



**Centro de Investigación en Alimentación  
y Desarrollo, A.C.**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL ORF2 DEL  
PCV2 EN EL ESTADO DE SONORA**

Por:

Jorge Alfonso Arvayo Zatarain

TESIS APROBADA POR LA  
COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN


Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis del Biol. Jorge Alfonso Arvayo Zatarain, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



---

Dr. Jesús Hernández López

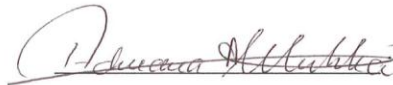
Director de tesis



---

Dra. Verónica Mata Haro

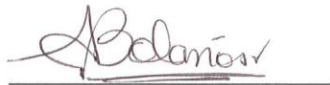
Asesor



---

Dra. Adriana Teresita Muhlia Almazán

Asesor



---

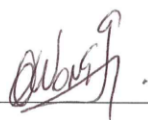
M.C. Adriana Verónica Bolaños Villar

Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD A.C.). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se de el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



---

Dr. Pablo Wong González

Director General

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo prestado durante la realización del posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., (CIAD A.C.) y a su personal, por su ayuda y por permitirme ser parte de este centro durante el desarrollo del posgrado.

Al Dr. Jesús Hernández y a los miembros del Laboratorio de Inmunología (Alex, Mony, Lupita, Elí, Erika, Edgar) por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y por sus valiosas enseñanzas.

A mi Comité de Tesis por sus valiosos comentarios y sugerencias.

A los maestros que tuve a lo largo del posgrado, cada uno contribuyendo de diferentes maneras.

A mi familia y amigos, quienes siempre han estado ahí.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., bajo la dirección del Dr. Jesús Hernández.

Este trabajo se realizó con el apoyo técnico de la Q.B. Mónica Reséndiz Sandoval

## DEDICATORIA

A mi familia: Siempre he creído en la lógica que lleva a la razón. Pero, después de una vida de búsqueda me pregunto, ¿Qué es la lógica? ¿Quién decide la razón? He buscado a través de lo físico, lo metafísico, lo delirante... y vuelto a empezar. Y he hecho el descubrimiento más importante de mi vida. Sólo en el amor puede encontrarse alguna lógica. Estoy aquí gracias a ustedes. Son mi única razón de ser. Son todas mis razones. ¡Gracias!. (Palabras adaptadas del supuesto discurso de John Nash al momento de recibir el Premio de Economía a la memoria de Alfred Nobel en 1994. Tomadas de mi película favorita “Una Mente Brillante”).

Al Dr. Víctor Raúl Burgos Fuentes, quien después de estar conmigo entre tantas enfermedades y 25 operaciones; al igual que mi familia, nunca se dio por vencido. Después de todo eso, aún sigo aquí.

A mi director de tesis, Dr. Jesús Hernández y a los miembros del Laboratorio de Inmunología. Sin ustedes, esto no hubiera sido posible.

A mis sinodales, por ayudarme en mi formación, realización y culminación de este trabajo.

Al Dr. José Manuel Grijalva Chon y Dra. Reina Castro Longoria, quienes han sido parte importante de mi formación.

A mis amigos, en especial a: Nayeli Cano, Sergio Moreno, Martín Acedo, Orlando Tapia, Sergio Leal, Christian Minjarez y Martha del Río.

A mis compañeros de generación por sus opiniones y consejos.

## CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Taxonomía de los Circovirus Porcinos	3
Morfología y Características Físicas de los Circovirus Porcinos	3
Importancia del PCV2 en la Producción Porcina	4
Patogénesis del PCV2	5
Epidemiología	5
Transmisión del PCV2 entre Cerdos	7
Diagnóstico del PCV2	7
Prevención y Control del PCV2	8
Mecanismo de Replicación de los Circovirus Porcinos	8
Características Genómicas del PCV2	10
Caracterización Molecular del PCV2	11
Distribución Geográfica del PCV2	12
En Europa	13
En Oceanía	15
En Asia	15

## **CONTENIDO**

	Página
En América	18
JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	23
General	23
Específicos	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
Muestreo	24
Extracción de ADN, PCR y Secuenciación	24
Análisis de Datos	25
RESULTADOS	27
Amplificación del ORF2 del PCV2	27
Secuenciación del ORF2 del PCV2	28
Variación Genética del ORF2 del PCV2	28
Análisis Filogenético	40
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	47
REFERENCIAS	48
ANEXO 1. LISTA DE ABREVIATURAS	59
ANEXO 2. CÓDIGO DE LOS AMINOÁCIDOS EN LETRAS	60



Tabla	<b>LISTA DE TABLAS</b>	Página
1. Nomenclatura de las secuencias del gen ORF2 del PCV2 de este estudio.		28
2. Total de secuencias utilizadas en este estudio.		31
3. Porcentaje de identidad de nucleótidos de las secuencias sonorenses.		33
4. Porcentaje de similitud de aminoácidos de las secuencias sonorenses.		34
5. Tasa de transición y transversión del ORF2 del PCV2.		39

Figura	<b>LISTA DE FIGURAS</b>	Página
1.	Taxonomía del circovirus.	4
2.	Modelo de replicación del PCV2.	10
3.	Esquema de sustituciones y transversiones.	12
4.	Localización de los primers utilizados.	26
5.	Perfil electroforético de las muestras.	27
6.	Alineamiento de las secuencias de nucleótidos.	35
7.	Alineamiento de aminoácidos de los aislados sonorenses obtenidos.	38
8.	Árbol filogenético de las 9 secuencias positivas obtenidas en este estudio y las de referencia.	41

## RESUMEN

El circovirus porcino tipo 2 (PCV2) es uno de los virus que más afecta a la producción porcina a nivel mundial causando enormes pérdidas económicas. Por lo anterior, el control del PCV2 es fundamental en la producción porcina. El genoma del PCV2 está compuesto por tres marcos de lectura abiertos (ORF1, ORF2 y ORF3), el ORF2 es un importante marcador filogenético y ha permitido identificar cinco genotipos del PCV2 (PCV2a al PCV2e). El objetivo del presente trabajo fue secuenciar el gen ORF2 del PCV2 a partir de muestras provenientes de granjas porcícolas del Estado de Sonora. Se aisló ADN de PCV2 a partir de cerdos con signos del síndrome del desmedro posdestete (PMWS). Se amplificó un producto de 800 pares de bases (pb) y las muestras positivas (n=9) fueron secuenciadas. Además, mediante métodos bioinformáticos se realizó un análisis molecular y filogenético de las secuencias obtenidas. El análisis mostró que el porcentaje de identidad de nucleótidos de las secuencias sonorenses fue entre 97 y 100 %. El porcentaje de identidad de aminoácidos fue entre 96 y 100%, Finalmente, al realizar los análisis filogenéticos, se observó que las muestras de este estudio pertenecen al genotipo PCV2a.

Palabras claves: PCR, PCV2, diagnóstico, ORF2, caracterización molecular

## ABSTRACT

Porcine circovirus type 2 is one of the viruses that most affect the swine world production causing significant economic losses. Thus, it is important to control it for porcine production to have optimal yields. The PCV2 genome contains three open reading frames (ORF's. ORF1, ORF2 and ORF3). The ORF2 codifies a capsid protein, is an important phylogenetic marker due to its variability among strains and this has allowed the identification of five genotypes of PCV2 (PCV2a to PCV2e). The aim of this work was to sequence the ORF2 of PCV2 from porcine farms of Sonora, Mexico. The PCV2 DNA was isolated from pigs serum with postweaning multisystemic syndrome (PMWS). A product of 800 bp was amplified and the positive samples (n=9) were sequenced. Also, phylogenetic analysis was performed using bioinformatic methods. The analysis showed that the percentage of nucleotide identity among the sonorant sequences was between 97 and 100%. The percentage of amino acids identity was 96 and 100%. Finally, the phylogenetic analysis showed that all the samples of this study were classified as genotype PCV2a.

Key words: PCR, PCV2, diagnostic, ORF2, molecular characterization

## INTRODUCCIÓN

Los principales países productores de carne de cerdo a nivel mundial son: China, Unión Europea, Estados Unidos, Brasil, Canadá, Rusia, Japón, México, Corea del Sur, Vietnam y Filipinas (Cabello-Villarreal, Torres-Garrido, 2011; FAO, 2011). En México, los principales estados productores de carne de cerdo son Jalisco y Sonora, seguidos de Guanajuato, Puebla y Yucatán (SAGARPA, 2012). Sin embargo, la porcicultura se ha visto afectada entre otras cosas, por agentes bacterianos y/o virales. Dentro de los principales virus que afectan a los cerdos se encuentra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), virus de la influenza porcina, virus de Aujeszky, coronavirus respiratorio, citomegalovirus y circovirus porcino tipo 2 (PCV2) (Bencomo, 2010).

El circovirus porcino denominado PCV1 fue descubierto por primera vez como contaminante no citopático en la línea celular de origen porcino PK-15. Posteriormente, se aisló una variante patogénica de este virus de tejidos de cerdo con síndrome de desmedro y se denominó circovirus porcino tipo 2 (PCV2) (Tischer *et al.*, 1982; Allan y Ellis, 2000). El PCV2 es el principal responsable de las enfermedades asociadas a circovirus (PCVAD), pero la principal enfermedad causada por el PCV2 es el síndrome de desmedro posdestete (postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS). Aunque, dentro del desarrollo del PMWS, el PCV2 se considera un agente infeccioso necesario pero generalmente no es suficiente para desencadenar la enfermedad clínica. Dentro de los factores que favorecen el PMWS, se encuentran la co-infección con otros virus, como el parvovirus, estimulación del sistema inmune, etc. (Hernández, 2011).

Una manera de entender el comportamiento y la epidemiología de los virus es mediante los estudios de genética molecular. Estos ayudan a generar conocimiento de genotipos existentes y su distribución en una región, lo cual favorece el entendimiento de la enfermedad y ayuda al desarrollo de mejor métodos de profilaxis o de protección. Por lo anterior, en este trabajo se realizó una caracterización molecular del PCV2 de muestras provenientes de granjas porcícolas del Estado de Sonora y se establecieron relaciones filogenéticas entre ellas y con virus de otras regiones de México y del mundo.

## ANTECEDENTES

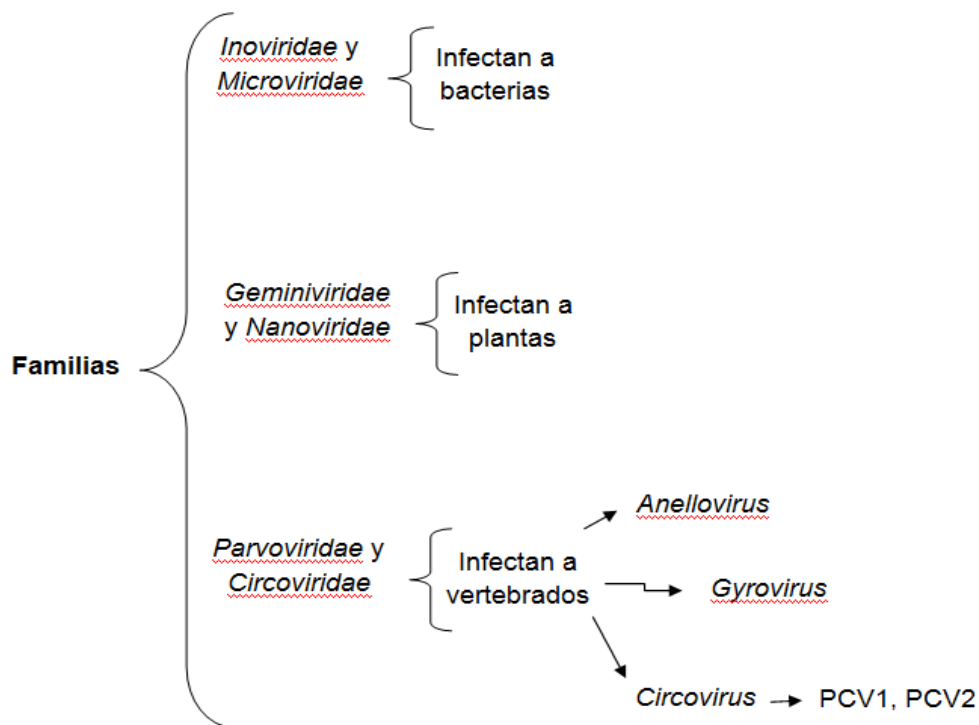
Los circovirus porcinos fueron descubiertos en 1974 como un contaminante de la línea celular PK-15. Posteriormente, se descubrió una variante patógena de los circovirus, a la cual se le denominó circovirus porcino tipo 2. Se distribuyen prácticamente alrededor del mundo, ya que su presencia se ha reportado en América, Asia, Europa y Oceanía (Allan y Ellis, 2000)

### **Taxonomía de los Circovirus Porcinos**

Los virus con una sola cadena de ADN, como los circovirus porcinos, se clasifican en 6 familias: los virus de las familias *Inoviridae* y *Microviridae* infectan a bacterias, los de las familias *Geminiviridae* y *Nanoviridae* son virus que infectan a plantas. Mientras que las familias *Parvoviridae* y *Circoviridae* se han encontrado en vertebrados. La familia *Circoviridae* se divide en los géneros *Circovirus*, *Anellovirus* y *Gyrovirus*. El género *Circovirus* contiene a los circovirus porcinos tipo 1 y 2 y virus aviares como circovirus de palomas, circovirus de canarios, ganso, pato, cuervo, entre otros (Lefebvre, 2009) En la Figura 1 se muestra un esquema representativo de esta taxonomía.

### **Morfología y Características Físicas de los Circovirus Porcinos**

Los PCV poseen genoma circular formado por una cadena sencilla de DNA en sentido negativo. Estos son virus pequeños con un tamaño de 17 nanómetros y sin envoltura. Son resistentes a pH ácido de hasta 3, temperaturas de 60°C durante 30 min y a desinfectantes comerciales basados en alcohol, agentes oxidantes o fenol (Lefebvre, 2009). Dentro del PCV existen dos tipos: El PCV1



**Figura 1. Taxonomía del circovirus. Adaptado de Lefebvre, 2009**

que tiene un tamaño de 1758 a 1760 nt y el PCV2 que tiene un tamaño de 1766 a 1768 nt y el porcentaje de identidad entre ambos es del 76% (Hammel *et al.*, 1998; Meehan *et al.*, 1998).

### **Importancia del PCV2 en la Producción Porcina**

El PCV2 es uno de los virus que más afecta a la producción porcina a nivel mundial, ocasionando enormes pérdidas económicas (alrededor de 9,428'786,400 millones de pesos anuales, Rice, 2011). Lo anterior se debe a que provoca adelgazamiento de los animales, disminución en la producción. Además, condiciona a una alta mortalidad debido a otras enfermedades conocidas como enfermedades asociadas a circovirus porcino (PCVAD, por sus siglas en inglés) (Allan y Ellis 2000).



## **Patogénesis del PCV2**

La morbilidad y mortalidad causada por PCV2 son muy variables según el caso. La morbilidad puede oscilar entre el 4 y el 30% de los cerdos. Los cerdos afectados presentan una tasa de mortalidad variables, pudiendo alcanzar el 70 o el 80% de los cerdos afectados. Histológicamente, durante el desarrollo de la enfermedad por PCV2 se han observado cambios como una neumonía intersticial granulomatosa acompañada de un agrandamiento de células, necrosis, desprendimiento de aire en el epitelio que puede progresar hasta convertirse en una bronquiolitis obliterante y linfadenopatía. Debido a que el PCV2 se caracteriza por el desarrollo de condiciones asociadas a lesiones en distintos órganos, se ha utilizado el término de síndrome multifactorial de desmedro posdestete (PMWS, por sus siglas en ingles) para describir la condición clínica. Usualmente en los cerdos con PMWS existe una linfadenopatía sistémica, que involucra a los nódulos linfáticos mediastínicos, bronquiales, mesentéricos e inguinales. Finalmente, en las últimas etapas de la enfermedad se ha observado una hinchazón y vacuolización de los hepatocitos y reemplazamiento progresivo de hepatocitos por células histiocíticas (Allan y Ellis, 2000).

## **Epidemiología**

El PCV2 afecta prácticamente cerdos de todos los grupos de edad, sin embargo durante el desarrollo de PMWS, los cerdos más afectados se encuentran entre las 6 y 14 semanas de edad (Sibila *et al.*, 2004). En lo que a estadísticas del PCV2 se refiere, se asume que este virus presenta una distribución mundial debido a la presencia de anticuerpos contra el PCV2 en todos los países donde se ha buscado. En México, se ha reportado que el virus se encuentra en todo el territorio (Ramírez-Mendoza *et al.*, 2009; Robles *et al.*, 2010). Es importante destacar que en el estudio de Ramírez-Mendoza *et al.* (2009), al ser un análisis retrospectivo desde el año 1972 al 2000, se reporta evidencia de infección por

PCV2 en México mucho antes de la primera descripción del PMWS en el país, realizada en 2001 (Trujano *et al.*, 2001).

En otro estudio, se reportó que en granjas comerciales de Estados Unidos y de México existe una prevalencia del 47% de ADN para PCV2 en cerdos neonatos (59/125), lo cual implica un porcentaje relativamente alto de la enfermedad (Shen *et al.*, 2010). Se ha reportado a nivel mundial, que la seroprevalencia del virus en animales va de de un 50 al 100% (Robles *et al.*, 2010). En donde los genotipos más reportados han sido el PCV2a y PCV2b y unos pocos casos para los genotipos restantes.

El PCV2 se ha dividido en cinco genotipos diferentes. En ellos se encuentran el PCV2a o del grupo 2, PCV2b o del grupo 1 (Olvera *et al.*, 2007; Grau-Roma *et al.*, 2008; Fort 2009), el PCV2c (descubierto en los años 80's en muestras provenientes de Dinamarca), PCV2d (observado en China, el cual posee 1766 nt.) y PCV2e, reportado recientemente en China y en Tailandia (Fenaux *et al.*, 2000; Dupont *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2010; Zhai *et al.*, 2011; Jantafong *et al.*, 2011).

Dentro de estos 5 genotipos del PCV2, los más reportados son PCV2a y PCV2b. El PCV2b posee 1767 nucleótidos y el PCV2a 1768 nucleótidos, mientras que su identidades nucleotídicas varia del 92 al 100% (Robles *et al.*, 2010; Resendiz *et al.*, 2012), siendo entre un 99% y 100 para el PCV2a y entre un 92-95 para el PCV2b (Zhai *et al.*, 2011). Además en el ORF2, existe una secuencia motivo el TcA/aac/CCC/CG presente en PCV2b y el motivo AcC/aac/AAA/AT en la posición 1486 del genoma de PCV2a (Rowland y Hesse, 2009).

Se ha sugerido que las diferencias de genotipos PCV2 pueden relacionarse con la región de procedencia del virus y que el genotipo no están directamente relacionado a su patogenicidad (Larochelle *et al.*, 2002; De Boissésou *et al.*, 2004; Juhan *et al.*, 2010). Por otro lado, en experimentos *in vitro*, se ha visto que la proteína del ORF3 está involucrada en la inducción de

apoptosis de células PK-15 (Liu *et al.*, 2005). Recientemente se ha reportado que los lechones inoculados con mutantes de PCV2 deficientes en ORF3 mostraron una disminución de la viremia y menos lesiones asociadas a PCV2, en comparación con cerdos inoculados con PCV2 de tipo silvestre. Por lo que, se ha sugerido que el ORF3 si podría estar relacionado tanto en la replicación como en la patogenicidad del virus (Karuppanan *et al.*, 2009; Juhan *et al.*, 2010).

### **Transmisión del PCV2 entre Cerdos**

El PCV2 se ha detectado excretado en distintas vías como las secreciones nasales, saliva, orina, semen, heces y secreciones oculares. Se asume que la ruta de transmisión más probable para PCV2 es por la vía oro-nasal, lo que indica que la transmisión entre cerda-lechón o lechón-lechón son eventos muy frecuentes (Segalés, 2005). También, se ha demostrado que los sementales infectados con PCV2 pueden secretar el virus a través del semen (Kim *et al.*, 2003). Sin embargo, la vía de transmisión sexual hasta el momento no ha sido estudiada o confirmada.

### **Diagnóstico de PCV2**

El diagnóstico del PCV2 se basa en la presencia de sintomatología clínica, lesiones características y detección del PCV2. Tomando en cuenta los tres puntos anteriores, la presencia del PCV2 se puede demostrar mediante técnicas de aislamiento vírico en células susceptibles, prueba de inmunohistoquímica, hibridación *in situ*, serología, ELISA y PCR (Allan y Ellis, 2000). Dentro de estas técnicas, el PCR convencional es importante porque nos permite detectar la presencia del virus en distintas muestras. Además la cuantificación del PCV2 es crucial, por lo cual se utilizan técnicas como el PCR en tiempo real. Las PCVAD son las principales enfermedades causadas por el PCV2, sin embargo no son tan agresivas. Los métodos de diagnóstico más

completos para PCVAD se basan en la detección de antígenos virales y/o en los ácidos nucleicos o las lesiones en los cerdos que cursan con la enfermedad (Allan y Ellis, 2000).

### **Prevención y Control del PCV2**

Las medidas de bioseguridad generales que se aplican en las granjas porcícolas para una correcta contención de enfermedades también son eficientes para la prevención de infecciones por PCV2. Entre estas podemos destacar: nivel de sanidad, elevada limpieza y desinfección de la zona de corrales; desparasitación de los cerdos, espacio amplio en la granja y en las diferentes zonas o etapas. También es importante garantizar una temperatura ambiental adecuada; tener un estricto control de las entradas y salidas de los cerdos (no mezclar cerdos provenientes de distintas granjas), vigilar el estatus vírico de los cerdos para evitar el contacto entre cerdos sanos e infectados y asegurar un sistema de vacunación adecuado (Beach y Meng, 2011; Allan y Ellis, 2000).

Además de los métodos anteriores, la aparición de las vacunas ha ayudado en el control del PCV2. La mayoría de las vacunas se basan en la proteína de la cápside del virus (ORF2) y son muy eficaces (Beach y Meng, 2011). Aunque los métodos de bioseguridad son recomendados, no siempre se aseguran la eliminación del PCV2 y de las enfermedades relacionadas con este virus; es por ello, que un diagnóstico rápido y acertado junto con la remoción de los animales infectados, combinado con buenas prácticas de higiene, podría ser uno de los métodos más confiables para controlar el PCV2 y las enfermedades relacionadas (Allan y Ellis, 2000).

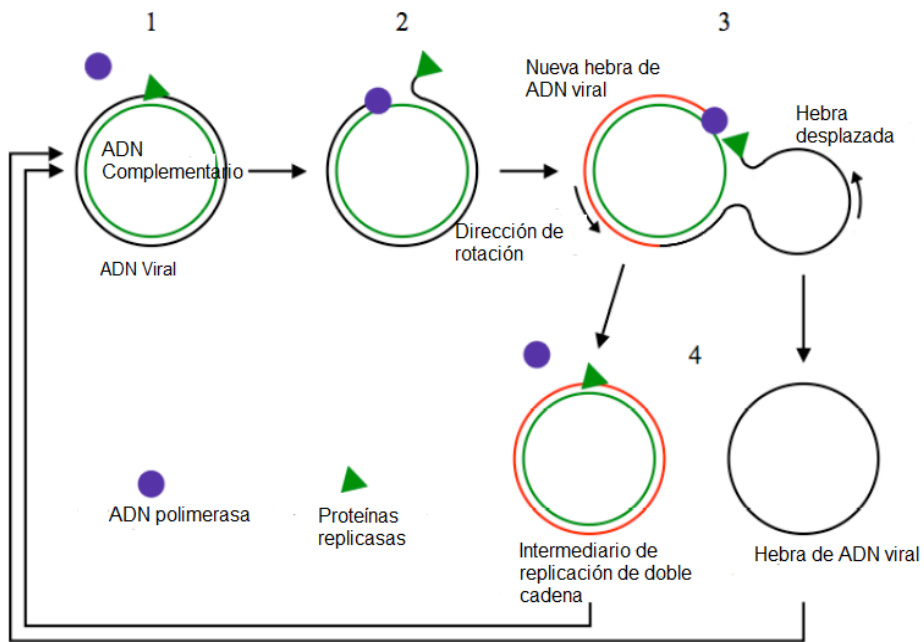
### **Mecanismo de Replicación de los Circovirus Porcinos**

Los PCV replican su genoma mediante el mecanismo de replicación de rotación circular (RCR por sus siglas en inglés) (Figura 2). Después de infectar a una

célula hospedera, la ADN polimerasa convierte la cadena sencilla de ADN en una de doble cadena que sirve como intermediario en la replicación. Subsecuentemente se expresan las proteínas Rep y Rep' en la célula infectada y estas moléculas de replicación se unen a la doble cadena de ADN sintetizada.

Mientras tanto, la región de origen va a comprender la región intergénica y el inicio de los puntos de traducción de los genes de Rep y de la cápside transcritos. Dentro del origen de replicación, hay una estructura de giro la cual posee un nucleótidos en el ápice y estos nucleótidos son conservados en las familias *Circoviridae*, *Geminiviridae* y *Nanoviridae*. Los nucleótidos consisten en una secuencia corta de TAGTATTAC para el PCV1 y AAGTATTAC para el PCV2 (Mankertz *et al.*, 1997; Hamel *et al.*, 1998; Meehan *et al.*, 1998). Este motivo de nucleótidos es esencial para la replicación de los circovirus (Chung *et al.*, 2005).

En el brazo derecho de la estructura de giro del origen de replicación, se encuentra el sitio de unión de Rep y Rep'. Después de unirse estas proteínas a la doble cadena de ADN intermediaria, las replicasas exhiben a los motivos de nucleótidos, los cuales se unen a la cadena de ADN del virus creando dos terminaciones libres de la cadena de ADN viral. En donde, una de estas dos terminaciones libres, sirve como punto de replicación del ADN mediante la polimerasa. En la replicación, el ADN viral original es desplazado por nuevo ADN viral sintetizado y después de un ciclo de síntesis, Rep y Rep' unen las dos terminaciones libres de la cadena de ADN viral desplazada, en los dos extremos terminales libres de la nueva cadena de ADN viral sintetizada. Este proceso libera la cadena original de ADN viral, después, las replicasas se unen a la cadena de ADN viral intermediaria de replicación formada por una doble cadena de ADN (Lefebvre, 2009).



**Figura 2.- Modelo de replicación del PCV2. Adaptado de Lefebvre, 2009**

### **Características Genómicas del PCV2**

Una de las características genéticas que más se han estudiado del PCV2 es su genoma, donde se encuentran sus ORF. La identidad genética dentro de los aislados de PCV2 es relativamente alta a pesar de la diversidad entre la población de PCV2 que existe. Los aislados de PCV2 tienen una relación de identidad de nucleótidos de más del 90%, mientras que el genoma del PCV1 y PCV2 posee una similitud de nucleótidos de alrededor del 76% (Allan y Ellis, 2000; Liu *et al.*, 2006; Fort, 2009).

El PCV2 posee 11 marcos de lectura abiertos (ORF), pero la expresión de proteínas se ha descrito solamente en 3 de ellos (Fort, 2009) (Figura 3). El ORF1, también llamado gen Rep tiene un tamaño de 945 pb, se transcribe en dirección de las agujas del reloj. Codifica para las proteínas de replicación Rep y Rep' de 314 y 178 aminoácidos, respectivamente. En el genoma del PCV2 se encuentra entre el nucleótido 50 y 995. El ORF2, también llamado gen Cap, se

transcribe en la cadena complementaria, en orientación contraria a las manecillas del reloj y codifica para una única proteína estructural de 233-234 aminoácidos, la cápside la proteína más inmunogénica del virus (Allan y Ellis, 2000; Jantafong *et al.*, 2011). Este marco de lectura se encuentra entre los nucleótidos 1030-1734 dentro del genoma del PCV2. El ORF2 es considerado un importante marcador filogenético para la diferenciación, ya que los árboles filogenéticos construidos con el genoma entero, pueden ser reconstruidos con el gen de la cápside, pero no con otros ORF's como el del ORF1 u ORF3. Esto se debe a que el gen de la cápside es más variable que el gen Rep y el ORF3, ya que la identidad de nucleótidos del ORF2 se encuentra entre 91-99%, mientras que la identidad del ORF1 y ORF3 es del 99% (Lefebvre, 2009; Juhan *et al.*, 2010).

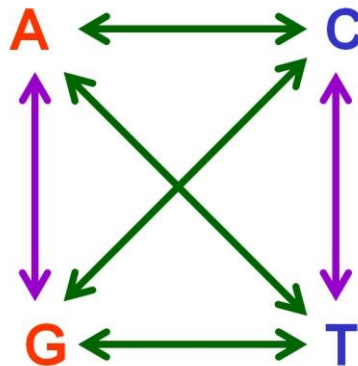
El otro marco de lectura es el ORF3 que está localizado en los nucleótidos del 348 al 671 dentro del genoma del PCV2 y codifica para una proteína no estructural de 105 aminoácidos de longitud.

### **Caracterización Molecular del PCV2**

La caracterización molecular del PCV2 ha permitido identificar distintos genotipos del virus, además gracias a estos estudios se ha comprendido que las variaciones genéticas del PCV2 deben asociarse más al origen geográfico que a la virulencia (Opriessnig *et al.*, 2006).

Dentro de los conocimientos que se tienen del código genético, se sabe que éste es degenerado. Lo anterior significa que varios codones pueden dar origen a un mismo aminoácido. De esta manera, cuando existe un cambio de nucleótido y se mantiene el mismo aminoácido, se dice que existe una mutación silenciosa o sustitución sinónimo. Por eso, es importante conocer la relación que existe entre el número de las diferencias sinónimo (dS) y el número de las diferencias no sinónimo, ya que esto nos dará una idea de qué tipo de selección (positiva o negativa) es la que opera en el virus, en este caso el PCV2.

Por otro lado, cuando el cambio de nucleótido da origen a un nuevo aminoácido, se dice que existe una sustitución productiva o no sinónimo. Por tanto, también dentro de los estudios de caracterizaciones moleculares, es importante conocer la frecuencia de nucleótidos y relación de sustituciones de transición y transversión. En donde una sustitución de transición se entiende como un cambio de purina por purina o pirimidina por pirimidina; mientras que una sustitución de transversión se entiende como un cambio de purina por pirimidina y viceversa. Lo anterior permitirá obtener información como la conservación de la secuencia, el tipo de sustituciones y el tipo de presión de selección que existe entre las secuencias (Figura 3).



**Figura 3. Esquema de sustituciones y transversiones.** Las flechas moradas representan a las transiciones, mientras que las flechas verdes representan transversiones

#### Distribución Geográfica del PCV2

La distribución del PCV2 es muy amplia y abarca prácticamente todo el mundo. Se ha encontrado en América (México, Estados Unidos, Canadá, Brasil), Europa (España, Francia, Holanda, Portugal), Asia (China, Corea del Sur, Japón, Taiwan) y Oceanía (Australia y Nueva Zelanda).



## En Europa

Gracias a caracterizaciones moleculares y estudios filogenéticos, se han podido encontrar variaciones genéticas y evolutivas del genoma del PCV2 en diferentes regiones del mundo. Uno de esos casos fue reportado por Dan *et al.*, en el 2003 en Hungría, quienes secuenciaron 6 muestras del genoma completo de PCV2 proveniente de distintos órganos de diferentes cerdos. En el análisis filogenético de estas muestras, dos se agruparon junto a secuencias españolas, 2 estuvieron en un grupo en común con secuencias de Francia, Alemania y Reino Unido y las 2 restantes tuvieron una relación cercana a secuencias alemanas de PCV2 (Dan *et al.*, 2006).

En una investigación de caso-control en Alemania, se reportó que de 10 aislados del PCV2 provenientes de cerdos con PMWS, los 10 aislados se clasificaron en un solo grupo a pesar de que difirieron en 77 nucleótidos uno del otro (porcentaje de identidad del 95.6-100%). Además, estas secuencias se agruparon filogenéticamente con secuencias provenientes de Estados Unidos, Canadá, Corea del Sur, Holanda, Inglaterra, Francia y España. Así mismo, se registraron cambios en 4 posiciones del ORF1 y en 16 posiciones del ORF2; pero no hubo patrones de cambio consistentes entre cerdos sin manifestación clínica y los que cursaron con PMWS (Grierson *et al.*, 2004)

En otro estudio también en Alemania, Knell *et al.* (2005), secuenciaron el genoma completo del PCV2 de jabalíes, para después clonarlo en un plásmido y amplificar segmentos del clon por PCR. Los autores reportaron que la longitud del ADN genómico fue de 1767 pb. En comparación de otras secuencias publicadas, las secuencias alemanas mostraron una delección de un nucleótido en la posición 1042/1043 del genoma del PCV2. Esta delección causó un cambio del ORF2 en el codón de terminación siendo desplazado hacia la región 3' sin traducir, permitiendo que se agregara una lisina en la posición 234 en la secuencia de la proteína de la cápside y originando un producto de 234

aminoácidos en lugar de 233. Sin embargo, los autores no reportaron cambio funcional (Knell *et al.*, 2005).

De Boissésón *et al.* (2004), reportaron otra caracterización del genoma completo de PCV2 en cerdos afectados y no afectados con PMWS en Francia. La mayoría de las secuencias presentaron 1767 nt de longitud en los casos con PMWS. Por otro lado, dos de las cepas donde no se presentó PMWS tuvieron una longitud de 1768 y 1778 nt. Esto se debe a una inserción en la posición 42, de 9 bases corriente arriba del codón de inicio del ORF1. Esta inserción introdujo un hexámero (CGGCAG) y un pentámero (CACCT). Para el caso de la cepa sin PMWS y con 1768 pb, esta inserción representó que esa muestra fuera la más distante genéticamente. Ya que las muestras anteriores se relacionaban filogenéticamente con muestras provenientes de Europa, mientras que la muestra de 1768, además de agruparse con muestras provenientes de Europa, también se relacionó filogenéticamente con muestras provenientes de Canadá.

Un dato importante descrito por De Boissésón *et al.* (2004), fue que la PCR específico para PCV2, fue positivo para el 100% de los animales con PMWS (31/31), mientras que en los cerdos que no desarrollaron PMWS, el PCR fue positivo para el 76% de los animales (19/25). De estos animales, los principales órganos positivos para el virus fueron los nódulos linfáticos. Esto va de acuerdo a los reportes sobre las patologías ocasionadas por el PCV2, en donde se ha observado que los nódulos linfáticos son de los órganos más afectados.

Dentro de los análisis filogenéticos realizados por De Boissésón *et al.* (2004), se reportó que los aislados se dividían en dos grupos principales. En el primer grupo se encontraban las secuencias del PCV2 de este estudio, más una secuencia de Francia, Reino Unido y Holanda. Además, el primer cluster se dividió en dos subclusters: uno compuesto por tres aislados de PMWS negativo y el segundo con 19 secuencias del PCV2, sin importar su condición de PMWS.

El segundo cluster incluía a un grupo compuesto por un aislado de Alemania, uno de Canadá y otro de Francia.

En Croacia, se ha reportado el análisis filogenético del PCV2 que muestra una relación cercana con secuencias del PCV2 de Eslovenia, Francia, Holanda, Reino Unido, China y Hungría (Lipej *et al.*, 2005). Así mismo, en Rumania, se ha reportado que los cerdos infectados de PCV2 están filogenéticamente relacionados con el PCV2 de Francia y Hungría (Cadar *et al.*, 2007).

### **En Oceanía**

En Oceanía también se han realizado investigaciones para detectar la presencia del circovirus porcino. Específicamente, en Australia se reportó que el PCV1 se encontró en cerdos del sur-oeste de ese país y Nueva Gales del sur y el PCV2 en cerdos del oeste de Australia, Nueva Gales del sur y Queensland (Raye *et al.*, 2005). En otra investigación, Muhling *et al.* (2006), utilizaron tejidos de cerdos con signos clínicos de PMWS, para determinar si la ausencia de la enfermedad se asociaba con cambios genéticos entre cepas del PCV presentes en Australia y en países donde se ha encontrado PMWS. Como resultado, las muestras australianas del PCV2 tuvieron una identidad del 94-99% con otras cepas de PCV2 del mundo que fueron aisladas de cerdos con PMWS. Sin embargo, no se reportaron diferencias significativas en la secuencia de aminoácidos de las muestras de PCV2 con otras cepas asociadas con PMWS en el mundo.

### **En Asia**

Wang *et al.* (2004) reportaron la caracterización molecular de aislados del genoma completo del PCV2 en lechones de Taiwán en donde los lechones infectados con PCV2 poseían una secuencia de 1768 pb y una identidad en la secuencia de aminoácidos de entre 95-99%.

En el sureste de China, Shuai *et al.* (2007) reportaron la caracterización molecular del ORF2 en cerdos con PCV2 proveniente de una granja con alta seroprevalencia. Los autores secuenciaron y alinearon el ORF2 de 27 aislados del PCV2 los cuales estaban estrechamente relacionadas entre sí (98-100%) y mostraron una menor identidad respecto a aislados de otras regiones de China (91-100%), o bien entre aislados de otras partes del mundo (91.3-98.9%). Los análisis filogenéticos revelaron 2 grupos con 48 cepas cada uno, donde se incluían secuencias del banco de genes que se utilizaron para comparar con las de los 27 aislados reportados por Guo *et al.* (2010). El grupo 1 tuvo 2 subgrupos y el grupo 2 contenía la mayoría de las secuencias que tenían sustituciones de aminoácidos. El subgrupo 1b contenía todos los aislados del ORF2 de 705 pb de longitud. Los 27 aislados secuenciados en el estudio se agruparon en el subgrupo 1a con otros aislados provenientes de China.

En Corea del Sur, An *et al.* (2007) reportaron una caracterización filogenética del PCV2 en cerdos diagnosticados con PMWS y el síndrome porcino de dermatitis y nefropatía (PDNS). Los análisis moleculares mostraron que las secuencias que codifican para la proteína de la cápside, se pueden dividir filogenéticamente en 2 grupos. El grupo 1 tiene la secuencia CCCCCG/TC y el grupo 2 AAAATC en los nucleótidos 262-267 del ORF2. El grupo 1 pueden presentar prolina, alanina o leucina, mientras que en el grupo 2 pueden ser lisina o isoleucina en las posiciones 88-89 de la cápside. En el grupo 1 se detectaron secuencias de Holanda, Tailandia y Reino Unido. En el grupo 2 se encontraron secuencias provenientes de Japón, Canadá, España, Taiwán y Sudáfrica. En ambos grupos se encontraron aislados de Corea, Francia, Hungría, Austria, Alemania, Brasil y Estados Unidos.

En China, Guo *et al.* (2010), reportaron la caracterización molecular del genoma de 19 cepas aisladas de PCV2 con un tamaño de entre 1766 y 1768 nucleótidos. Los autores reportaron que la secuencia de 1766 nucleótidos, pertenecía al genotipo PCV2b mediante análisis bioinformático, se observó una

mutación en la posición 39, la cual corresponde a una delección de citocina. Mientras que en otra cepa se observó una delección de guanina en la posición 1039. Estas cepas mutantes mostraron una elongación de lisina en comparación a las otras cepas. Además de estas mutaciones, dos cepas con genomas de 1768 nucleótidos tuvieron una inserción de base (timina) en la posición 1040. Mediante alineamientos de secuencias y análisis, se encontró que las posiciones de delecciones de bases difieren de acuerdo a las distintas cepas para aquellas muestras con genoma de 1766 nucleótidos. Por ejemplo, además de las delecciones en las posiciones 39 y 1039, se han reportado delecciones en las bases 1060, 1002 y 1003. Estos resultados sugieren que las mutaciones ocurren frecuentemente en las cepas de PCV2.

Chae y Choi (2010), reportaron una caracterización genética de cerdos con o sin PMWS en Corea del Sur. En este estudio se secuenciaron y analizaron 38 muestras de PCV2. Los análisis filogenéticos mostraron dos grupos. Uno en donde los cerdos infectados con PMWS pertenecen al PCV2b, mientras que los casos sin signos clínicos pertenecen al PCV2a. En Malasia, se reportó la caracterización molecular del genoma completo de 13 aislados de PCV2 de cerdos con síntomas de PCVAD. Los análisis mostraron que todas las secuencias de Malasia se agruparon filogenéticamente en el genotipo PCV2b, relacionándose con secuencias provenientes de Holanda, Portugal, Corea del Sur y China. Además de poseer una identidad de nucleótidos del 97-99%, mientras que la identidad de aminoácidos del ORF2 fue de 94-100% (Jaganathan *et al.*, 2011).

En Tailandia Jantafong *et al.* (2011) reportaron una amplificación y secuenciación del ORF2 de PCV2 para comparar granjas con cerdos que no desarrollaron PMWS (1 cerdo) respecto a aquellas granjas con el PMWS (9 cerdos). Las 10 secuencias del ORF2 se compararon mediante análisis filogenéticos con otras 82 previamente reportadas en el banco de genes y se demostró que los 10 aislados poseían una identidad nucleotídica de entre 92.4

y 99.5%. El árbol filogenético reveló que estas secuencias se podían agrupar en 5 subtipos: PCV2a, PCV2b, PCV2c, PCV2d y PCV2e (Jantafong *et al.*, 2011). Al comparar y clasificar los nucleótidos de la posición 262-267 y los aminoácidos de la posición 88-89 del ORF2 de todas las secuencias, se observaron que poseían las secuencias consenso CCCCCG, CCCCTC y AAAATC, que corresponden al genotipo PCV2a. Mientras que al alinear el ORF2 de las 10 secuencias utilizadas originalmente para este estudio, se reveló que todos los aislados contenían motivos del PCV2b.

### **En América**

En América, específicamente Canadá y algunas regiones de Estados Unidos, se ha realizado la caracterización molecular mediante PCR convencional y otros métodos, como RFLP (Restriction fragment length polymorphism o polimorfismo de restricción de fragmento largo), para detectar diferencias en aislados de PCV2 y PCV1. De acuerdo a Fenaux *et al.* (2000) el genoma de las muestras infectadas con PCV2 aislados de cerdos que cursaron con PMWS, mostró una longitud de 1768 pb y un porcentaje de identidad en la secuencia del 95-99%. Mientras que el ORF2 mostró una identidad de aminoácidos de entre 90-100%. Además, mediante la secuenciación se pudo observar que la región amino terminal del ORF2 del PCV2 es rica en residuos de aminoácidos básicos (arginina y lisina). Además se observó que el genoma de los aislados de PCV1 poseía una longitud de 1758 a 1760 pb y una identidad entre su genoma del 98-99%. Por otro lado, la identidad de la secuencia de nucleótidos entre los genomas del PCV1 y PCV2 fue del 75-77%.

Para obtener un mejor entendimiento de las relaciones genéticas y evolutivas del PCV, Fenaux *et al.* (2000), realizaron el análisis filogenético de secuencias provenientes de diferentes partes del mundo, incluyendo Estados Unidos y Canadá. Con este estudio se encontró que los aislados del PCV1

estaban estrechamente relacionados, el mismo caso fue para Canadá, solo dos de estas cepas no estaban relacionadas con el resto.

En Cuba, se reportó una investigación donde se colectaron tejidos de cerdos enfermos detectándose que el 67.7% de las muestras (23/34) provenientes de 7 cerdos, fueron positivos para PCV2, mientras que en el resto de las muestras no se detectó el virus. Además, se observó una co-infección con parvovirus porcino (PPV) en 10 de las muestras y en 17 muestras también se detectó una co-infección con el virus de la peste porcina (CSFV). Este estudio demuestra una co-infección de PCV2 con PPV y CSFV (Pérez *et al.*, 2010a). Así mismo, también en Cuba en un estudio sobre la diversidad genética en las secuencias del PCV2, las cuales mostraron variaciones en la secuencia de aminoácidos en la proteína de la cápside. Además, todas las secuencias analizadas demostraron que el PCV2 detectado en Cuba, corresponde al genotipo del PCV2b (Pérez *et al.*, 2010b).

En el caso de México, Robles *et al.* (2010) reportaron el análisis genético de la secuencia del ORF2 en muestras de tejido y suero provenientes de distintas regiones de México. Los autores indicaron que el PCV2 en México tiene una identidad de nucleótidos entre 89-99% y filogenéticamente se divide en dos genotipos principales (PCV2a y PCV2b). El primer grupo se dividió en dos subgrupos que corresponden a las regiones del centro y sureste de México; mientras que el segundo grupo está formado únicamente por un aislado de la región central. El tercer grupo incluye a la mayoría de secuencias y se subdivide en 3 subgrupos: un subgrupo con 2 secuencias del norte de México, un subgrupo más con una secuencia del norte de México y un subgrupo con 2 secuencias que podrían ser heterólogas respecto a los dos subgrupos anteriores.

En el mismo estudio, Robles *et al.* (2010), reportaron el análisis de la secuencia de aminoácidos, ésta mostró tener un porcentaje de identidad de entre 88-100%, siendo las cepas con mayores diferencias aquellas que

provenían de Querétaro y Guanajuato. La diferencia principal en los dos genotipos del PCV2 en México son 11 cambios de aminoácidos en el ORF2.

Al comparar las muestras de PCV2 aislado en México con otras del resto del mundo, se identificó que en México existe el genotipo a y b del PCV2. Las muestras provenientes de Guanajuato y Querétaro se encontraron dentro del genotipo PCV2a, mientras que las muestras de otras regiones (Jalisco, Puebla, Michoacán, Nuevo León, Sonora y Yucatán) se encontraron dentro del genotipo PCV2b. La mayor parte de las secuencias del PCV2 en México están relacionadas con virus provenientes de Europa, excepto por la de Puebla que está relacionada con virus de China y de Yucatán, relacionada con PCV2 de Canadá (Robles *et al.*, 2010).

Por otro lado, también existen reportes realizados para el ORF2 del PCV2 en Sonora México (Reséndiz *et al.*, 2012; Burgara-Estrella *et al.*, 2012). En el primer reporte, Reséndiz *et al.* (2012), señalaron que en el Estado de Sonora se encontraron dos genotipos del PCV2 (PCV2a y PCV2b) en muestras de suero positivas a PCV2. Mientras que Burgara-Estrella *et al.* (2012), en muestras de suero y semen de cerdos positivos a PCV2 reportaron solamente el genotipo PCV2b, el cual sugirieron que podría ser el predominante en el estado de Sonora.



## **JUSTIFICACIÓN**

El PCV2 es una de los virus más importantes que afectan a los cerdos. Este virus posee un genoma con 3 ORF'S. Uno de ellos, el ORF2 codifica para la cápside del virus, posee una alta variabilidad y se ha utilizado ampliamente para realizar análisis filogenéticos. Este tipo de estudios son importantes ya que permitirá conocer las características moleculares del PCV2 en Sonora, su relación filogenética con cepas de distintas partes del mundo, el nivel de identidad entre las cepas del Estado e incluso con muestras provenientes de diferentes países. Toda esta información podría orientar a que en un futuro se mejoren los métodos ya existentes de control y/o profilaxis del PCV2 en el Estado de Sonora.

## **HIPÓTESIS**

Las secuencias de nucleótidos del ORF2 del PCV2 provenientes del Estado de Sonora presentarán diferencias que permitan establecer relaciones filogenéticas con secuencias del ORF2 provenientes de México y el mundo.

## **OBJETIVOS**

### General

Secuenciar el ORF2 del circovirus porcino tipo 2 de muestras provenientes de granjas porcícolas del Estado de Sonora.

### Específicos

- 1.- Calcular el porcentaje de identidad entre las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del ORF2 del PCV2 de aislados del Estado de Sonora mediante alineamientos múltiples de secuencias.
- 2.- Identificar diferencias en las secuencias nucleotídicas del PCV2 provenientes del Estado de Sonora con el PCV2 de otras partes de México y el mundo.
- 3.- Establecer relaciones filogenéticas entre las muestras de PCV2 provenientes de distintas granjas del Estado de Sonora con virus de otras regiones del mundo por el método de Neighbor-Joining.
- 4.- Realizar un análisis evolutivo mediante el cálculo del radio de las diferencias no sinónimas y sinónimas (dN/dS) de las secuencias de Sonora.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestreo

Se colectaron un total de 353 muestras de suero para diagnóstico de PCV2 entre los meses de octubre del 2011 a junio de 2012 de 11 granjas porcícolas del Estado de Sonora. El diagnóstico se realizó mediante PCR convencional para amplificar el ORF2 del PCV2.

### Extracción de ADN, PCR y secuenciación

La extracción de ADN se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Qiagen). Cada reacción de PCR se realizó con la siguiente mezcla: 5  $\mu$ L de  $MgCl_2$  (25 mM), 5  $\mu$ L de dNTP mix (10 mM), 5  $\mu$ L de buffer 10x, 1.5  $\mu$ L del iniciador sentido (10  $\mu$ M), 1.5  $\mu$ L del iniciador antisentido (10  $\mu$ M), 29.75  $\mu$ L de agua, 0.25  $\mu$ L de Taq polimerasa recombinante brasileña (5 u/ $\mu$ L) (Invitrogen) y 2  $\mu$ L de templado. Las condiciones del PCR fueron: 1 ciclo a 95° C por 15 minutos, 35 ciclos de: 94° C durante 30 segundos, 60° C durante 30 segundos y 72° C durante 1 minuto; finalmente un ciclo a 72° C durante 10 minutos. Posteriormente las muestras fueron sometidas a una electroforesis en gel de agarosa al 1.2%.

La secuencia de los iniciadores utilizados fueron el sentido 5'-AGCGCACTTCTTTTCGTTTTTCAG-3' y el iniciador antisentido 5'-GAATGCGGCCGCTTATCACTTCGTAATGGTTTTTATTATTCA-3' reportados previamente y que amplifican un producto de 800 pares de bases (pb) ver Figura 4 (Lefebvre *et al.*, 2008). Las muestras se secuenciaron en la Universidad de Arizona.

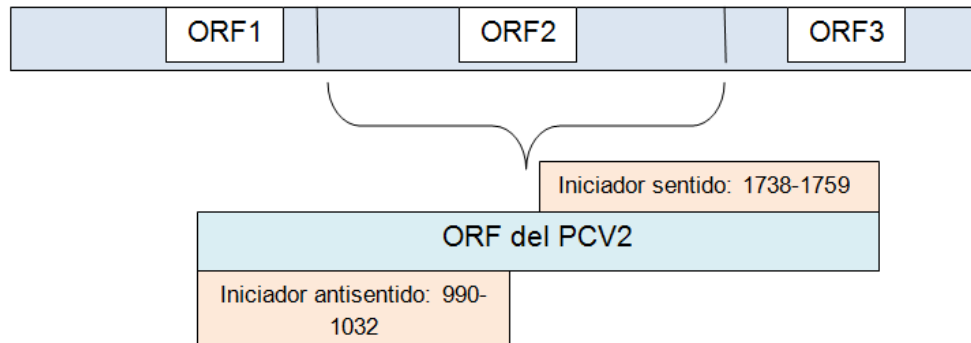
### Análisis de Datos

Las secuencias de los diferentes aislados virales fueron analizadas para confirmar su calidad y se seleccionaron aquellas secuencias que codificaran para la proteína de la cápside de PCV. Las secuencias se alinearon con el paquete CLUSTALW, disponible en: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> y con el programa BIOEDIT 7.0.9.0 se obtuvo el porcentaje de identidad de nucleótidos. Posteriormente, se llevó a cabo la deducción de la secuencia de aminoácidos de las secuencias de este estudio mediante el programa disponible en: <http://insilico.ehu.es/translate/> (Bikandi *et al.*, 2004).

Finalmente con el programa MEGA4, se realizó un análisis filogenético de las secuencias de nucleótidos de los aislados sonorenses mediante el método de Neighbor-Joining y el modelo de Kimura de 2 parámetros. La robustez del análisis se calculó con un análisis bootstrap de 1000 repeticiones. En el análisis se incluyeron 49 secuencias reportadas en del banco de genes incluidas secuencias del ORF2 del PCV2 reportadas para Sonora

Después, con ayuda del programa MEGA4 se estimó la relación de sustituciones de transición/transversión. Posteriormente se realizó un análisis evolutivo mediante el cálculo de la relación de sustituciones sinónimo y no

sinónimo mediante el método de Nei-Gojobori (Jantafong *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2010; De Boissésou *et al.*, 2004).

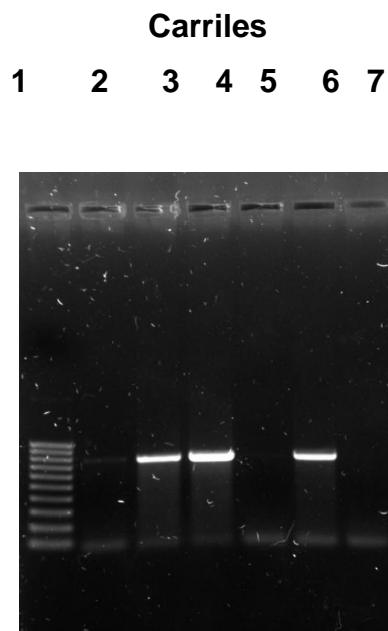


**Figura 4. Localización de los iniciadores utilizados en este estudio**

## RESULTADOS

### Amplificación del ORF2 del PCV2

Se amplificó el gen ORF2 de 9 muestras de suero porcino positivas a PCV2 provenientes de distintas granjas del Estado de Sonora. En la Figura 5 se muestra el perfil electroforético de algunas de las muestras analizadas, donde se muestra un fragmento de 800 pares de bases (pb), que corresponde al gen ORF2 en su totalidad, en 3 muestras positivas. Una vez amplificado el gen ORF2 y visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, el ADN de las muestras se cuantificó para su posterior secuenciación.



**Figura 5. Perfil electroforético de muestras de este estudio.** Carril 1, marcador de pares de bases (EZ Load de Biorad). Carril 2, control negativo. Carril 3, PCV2Ciad031. Carril 4, PCV2Ciad032. Carril 5, control negativo. Carril 6, PCV2Ciad033. Carril 7, control negativo

## Secuenciación del ORF2 del PCV2

La Tabla 1 muestra el nombre asignado, el origen y el año de recolección de las 9 muestras de donde se amplificó y secuenció el gen ORF2 del PCV2 en este estudio. Estas se encuentran en proceso para darlas de alta en el banco de genes.

**Tabla 1. Secuencias del gen ORF2 del PCV2 de este estudio**

Nombre de la muestra	Lugar	Año de obtención
PCV2Ciad031	Sonora	2012
PCV2Ciad032	Sonora	2012
PCV2Ciad033	Sonora	2012
PCV2Ciad034	Sonora	2012
PCV2Ciad035	Sonora	2012
PCV2Ciad036	Sonora	2012
PCV2Ciad037	Sonora	2012
PCV2Ciad038	Sonora	2012
PCV2Ciad039	Sonora	2012

## Variación Genética del ORF2 del PCV2

Con el objetivo de conocer la variabilidad de nucleótidos entre las secuencias de PCV2, se realizó un alineamiento de las 9 secuencias obtenidas en este estudio, junto con 49 secuencias de referencia que pertenecen a los distintos genotipos del PCV2 (Tabla 2). Así mismo, se realizó un alineamiento y análisis con el programa BIOEDIT para conocer la identidad de nucleótidos entre las secuencias sonorenses en este estudio. El resultado del porcentaje de identidad osciló entre 97 y 100% (Tabla 3). Por otro lado, la identidad de nucleótidos entre las secuencias sonorenses de este estudio y las secuencias de referencia



estuvo en un rango del 85 al 100%, lo que indica una variabilidad entre las secuencias del 15%.

Por otro lado, la identidad entre las secuencias de aminoácidos de este estudio estuvo entre 96 y 100% (Tabla 4). Mientras que la identidad de las secuencias de aminoácidos de este estudio respecto a las de referencia, estuvo entre 82-100%.

Así mismo, en las Figura 6 y 7 se presenta el alineamiento de nucleótidos y aminoácidos de las secuencias sonorenses de este estudio, en donde en los alineamientos de nucleótidos se pueden observar mutaciones puntuales en ciertas posiciones. Entre estas mutaciones se puede observar que en la secuencia PCV2Ciad032 existen cambios en las posiciones 57 (G en lugar de C), 97 (C por A), 184 (T en vez G), 281 (G por T), 422 (T se cambia por A), 645 (A por C), 649 (A por C), 678 (T por C), 681 (G por A) y 706 (T por C). Estas diferencias en los nucleótidos de la secuencia PCV2Ciad032 ocasionan cambios en su secuencia de aminoácidos tales como: en la posición del aminoácido 62 (F en lugar de V), 94 (S en lugar de I), 141 (Q se cambió por L), 205 (E en lugar de D) y 236 (en lugar de L existe una F).

Mientras que para la secuencia PCV2Ciad033 se reportaron los siguientes cambios en su secuencia de nucleótidos: en la posición 87 (C en vez de A), en la 93 (C en vez de G), en la 190 (G por A), en la 191 (C por G), en la 192 (T en lugar de A), en la posición 222 (C en lugar de G), en lugar 618 (A en lugar de G) y 657 (G en vez de T). Esos cambios originaron las siguientes diferencias en la secuencia de aminoácidos de la secuencia PCV2Ciad033: en la posición 57 (T en lugar de N) y en la posición 63 (A en lugar de R).

Por otro lado, en la secuencia PCV2Ciad034 se observaron las siguientes diferencias en la secuencia de nucleótidos: en la posición 57 (C en lugar de G), 87 (C en lugar de A), 184 (T en lugar de G), 185 (G por T), de la posición 277 a la 280 (C en lugar de A), 281 (G en lugar de T). 645 (En lugar de C), en la 714 (A por C). En tanto los cambios de aminoácidos para la secuencia PCV2Ciad034 fueron en la posición 62 (C por V), en la 93 (P en lugar de K), en la 94 (R en vez de I) y en la posición 200 (E en vez de D).

Para la secuencia PCV2Ciad035 los cambios en su secuencia de nucleótidos fueron: en la posición 57 (C en vez de G), en la 82 (C en vez de A), 184 (T en vez de G), 281 (G por T), 422 (T en lugar de A), en la 645 (A en lugar de C). Mientras que los cambios en la secuencia de aminoácidos de la secuencia PCV2Ciad035 fueron: en la posición 62 (F en lugar de V), en la 94 (S en lugar de I), 141 (L en vez de Q) y en el lugar 215 (E en vez de D).

Para la secuencia de nucleótidos de PCV2Ciad036 se presentaron los siguientes cambios: en la posición 28 (G en vez de A), en la 30 (A en vez de G), en la 57 (C en lugar de G), 64 (A en vez de R), 87 (C en vez de A), 90 (C por G), 92 (C en vez de G), 170 (C en lugar de A), 190 (G en vez de A), 191 (C por G), 192 (T por A), 222 (C en lugar de G), en la posición 390 (C en lugar de A), 618 (A en vez de G), 655 (G en vez de C). Estas diferencias, originaron los siguientes cambios de aminoácidos en la secuencia de PCV2Ciad036: en la posición 10 (G en lugar de R), en la 32 (P en lugar de R), en 57 (T en vez de N), 63 (A en vez de R) y en el lugar 219 (G en vez de R).

En la secuencia PCV2Ciad037 se observaron los cambios de nucleótidos: en la posición 4 (C en vez de T), en la 5 (G en vez de C), en la 57 (C en vez de G), 64 m(A en vez de R), en la 87 (C en vez de A), en la 93 (C en lugar de G), en la 170 (C en vez de A), 190 (G en vez de A), 191 (C por G), 192 (T por A), en la posición 222 (C por G), 390 (C en vez de A), en la posición 618 (A en vez de G), en la 713 (T en lugar de C) y 714 (A en vez de T). Mientras que los cambios en las secuencias de aminoácidos de PCV2Ciad037 fueron: en la posición 3 (R en vez de F), en la 57 (T en vez de N) y 63 (A en vez de R),

Por otro lado, la secuencia PCV2Ciad038 presentó los siguientes cambios en su secuencia de nucleótidos: en la posición 6 (T en vez de G), en la posición 57 (C en lugar de G), 64 (A en vez de R), 87 (C en vez de A), 93 (C en lugar de G), en el lugar 170 (G en vez de A), 189 (A en lugar de G), 190 (G en vez de A), 191 (C por G) y 192 (T por A). En tanto que los cambios de aminoácidos para la secuencia PCV2Ciad038 fueron: en la posición 57 (T en vez de N) y 63 (A en vez de R).

Finalmente, en la secuencia PCV2Ciad039 se observaron las siguientes sustituciones de nucleótidos: en la posición 87 (C en vez de A), 93 (C en lugar de G), 170 (C en vez de A), 190 (G en vez de A), 191 (C por G), 192 (T por A), 222 (C en vez de G), 618 (A en vez de G), 618 (A en vez de C) y 657 (G en vez de T). Por otro lado, los cambios que presentó la secuencia de aminoácidos de PCV2Ciad039 fueron: en la posición 57 (T en vez de N) y 64 (A en lugar de R),

**Tabla 2. Total de secuencias utilizadas en este estudio**

Identificación	Genotipo	Origen	Autor y año de publicación
PCV2Ciad031	PCV2a	México	
PCV2Ciad032	PCV2a	México	
PCV2Ciad033	PCV2a	México	
PCV2Ciad034	PCV2a	México	
PCV2Ciad035	PCV2a	México	
PCV2Ciad036	PCV2a	México	
PCV2Ciad037	PCV2a	México	
PCV2Ciad038	PCV2a	México	
PCV2Ciad039	PCV2a	México	
PCV2Ciad01	PCV2b	México	Reséndiz <i>et al.</i> , 2012
PCV2Ciad02	PCV2b	México	Reséndiz <i>et al.</i> , 2012
PCV2Ciad03	PCV2b	México	Reséndiz <i>et al.</i> , 2012
PCV2Ciad04	PCV2b	México	Reséndiz <i>et al.</i> , 2012
PCV2Ciad05	PCV2a	México	Reséndiz <i>et al.</i> , 2012
PCV2Ciad06	PCV2a	México	Reséndiz <i>et al.</i> , 2012
PCV2Ciad07	PCV2b	México	Reséndiz <i>et al.</i> , 2012
JN382185	PCV2b	Rumania	Cadar <i>et al.</i> , 2012
JN133305	PCV2a	Eslovaquia	Saha <i>et al.</i> , 2012
JN382180	PCV2b	Rumania	Cadar <i>et al.</i> , 2012
JN382177	PCV2a	Rumania	Cadar <i>et al.</i> , 2012
JN382161	PCV2a	Rumania	Cadar <i>et al.</i> , 2012
JN382159	PCV2b	Rumania	Cadar <i>et al.</i> , 2012
JN382175	PCV2a	Rumania	Cadar <i>et al.</i> , 2012
JN382171	PCV2b	Rumania	Cadar <i>et al.</i> , 2012
JN644769	PCV2b	Uruguay	Ramos <i>et al.</i> , 2012
JN006464	PCV2b	Rumania	Turcitu <i>et al.</i> , 2012
JN006454	PCV2b	Rumania	Turcitu <i>et al.</i> , 2012
JN006444	PCV2b	Rumania	Turcitu <i>et al.</i> , 2012
JN006451	PCV2b	Rumania	Turcitu <i>et al.</i> , 2012

**Tabla 2. Total de secuencias utilizadas en este estudio (continuación)**

Identificación	Genotipo	Origen	Autor y año de publicación
JN006443	PCV2b	Rumania	Turcitu <i>et al.</i> , 2012
JN176181	PCV2b	China	Xie <i>et al.</i> , 2012
HM776453	PCV2b	China	Zhao <i>et al.</i> , 2010
HM776447	PCV2b	China	Zhao <i>et al.</i> , 2010
HM776443	PCV2d	China	Zhao <i>et al.</i> , 2010
HM776452	PCV2d	China	Zhao <i>et al.</i> , 2010
HM776446	PCV2b	China	Zhao <i>et al.</i> , 2010
HM776438	PCV2b	China	Zhao <i>et al.</i> , 2010
HQ693093	PCV2b	China	Wang <i>et al.</i> , 2010
HQ693092	PCV2b	China	Wang <i>et al.</i> , 2010
HQ650833	PCV2b	China	Zhu <i>et al.</i> , 2010
FJ870975	PCV2b	China	Li <i>et al.</i> , 2010
FJ870971	PCV2b	China	Li <i>et al.</i> , 2010
FJ870970	PCV2b	China	Li <i>et al.</i> , 2010
EU750909	PCV2b	Chile	Bucarey <i>et al.</i> , 2009
EU519223	PCV2b	Chile	Bucarey <i>et al.</i> , 2009
EU519224	PCV2b	Chile	Bucarey <i>et al.</i> , 2009
EU296794	PCV2b	China	Wang <i>et al.</i> , 2007
GU049342	PCV2b	España	Fort <i>et al.</i> , 2010
GU049340	PCV2a	España	Fort <i>et al.</i> , 2010
GU049341	PCV2b	España	Fort <i>et al.</i> , 2010
GQ845028	PCV2b	China	Li <i>et al.</i> , 2010
HQ701666	PCV2e	Tailandia	Jantafong <i>et al.</i> , 2010
EU148505	PCV2c	Dinamarca	Dupont <i>et al.</i> , 2008
EF452365	PCV2a	USA	Lyyo <i>et al.</i> , 2008
EF452364	PCV2a	USA	Lyyo <i>et al.</i> , 2008
JN644771	PCV2b	Uruguay	Ramos <i>et al.</i> , 2011
JN382191	PCV2b	Rumania	Cadar <i>et al.</i> , 2012
JN382157	PCV2a	Rumania	Cadar <i>et al.</i> , 2012

**Tabla 3. Porcentaje de identidad de nucleótidos de las secuencias sonorenses**

Muestra	Ciad031	Ciad032	Ciad033	Ciad034	Ciad035	Ciad036	Ciad037	Ciad038	Ciad039
Ciad031		98	98	98	98	98	98	98	98
Ciad032	98		97	98	99	97	97	97	97
Ciad033	98	97		97	97	98	99	99	100
Ciad034	98	98	97		98	97	97	97	97
Ciad035	98	99	97	98		97	97	98	97
Ciad036	98	97	98	97	97		99	98	98
Ciad037	98	97	99	97	97	99		99	99
Ciad038	98	98	99	98	98	98	99		99
Ciad039	98	97	100	97	97	98	99	99	

Nota: Las muestras son las pertenecientes a las de la Tabla 1 que empiezan con el prefijo PCV2.

**Tabla 4. Porcentaje de similitud de aminoácidos de las secuencias sonorenses**

Muestra	Ciad031	Ciad032	Ciad033	Ciad034	Ciad035	Ciad036	Ciad037	Ciad038	Ciad039
Ciad031		97	99	98	98	98	99	99	99
Ciad032	97		96	97	99	96	96	96	96
Ciad033	99	96		97	97	99	100	100	100
Ciad034	98	97	97		98	96	97	97	97
Ciad035	98	99	97	98		96	97	97	97
Ciad036	98	96	99	96	96		99	99	99
Ciad037	99	96	100	97	97	99		100	100
Ciad038	99	96	100	97	97	99	100		100
Ciad039	99	96	100	97	97	99	100	100	

Nota: Las muestras son las pertenecientes a las de la Tabla 1 que empiezan con el prefijo PCV2.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
PCV2CIAD031	CTTTCGTTTTTCAGCTATGACGTATCCAAGGAGGCGTTACCGAAGAAGAAGACACCGGCCCGCAGCCATCTTGGCCAGATCCTCCGACGCCGGCCCTGGC									
PCV2CIAD032	.....C.....C.....									
PCV2CIAD033	.....C.....C.....									
PCV2CIAD034	.....C.....C.....									
PCV2CIAD035	.....C.....C.....									
PCV2CIAD036	.....G.A.....C.....C.G.C.....									
PCV2CIAD037	...CG.....C.....C.....C.....									
PCV2CIAD038	...T.....C.....C.....C.....									
PCV2CIAD039	.....C.....C.....									
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
PCV2CIAD031	TCGTCCACCCCGCCACCGCTACCGTTGGAGAAGGAAAAATGGCATCTTCAACACCCGCCTTCCCGCAACTTCGGATATACTGTCAAGAGAACCACAGT									
PCV2CIAD032	.....T.....									
PCV2CIAD033	.....C.....GCT.....									
PCV2CIAD034	.....TG.....									
PCV2CIAD035	.....T.....									
PCV2CIAD036	.....C.....GCT.....									
PCV2CIAD037	.....C.....GCT.....									
PCV2CIAD038	.....C.....AGCT.....									
PCV2CIAD039	.....C.....GCT.....									
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
PCV2CIAD031	CAGAACGCCCTCCTGGGCGGTGGACATGATGAGATTTAATCTTGACGACTTTGTTCCCCGGGAGGGGGACCAACAAAATCTCTATACCCTTTGAATAC									
PCV2CIAD032	.....G.....									
PCV2CIAD033	.....C.....									
PCV2CIAD034	.....CCCCG.....									
PCV2CIAD035	.....G.....									
PCV2CIAD036	.....C.....									
PCV2CIAD037	.....C.....									
PCV2CIAD038	.....									
PCV2CIAD039	.....C.....									

**Figura 6. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de PCV de este estudio**

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
PCV2CIAD031	TACAGAATAAGAAAAGTTAAGGTTGAATTC	TGGCCCTGCTCCCCATCACCCAGGGTGATAGGGGAGTGGGCTCCACTGCTGTTATTCTAGATGATAACT								
PCV2CIAD032	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PCV2CIAD033	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PCV2CIAD034	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PCV2CIAD035	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PCV2CIAD036	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PCV2CIAD037	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PCV2CIAD038	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PCV2CIAD039	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
.....	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
PCV2CIAD031	TTGTACCAAAGGTCAATGCCCAAACCTATGACCCATATGTA	AACTACTCCTCCCGCCATACAATCCCCAACCCCTTCTCCTACCACTCCCGTTACTTCAC								
PCV2CIAD032	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PCV2CIAD033	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PCV2CIAD034	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PCV2CIAD035	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PCV2CIAD036	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PCV2CIAD037	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PCV2CIAD038	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PCV2CIAD039	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
PCV2CIAD031	ACCCAAACCTGTTCTTGACTCCACTATTGATTACTTCCAACCA	AAATAACAAAAGGAATCAGCTTTGGCTGAGGCTACAAACCTCTAGAAATGTGGACCAC								
PCV2CIAD032	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PCV2CIAD033	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PCV2CIAD034	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PCV2CIAD035	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PCV2CIAD036	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PCV2CIAD037	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PCV2CIAD038	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PCV2CIAD039	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

**Figura 6. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de PCV de este estudio (continuación)**

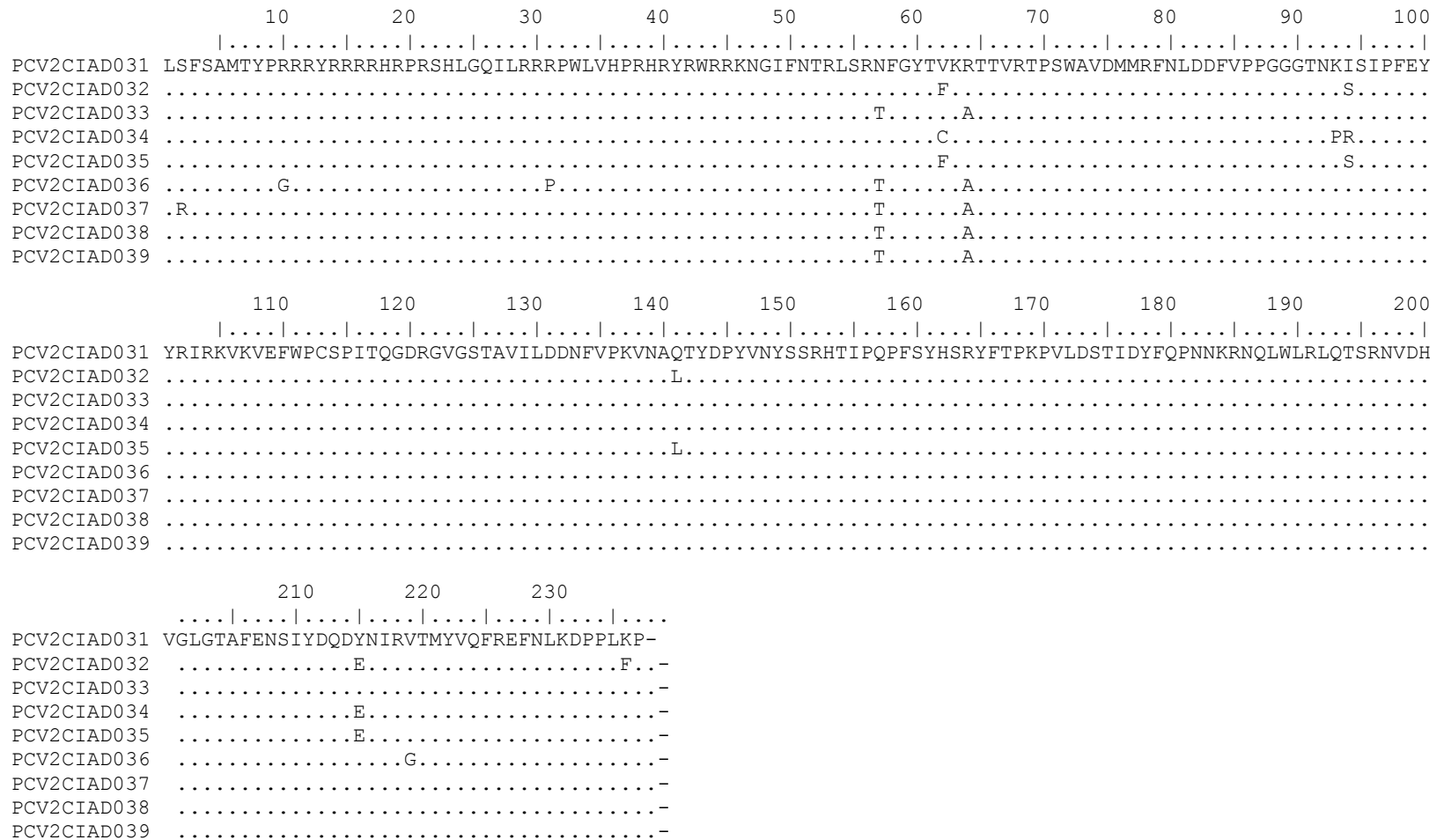


	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
PCV2CIAD031	GTAGGCCTCGGCACTGCGTTCGAAAACAGTATATACGACCAGGACTACAATATCCGGTGTAAACCATGTATGTACAATTCAGAGAATTTAATCTTAAAGACC									
PCV2CIAD032	.....	.....	.....	.....	.....A.....	.....A.....	.....	.....T.G.....	.....	.....
PCV2CIAD033	.....	.....A.....	.....	.....	.....	.....G.....	.....	.....	.....	.....
PCV2CIAD034	.....	.....	.....	.....	.....A.....	.....	.....	.....	.....	.....
PCV2CIAD035	.....	.....	.....	.....	.....A.....	.....	.....	.....G.....	.....	.....
PCV2CIAD036	.....	.....A.....	.....	.....	.....	.....G.....	.....	.....	.....	.....
PCV2CIAD037	.....	.....A.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PCV2CIAD038	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PCV2CIAD039	.....	.....A.....	.....	.....	.....	.....G.....	.....	.....	.....	.....

	710
PCV2CIAD031	.... .... .... ..
PCV2CIAD032	CCCCACTTAAACCCTAA
PCV2CIAD033	.....T.....
PCV2CIAD034	.....
PCV2CIAD035	.....T...
PCV2CIAD036	.....
PCV2CIAD037	.....TA.-
PCV2CIAD038	.....
PCV2CIAD039	.....

**Figura 6. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de PCV de este estudio (continuación)**



**Figura 7. Alineamiento de aminoácidos de los aislados sonorenses de PCV obtenidos en este estudio**

Además de calcular el porcentaje de identidad de nucleótidos y aminoácidos, también se calculó la frecuencia de nucleótidos y la relación de sustituciones/transversiones (R) de las secuencias sonorenses. En la Tabla 5 se indica la probabilidad de sustitución de una base (línea) a otra (columna). El análisis de las secuencias sonorenses reveló que la frecuencia de cada nucleótido fue de: 0.277 para adenina (A), 0.228 para timina o uracilo (T/U), 0.306 para citocina (C) y 0.189 para guanina (G). Las tasas de radio para transición/transversión fueron  $k_1 = 1.17$  (purinas) y  $k_2 = 0.42$  (pirimidinas). Las tasas indican la probabilidad de que se presenten purinas y pirimidinas en las secuencias. El sesgo general de transición/transversión (R), que se representa como  $R = [A \cdot G \cdot k_1 + T \cdot C \cdot k_2] / [(A+G) \cdot (T+C)]$  fue igual a 0.334. Esto indica que el tipo de sustitución de transversión es 0.3 veces más común que el cambio por transición.

**Tabla 5. Tasa de transición y transversión del ORF2 del PCV2**

Nucleótido	A	T	C	G
A		8.25	<i>11.04</i>	<b>7.99</b>
T	9.99		<b>4.64</b>	6.83
C	9.99	<b>3.47</b>		6.83
G	<b>11.68</b>	8.25	11.04	

Nota: La tasa de sustitución de transición se representa en negritas, mientras que las sustituciones de transversión se muestran en itálicas.

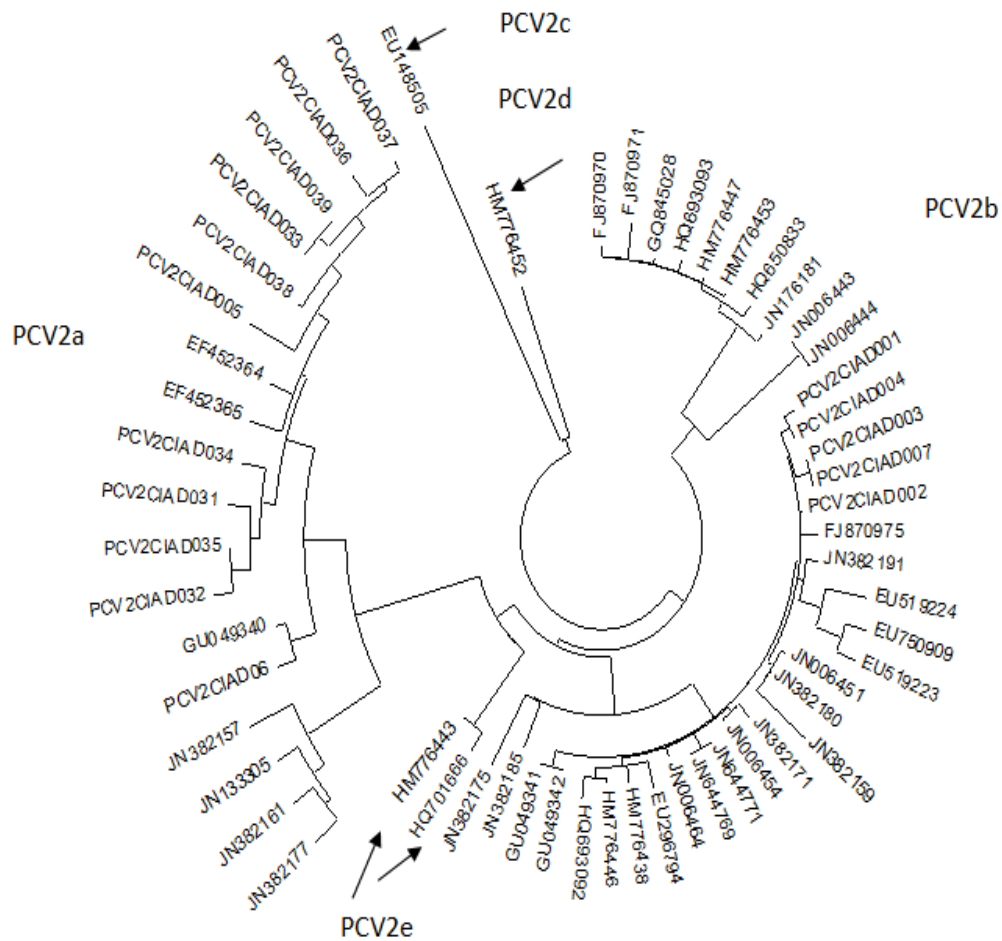
Posteriormente, se realizó un análisis evolutivo para las secuencias de Sonora obtenidas en este estudio, mediante el cálculo del radio de diferencias sinónimas (dS) de las secuencias, dando como resultado:  $0.033 \pm 0.008$ , mientras que el radio del número de diferencias no sinónimo (dN) fue de  $0.011 \pm 0.04$ . Dados estos datos, se calculó el radio de las diferencias sinónimo y no sinónimo entre las secuencias  $(dN/dS)=0.33$ .

## Análisis Filogenético

En los análisis filogenéticos, se tomaron en cuenta secuencias pertenecientes a los 5 genotipos del PCV2 reportados hasta el momento (Figura 8). Dentro de las ramas pertenecientes al genotipo del PCV2a se encontraron secuencias provenientes de Estados Unidos, Rumania, China y Eslovaquia, pero además, en las ramas de este genotipo se agruparon las 9 secuencias de este estudio y una secuencia de PCV2 reportada previamente para Sonora por Reséndiz *et al.* (2012).

Por otro lado, en las ramas del genotipo perteneciente al PCV2b se agruparon secuencias de Sonora reportadas por Reséndiz *et al.* (2012), junto con aislados de Uruguay, Chile, China, España y Rumania.

En ramas separadas se encontraron las secuencias de los genotipos PCV2c, PCV2d y PCV2e. De estos genotipos, el PCV2c solamente ha sido reportado en Dinamarca, mientras que el PCV2d y PCV2e se reportó recientemente en China y Tailandia. En ninguno de estos 3 genotipos se agruparon las secuencias provenientes de Sonora, por lo que en base a estos resultados se puede decir que en Sonora se encuentran los genotipos PCV2a y PCV2b.



**Figura 8. Árbol filogenético de 58 secuencias PCV2.** Se incluyeron las 9 secuencias de este estudio, además de 49 secuencias reportadas en el banco de genes. El análisis se realizó el método de Neighbor-Joining con el modelo de Kimura de 2 parámetros y 1000 réplicas, todas las posiciones con deleciones fueron eliminadas por lo que se analizaron un total de 673 posiciones. El análisis se llevo a cabo en MEGA4

## DISCUSIÓN

Sonora es uno de los principales estados de la República Mexicana en lo que se refiere a la producción de carne de cerdo. Sin embargo, existen diversos factores que afectan dicha producción, como lo pueden ser las sequías, los agentes bacterianos y víricos. Uno de los principales agentes víricos que afecta a la porcicultura es el circovirus porcino tipo 2.

En el genoma del PCV2 existen 3 ORF's, de los cuales el ORF2 es de mayor relevancia debido a que presenta más variabilidad en su identidad de nucleótidos y aminoácidos, además de que codifica para la proteína de la cápside y es un marcador epidemiológico importante del virus. Debido a la alta variabilidad del ORF2, se ha utilizado para realizar estudios filogenéticos del PCV2 y así entender mejor las relaciones que guardan los PCV2 en distintas regiones del mundo, sus niveles de homología, sus genotipos predominantes, entre otras cosas. Todo esto con el propósito de en un futuro tener un mayor conocimiento de la enfermedad y así poder tener un mejor control de ésta.

Para ello, en este estudio se analizaron 353 muestras de suero para circovirus porcino y se diagnosticaron 9 muestras positivas a PCV2 provenientes de 5 granjas porcícolas de Sonora y posteriormente se secuenció el ORF2 completo. Con la secuencia se determinó la relación entre las muestras positivas a PCV2 obtenidas en este estudio y se compararon con 49 secuencias de referencia del banco de genes provenientes de Sonora y del mundo para realizar el estudio filogenético del PCV2 en el Estado de Sonora.

Dentro de la variación genética obtenida en este estudio, el rango de identidad máxima de nucleótidos fue de entre 97 y 100 %. Al comparar las secuencias de aislados sonorenses con las reportadas en el banco de genes, se obtuvo una identidad de nucleótidos entre el 85 y 100%. Dicho rango de identidad concuerda con el reportado por diversos autores para aislados de PCV2 de distintas regiones del mundo. Como ejemplo Fenaux *et al.* (2000) en Estados Unidos, señalaron que el porcentaje promedio de identidad de nucleótidos entre distintos aislados del PCV2 es del 90%. Mientras que en un estudio sobre caracterización molecular del ORF2 del PCV2 en México realizado por Robles *et al.* (2010), los porcentajes de identidad de nucleótidos van desde 89-99%, los cuales también concuerdan con el promedio de 90% reportado por Fenaux *et al.* (2010). Además, el porcentaje de identidad de nucleótidos de este estudio también es similar al reportado por distintas investigaciones, como Jantafong *et al.* (2011) en Tailandia (92.4 al 99.5%).

En relación a la identidad máxima de aminoácidos, Robles *et al.* (2010) observaron que para aislados del ORF2 del PCV2 de distintas partes de México, el porcentaje osciló entre 88 y 100%. Mientras que el porcentaje de identidad de aminoácidos para las secuencias de este estudio se encontró en el rango del 96 al 100%, lo que indica una variabilidad del 4%. Dichos resultados, muestran que las secuencias de Sonora tuvieron un porcentaje mayor de identidad de aminoácidos, con respecto a los reportados por otros autores en diferentes países o regiones del mismo país. Por ejemplo Robles *et al.* (2010), reportaron secuencias de distintos estados de México como Jalisco, Sonora, Nayarit, Sonora y Distrito Federal, mientras que aquí solamente se incluyeron secuencias de Sonora.

Los resultados obtenidos en distintos estudios indican una alta identidad de nucleótidos y aminoácidos para el ORF2 del PCV2, por lo que se puede decir que el grado de conservación de las distintas secuencias es muy alto, aún considerando su amplia distribución geográfica y su prevalencia. Esta homogeneidad puede ser explicada debido a que el circovirus porcino podría haber sido sometido a un cuello de botella genético, en el cual se ha descrito

que los organismos presentan una escasa variabilidad genética. Es decir, el PCV2 ha permanecido relativamente con poca variabilidad genética, a pesar de que su hospedero se ha extendido por todo el mundo. La baja variabilidad se puede explicar porque en el PCV2 se presenta una mayor tasa de sustituciones sinónimas (dS) en comparación con la tasa de sustituciones no sinónimas (dN) (dS>dN). Si se presentaran mayores sustituciones dN que dS se podría suponer una presión por parte del hospedero, principalmente dada por la respuesta inmune (De Boissésou *et al.*, 2004).

En este trabajo también se evaluó la tasa de transición y transversión del ORF2 del PCV2. Dichas tasas dieron como resultado que el ORF2 del PCV2 posee cambios de sustituciones de transversión mayor que las transiciones. Comparando esta aseveración con la tasa de transición del ORF5 del PRRSV, el cual es otro virus que ataca a cerdos y junto con el PCV2 son los de mayor importancia en la industria porcina, en el 2008 Burgara reportó que el ORF5 PRRSV posee un mayor número de sustitución por transiciones. Además, se comparó la frecuencia de nucleótidos para el ORF5 del PRRSV. En el 2008 Burgara reportó que en el ORF5 del PRRSV las frecuencias de nucleótidos fueron 0.205 (A), 0.3 (T/U), 0.235 (C) y 0.261 (G). Dichos valores son similares para las secuencias de nucleótidos de las muestras del ORF2 del PCV2 de este estudio, donde los valores fueron 0.277 (A), 0.228 (T/U), 0.306 (C) y 0.189 (G).

Dentro de las caracterizaciones moleculares del ORF2 del PCV2 en aislados sonorenses, se ha señalado que el genotipo del PCV2 dominante en México y sobretodo en Sonora es el PCV2b (Robles *et al.*, 2010). Así mismo, Reséndiz *et al.* (2012) y Robles *et al.* (2010), reportaron la existencia de dos genotipos en aislados de Sonora, el PCV2a y PCV2b provenientes de muestras del 2008 y 2006 respectivamente.

Para determinar la relación entre los 9 aislados sonorenses obtenidos, se analizó su variación genética y se compararon con 49 secuencias de referencia. El análisis filogenético indicó que las 9 secuencias sonorenses de este estudio se agruparon con aquellas secuencias del genotipo PCV2a del ORF2. Además, dentro de este genotipo, también se agrupó una reportada por (Reséndiz *et al.*



(2012). Mientras que las demás secuencias reportadas por Reséndiz *et al.* (2012), se agruparon en el genotipo PCV2b. Lo anterior concuerda con los trabajos reportados anteriormente para México y Sonora por autores como Robles *et al.* (2010) y Reséndiz *et al.*, (2010) donde se señala que en México y en Sonora existen los genotipos PCV2a y PCV2b.

Dentro del árbol filogenético realizado en este estudio, se puede observar que las secuencias pertenecientes al genotipo PCV2a presentan una rama más homogénea, mientras que las secuencias del PCV2b tienen una rama más heterogénea. Esto podría deberse a que según en la información generada a lo largo del tiempo, se ha señalado que el genotipo PCV2a posee un mayor porcentaje de identidad que el PCV2b, lo que le permite agruparse más homogéneamente dentro del árbol filogenético (Zhai *et al.*, 2011)

Las secuencias obtenidas en este estudio se relacionaron filogenéticamente con las provenientes de Japón, Sonora, Estados Unidos, Brasil, Rumania, China y Eslovaquia (Farnham *et al.*, 2003, Takahagi *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010; Lyoo *et al.*, 2008; Turcitu *et al.*, 2011; Cadar *et al.*, 2012; Saha *et al.*, 2012).

Existen estudios en donde se ha evaluado la presión evolutiva para cambiar la secuencia de aminoácidos de algunos virus, mediante el cálculo de la tasa sustituciones de aminoácidos no sinónimos y sinónimo (dN/dS). Por ejemplo, se ha reportado que el ORF2 del PPV presenta una selección negativa o estabilizadora (Shangjin *et al.*, 2009). En este tipo de selección, los extremos de una característica son seleccionados en contra, por lo que los organismos con características del rango promedio son los que más sobreviven. Es decir, aquellos organismos que poseen características dentro de una distribución normal, son los que sobreviven. Es por eso que para evaluar la presión relativa evolutiva del ORF2 del PCV2, ya sea para cambiar o conservar su secuencia de aminoácidos, se determinó el radio entre el número de sustituciones de nucleótidos que dan como resultado la sustitución de aminoácidos (sustituciones no sinónimo) y las que no dan como resultado la sustitución de aminoácidos (sustituciones sinónimas). Si el resultado de dN/dS es mayor a 1,

significa que el sitio estudiado se encuentra bajo una presión de selección positiva (Firth *et al.*, 2009). Es decir, en este tipo de selección habría un mayor número de sustituciones no sinónimo a comparación de sustituciones sinónimo.

Para el ORF2 del PCV2 de las muestras sonorenses de este estudio, el dN/dS mostró un valor de 0.33. Dicho valor, al ser menor que 1 significa que las muestras sonorenses se encuentran bajo una presión de selección negativa, también llamada purificadora o estabilizadora. Comparando este dato con el reportado por otros autores, en el 2009 Firth *et al.*, reportaron que el dN/dS para el gen de la cápside del PCV2 era de 0.230. Mientras que Hughes y Piontkivska en el 2008, también señalaron que existe una selección negativa para el ORF2 del PCV2.

## CONCLUSIONES

Después de construir el árbol filogenético, se encontró que las secuencias reportadas en este estudio poseen características que permiten agruparlas dentro del genotipo PCV2a. Al realizar los análisis filogenéticos con las secuencias obtenidas en este estudio, más otras reportadas anteriormente para Sonora, se comprueba que en el Estado de Sonora existen dos genotipos: el PCV2a y PCV2b. Al analizar la relación que tienen los aislados sonorenses con los de otras partes del mundo, se observó que los aislados provenientes de Sonora se relacionan filogenéticamente con secuencias provenientes de Europa, Asia y América. Finalmente, el cálculo de la relación sustituciones no sinónimas y sinónimas fue de 0.33, lo cual indica que las muestras de este estudio se encuentran bajo una selección negativa

## REFERENCIAS

- Allan G, Ellis J. Porcine circoviruses: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2000; 12: 3-14.
- An D, Roh I, Song D, Park C, Park B. Phylogenetic characterization of porcine circovirus type 2 in PMWS and PDNS Korean pigs between 1999 and 2006. *Virus Research* 2007; 2: 115-122.
- Beach M, Meng X. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Research* 2011; 134: 33-42.
- Bencomo A. Principales enfermedades de los cerdos. Programa Especial para la Seguridad Alimentaria (PESA). Nicaragua, 2010.
- Bikandi, J., San Millán, R., Rementeria, A., and Garaizar, J. 2004 *In silico* analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR, and endonuclease restriction. *Bioinformatics* 20:798-9. DOI: [10.1093/bioinformatics/btg491](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg491)
- Bucarey S, Noriega J, Reyes P, Tapia C, Saenz L, Zuñiga A, Tobar J. The optimized capsid gene of porcine circovirus type 2 expressed in yeast forms virus-like particles and elicits antibody responses in mice fed with recombinant yeast extracts. *Vaccine* 2009; 27: 5781-5790.

- Burgara A. Variación genética del gen ORF5 del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) en el Estado de Sonora. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. 2008, Pp: 23.
- Cabello-Villarreal M, Torres-Garrido E. Carne de Porcino 2010, 2011. Panorama agroalimentario 2010, 2011. 3-25. Consultado el 19 de octubre de 2012 en <http://es.scribd.com/doc/106327591/Panorama-Agroalimentario-Carne-Porcino-2010>
- Cadar D, Csagola A, Lorincz M, Tombácz K, Spinu M, Tuboly T. Detection of natural inter- and intra-genotype recombination events revealed by cap gene analysis and decreasing prevalence of PCV2 in wild boars. *Infection Genetics. Evolution* 2012; 12: 420-427.
- Cadar D, Cságola A, Dán A, Deim Z, Spinu M, Miclaus V, Kobolkuti L, Czirjak J, Tuboly T. Porcine circovirus type 2 and associated diseases in Romania-short communication. *Acta Veterinaria Hungárica* 2007; 1: 151-156.
- Chae J, Choi K. Genetic diversity of porcine circovirus type 2 from pigs in Republic of Korea. *Research in Veterinary Science* 2010; 2: 333-338.
- Chung W, Chan W, Chaung H, Lien Y, Wu C, Huang Y: Real-time PCR for quantitation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 in naturally-infected and challenged pigs. *Journal of Virology Methods*. 2005; 124:11-19.
- Dan A, Molnár A, Biksi I, Glavits R, Shaheim M, Harrach B. Characterization of Hungarian porcine circovirus 2 genomes associated with PMWS and PDNS cases. *Acta Veterinaria Hungarica* 2003; 4: 551-562.

De Boissésou C, Béven V, Bigarré L, Thiéry R, Rose N, Eveno E, Madec F, Jestin A. Molecular characterization of porcine circovirus type 2 isolates from post-weaning multisystemic wasting syndrome affected and non-affected pigs. *Journal of General Virology* 2004; 85: 293-304.

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

Food and Agriculture Organization:  
<http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/pigs/home.html>

Farnham M, Choi Y, Goyal S, Joo H. Isolation and characterization of porcine circovirus type-2 from sera of stillborn fetuses. *Canadian Journal of Veterinary Research* 2003; 67: 108-113.

Fenaux M, Halbur P, Gill M, Toth T, Meng X. 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* 2000; 38:2494-2503.

Firth C, Charleston M, Duffy S, Shapiro B, Holmes E. Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: Porcine Circovirus 2. *Journal of Virology* 2009; 24: 12813-12821.

Fort M. Characterization of immune responses to porcine circovirus type 2 (PCV2) infection and vaccination in pigs. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, 2009. Pp: 7-8

- Fort M, Sibila M, Nofrarias M, Pérez-Martin E, Olvera A, Matieu E, Segalés J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) Cap and Rep proteins are involved in the development of cell-mediated immunity upon PCV2 infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2010; 137: 226-234.
- Grau-Roma L, Crisci E, Sibila M, López-Soria S, Nofrarias M, Cortey M, Fraile L, Olvera A, Segales J.. A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definitions and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. *Veterinary Microbiology* 2008; 128: 23-35.
- Grierson S, King D, Wellenberg G, Banks M. Genome sequence analysis of 10 Dutch porcine circovirus type 2 (PCV-2) isolates from a PMWS case-control study. *Research in Veterinary Science* 2004; 3: 265-268.
- Guo L, Lu Y, Wei Y, Huang L, Liu C. Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China. *Virology Journal* 2010; 7: 273-285
- Hamel A, Lin L, Nayar G. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Journal of Virology* 1998; 72: 5262-5267.
- Hernández J. Actualización sobre circovirus porcino tipo 2 (PCV2). *Rev Porcicultura Iberoam* 1-5. Fecha de acceso 24 de junio de 2012. Disponible en <http://www.bvs.hn/RFCM/pdf/2008/pdf/RFCMVol5-1-2008-12.pdf>
- Henriques A, Duarte M, Fagulha T, Ramos F, Barros C, Tiago L, Fevereiro M. Molecular study of porcine circovirus type 2 circulating in Portugal.

Infection, genetics and evolution. *Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 2011; 8: 2162-2172.

Hughes A, Piontkivska H. Nucleotide sequence polymorphism in circoviruses. *Infection, genetics and evolution* 2008; 2: 130-138.

Jaganathan S, Toung O, Yee P *et al.* Genetic characterization of Porcine circovirus 2 found in Malaysia. *Virology Journal* 2011; 8: 437.

Jantafong T, Boonsoongnern A, Poolperm P, Urairong K, Lekcharoensuk C, Lekcharoensuk P. Genetic Characterization of porcine circovirus type 2 in piglets from PMWS-affected and –negative farms in Thailand. *Virology Journal* 2011; 8: 1-6.

Juhan N, LeRoth T, Opriessnig T, Meng J. The open reading frame 3 (ORF3) of porcine circovirus type 2 (PCV2) is dispensable for virus infection but evidence of reduced pathogenicity is limited in pigs infected by and ORF3-null PCV2 mutant. *Virus Research* 2010; 147: 60-66.

Karuppanan A, Jong M, Lee S, Zhu Y, Selvaraj M, Lau J *et al.* Attenuation of porcine circovirus 2 in SPF piglets by abrogation of ORF3 function. *Virology* 2009; 383: 338-347.

Kim J, Han D, Choi C, Chae C. Simultaneous detection and differentiation between porcine circovirus and porcine parvovirus in boar semen by multiplex seminested polymerase chain reaction 2003. *Journal of Veterinary Medical Sciences* 2003; 65:741-744.

Knell S, Willems H, Hertrampf B, Reiner G. Comparative genetic characterization of porcine circovirus type 2 samples from german wild boar population. *Veterinary Microbiology* 2005; 109: 169-177.



- Lefebvre D. Genetic, antigenic and pathogenic features of porcine circovirus type 2 strains. Tesis de Doctorado, Universidad de Gent. 2009
- Lefebvre D, Costers S, Van Doorselaere J *et al.* Antigenic differences among porcine circovirus type 2 strains, as demonstrated by the use of monoclonal antibodies. *Journal of General Virology* 2008; 89: 177-187.
- Larochelle, R, Magar, R, D'Allaire, S. Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions. *Virus Research* 2002; 90: 101–112.
- Li W, Wang X, Ma T, Feng Z, Li Y, Jiang P. Genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains isolated between 2001 and 2009: genotype PCV2b predominate in postweaning multisystemic wasting syndrome occurrences in eastern China. *Virus Genes* 2010; 2: 244-251.
- Li W, Cao Y, Guo H, He Q. Genotypes sequence analysis of PCV2a and PCV2b from China and study for detection a shift in genotypes for some time. Pendiente de publicación. Secuencia consultada el 24 de julio de 2012. en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/FJ870975>
- Liu J, Chen I, Kwang J. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role on virus infected-induced apoptosis. *Journal of Virology* 2006; 79: 8262-8274.
- Lipej Z, Segalés J, Toplak I, Sostaric B, Roic B, Lojkic M *et al.* Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in Croatia: detection and characterisation of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Acta Veterinaria Hungarica* 2005; 53: 385-396.

- Lyou K, Kim H, Joo H. Evaluation of a nested polymerase chain reaction assay to differentiate between two genotypes of porcine circovirus-2. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations* 2008; 20: 283-288 (2008).
- Mankertz A, Persson F, Mankertz J *et al.* Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *Journal of Virology* 1997; 71: 2562-2566.
- Meehan B, McNeilly F, Todd D, Kennedy S, Jewhurst V, Ellis J, Hassard L, Clark E, Haines D, Allan G. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *Journal of General Virology* 1998; 79: 2171-2179.
- Muhling J, Raye W, Buddle J, Wilcox G. Genetic characterization of Australian strains of porcine circovirus types 1 and 2. *Australian Veterinary Journal* 2006; 421-425.
- Olvera, A., Cortey, M, Segalés, J. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology* 2007; 357: 175-185.
- Pérez L, Díaz de Arce H, Percedo M, Domínguez P, Frías M. First report of porcine circovirus type 2 infections in Cuba. *Research in Veterinary Science* 2010a; 3: 528-530.
- Pérez L, Díaz de Arce H, Frías M. Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 strains present in Cuban swine herds. *Research in Veterinary Science* 2010b; 2: 301-305.
- Ramos N, Mirazo S, Castro G, Arbiza J. Detection and molecular characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) from piglets with

exudative epidermitis in Uruguay. *Research in Veterinary Science* 2012; 2: 1042-1045.

Ramírez-Mendoza H, Castillo-Juárez H, Hernández J, Correa P, Segalés J. Retrospective serological survey of porcine circovirus-2 infection in Mexico. *The Canadian Journal of Veterinary Research* 2009; 73: 21-24.

Raye W, Muhling J, Warfe L, Buddle J, Palmer C, Wilcox G. The detection of porcine circovirus in the Australian pig herd 2005; 5: 300-304.

Reséndiz M, Montalvo-Corral M, Flores-Mendoza L, Ramírez-Mendoza H, Segalés J, Hernández H. Cytokine expression in growing pigs co-infected with porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinaria Mexicana* 2012; 1: 45-58.

Rice, B. Boletín de prensa. Associated pig diseases cost the industry €562 million per year. Fecha de acceso 24 de septiembre de 2012. Disponible en [http://www.wattagnet.com/UK\\_Pig\\_Veterinary\\_Society\\_meeting\\_focuses\\_on\\_PCV2.html](http://www.wattagnet.com/UK_Pig_Veterinary_Society_meeting_focuses_on_PCV2.html)

Robles F, Chevez J, Angulo R, Díaz E, González C. Analysis of the genetic sequences of PCV2 virus in Mexico. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 2010; 65: 353-357.

Rowland R, Hesse R. PCV-2 nomenclature: How molecular differences translate to the field. *American Association of Swine Veterinarians* 2009; 485-486.

SAGARPA. Boletín ASERCA Regional Peninsular. "La Porcicultura". Enero del 2012.

- Saha D, Huang L, Bussalleu E, Lefebvre D, Fort M, Van Doorselaere J, Nauwynck H. Antigenic subtyping and epitopes' competition analysis of porcine circovirus type 2 using monoclonal antibodies. *Veterinary Microbiology* 2012; 157: 13-22.
- Segalés, J, Allan, G, Domingo M. Porcine circovirus diseases. *Animal Health Research Revision* 2005; 6:119-142.
- Shangjin C, Cortey M, Segalés J. Phylogeny and evolution of the NS1 and VP1/VP2 gene sequences from porcine parvovirus. *Virus Research* 2009; 140: 209-215.
- Shen H, Wang C, Madson D, Opriessnig T. High prevalence of porcine circovirus viremia in newborn piglets in five clinically normal swine breeding herds in North America. *Preventive Veterinary Medicine* 2010; 97: 228-236.
- Shuai J, Wei W, Li X, Chen N, Zhang Z, Chen X, Fang W. Genetic characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) from pigs in high-seroprevalence areas in southeastern China. *Virus Genes* 2007; 3: 619-627.
- Sibila M, Calsamiglia M, Segalés J, Blanchard P, Badiella L, Le Dimna M, Jestin A, Domingo M. Use of a polymerase chain reaction assay and an ELISA to monitor porcine circovirus type 2 infection in pigs from farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *American Journal of Veterinary Research* 2004; 65:88-92.
- Takahagi Y, Nishiyama Y, Toki S, Yonekita T, Morimatsu F, Murakami H. Genotypic change of porcine circovirus type 2 on Japanese pig farms

as revealed by restriction fragment length polymorphism analysis. Journal of Veterinary Medical. Sciences 2008; 70: 603-606.

Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, Koch M. A very small porcine virus with a circular single-stranded DNA. Nature 1982; 295: 64-66.

Trujano M, Iglesias G, Segalés J, Palacios JM. PCV-2 from emaciated pigs in Mexico. The Vet Record 2001; 148:792.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11465277>

Turcitu M, Wellenberg J, Barboi G, Codreanu M, Vuta V, Nicolae S, Barbuceanu F, Coste H, Cioranu R. Genetic diversity of porcine circovirus type 2 (PCV2) in the Romanian wild boar population. Research Veterinary Science 2011; 91: E103-E106.

Wang C, Huang T, Huang C, Tu C, Jong M, Lin S, Lai S. Characterization of porcine circovirus type 2 in Taiwan. The Journal of Veterinary Medical Science 2004; 5: 469-475.

Wang C, Yang X, Chen L. Isolation and Identification of PCV2 Strain Henan and Cloning and Sequence Analysis of the ORF2; 2004. En prensa 2004. Secuencia consultada el 24 de julio de 2012 en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EU296794>

Wang S, Wang Y, Chen H, Cui B, Zhu Q, Wang Z. Cloning and sequencing of PCV2 gene. En prensa 2010. Secuencia consultada el 24 de junio de 2012 en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HQ693093> y <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HQ693092>

Xie J, Zhou S. Isolation and identification of PCV2 strain in Tianjin in 2010. En prensa 2010. Secuencia consultada el 24 de julio de 2012 en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JN176181>

Zhai S, Chen S, Wei Z, Zhang J, Huang L, Lin T, Yue C, Ran D, Yuan S, Wei W, Long J. Co-existence of multiple strains of porcine circovirus type 2 in the same pig from China. *Virology Journal* 2011; 8: 517.

Zhao G, Cheng W, Zhang P, Han Y, Chen D. Novel genotypes of type 2 Porcine circovirus (PCV2) in PMWS pigs in China between 2008 and 2009. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 2010; 24: 3083-3091.

Zhu Q, Cui B, Chen H, Wang S, Wang Y, Wang Z, Liu J. Cloning and sequencing o PCV2 Gene; 2010. En prensa 2010. Secuencia consultada el 24 de julio de 2012 en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HQ650833>

## ANEXO I. LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

°C: Grados centígrados.

Cap: Cápside.

CSFV: Virus de la peste porcina.

FAO: Food and Agriculture Organization. Organización de agricultura y alimentos.

ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.

kb: Kilobases.

nm: Nanómetros.

nt: Nucleótidos.

ORF: Marco de lectura abierto.

pb: Pares de bases.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PCV: Circovirus porcino.

PCVAD: Enfermedades asociadas a circovirus porcino.

PDNS: Síndrome porcino de dermatitis y nefropatía.

PMWS: Post-mediated weaning syndrome, síndrome multisistémico de desmedro posdestete.

PPV: Parvovirus porcino.

Rep: Replicación.

RF: Forma replicativa.

RFLP: Restriction fragment length polymorphism o polimorfismo de restricción de fragmento largo.

Taq polimerasa: Polimerasa *Thermophilus aquaticus*.

## ANEXO 2. CÓDIGO DE LOS AMINOÁCIDOS EN LETRAS

Aminoácido	Código
Alanina	A
Arginina	R
Asparagina	N
Ac. Aspártico	D
Cisteína	C
Glutamina	Q
Ac. Glutámico	E
Glicina	G
Histidina	H
Isoleucina	I
Leucina	L
Lisina	K
Metionina	M
Fenilalanina	F
Prolina	P
Serina	S
Treonina	T
Triptófano	W
Tirosina	Y
Valina	V









