido, dada la amplia distribución, tanto del virus en el mundo, y presumiblemente en el territorio nacional, como de los jabalíes en Uruguay, es muy probable que existan ejemplares infectados por PCV3 en todas las poblaciones de esta especie que se encuentran distribuidas a lo largo y ancho del

país. Sería interesante desarrollar más estudios sobre la presencia de PCV3 en las poblaciones de jabalíes del Uruguay, dado que se sospecha que puedan desempeñarse como un importante reservorio de este virus (Kroeger, 2022). Además, se conoce su rol como hospederos del relacionado PCV2, tal y como se demostró anteriormente en nuestro país, en un trabajo realizado en la Sección Virología (Ramos et al., 2017). De hecho, gracias al mismo se sabe que las muestras de jabalíes positivas para PCV3 en este estudio, también lo son para PCV2 (Ramos et al., 2017). Respecto a la detección de PCV3 en cerdos domésticos, su identificación en individuos de diversas edades, desde lechones a adultos, y en animales asintomáticos o con sintomatología, se suma a lo ya reportado ampliamente en la bibliografía (Kroeger, 2022; Opriessnig et al., 2020). A pesar de que el 75% de las muestras de cerdo positivas provenían de individuos que mostraban algún tipo de síntoma, entre ellos signos clínicos que han sido asociados a la infección por PCV3 como diarrea y problemas reproductivos (Sirisereewan et al., 2022), esto no constituye evidencia de campo a favor del rol patogénico de este virus. Tanto el reducido número de muestras como la estrategia experimental llevada a cabo en este estudio, enfocada en otro objetivo, no permiten extraer conclusiones acerca de este aspecto. El porcentaje tan alto de animales PCV3+ sintomáticos se debe muy probablemente al criterio de muestreo mencionado anteriormente, y no a una estrecha asociación entre la presencia del virus y el desarrollo de enfermedad, algo que no ha sido completamente esclarecido, aún con la evidencia proporcionada por los estudios de infecciones experimentales (Kroeger, 2022). Además, los signos clínicos observados pueden deberse a la infección por otros patógenos como PCV2, que fue identificado en algunos casos, u otros no testeados en este estudio.

La puesta a punto de un protocolo capaz de amplificar fragmentos informativos del genoma viral permitió caracterizar, en base al análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas obtenidas, a la mayor parte de las cepas uruguayas. La región más relevante para este procedimiento, ORF2, se obtuvo para 8 de las 10 muestras positivas totales. En 6 de los casos solo se obtuvo la secuencia parcial, proveniente, como se mencionó anteriormente, del segundo *round* de la *Nested-PCR* utilizada. Esto limitó el acceso a la secuencia de las regiones 3' y 5' del gen *Cap*, y determinó no conocer los aminoácidos presentes en las posiciones 24 y 150 de la proteína, y la construcción de la filogenia con secuencias parciales. La obtención de la secuencia completa del ORF2 depende del primer *round* de la *Nested-PCR*, por lo que en definitiva lo hace de una PCR convencional (o punto final). Por lo tanto, la obtención de uno y otro fragmento (ORF2 completo/ORF2 parcial) no representa la misma dificultad. Es probable que muestras como URU-001 y URU-005, para las cuales se obtuvo la secuencia de cápside completa, posean una mayor cantidad de ADN viral que facilita la obtención de un amplicón visible en el primer *round* de un ensayo cualitativo como el utilizado. En cambio, para las 6 muestras caracterizadas restantes, una menor concentración de ADN de PCV3 impediría apreciar una cantidad significativa de producto en la primera reacción, que sí se obtuvo tras el segundo *round*. La variante *Nested-PCR* aumenta la sensibilidad respecto a una PCR simple.

A pesar de ello, el acceso a la posición 24 de la secuencia aminoacídica del ORF2 posibilitó la clasificación de estas 8 cepas en PCV3a o PCV3b.

En el caso de la región ORF1-3, solo se logró su amplificación en 3 de las 10 muestras, y es probable que se deba a las dificultades anteriormente mencionadas

que representa la utilización de una PCR simple. La obtención de esta porción genómica significó conocer más de la mitad del genoma de las muestras URU-001 y URU-005, para las cuales ya se contaba con la secuencia de cápside completa.

Las únicas dos muestras que no lograron ser caracterizadas son URU-002 y URU-006. Para la muestra URU-002 no se logró la amplificación de ningún fragmento que permitiera su caracterización. Esto quizás se deba a un deterioro de la misma, por los procesos de congelado y descongelado, u otros, que tuvieron lugar entre que resultó positiva en el protocolo de detección molecular y se sometió al de caracterización. En el caso de URU-006, no se logró amplificar ninguna porción del ORF2, pero se obtuvo la región ORF1-3. Esta última no comprendió el motivo aminoacídico que hubiese permitido su asignación a un grupo (posición 1 del ORF3). Se desconocen los motivos por los que no funcionó correctamente una técnica como la *Nested-PCR*, de la cual ya se han mencionado sus atributos/ventajas. Es probable que haya ocurrido algún error de manipulación al someter la muestra a los protocolos, como por ejemplo no adicionar ADN molde en el primer *round* o no añadir el producto del mismo al tubo en donde ocurrió la segunda reacción.

De todos modos, la caracterización molecular de los virus detectados fue exitosa. Los motivos presentes en las secuencias parciales bastaron para determinar a qué grupo pertenecían la mayoría de las cepas detectadas y representar sus relaciones filogenéticas.

El análisis de los motivos presentes en la secuencia aminoacídica permitió identificar a PCV3b como el grupo mayoritario que circula en las poblaciones de cerdos domésticos de nuestro país, subgrupo b1. Para sus pares salvajes no se logró identificar un grupo más representado que otro, dado que tan solo se obtuvieron 2 muestras positivas, siendo una PCV3a y la otra PCV3b. Estudios adicionales, que tengan como objetivo las poblaciones de jabalíes, podrían esclarecer si en ellas un grupo prima sobre otro, o si se reparten de forma equitativa.

La posición 27 del ORF2 podría emplearse como marcador, dado que es de fácil acceso, con el protocolo aquí empleado, y parecería poseer un aminoácido claramente distinto en miembros de uno y otro grupo. Lo mismo sucede con la posición 1 del ORF3, pero se debería implementar un protocolo nuevo o modificado que permita obtener la porción de secuencia que la contiene.

Por otra parte, el árbol filogenético realizado con la secuencia parcial del ORF2, y el modelo evolutivo que mejor se ajusta a estos datos, arroja varios agrupamientos, pero en su mayoría no poseen un soporte estadístico significativo, por lo que no se establece una división clara entre dos grupos monofiléticos que se correspondan con los grupos PCV3a y PCV3b definidos previamente según los motivos presentes en la secuencia aminoacídica.

La utilización de otro método de inferencia filogenética y otro modelo evolutivo, como *Neighbor-Joining* y *p-distance*, respectivamente, no implicó cambios sustanciales en la representación. En este caso, tampoco se aprecia una división clara que represente los grupos PCV3a y PCV3b (Anexo IV). Se obtienen diferencias topológicas puntuales que no implican una diferencia significativa entre uno y otro árbol y que, además, carecen de un soporte estadístico adecuado.

Si bien en ambos árboles no se está analizando un región genómica que cubra todas las posiciones involucradas para la clasificación mencionada, los datos de secuencia nucleotídica empleados no reflejarían fielmente las divisiones y subdivisiones planteadas en base a los motivos aminoacídicos.

Los resultados obtenidos a este nivel son consistentes con lo reportado previamente por Fux et al. (2018), donde también se observaron varios *clusters*, en los cuales las cepas de cada grupo y subgrupo agrupan juntas de manera congruente, y cuyos nodos carecen de un soporte estadístico robusto. Asimismo, Fux et al. (2018) establece que “en contraste con el grupo a, el cuál mostró una alta identidad de secuencia nucleotídica, el grupo b se subdividió en tres *clusters* y su identidad de secuencia fue más baja”, lo que coincide con la ausencia de dos grupos monofiléticos (a y b) bien definidos. Cabe destacar que esta topología también se aprecia en la representación filogenética construida en este trabajo, como se ha descrito previamente y se ilustra en la figura 10. En la porción superior de la figura se puede apreciar un *cluster* integrado por la cepa URU-010, clasificada como PCV3a (Tabla 3), que agrupa con cepas extranjeras. Entre ellas se encuentran dos cepas colombianas que han sido caracterizadas previamente como integrantes del mencionado grupo a (Vargas-Bermudez et al., 2019). Por debajo, se aprecian tres *clusters* integrados por cepas uruguayas y extranjeras, entre las cuales hay algunas representantes del grupo PCV3b (MF079253 y MF805723), bien caracterizadas según los motivos de su secuencia aminoacídica (Fux et al., 2018; Vargas-Bermudez et al., 2019). Asimismo, las cepas nacionales presentes en estos agrupamientos han sido caracterizadas en este trabajo como miembros del grupo PCV3b, lo que le daría cierta consistencia a la observación. De todos modos, al no estar caracterizadas la totalidad de las cepas extranjeras de cada agrupamiento, y no poseer un soporte de *bootstrap* adecuado, no se pueden realizar afirmaciones categóricas sobre una co-relación entre la clasificación basada en los motivos presentes en la secuencia aminoacídica de las cepas y las representaciones filogenéticas a partir de la secuencia nucleotídica parcial del ORF2 de PCV3. Los métodos de inferencia y modelos evolutivos utilizados tampoco parecen tener un rol preponderante, lo observado debería obedecer a características intrínsecas de las secuencias de las cepas.

Añadir información genética, más específicamente utilizar la secuencia completa del ORF2 y el ORF1-3, podría producir la aparición de dos grupos claros en la reconstrucción filogenética que se podrían asociar con PCV3a y PCV3b. Esto gracias a que las cepas de uno y otro grupo, previamente clasificadas, se disponen en grupos monofiléticos, aunque con un porcentaje de *bootstrap* menor al 50%. Quien se observa por fuera de estos agrupamientos es la cepa uruguaya URU-001, la cual integraría el grupo PCV3b (según la caracterización aminoacídica), pero en este caso se dispone fuera del *cluster* que agrupa las cepas del mismo. En comparación con el árbol realizado en base a la secuencia parcial del ORF2, donde se ubicaba dentro de los grupos que contenían cepas PCV3b, cuando se añade más información sobre el gen *Cap* y sobre el ORF1-3, tiene una localización externa al mismo. Esto podría deberse a la existencia de diferencias, entre URU-001 y las cepas PCV3b de referencia empleadas, a nivel de las porciones de secuencia incluidas en el segundo árbol.

De todos modos, no se pueden realizar afirmaciones concluyentes sobre esto, dado que la topología observada no es apoyada estadísticamente. Además, en el árbol realizado se incluyó un número de secuencias acotado.

Respecto a la similitud de los virus detectados en Uruguay, si visualizamos la identidad nucleotídica a nivel de la secuencia parcial del gen *Cap* por grupo y subgrupo de PCV3, podemos ver como la ID se ubica entre 95,5% y 99,6% para el grupo PCV3b. Este rango es acorde a lo reportado por Fux et al. (2018) y refleja una diversidad considerable dentro del grupo b, el grupo más representado en nuestro país. Particularmente, la mayor divergencia del mismo se debería al subgrupo b1, dado que los subgrupos a1, a2 y b2 presentarían una alta ID (Fux et al., 2018). La mayor parte de las cepas uruguayas corresponden al subgrupo PCV3b1. A su vez, se esperaría que las cepas del grupo PCV3a presentaran alta identidad de secuencia nucleotídica (Fux et al., 2018), pero en este trabajo solo se obtuvo la secuencia de una única cepa perteneciente a este grupo, por lo que esto no pudo ser analizado.

La alta identidad de secuencia observada entre las cepas a nivel del ORF1-3 podría deberse a que dicha región presenta una menor variabilidad y está sometida a selección purificadora (Franzo et al., 2019; Opriessnig et al., 2020).

Al ser un virus identificado recientemente, aún no existe un consenso sobre la variabilidad del mismo y las implicaciones que esta pueda tener en los sistemas de clasificación. A pesar de ello, diferentes grupos de investigadores han propuesto algunos sistemas preliminares, debido a la relevancia de clasificar y ordenar las cepas que se reportan para la comprensión de la epidemiología viral. En este sentido, han surgido diversas propuestas, con criterios detallados en mayor o menor medida, y que en algunos casos no se han comunicado de una forma correcta, por lo que se pueden generar resultados engañosos y poco reproducibles entre diferentes investigaciones (Franzo et al., 2020). Para evitarlo, la difusión de los criterios empleados para la clasificación debe considerarse obligatoria (Franzo & Segalés, 2023). El sistema propuesto por Fux et al. (2018), y empleado por Vargas-Bermudez et al. (2019), sí cuenta con criterios bien definidos en base a los cuales clasificar las cepas del virus, pero no se puede afirmar una correlación entre lo visualizado a nivel nucleotídico y aminoacídico, como se expresa en este trabajo. Un estudio realizado por Franco et al. (2020), empleando una vasta cantidad de secuencias, tanto de ORF2 como de genomas completos, y diferentes métodos de análisis, obtuvo una topología similar a la reportada previamente por Fux et al. (2018) y visualizada en este estudio, con la aparición de diferentes *clusters* que podrían corresponderse con los grupos definidos en base a los motivos aminoacídicos, pero, de igual forma, carecían de un adecuado soporte estadístico. Ante esto, los autores proponen la existencia de un único grupo de PCV3, al que denominan PCV3a y sugieren que, si bien la clasificación de las cepas virales reportadas es relevante y se deben examinar los sistemas de clasificación propuestos, la introducción de nuevos sistemas sin razones biológicas o epidemiológicas contundentes es contraproducente (Franzo et al., 2020; Franco & Segalés, 2023). Con esto en cuenta, y lo evidenciado en el presente trabajo, parecería que clasificar las cepas de PCV3 en grupos (a y b) y, más aún, en subgrupos (a1, a2, b1 y b2) resulta forzado, dado que no es sustentado por sus características moleculares, biológicas y epidemiológicas.

Este trabajo constituye el primer reporte de detección de PCV3 en Uruguay y se añade a la lista de países que han detectado el virus, desde su identificación por primera vez en 2016 (Palinski et al., 2016; Phan et al., 2016), proporcionando evidencia adicional acerca de su distribución globalizada. En Sudamérica, es el quinto país en confirmar su presencia, después de su detección en Brasil (Tochetto et al., 2017), Colombia (Vargas-Bermudez et al., 2019), Chile (Rubilar et al., 2020) y Argentina (Serena et al., 2021). Asimismo, provee herramientas moleculares adaptadas y efectivas para la detección específica de PCV3 y su caracterización molecular. Las mismas pueden ser empleadas en estudios posteriores que contribuyan al conocimiento de un virus del cual todavía quedan muchos aspectos por dilucidar, como por ejemplo su prevalencia a nivel local en diferentes establecimientos vinculados a la industria porcina, su posible vinculación con patologías que afectan la salud de estos animales, el rol de las especies salvajes como reservorio natural del virus y su interacción con el cerdo doméstico (teniendo en cuenta la presencia de PCV3 en jabalíes, como se demostró en este estudio), entre otros.

Por otra parte, aporta evidencia consistente con la bibliografía acerca de la clasificación de las cepas detectadas de PCV3, destacando la falta de sustento para establecer sistemas de clasificación complejos.

7. Conclusiones

- Se logró adaptar un protocolo basado en PCR convencional para la detección molecular específica de PCV3.
- Se identificó, por primera vez, la presencia de PCV3 en cerdos domésticos y jabalíes del Uruguay.
- Se detectó PCV3 en un 16,67% de las muestras de cerdo doméstico procesadas y en un 33,33% de las muestras de jabalíes.
- Se optimizó exitosamente un protocolo basado en *Nested-PCR* y PCR convencional para la caracterización molecular de los virus detectados.
- Se logró caracterizar el 80% de las muestras positivas según los motivos presentes en su secuencia aminoacídica. Sin embargo, las filogenias construidas a partir de las secuencias nucleotídicas no reflejarían fielmente las divisiones y subdivisiones planteadas en base a los motivos aminoacídicos.
- Los virus identificados en este trabajo pertenecen al grupo PCV3b, con la excepción de una cepa detectada en jabalí que resultó ser del grupo PCV3a.

- Debido a que la clasificación de PCV3 en grupos y subgrupos resulta poco robusta, su actual utilización carecería de relevancia y no sería conveniente.

8. Perspectivas

- Sería interesante continuar con la identificación de este virus en nuestro país con el objetivo de actualizar la información sobre su circulación
- Ampliar el estudio sobre las poblaciones de cerdos domésticos añadiendo muestras de diferentes establecimientos provenientes de distintos departamentos del país y con diferente estatus sanitario.
- Estudiar la presencia de PCV3 en las poblaciones de cerdos salvajes del Uruguay, incrementando los esfuerzos en el estudio de las poblaciones de jabalíes distribuidas en el territorio.
- Analizar la presencia de PCV3 en otras especies salvajes que se ha demostrado pueden oficial como hospederos del virus. Sería interesante analizar muestras provenientes de las especies de cérvidos que habitan nuestro país.

9. Bibliografía

- Alarcon, P., Rushton, J., Nathues, H., & Wieland, B. (2013). Economic efficiency analysis of different strategies to control post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type 2 subclinical infection in 3-weekly batch system farms. *Preventive Veterinary Medicine*, 110(2), 103-118. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.12.006>
- Alarcon, P., Rushton, J., & Wieland, B. (2013). Cost of post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type-2 subclinical infection in England – An economic disease model. *Preventive Veterinary Medicine*, 110(2), 88-102. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.02.010>
- Allan, G. M., McNeilly, F., Cassidy, J. P., Reilly, G. A. C., Adair, B., Ellis, W. A., & McNulty, M. S. (1995). Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. *Veterinary Microbiology*, 44(1), 49-64. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)00136-K](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)00136-K)
- Allan, G. M., McNeilly, F., Kennedy, S., Daft, B., Ellis, J. A., Haines, D. M., Meehan, B. M., & Adair, B. M. (1998). Isolation of Porcine Circovirus-like Viruses from Pigs with a Wasting Disease in the USA and Europe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 10(1), 3-10. <https://doi.org/10.1177/104063879801000102>
- Bera, B. C., Choudhary, M., Anand, T., Virmani, N., Sundaram, K., Choudhary, B., & Tripathi, B. N. (2020). Detection and genetic characterization of porcine circovirus 3 (PCV3) in pigs in India. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(3), 1062-1067. <https://doi.org/10.1111/tbed.13463>
- Bi, M., Li, X., Zhai, W., Yin, B., Tian, K., & Mo, X. (2020). Structural insight into the type-specific epitope of porcine circovirus type 3. *Bioscience Reports*, 40(6), BSR20201109. <https://doi.org/10.1042/BSR20201109>
- Blunt, R., McOrist, S., McKillen, J., McNair, I., Jiang, T., & Mellits, K. (2011). House fly vector for porcine circovirus 2b on commercial pig farms. *Veterinary Microbiology*, 149(3-4), 452-455. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.11.019>
- Breitbart, M., Delwart, E., Rosario, K., Segalés, J., & Varsani, A. (2017). *Virus Taxonomy The ICTV Report on Virus Classification and Taxon Nomenclature Circoviridae Chapter*.
- Cao, L., Sun, W., Lu, H., Tian, M., Xie, C., Zhao, G., Han, J., Wang, W., Zheng, M., Du, R., Jin, N., & Qian, A. (2018). Genetic variation analysis of PCV1 strains isolated from Guangxi Province of China in 2015. *BMC Veterinary Research*, 14, 43. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1345-z>

Cheung, A. K. (2003). The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and DNA replication of porcine circovirus type 2. *Virology*, 313(2), 452-459. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00373-8](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00373-8)

Cheung, A. K. (2004a). Identification of an octanucleotide motif sequence essential for viral protein, DNA, and progeny virus biosynthesis at the origin of DNA replication of porcine circovirus type 2. *Virology*, 324(1), 28-36. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.037>

Cheung, A. K. (2004b). Identification of the essential and non-essential transcription units for protein synthesis, DNA replication and infectious virus production of Porcine circovirus type 1. *Archives of Virology*, 149(5), 975-988. <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0249-8>

Cheung, A. K. (2006). Rolling-Circle Replication of an Animal Circovirus Genome in a Theta-Replicating Bacterial Plasmid in Escherichia coli. *Journal of Virology*, 80(17), 8686-8694. <https://doi.org/10.1128/JVI.00655-06>

Cortey, M., & Segalés, J. (2012). Low levels of diversity among genomes of Porcine circovirus type 1 (PCV1) points to differential adaptive selection between Porcine circoviruses. *Virology*, 422(2), 161-164. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.10.014>

Crowther, R. A., Berriman, J. A., Curran, W. L., Allan, G. M., & Todd, D. (2003). Comparison of the Structures of Three Circoviruses: Chicken Anemia Virus, Porcine Circovirus Type 2, and Beak and Feather Disease Virus. *Journal of Virology*, 77(24), 13036-13041. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.24.13036-13041.2003>

Da Silva, N., Carriquiry, A., O'Neill, K., Opriessnig, T., & O'Connor, A. M. (2014). Mixed treatment comparison meta-analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines used in piglets. *Preventive Veterinary Medicine*, 117(3-4), 413-424. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.10.006>

Deng, H., Zhu, S., Zhu, L., Jian, Z., Zhou, Y., Li, F., Deng, L., Deng, J., Deng, Y., Lai, S., & Xu, Z. (2023). Histopathological Changes and Inflammatory Response in Specific Pathogen-Free (SPF) with Porcine Circovirus Type 3 Infection. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*, 13(3), 530. <https://doi.org/10.3390/ani13030530>

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. *The Canadian Veterinary Journal*, 39(1), 44-51.

Faccini, S., Barbieri, I., Gilioli, A., Sala, G., Gibelli, L. R., Moreno, A., Sacchi, C., Rosignoli, C., Franzini, G., & Nigrelli, A. (2017). Detection and genetic characterization of Porcine circovirus type 3 in Italy. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(6), 1661-1664. <https://doi.org/10.1111/tbed.12714>

Faurez, F., Dory, D., Grasland, B., & Jestin, A. (2009). Replication of porcine circoviruses. *Virology Journal*, 6, 60. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-60>

Fenaux, M., Halbur, P. G., Gill, M., Toth, T. E., & Meng, X.-J. (2000). Genetic Characterization of Type 2 Porcine Circovirus (PCV-2) from Pigs with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in Different Geographic Regions of North America and Development of a Differential PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay To Detect and Differentiate between Infections with PCV-1 and PCV-2. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7), 2494-2503.

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. *Journal of Virology*, 83(24), 12813-12821. <https://doi.org/10.1128/JVI.01719-09>

Franzo, G., Grassi, L., Tucciarone, C. M., Drigo, M., Martini, M., Pasotto, D., Mondin, A., & Menandro, M. L. (2019). A wild circulation: High presence of *Porcine circovirus 3* in different mammalian wild hosts and ticks. *Transboundary and Emerging Diseases*, tbed.13180. <https://doi.org/10.1111/tbed.13180>

Franzo, G., He, W., Correa-Fiz, F., Li, G., Legnardi, M., Su, S., & Segalés, J. (2019). A Shift in Porcine Circovirus 3 (PCV-3) History Paradigm: Phylodynamic Analyses Reveal an Ancient Origin and Prolonged Undetected Circulation in the Worldwide Swine Population. *Advanced Science*, 6(22), 1901004. <https://doi.org/10.1002/advs.201901004>

Franzo, G., Ruiz, A., Grassi, L., Sibila, M., Drigo, M., & Segalés, J. (2020). Lack of Porcine circovirus 4 Genome Detection in Pig Samples from Italy and Spain. *Pathogens*, 9(6), 433. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060433>

Franzo, G., & Segalés, J. (2018). Porcine circovirus 2 (PCV-2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology. *PLOS ONE*, 13(12), e0208585. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208585>

Franzo, G., Tucciarone, C. M., Cecchinato, M., & Drigo, M. (2016). Porcine circovirus type 2 (PCV2) evolution before and after the vaccination introduction: A large scale epidemiological study. *Scientific Reports*, 6, 39458. <https://doi.org/10.1038/srep39458>

Franzo, G., Delwart, E., Fux, R., Hause, B., Su, S., Zhou, J., & Segalés, J. (2020). Genotyping Porcine Circovirus 3 (PCV-3) Nowadays: Does It Make Sense?. *Viruses*, 12(3), 265. <https://doi.org/10.3390/v12030265>

Franzo, G., & Segalés, J. (2023). Porcine circovirus 3 (PCV-3) variability: Is it in the virus or in the classification criteria?. *Virology journal*, 20(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s12985-023-01984-6>

Fux, R., Söckler, C., Link, E. K., Renken, C., Krejci, R., Sutter, G., Ritzmann, M., & Eddicks, M. (2018). Full genome characterization of porcine circovirus type 3 isolates

reveals the existence of two distinct groups of virus strains. *Virology Journal*, 15, 25. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-0929-3>

Ha, Z., Li, J.-F., Xie, C.-Z., Li, C.-H., Zhou, H.-N., Zhang, Y., Hao, P.-F., Nan, F.-L., Zhang, J.-Y., Han, J.-C., Zhang, H., Zhuang, X.-Y., Guo, Y.-C., Lu, H.-J., & Jin, N.-Y. (2020). First detection and genomic characterization of porcine circovirus 3 in mosquitoes from pig farms in China. *Veterinary Microbiology*, 240, 108522. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108522>

Ha, Z., Xie, C., Li, J., Wen, S., Zhang, K., Nan, F., Zhang, H., Guo, Y., Wang, W., Lu, H., & Jin, N. (2018). Molecular detection and genomic characterization of porcine circovirus 3 in pigs from Northeast China. *BMC Veterinary Research*, 14, 321. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1634-6>

Hough, K. P., Rogers, A. M., Zelic, M., Paris, M., & Heilman, D. W. (2015). Transformed cell-specific induction of apoptosis by porcine circovirus type 1 viral protein 3. *Journal of General Virology*, 96(2), 351-359. <https://doi.org/10.1099/vir.0.070284-0>

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 Microbiology*, 11, 188. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-188>

Hughes, A. L., & Piontkivska, H. (2008). Nucleotide Sequence Polymorphism in Circoviruses. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 8(2), 130-138. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2007.11.001>

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). (2023). <https://ictv.global/taxonomy/>.

Jiang, H., Wang, D., Wang, J., Zhu, S., She, R., Ren, X., Tian, J., Quan, R., Hou, L., Li, Z., Chu, J., Guo, Y., Xi, Y., Song, H., Yuan, F., Wei, L., & Liu, J. (2019). Induction of Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome in Piglets by Infection with Porcine Circovirus Type 3. *Journal of Virology*, 93(4), e02045-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.02045-18>

Kim, H.-H., Park, S.-I., Hyun, B.-H., Park, S.-J., Jeong, Y.-J., Shin, D.-J., Chun, Y.-H., Hosmillo, M., Lee, B.-J., Kang, M.-I., & Cho, K.-O. (2009). Genetic Diversity of Porcine Circovirus Type 2 in Korean Pigs with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome during 2005-2007. *Journal of Veterinary Medical Science*, 71(3), 349-353. <https://doi.org/10.1292/jvms.71.349>

Kiupel, M., Stevenson, G. W., Choi, J., Latimer, K. S., Kanitz, C. L., & Mittal, S. K. (2001). Viral Replication and Lesions in BALB/c Mice Experimentally Inoculated with

Porcine Circovirus Isolated from a Pig with Postweaning Multisystemic Wasting Disease. *Veterinary Pathology*, 38(1), 74-82. <https://doi.org/10.1354/vp.38-1-74>

Kiupel, M., Stevenson, G. W., Galbreath, E. J., North, A., HogenEsch, H., & Mittal, S. K. (2005). Porcine Circovirus type 2 (PCV2) causes apoptosis in experimentally inoculated BALB/c mice. *BMC Veterinary Research*, 1, 7. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-1-7>

Kiupel, M., Stevenson, G. W., Mittal, S. K., Clark, E. G., & Haines, D. M. (1998). Circovirus-like Viral Associated Disease in Weaned Pigs in Indiana. *Veterinary Pathology*, 35(4), 303-307. <https://doi.org/10.1177/030098589803500411>

Kroeger, M. (2022). Five years of porcine circovirus 3: What have we learned about the clinical disease, immune pathogenesis, and diagnosis. *Virus Research*.

Krog, J. S., Larsen, L. E., & Schultz, A. C. (2014). Enteric porcine viruses in farmed shellfish in Denmark. *International Journal of Food Microbiology*, 186, 105-109. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.012>

Krüger, L., Längin, M., Reichart, B., Fiebig, U., Kristiansen, Y., Prinz, C., Kessler, B., Egerer, S., Wolf, E., Abicht, J.-M., & Denner, J. (2019). Transmission of Porcine Circovirus 3 (PCV3) by Xenotransplantation of Pig Hearts into Baboons. *Viruses*, 11(7), 650. <https://doi.org/10.3390/v11070650>

Ku, X., Chen, F., Li, P., Wang, Y., Yu, X., Fan, S., Qian, P., Wu, M., & He, Q. (2017). Identification and genetic characterization of porcine circovirus type 3 in China. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(3), 703-708. <https://doi.org/10.1111/tbed.12638>

Li, G., He, W., Zhu, H., Bi, Y., Wang, R., Xing, G., Zhang, C., Zhou, J., Yuen, K., Gao, G. F., & Su, S. (2018). Origin, Genetic Diversity, and Evolutionary Dynamics of Novel Porcine Circovirus 3. *Advanced Science*, 5(9), 1800275. <https://doi.org/10.1002/advs.201800275>

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. *Journal of Virology*, 79(13), 8262-8274. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.13.8262-8274.2005>

Mahé, D., Blanchard, P., Truong, C., Arnould, C., Le Cann, P., Cariolet, R., Madec, F., Albina, E., & Jestin, A. (2000). Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *Microbiology*, 81(7), 1815-1824. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-7-1815>

Mankertz, A., Persson, F., Mankertz, J., Blaess, G., & Buhk, H. J. (1997). Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *Journal of Virology*, 71(3), 2562-2566.

Meng, X.-J. (2013). Porcine Circovirus Type 2 (PCV2): Pathogenesis and Interaction with the Immune System. *Annual Review of Animal Biosciences*, 1(1), 43-64. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-031412-103720>

Mora-Díaz, J., Piñeyro, P., Shen, H., Schwartz, K., Vannucci, F., Li, G., Arruda, B., & Giménez-Lirola, L. (2020). Isolation of PCV3 from Perinatal and Reproductive Cases of PCV3-Associated Disease and In Vivo Characterization of PCV3 Replication in CD/CD Growing Pigs. *Viruses*, 12(2), 219. <https://doi.org/10.3390/v12020219>

Morozov, I., Sirinarumitr, T., Sorden, S. D., Halbur, P. G., Morgan, M. K., Yoon, K.-J., & Paul, P. S. (1998). Detection of a Novel Strain of Porcine Circovirus in Pigs with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(9), 2535-2541.

Nayar, G. P., Hamel, A., & Lin, L. (1997). Detection and characterization of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *The Canadian Veterinary Journal*, 38(6), 385-386.

Nguyen, V., Do, H., Huynh, T., Park, Y., Park, B., & Chung, H. (2021). Molecular-based detection, genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus 4 from Korean domestic swine farms. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(2), 538-548. <https://doi.org/10.1111/tbed.14017>

Niagro, F. D., Forsthofel, A. N., Lawther, R. P., Kamalanathan, L., Ritchie, B. W., Latimer, K. S., & Lukert, P. D. (1998). Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: Intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. *Archives of Virology*, 143(9), 1723-1744. <https://doi.org/10.1007/s007050050412>

Noteborn, M. H., Todd, D., Verschueren, C. A., de Gauw, H. W., Curran, W. L., Veldkamp, S., Douglas, A. J., McNulty, M. S., van der EB, A. J., & Koch, G. (1994). A single chicken anemia virus protein induces apoptosis. *Journal of Virology*, 68(1), 346-351.

Oh, T., & Chae, C. (2020). First isolation and genetic characterization of porcine circovirus type 3 using primary porcine kidney cells. *Veterinary Microbiology*, 241, 108576. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108576>

Opriessnig, T., Karuppanan, A. K., Castro, A. M. M. G., & Xiao, C.-T. (2020). Porcine circoviruses: Current status, knowledge gaps and challenges. *Virus Research*, 286, 198044. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198044>

Opriessnig, T., & Langohr, I. (2013). Current State of Knowledge on Porcine Circovirus Type 2-Associated Lesions. *Veterinary Pathology*, 50(1), 23-38. <https://doi.org/10.1177/0300985812450726>

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 Veterinary Diagnostic Investigation*, 19(6), 591-615. <https://doi.org/10.1177/104063870701900601>

Palinski, R., Piñeyro, P., Shang, P., Yuan, F., Guo, R., Fang, Y., Byers, E., & Hause, B. M. (2016). A Novel Porcine Circovirus Distantly Related to Known Circoviruses Is Associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and Reproductive Failure. *Journal of Virology*, 91(1), e01879-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.01879-16>

Patterson, A. R., & Opriessnig, T. (2010). Epidemiology and horizontal transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Animal Health Research Reviews*, 11(2), 217-234. <https://doi.org/10.1017/S1466252310000162>

Phan, T. G., Giannitti, F., Rossow, S., Marthaler, D., Knutson, T. P., Li, L., Deng, X., Resende, T., Vannucci, F., & Delwart, E. (2016). Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation. *Virology Journal*, 13(1), 184. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0642-z>

Pinheiro, A. L. B. C., Bulos, L. H. S., Onofre, T. S., De Paula Gabardo, M., De Carvalho, O. V., Fausto, M. C., Guedes, R. M. C., De Almeida, M. R., & Silva, A. (2013). Verification of natural infection of peridomestic rodents by PCV2 on commercial swine farms. *Research in Veterinary Science*, 94(3), 764-768. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.10.006>

Piñeyro, P., & Ramamoorthy, S. (2022). *Circoviridae* (pp. 469-477). <https://doi.org/10.1002/9781119650836.ch48>

Puvanendiran, S., Stone, S., Yu, W., Johnson, C. R., Abrahante, J., Jimenez, L. G., Griggs, T., Haley, C., Wagner, B., & Murtaugh, M. P. (2011). Absence of porcine circovirus type 1 (PCV1) and high prevalence of PCV 2 exposure and infection in swine finisher herds. *Virus Research*, 157(1), 92-98. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.02.012>

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. *Research in Veterinary Science*, 93(2), 1042-1045. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.01.006>

Ramos, N., Mirazo, S., Castro, G., & Arbiza, J. (2013). Molecular analysis of Porcine Circovirus Type 2 strains from Uruguay: Evidence for natural occurring recombination. *Infection, Genetics and Evolution*, 19, 23-31. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.06.017>

Ramos, N., Mirazo, S., Castro, G., & Arbiza, J. (2015). First identification of Porcine Circovirus Type 2b mutant in pigs from Uruguay. *Infection, Genetics and Evolution*, 33, 320-323. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.05.023>

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>

Ritchie, B. W., Niagro, F. D., Latimer, K. S., Lukert, P. D., Steffens, W. L., Rakich, P. M., & Pritchard, N. (1990). ULTRASTRUCTURAL, PROTEIN COMPOSITION, AND ANTIGENIC COMPARISON OF PSITTACINE BEAK AND FEATHER DISEASE VIRUS PURIFIED FROM FOUR GENERA OF PSITTACINE BIRDS. *Journal of Wildlife Diseases*, 26(2), 196-203. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-26.2.196>

Ritchie, B. W., Niagro, F. D., Lukert, P. D., Steffens, W. L., & Latimer, K. S. (1989). Characterization of a new virus from cockatoos with psittacine beak and feather disease. *Virology*, 171(1), 83-88. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90513-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90513-8)

Rosario, K., Breitbart, M., Harrach, B., Segalés, J., Delwart, E., Biagini, P., & Varsani, A. (2017). Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: Establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus. *Archives of Virology*, 162(5), 1447-1463. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3247-y>

Rubilar, Paulina & Tognarelli, Javier & Fernández, Jorge & Valdes, Cristobal & Broitman, Felipe & Mandakovic, Dinka & Pulgar, Rodrigo. (2020). Swine viral detection by adapted Next-Generation Sequencing (NGS) for RNA and DNA species reveals first detection of porcine circovirus type 3 (PCV3) in Chile. 10.1101/2020.06.07.138925.

Saraiva, G. L., Vidigal, P. M. P., Fietto, J. L. R., Bressan, G. C., Silva Júnior, A., & De Almeida, M. R. (2018). Evolutionary analysis of Porcine circovirus 3 (PCV3) indicates an ancient origin for its current strains and a worldwide dispersion. *Virus Genes*, 54(3), 376-384. <https://doi.org/10.1007/s11262-018-1545-4>

Segalés, J. (2012). Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Research*, 164(1-2), 10-19. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.10.007>

Segalés, J., & Domingo, M. (2002). Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Veterinary Quarterly*, 24(3), 109-124. <https://doi.org/10.1080/01652176.2002.9695132>

Serena, M. S., Cappuccio, J. A., Barrales, H., Metz, G. E., Aspitia, C. G., Lozada, I., Perfumo, C. J., Quiroga, M. A., Piñeyro, P., & Echeverría, M. G. (2021). First detection and genetic characterization of porcine circovirus type 3 (PCV3) in Argentina and its association with reproductive failure. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(4), 1761-1766. <https://doi.org/10.1111/tbed.13893>

Sirisereewan, C., Thanawongnuwech, R., & Kedkovid, R. (2022). Current Understanding of the Pathogenesis of Porcine Circovirus 3. *Pathogens*, 11(1), 64. <https://doi.org/10.3390/pathogens11010064>

Song, T., Hao, J., Zhang, R., Tang, M., Li, W., Hui, W., Fu, Q., Wang, C., Xin, S., Zhang, S., Rui, P., Ren, H., & Ma, Z. (2019). First detection and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 in raccoon dogs. *BMC Veterinary Research*, 15, 107. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1856-2>

Steinfeldt, T., Finsterbusch, T., & Mankertz, A. (2006). Demonstration of Nicking/Joining Activity at the Origin of DNA Replication Associated with the Rep and Rep' Proteins of Porcine Circovirus Type 1. *Journal of Virology*, 80(13), 6225-6234. <https://doi.org/10.1128/JVI.02506-05>

Steinfeldt, T., Finsterbusch, T., & Mankertz, A. (2007). Functional Analysis of cis- and trans-Acting Replication Factors of Porcine Circovirus Type 1. *Journal of Virology*, 81(11), 5696-5704. <https://doi.org/10.1128/JVI.02420-06>

Temeeyasen, G., Lierman, S., Arruda, B. L., Main, R., Vannucci, F., Gimenez-Lirola, L. G., & Piñeyro, P. E. (2021). Pathogenicity and immune response against porcine circovirus type 3 infection in caesarean-derived, colostrum-deprived pigs. *The Journal of General Virology*, 102(1). <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001502>

Tischer, I., Rasch, R., & Tochtermann, G. (1974). Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie*, 226(2), 153–167.

Tischer, I., Gelderblom, H., Vettermann, W., & Koch, M. A. (1982). A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature*, 295(5844), 64-66. <https://doi.org/10.1038/295064a0>

Tischer, I., Miels, W., Wolff, D., Vagt, M., & Griem, W. (1986). Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Archives of Virology*, 91(3-4), 271-276. <https://doi.org/10.1007/BF01314286>

Tischer, I., Peters, D., Rasch, R., & Pociuli, S. (1987). Replication of porcine circovirus: Induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Archives of Virology*, 96(1-2), 39-57. <https://doi.org/10.1007/BF01310989>

Tochetto, C., Lima, D. A., Varela, A. P. M., Loiko, M. R., Paim, W. P., Scheffer, C. M., Herpich, J. I., Cerva, C., Schmitd, C., Cibulski, S. P., Santos, A. C., Mayer, F. Q., & Roehe, P. M. (2017). Full-Genome Sequence of Porcine Circovirus type 3 recovered from serum of sows with stillbirths in Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(1), 5-9. <https://doi.org/10.1111/tbed.12735>

Todd, D., Niagro, F. D., Ritchie, B. W., Curran, W., Allan, G. M., Lukert, P. D., Latimer, K. S., Steffens, W. L., & McNulty, M. S. (1991). Comparison of three animal viruses with circular single-stranded DNA genomes. *Archives of Virology*, 117(1-2), 129-135. <https://doi.org/10.1007/BF01310498>

Todd, D., Weston, J. H., Soike, D., & Smyth, J. A. (2001). Genome Sequence Determinations and Analyses of Novel Circoviruses from Goose and Pigeon. *Virology*, 286(2), 354-362. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.0985>

Vargas-Bermudez, D. S., Campos, F. S., Bonil, L., Mogollon, D., & Jaime, J. (2019). First detection of porcine circovirus type 3 in Colombia and the complete genome sequence demonstrates the circulation of PCV3a1 and PCV3a2. *Veterinary Medicine and Science*, 5(2), 182-188. <https://doi.org/10.1002/vms3.155>

Wang, D., Mai, J., Yang, Y., Xiao, C.-T., & Wang, N. (2022). Current knowledge on epidemiology and evolution of novel porcine circovirus 4. *Veterinary Research*, 53, 38. <https://doi.org/10.1186/s13567-022-01053-w>

Wang, W., Sun, W., Cao, L., Zheng, M., Zhu, Y., Li, W., Liu, C., Zhuang, X., Xing, J., Lu, H., Luo, T., & Jin, N. (2019). An epidemiological investigation of porcine circovirus 3 infection in cattle in Shandong province, China. *BMC Veterinary Research*, 15, 60. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1793-0>

Zhai, S.-L., Chen, R.-A., Chen, S.-N., Wen, X.-H., Lv, D.-H., Wu, D.-C., Yuan, J., Huang, Z., Zhou, X.-R., Luo, M.-L., He, D.-S., & Wei, W.-K. (2014). First molecular detection of porcine circovirus type 2 in bovids in China. *Virus Genes*, 49(3), 507-511. <https://doi.org/10.1007/s11262-014-1117-1>

Zhang, F., Yuan, W., Li, Z., Zhang, Y., Zeng, X., Zhao, M., Ye, Y., Ding, Z., He, H., Wu, Q., Song, D., & Tang, Y. (2020). Porcine Circovirus Type 3 in Pig Farms Experiencing Diarrhea in Jiangxi, China: Prevalence, Genome Sequence and Pathogenicity. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*, 10(12), 2324. <https://doi.org/10.3390/ani10122324>

Zhang, H., Hu, W., Li, J., Liu, T., Zhou, J., Opriessnig, T., & Xiao, C. (2020). Novel circovirus species identified in farmed pigs designated as *Porcine circovirus 4*, Hunan province, China. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(3), 1057-1061. <https://doi.org/10.1111/tbed.13446>

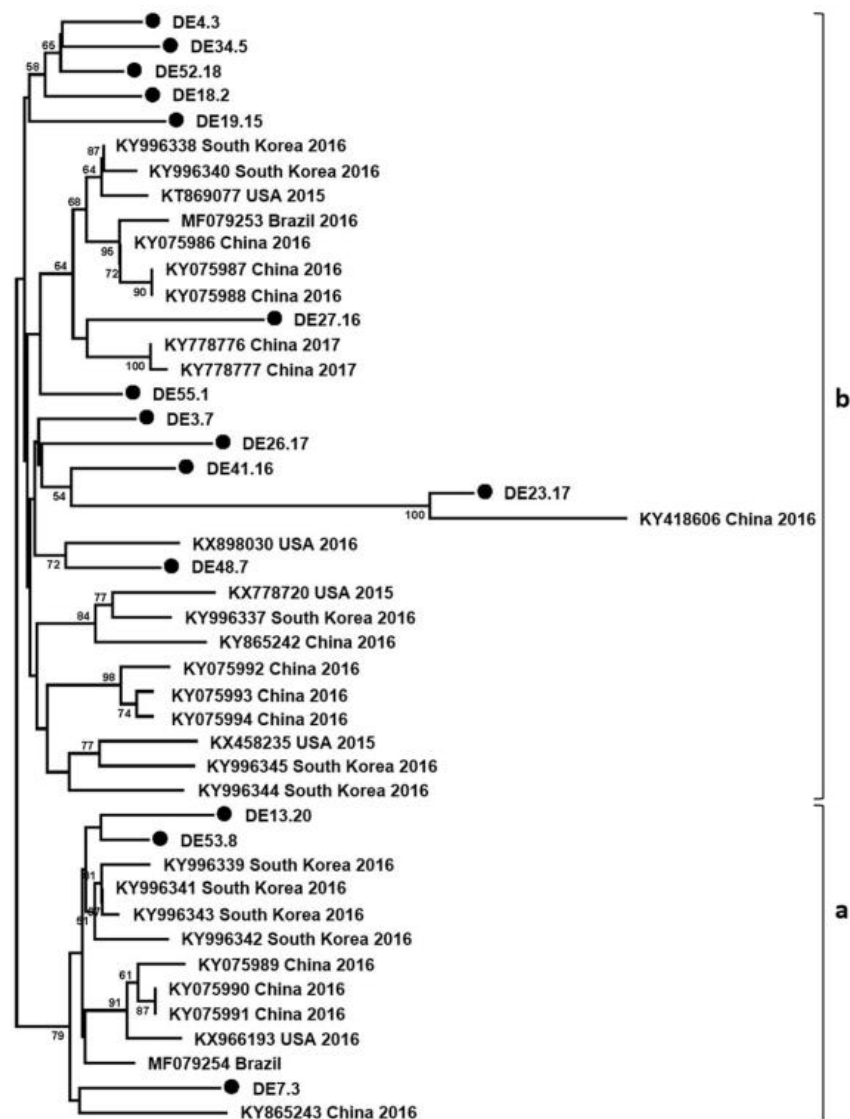
Zhang, J., Liu, Z., Zou, Y., Zhang, N., Wang, D., Tu, D., Yang, L., Deng, Z., Yang, Y., Jiang, P., & Wang, N. (2018). First molecular detection of porcine circovirus type 3 in dogs in China. *Virus Genes*, 54(1), 140-144. <https://doi.org/10.1007/s11262-017-1509-0>

Anexo:

Anexo I. Especies de circovirus. En esta tabla se pueden apreciar algunas de las especies de circovirus descritas, la abreviación de su nombre, y el huésped que infectan (o animal en el que se identificaron por primera vez).

Nombre del virus	Abreviación	Especie
<i>Barbel circovirus</i>	BarCV	Pez barbo
<i>Bat associated circovirus (1-12)</i>	BatACV(1-12)	Murciélago
<i>Beak and feather disease virus</i>	BFDV	Aves psitaciformes
<i>Canary circovirus</i>	CaCV	Canario
<i>Canine circovirus</i>	CanineCV	Perro
<i>Chimpanzee associated circovirus 1</i>	ChimpACV	Chimpancé
<i>Civet circovirus</i>	CivCV	Civeta
<i>Duck circovirus</i>	DuCV	Pato
<i>Goose circovirus</i>	GoCV	Ganso
<i>Human associated circovirus 1</i>	HuACV1	Humano
<i>Mosquito associated circovirus 1</i>	MosACV1	Mosquito
<i>Pigeon circovirus</i>	PiCV	Paloma
<i>Porcine circovirus (1-4)</i>	PCV(1-4)	Cerdo
<i>Tick associated circovirus (1-2)</i>	TiACV(1-2)	Garrapata

Adaptado de Breitbart et al., 2017.



Anexo II. Análisis filogenético realizado por Fux et al. (2018). Árbol filogenético construido en base a los genomas completos de 15 cepas alemanas de PCV3 y 30 secuencias de referencia provenientes de GenBank, bajo el método de inferencia filogenética *Neighbor Joining*, modelo evolutivo *p-distance* y 1000 réplicas de *bootstrap*. Se muestran los valores de *bootstrap* superiores al 50%.

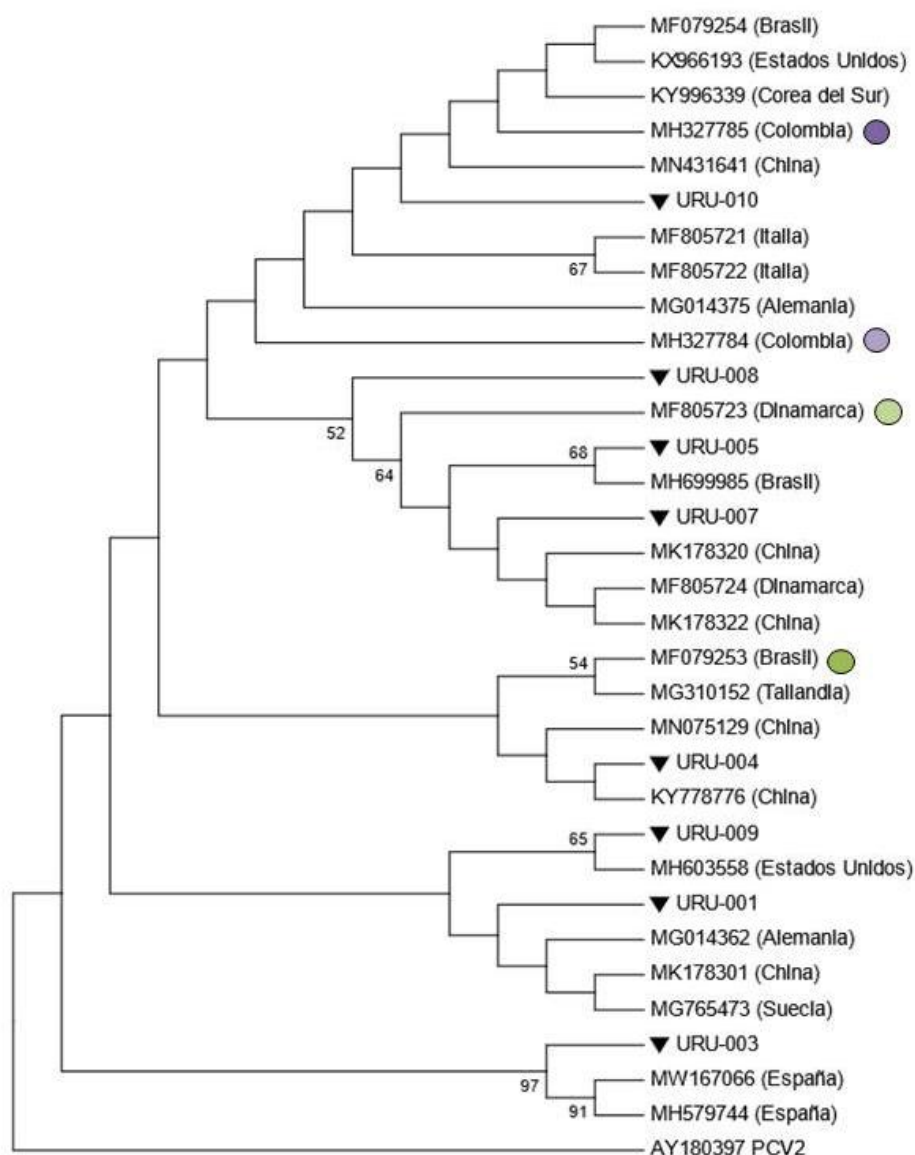
Tomado y adaptado de Fux et al. (2018).

Anexo III. Cebadores utilizados. En esta tabla se presentan los *primers* empleados en los diferentes protocolos.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Largo	Región
PCV3DetF ^a	AGT GCT CCC CAT TGA ACG	18 nt	1427 - 1444
PCV3DetR ^a	ACA CAG CCG TTA CTT CAC	18 nt	1544 - 1561
CAPEF ^b	ACT TAG AGA ACG GAC TTG TAA CG	23 nt	1334 - 1356
CAPER ^b	AAA TGA GAC ACA GAG CTA TAT TCA G	25 nt	1958 - 1982
CAPIF ^a	CCG CAT AAG GGT CGT CTT G	19 nt	1598 - 1616
CAPIR ^a	CCA CAG AAG GCG CTA TGT C	19 nt	1909 - 1927
ORF1-3F ^a	CAC CGT GTG AGT GGA TAT AC	20 nt	74 - 93
ORF1-3R ^a	CAA ACC CAC CCT TAA CAG	18 nt	910 - 927

a. Reportados por Palinski et al. (2016).

b. Reportados por Ku et al. (2017).



Anexo IV. Árbol filogenético basado en la secuencia parcial del ORF2 (329 pb) de PCV3.

Árbol filogenético realizado mediante *Neighbor Joining* (NJ), modelo evolutivo *p-distance* y 1000 réplicas de *bootstrap*. Se muestra el valor de *bootstrap* en los casos donde sea mayor o igual al 50%. Se pueden apreciar las cepas uruguayas de PCV3, marcadas con un triángulo, y cepas de referencia extraídas de GenBank con su número de acceso y país de origen. Además, se incluyó una secuencia de PCV2 como grupo externo.

Agradecimientos

A mis tutores, Natalia y Juan, por la paciencia, dedicación y el conocimiento brindado durante todo el proceso que culmina con esta tesina de grado.

A mis padres, Nelson y Marisol, por la contención y el apoyo durante todos estos años.

A mi hermano Jonathan, a mi familia y a mis amigos por la motivación constante.

A los integrantes de la Sección Virología por brindarme un espacio ameno para la realización de esta tesina y hacerme sentir parte del laboratorio.

A Matías Victoria y Natalia Olivero por formar parte del tribunal evaluador de este trabajo.