

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



TESIS DOCTORAL

**Estudios epidemiológicos y moleculares sobre virus entéricos
porcinos en España: aplicaciones al diagnóstico del virus de la
enfermedad vesicular del cerdo**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Cristina Cano Gómez

Director

Miguel Ángel Jiménez Clavero

Madrid, 2013

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA**

Departamento de Sanidad Animal



**ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS Y MOLECULARES SOBRE
VIRUS ENTÉRICOS PORCINOS EN ESPAÑA: APLICACIONES
AL DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD
VESICULAR DEL CERDO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Cristina Cano Gómez

DIRECTOR:
Dr. Miguel Ángel Jiménez Clavero

Madrid, 2013

El trabajo presentado en esta tesis ha sido realizado en el Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA), bajo la dirección del Doctor Miguel Ángel Jiménez Clavero, como parte del proyecto AGL2007-61859 y financiado por una beca predoctoral del INIA otorgada por el Ministerio de Ciencia e Innovación. Asimismo, parte del trabajo ha sido financiado por el convenio de colaboración (CC-08-020) y la encomienda de gestión (AEG11-053 2011-2012), ambos entre el MAGRAMA y el INIA, para la realización de actividades de I+D en sanidad animal y apoyo a los laboratorios nacionales de referencia del MAGRAMA.



MINISTERIO
DE ECONOMÍA Y
COMPETITIVIDAD



Instituto Nacional de Investigación
y Tecnología Agraria y Alimentaria

SUBDIRECCIÓN GENERAL DE
INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN SANIDAD ANIMAL

MIGUEL ÁNGEL JIMÉNEZ CLAVERO, doctor en Ciencias Biológicas,

Informa:

Que Cristina Cano Gómez, licenciada en Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado **“ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS Y MOLECULARES SOBRE VIRUS ENTÉRICOS PORCINOS EN ESPAÑA: APLICACIONES AL DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD VESICULAR DEL CERDO”**, que considero reúne las condiciones y calidad científica necesarias para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense.

Que, como resultado de este trabajo se han publicado hasta el momento, cuatro artículos en revistas del *Science Citation Index*: uno en *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* (2010), uno en *Journal of Virological Methods* (2011), uno en *Infection, Genetics and Evolution* (2011) y otro en *Veterinary Microbiology* (2012).

Que, durante la realización de este trabajo, se han presentado ocho comunicaciones a congresos nacionales e internacionales.

De lo que informo en Madrid, a 1 de Diciembre de 2012.

Fdo. Miguel Ángel Jiménez Clavero
Jefe de Servicio de Coordinación P3
(CISA-INIA)

Correo electrónico:

majimenez@inia.es

Ctra. de Algete a El Casar, s/n
28130 Valdeolmos
MADRID
TEL: 91 620 23 00
FAX: 91 620 22 47

*“Dichoso el que sabe hacer brotar la alegría
en el corazón del hermano”*

***A mi madre y a mi tío,
con todo mi cariño y amor***

AGRADECIMIENTOS

Pensé que después del duro trabajo de escribir mi tesis doctoral no tendría que escribir nada que me llevara tanta dedicación y meditación. Me siento en la obligación de sintetizar en unas breves líneas mi sincera gratitud a todas aquellas personas que han hecho posible, de un modo u otro, que este proyecto llegue a ser una realidad.

“Agradece a la llama su luz, pero no olvides el pie del candil que, constante y paciente, la sostiene en la sombra”... (Rabindranath Tagore)

A **Miguel Ángel**, director de esta tesis, por su apoyo, comprensión y generosidad pero especialmente por darme la oportunidad de cumplir un sueño. Por haber confiado en mí y por transmitirme su positividad y experiencia en todo momento.

A los que empezaron este trabajo desde el Laboratorio Central de Veterinaria y a los que a día de hoy siguen colaborando: A **Lola**, por darme a conocer el maravilloso mundo de los enterovirus, gracias por cederme el testigo y ayudarme tanto; A **Rubén** y a **Montse**, por tenderme una mano siempre que la necesité. A su directora, **Concha Gómez Tejedor**, por su coordinación y por facilitarme el trabajo siempre.

A **José Manuel Sánchez-Vizcaíno**, mi profe de infecciosas y preventiva, por ser mi tutor desde la Universidad y por su estimable ayuda a lo largo de estos años.

Mi especial gratitud a **Ana Moreno, Paolo Cordioli, Davide Lelli, Enrica Sozzi** y a todo el personal del departamento de virología del ISZLER “Bruno Ubertini”: *Grazie mille per avermi fatto sentire una del gruppo e per aver condiviso con me il vostro tempo e i teschovirus italiani.* También a «le mie amiche» **Simona y Rosaria** por cuidarme tanto durante mi estancia en Brescia: *Siete semplicemente stupende e molto gentili... Per te, per me e perché...*

*To **Falko Steinbach and Jean-Pierre Frossard** from AHVLA (Weybridge, UK) for hosting me in their laboratory and for their enthusiasm providing me with every means at their disposal for my training. To Anna La Rocca for trusting me and letting me cooperate with her as well. To my friends in the “Spanish Room”: **Nitin, Miriam and Pedro** (and the kids) for making me feel like at home. From the bottom of my heart: thank you all.*

A todos aquellos que amablemente aportaron su conocimiento y todo lo que estuvo en sus manos a mis estudios, principalmente a **Roland Zöll** (Universidad de Jena, Alemania), **Ana Carvajal** (Facultad de Veterinaria de León), **Ayalkibet Hundesa** (Facultad de Biología de Barcelona), **Ramón Soringuer** y **Jordi Figuerola** (EBD), **Mateo del Pozo** (CISA-INIA), **Alberto López** (CBM) y **Ferran Palero** (CSISP).

Al servicio de anatomía patológica del CISA, **José María Nieto, Toñi y Lourdes**, por robarles su tiempo y por el entusiasmo depositado; también al personal del animalario... **Antonio, Teresa, Miguel Ángel, Ángela, Alarilla, Sandra y Paco** por cuidar tan bien de mis conejos y cerditos.

Y como no, a todos aquellos que me han aportado tanto durante estos 4 años. Para mí ha sido fundamental el tener a mi lado a gente tan maravillosa y profesional, que siempre ha tenido una sonrisa y un ratito para compartirlo conmigo. Especialmente a mi **Mary**, porque pusiste orden en mi labo-vida, por darme ánimos y por hacerme ver que...*ellos son muchos pero nosotras somos más grandes!!!*. A mis chicas... **Jovi**, por tu tiempo y paciencia con mi mar de dudas y por hacerme ver las cosas *color esperanza*. A mi florecilla, **Ana**...por ayudarme tantísimo con la PCR y estar siempre que la necesitaba. A **Maia, Conchi, Amalia (mi paisana)**...gracias por llenarme de afecto. Muchísimas gracias a **Carmina, Raquel, Vir, Alex, Paloma, Cristina, Cova, Alicia, Elena, Maite, Sara, Yoli**...por los buenos consejos y porque habéis sido imprescindibles en este camino. A mis chicos del L-15, **Paco, Javo y Elisa**...gracias por compartir tantas horas, espacio, pipetas y proyectos (jeje)...A **Caty** y a **Yin-Yin**...por ser tan cariñosas conmigo y a **Tony**, por recordarme tantísimas cosas y por contagiarme cada mañana su alegría. A **las becarias del CISA** y muchas ya doctoras: **Lenny, Elena, Jana, Susana, Eva, Teresa, Nina**...muchísimas gracias por la comprensión y por los ratos vividos. A mi **cooperativa**, porque hubo un antes y un después (what's up!)... por los cientos de horas juntos, en tan poco espacio...*Si eso no une!*...Porque en cada página hay un poco de todos vosotros, por enseñarme tanto y por hacerlo siempre sonriendo...se agradece un montón!

A los que dais sentido a mi vida...**A mi familia**: a **mi padre**, por apoyarme en todo lo que me proponía y por darme la libertad y la confianza para dirigir mi vida. A **mi hermana**, porque no puedo concebir la vida sin ella, por cuidarme de pequeña y no tan pequeña, por aguantarme, por entender mi locura por los animales y por contagiarme su alegría...eres simplemente genial! A **mi hermano Andrés**, porque el estar contigo me hace querer ser una mejor persona...ya verás...este año la Liga y la Champions! A mis niños, **Coco y Gala**...porque nadie mejor que vosotros sabe hacerme feliz. A mi **tita Tere**...porque hace el mejor cocido de Madrid, por demostrarme su cariño en cada oportunidad y porque para mí eres un ejemplo de superación, a **mis primos**, por los momentos especiales y los días felices.

A mis amigos, especialmente a **Laura y Noe**..."*mis almas gemelas*", por estar a mi lado todo este tiempo, por entenderme mejor que nadie y ayudarme a crecer y al grupo *Minipig*... **Richar, Vane, Fer, Porras, Gity, Spidy, Manu**...porque no cambiaría el "*Vanessa Paradise*", la "*vaina loca*" y el "*baile de las flores*" por nada del mundo y por compartir conmigo un poquito de cada uno. A mis **vets, Martiña, Mari, Patri, Judita, Aran, Leti, Barby, Iren, Be y Vir**...porque fuisteis mi familia durante muchos años en la facultad y a día de hoy lo seguís siendo...como diría Aran...Vaya tela! ...Sois estupendas!

Y finalmente, a ti **AI**, porque has sufrido más que nadie esta tesis, por mis ausencias y mis cambios de humor, por quererme con todos mis defectos, y darme tanto día a día.

RESUMEN

En el diagnóstico serológico de la enfermedad vesicular del cerdo (EVP) se dan con cierta frecuencia reacciones positivas falsas, que obligan a investigar la presencia del virus (VEVP) en heces por aislamiento en cultivo celular y posterior identificación por RT-PCR. Este procedimiento ralentiza el diagnóstico, lo que conlleva en muchos casos significativas pérdidas económicas a los ganaderos, que deben inmovilizar las explotaciones afectadas durante este proceso. En la vigilancia seroepidemiológica de la EVP que se hace en España (país libre de la EVP) se dan con frecuencia mayor de la esperada reacciones falsamente positivas al VEVP, al tiempo que es habitual aislar virus que no son EVP en heces porcinas de las explotaciones afectadas.

En esta tesis se ha estudiado la naturaleza de estos virus mediante las técnicas moleculares disponibles y se han desarrollado herramientas diagnósticas que permitan distinguirlos del VEVP. Para ello se ha validado una técnica de RRT-PCR para todos los genotipos del G⁰ *Teschovirus* y se ha diseñado una técnica de caracterización de aislados víricos del G⁰ *Teschovirus*, basada en la amplificación por RT-PCR y posterior secuenciación de la región codificante de la proteína VP1, que ha permitido la clasificación de los aislados hallados y el reconocimiento de dos genotipos no conocidos (PTV12 y PTV14). A su vez, se ha demostrado por estudios experimentales que el aislado CC25 (PTV-12) era un nuevo genotipo y serotipo, no patógeno, con tropismo tisular por el sistema linfático y digestivo, e incapaz de conferir protección cruzada frente a una cepa heteróloga (PTV-1). Por otro lado, los estudios llevados a cabo han puesto de manifiesto la abundancia de teschovirus y sapelovirus en jabalíes, y su análisis ha permitido establecer las relaciones filogenéticas entre éstos y los aislados porcinos. Además, la diversidad de las comunidades víricas presentes en heces porcinas ha sido caracterizada mediante el empleo de la metagenómica.

La falta de reactividad serológica de una colección de antisueros policlonales monoespecíficos en las técnicas para detección de anticuerpos (ELISA-FL y virus-neutralización) frente al VEVP ha demostrado que ninguno de los virus entéricos porcinos no vesiculares estudiados es el responsable de las reacciones falsamente positivas al VEVP observadas en nuestro país. Esta conclusión ha sido corroborada al observarse en muestras de campo una ausencia de correlación estadística entre los resultados serológicos frente al VEVP y frente al aislado español de teschovirus "CC77" (PTV-2).

Asimismo, estudios preliminares han demostrado que la adición de anticuerpos neutralizantes específicos frente a los VEP-NV más abundantes identificados en nuestro país podría mejorar la técnica de aislamiento del VEVP, siendo necesaria su optimización para conseguir una mejora efectiva en el diagnóstico confirmatorio de la EVP.

SUMMARY

In the diagnosis of swine vesicular disease (SVD), false positive reactions occur occasionally, that prompt to investigate the presence of the virus (SVDV) in faeces by virus isolation followed by RT-PCR identification. This process delays the diagnostic, which in turn causes significant economic losses to the farmers, who are prevented from moving their livestock in the meantime. The SVD seroepidemiological surveillance carried out in Spain (SVD-free country), false positive reactions to SVDV are more frequent than expected, and, in addition, the isolation of viruses that are not SVDV in porcine faeces from the affected farms is common.

The nature of these viruses has been studied in this thesis using molecular methods available and newly developed diagnostic techniques aimed at enabling a correct differential diagnosis of SVDV. To this aim, a RRT-PCR technique for the detection of all genotypes of G⁰ *Teschovirus* has been validated, and a method for the characterization of viral isolates belonging to this genus has been developed, based on the amplification and nucleotide sequencing of the VP1 protein-coding region of its genome, which enabled the classification of isolates found and the recognition of two as yet unknown genotypes (PTV12 and PTV14). In turn, experimental studies have shown that the isolate CC25 was a new genotype and serotype (PTV-12), nonpathogenic, showing tissue tropism for lymphoid and digestive systems and unable to confer cross-protection against a heterologous strain (PTV-1). Likewise, studies conducted in wild boar have shown the abundance of teschoviruses and sapeloviruses in faecal samples, and further analysis has allowed to establish phylogenetic relationships with their domestic porcine counterparts. In addition, the diversity of viral communities present in pig faeces has been characterized by using metagenomics.

The lack of serologic reactivity of a collection of monospecific polyclonal antisera in the tests used for detection of antibodies to SVDV (ELISA-LP and virus-neutralization test) demonstrated that none of the non-vesicular porcine enteric viruses studied is responsible for the false-positive reactions to VEVP observed in our country. This conclusion was corroborated by the observed absence of statistical correlation between serological results obtained to VEVP and to the Spanish teschovirus isolates "CC77" (PTV-2) in field samples.

Moreover, preliminary studies have shown that the addition of specific neutralizing antibodies to the most abundant VEP-NV found in our country, could improve the technique of VEVP isolation, though it requires an optimization to achieve an effective improvement in the confirmatory diagnosis of EVP.

ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
ENFERMEDAD VESICULAR PORCINA	2
1. Antecedentes históricos de la EVP	2
2. Estructura y organización genómica	4
3. Estructura de la cápsida viral y sus proteínas	6
4. Estructura antigénica	7
5. Epidemiología	9
6. Patogénesis	10
7. Signos clínicos	11
8. Respuesta inmune	12
9. Diagnóstico diferencial	13
10. Pruebas laboratoriales: diagnóstico molecular y serológico	13
11. Prevención y profilaxis	15
12. Control y erradicación	16
SITUACIÓN EN ESPAÑA RESPECTO AL VIRUS DE LA EVP	16
1. Reacciones falsas positivas o “ <i>singleton reactors</i> ”	18
2. Etiología de las reacciones cruzadas	19
VIRUS ENTÉRICOS PORCINOS EN ESPAÑA: NECESIDAD DE UN ESTUDIO	
DESCRIPTIVO	21
1. Familia <i>Picornaviridae</i>	23
1.1 Género <i>Teschovirus</i>	24
1.2 Género <i>Sapelovirus</i>	29
1.3 Género <i>Enterovirus B</i>	29
2. Familia <i>Adenoviridae</i>	30
APLICACIÓN DE NUEVAS TECNOLOGÍAS AL CONOCIMIENTO DE LOS VIRUS	
ENTÉRICOS PORCINOS	32
OBJETIVOS	34

MATERIALES Y MÉTODOS	38
MATERIALES	40
1. Líneas celulares.....	40
2. Mantenimiento de las líneas celulares	40
3. Otros reactivos empleados.....	40
4. Cepas virales	41
5. Muestras experimentales y de campo	42
5.1 Muestras virológicas	42
5.2 Muestras serológicas	42
6. Materiales de referencia utilizados como control serológico y virológico	43
6.1 Materiales de control serológico	43
6.2 Materiales de control virológico	43
MÉTODOS	44
1. MÉTODOS VIROLÓGICOS	44
1.1 Preparación de las muestras para el aislamiento y la extracción de ácidos nucleicos	44
1.2 Aislamiento y propagación viral en cultivos celulares	44
1.3 Neutralización de la interferencia de los VEP-NV en la técnica de aislamiento del virus de la EVP en cultivo celular	45
1.4 Titulación viral por dilución límite (DICT ₅₀)	46
1.5 Obtención de antisueros policlonales monoespecíficos por inmunización de conejos	46
1.5.1 Propagación de los virus a emplear como antígeno.....	46
1.5.2 Inactivación de los virus con BEI	46
1.5.3 Concentración y semipurificación	47
1.5.4 Inmunización de conejos con los antígenos víricos	47
1.5.4.1 Inoculación de antígenos víricos	47
1.5.4.2 Recogida y procesamiento de sangre	48
2. MÉTODOS SEROLÓGICOS	49
2.1 Preparación de las muestras para serología	49
2.2 Seroneutralización	49
2.3 Elisa <i>sándwich</i> de bloqueo en fase líquida (ELISA-FL) para EVP	50

2.4	Análisis estadísticos	50
3.	MÉTODOS MOLECULARES	51
3.1	Extracción de ácidos nucleicos	51
3.2	Amplificación de ácidos nucleicos	51
3.3	Métodos de RT-PCR para detección de genoma vírico.....	52
3.3.1	Técnica de RT-PCR en tiempo real para la detección de teschovirus ...	52
3.3.2	Técnica de RT-PCR en tiempo real para la detección del virus de la enfermedad vesicular porcina (VEVP)	53
3.3.3	Técnica de RT-PCR en tiempo real para la detección del virus de la enfermedad vesicular porcina (VEVP) con control interno (β -actina)	54
3.3.4	Técnica de RT-PCR para la detección de teschovirus y sapelovirus ...	55
3.3.5	Técnica de RT-PCR para la detección de enterovirus-B (serotipos PEV-9 y PEV-10)	56
3.3.6	Técnica de RT-PCR convencional para la detección de teschovirus, sapelovirus y enterovirus-B	56
3.3.7	Técnica de PCR para la detección de adenovirus porcinos	57
3.3.8	Técnica de RT-PCR múltiple para la detección del VEVP, teschovirus y sapelovirus	57
3.3.9	Técnica de RT-PCR para la detección de coronavirus porcino	58
3.4	Métodos para la caracterización molecular de aislados víricos por amplificación y secuenciación	59
3.4.1	Caracterización de aislados del G ^o <i>Teschovirus</i>	59
3.4.1.1	Amplificación y secuenciación de la proteína VP1 de aislados del G ^o <i>Teschovirus</i>	59
3.4.1.2	Amplificación y secuenciación de la proteína VP2 de aislados del G ^o <i>Teschovirus</i>	60
3.4.2	Caracterización de aislados del G ^o <i>Sapelovirus</i> por amplificación y secuenciación de la proteína VP4.....	61
3.4.3	Método para el análisis de la secuencia completa del genoma del aislado CC25 perteneciente al G ^o <i>Teschovirus</i>	61
3.5	Visualización de los productos de amplificación	61
3.6	Purificación del ADN y secuenciación	62
3.7	Análisis filogenéticos y filogeográficos	63

3.7.1 Análisis filogenéticos de la proteína VP1 del G ^o <i>Teschovirus</i> : aislados porcinos españoles	63
3.7.2 Análisis filogenéticos de la proteína VP1 del G ^o <i>Teschovirus</i> : aislados porcinos italianos	64
3.7.3 Análisis filogenéticos de la proteína VP1 del G ^o <i>Teschovirus</i> y VP4 del G ^o <i>Sapelovirus</i> : aislados de jabalíes	64
3.7.4 Análisis filogenéticos de la poliproteína (P1) del G ^o <i>Teschovirus</i> : aislado CC25 (PTV12)	65
4. MÉTODOS HISTOLÓGICOS	65
4.1 Preparación de las muestras para su estudio microscópico	65
4.2 Inmunohistoquímica	65
5. METODOLOGÍA ESPECÍFICA EMPLEADA EN LOS ESTUDIOS DE METAGENÓMICA	66
5.1 Preparación de las partículas víricas	66
5.1.1 Extracción de las partículas víricas a partir de heces porcinas	66
5.1.2 Purificación y concentración de las partículas víricas	67
5.1.3 Eliminación de los ácidos nucleicos contaminantes	67
5.1.3.1 Tratamiento con nucleasas	67
5.2 Purificación de los ácidos nucleicos: <i>viroma ADN</i> y <i>viroma ARN</i>	68
5.2.1 Purificación y cuantificación de ADN vírico (<i>viroma ADN</i>)	68
5.2.2 Purificación de ARN vírico (<i>viroma ARN</i>)	69
5.3 Amplificación al azar de ARN vírico por amplificación con un único oligonucleótido e independiente de secuencia (SISPA)	69
5.4 Visualización del ADN viral	71
5.5 Control de presencia de secuencias contaminantes de genomas eucariotas, bacterianos y de secuencias virales específicos en las preparaciones	72
5.5.1 Control de la diversidad vírica y de la contaminación genómica y bacteriana	73
5.6 Pirosecuenciación y análisis metagenómico	73
5.7 Análisis de secuencias	73
6. ENSAYOS <i>IN-VIVO</i>: EXPERIMENTACIÓN ANIMAL	76
6.1 Aspectos generales de la experimentación animal realizada	76

6.2 Estudio del tropismo y la patogenicidad de un nuevo genotipo del G ⁰ <i>Teschovirus</i> (aislado CC25) en la especie de destino (Cerdo de <i>Sach (Minipig)</i>	77
6.2.1 Inoculación.....	77
6.2.2 Control previo: análisis serológicos y moleculares	77
6.2.3 Recogida y procesamiento de las muestras	77
6.3 Estudio de protección cruzada heteróloga conferida por una infección previa por el aislado CC25, serotipo 12 frente a una infección posterior por el aislado <i>Teschen-Tirol</i> , serotipo 1	78
6.3.1 Inoculación	78
6.3.2 Recogida y procesamiento de las muestras	78
RESULTADOS	80
1. Determinación de la naturaleza de los virus entéricos porcinos no vesiculares citopáticos aislados (VEP-NVC)	82
1.1 Estudios sobre virus entéricos porcinos no vesiculares citopáticos en España. .	82
1.2 Validación de la RT-PCR en tiempo real para detección molecular de todos los serotipos conocidos de teschovirus	84
1.2.1 Determinación de la especificidad analítica	84
1.2.2 Determinación de la sensibilidad analítica	85
1.2.3 Ensayos de especificidad y sensibilidad diagnóstica	88
1.3 Caracterización molecular de los aislados españoles del G ⁰ <i>Teschovirus</i> (VP1)	89
1.3.1 Identificación molecular y correlación con el serotipo	89
1.3.2 Análisis filogenético	93
1.3.3 Estimación de los índices de sustitución nucleotídica y los tiempos de divergencia para el G ⁰ <i>Teschovirus</i> por análisis de la región VP1.....	93
1.3.4 Comparación de dos métodos de caracterización molecular del G ⁰ <i>Teschovirus</i> : VP1c vs. VP2p	97
1.3.5 Comparación de dos métodos de caracterización molecular del G ⁰ <i>Teschovirus</i> : VP1p vs. VP1c	99
1.4 Estudio de virus entéricos en jabalíes salvajes (<i>Sus scrofa</i>) en España	103
1.4.1 Identificación molecular de teschovirus y sapelovirus en heces de jabalíes	103
1.4.2 Análisis filogenético de las secuencias de teschovirus y sapelovirus	105

2. Caracterización de un nuevo genotipo/serotipo de teschovirus aislado en España: Teschovirus-12. Tropismo, patogenicidad y protección cruzada	108
2.1 Caracterización genotípica: secuenciación del genoma completo	108
2.2 Análisis de homología nucleotídica y aminoacídica	108
2.3 Análisis filogenético de la región P1	109
2.4 Estudios <i>in-vivo</i> : Estudios de tropismo y la patogenicidad del aislado CC25 (PTV12) en su hospedador natural. Estudio de protección cruzada	111
2.4.1 Caracterización serológica	112
2.4.1.1 Prueba de neutralización del aislado CC25 con antisueros específicos frente a cepas víricas de referencia y de campo	112
2.4.1.2 Prueba de neutralización de cepas de referencia para el género <i>Teschovirus</i> con sueros positivos a CC25	113
2.4.2 Detección del virus en sangre, saliva y heces	114
2.4.3 Estudio del tropismo y la patogenicidad	115
2.4.3.1 Lesiones macroscópicas	115
2.4.3.2 Lesiones microscópicas	116
2.4.3.3 Tropismo tisular del aislado CC25	121
2.4.4 Estudio de protección cruzada frente a un serotipo heterólogo (aislado <i>Teschen-Tirol</i> , serotipo 1)	121
2.4.4.1 Estudios serológicos	123
3. Aplicación de nuevas tecnologías al conocimiento de los virus entéricos porcinos mediante secuenciación masiva de nueva generación (<i>Next Generation Sequencing</i>)	125
3.1 Análisis de las secuencias	125
3.2 Análisis de los <i>contigs</i>	127
4. Rastreo seroepidemiológico del tipo de VEP-NVC más abundante en España (Teschovirus). Determinación de la posible correlación con la serología positiva a VEVP	130
5. Análisis inmunoquímico de la reacción cruzada: cros-neutralización con antisueros específicos (VN y ensayos de ELISA), dirigidos a demostrar o descartar la hipótesis de la reacción cruzada entre el VEVP y los VEP-NVC	133

5.1 Análisis de seroneutralización de VEVP empleando antisueros específicos frente a VEP-NV	133
5.1.1 Obtención de antisueros policlonales específicos en conejos	133
5.1.2 Seroneutralización con aislados del virus de la EVP	135
5.1.3 Seroneutralización con cepas de PTV-PSV-PEV-B	136
5.2 Análisis de antisueros específicos para VEP-NV por la técnica de ELISA <i>sándwich</i> de bloqueo en fase líquida para el virus de la EVP.....	137
6. Neutralización de la interferencia de los virus entéricos porcinos no vesiculares en la técnica de aislamiento del VEVP en cultivo celular, mediante el uso de antisueros	138
DISCUSIÓN	142
1. Estudios moleculares y epidemiológicos de los virus entéricos porcinos no vesiculares en España	145
2. Nuevas aportaciones al diagnóstico virológico y caracterización del virus de la enfermedad de Teschen-Talfan	153
3. Análisis dirigidos a demostrar o descartar la hipótesis de la reacción cruzada entre el VEVP y los VEP-NVC. Estudios de interferencia en la técnica del cultivo celular	163
CONCLUSIONES	166
BIBLIOGRAFÍA	170
ANEXO I	198
• Abreviaturas	200
• Listado de Figuras	208
• Listado de Tablas	212
• Tabla descriptiva G ⁰ <i>Teschovirus</i>	216
ANEXO II	220
• Publicaciones relacionadas con la tesis	222

INTRODUCCIÓN

ENFERMEDAD VESICULAR PORCINA

La enfermedad vesicular porcina (EVP) es una enfermedad contagiosa de ganado porcino, de gran relevancia sanitaria, que está incluida en el listado de enfermedades de declaración obligatoria por la *Oficina Mundial de la Sanidad Animal* (OIE), por sus graves repercusiones sanitarias y sus consecuencias sobre el comercio internacional de animales y productos derivados de éstos (OIE., 2008, Capítulo 2.8.9).

La importancia crucial de la EVP reside en la imposibilidad de distinguirla clínicamente de la fiebre aftosa (FA), y debe asumirse que los brotes de la enfermedad vesicular en cerdos corresponden a FA hasta que se investiguen mediante pruebas de laboratorio y pueda demostrarse lo contrario. Por otra parte, tres enfermedades porcinas, exantema vesicular del cerdo, estomatitis vesicular porcina y enfermedad vesicular idiopática, pueden originar síntomas muy parecidos al virus de la EVP, siendo necesario incluirlas en el diagnóstico diferencial de la misma.

1. Antecedentes históricos de la EVP

El agente causal es el virus de la enfermedad vesicular del cerdo (VEVP), perteneciente al género *Enterovirus*, dentro de la familia *Picornaviridae*, la cual engloba virus que afectan a animales y a humanos, tales como el virus de la fiebre aftosa, de la poliomielitis, de la hepatitis A y del catarro común, entre otros.

El VEVP es considerado una variante de los coxsackievirus B5 humanos (CV-B5) por adaptación del virus a la especie porcina (Brown y cols., 1973; Graves., 1973). El virus de la EVP muestra una gran homología molecular y antigénica con los coxsackievirus B5 compartiendo entre el 75-85% de la secuencia de nucleótidos (Knowles y McCauley., 1997), y análisis filogenéticos indican la probabilidad de un ancestro común entre los años 1945 y 1965, al que se considera su precursor (Zhang y cols., 1993; Zhang y cols., 1999).

Su primera aparición fue en Lombardía (Italia) en 1966, donde fue reconocida clínicamente como fiebre aftosa (FA), siendo posteriormente denominada “*infección por enterovirus porcinos*” debido a que por análisis físico-químicos se demostró que el agente causal era un enterovirus (Nardelli y cols., 1968). Posteriormente, en 1971, se detectó en Hong Kong, en un ensayo de vacunas de fiebre aftosa (Mowat y cols., 1972) y un año después apareció en Reino Unido, donde fue renombrada como virus de la enfermedad vesicular porcina. Durante varias décadas, la EVP ha sido diagnosticada en diversos países europeos y asiáticos (Dawe y cols., 1973; Brocchi y cols., 1997; Kanno y cols., 1999) (Tabla 1).

La enfermedad llegó a España en el 1993, siendo eliminada en pocos meses y manteniéndose libre desde entonces (Escribano-Romero y cols., 2000). Aunque en el 2004 y 2007 hubo brotes aislados en Portugal en el distrito de Leiria y en la provincia de Beja, respectivamente (Knowles y cols., 2007), desde 1994 la enfermedad en Europa, está focalizada en Italia, donde permanece endémica, a pesar de la campaña de erradicación que se está llevando a cabo en el país. Su último brote notificado se ha situado en el sur de Italia, en la región de Campania (Campobasso y Salerno), en 2011 (Bellini y cols., 2007; Bellini y cols., 2010) (Figura 1).

Norte y Sudamérica, África y Australia han permanecido libres de la enfermedad pero es probable que en algunos países asiáticos, la enfermedad esté todavía presente (Kanno y cols., 1999).

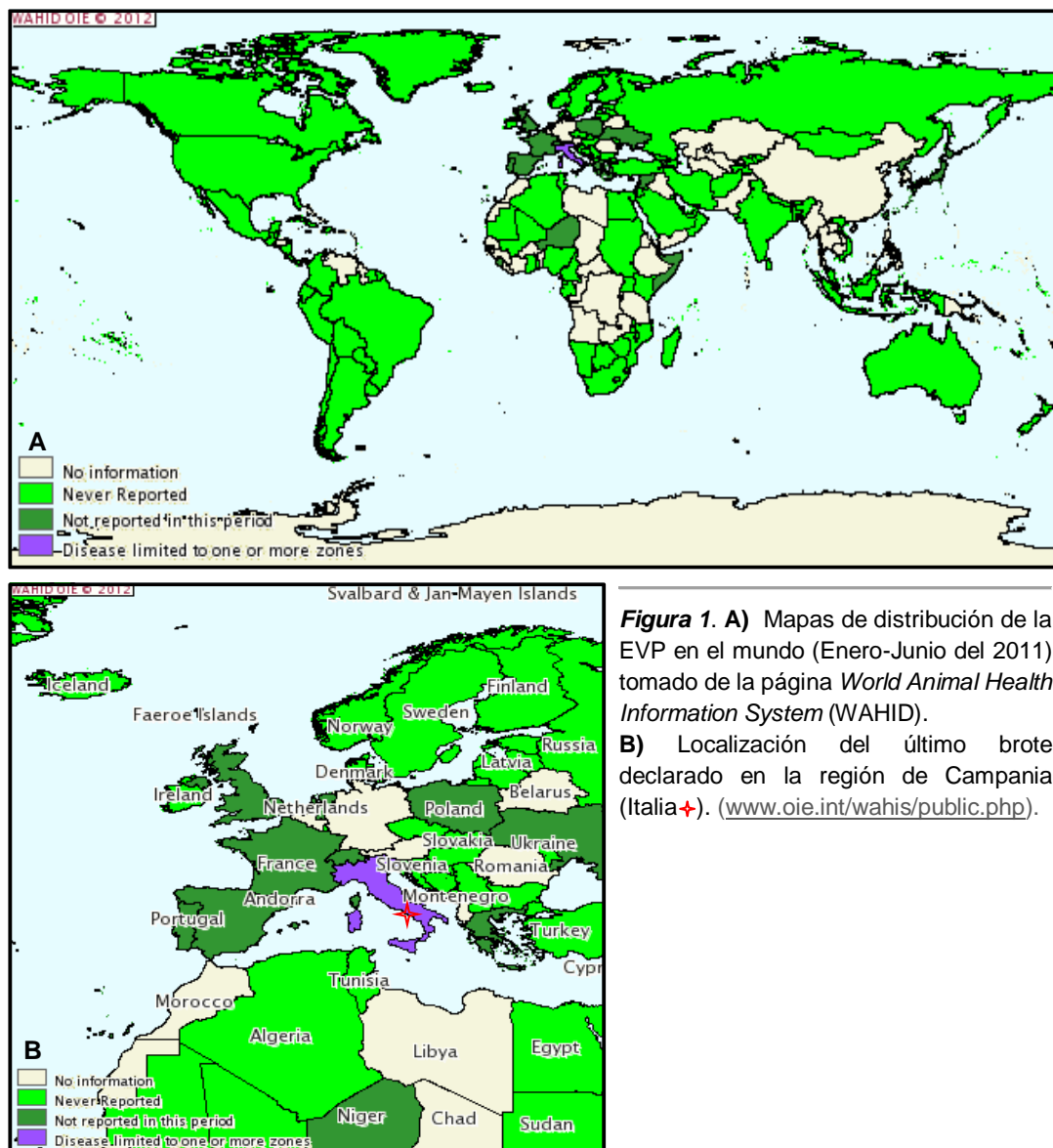


Figura 1. A) Mapas de distribución de la EVP en el mundo (Enero-Junio del 2011) tomado de la página *World Animal Health Information System (WAHID)*. **B)** Localización del último brote declarado en la región de Campania (Italia+). (www.oie.int/wahis/public.php).

PAÍS	BROTOS REPORTADOS (años)	ÚLTIMO BROTE
Europa		
Austria	1972-1976,1978	1979
Bélgica	1973,1979,1992	1993
Bulgaria	1971	1971
Francia	1973-1975,1982	1983
Alemania	1973-1977,1979-1982	1985
Grecia	1979	1979
Holanda	1975,1992	1994
Italia	1966,1972-1984,1988- 1989,1991-2010	2011
Malta	1975	1978
Polonia	1972	1973
Portugal	1995,2003-2004	2007
Rumania	1972-1973	1987
Rusia	1972	1976
España	1993	1993
Suiza	1973	1975
Países Bajos	1975	1994
Ucrania	1972	1977
Reino Unido	1972-1977,1979-1981	1982
Asia		
China	1971-1977,1979-1981,1984- 1985, 1887-1989	1991
Japón	1973	1975
Macao	1989	1989
Taiwán	1997-1998	2000

Tabla 1. Países europeos y asiáticos y los años correspondientes a los brotes declarados de la EVP.

2. Estructura y organización genómica

Es un virus de pequeño tamaño (28-30 nm), sin envuelta y con una cápsida esférica de simetría icosaédrica constituida por cuatro proteínas estructurales. El genoma del VEV consiste en una única molécula de ARN monocatenaria de 7400 nucleótidos, de polaridad positiva, que actúa en la célula infectada como ARN mensajero (Inoue y cols., 1989; Seechurn y cols., 1990; Inoue y cols., 1993). Posee una única fase de lectura abierta que codifica una única poliproteína (precursor). Dicho precursor se procesa en el citoplasma de las células infectadas por proteasas específicas, para dar las 11 proteínas funcionales (Rueckert., 1996). Una primera escisión de este precursor produce tres polipéptidos (P1, P2 y P3). P1 dará lugar a las cuatro proteínas estructurales de la cápsida, VP1, VP2, VP3 y VP4 (véase “Estructura de la cápsida viral”), mientras que P2 y P3 darán lugar a las siete proteínas no estructurales (Figura 2).

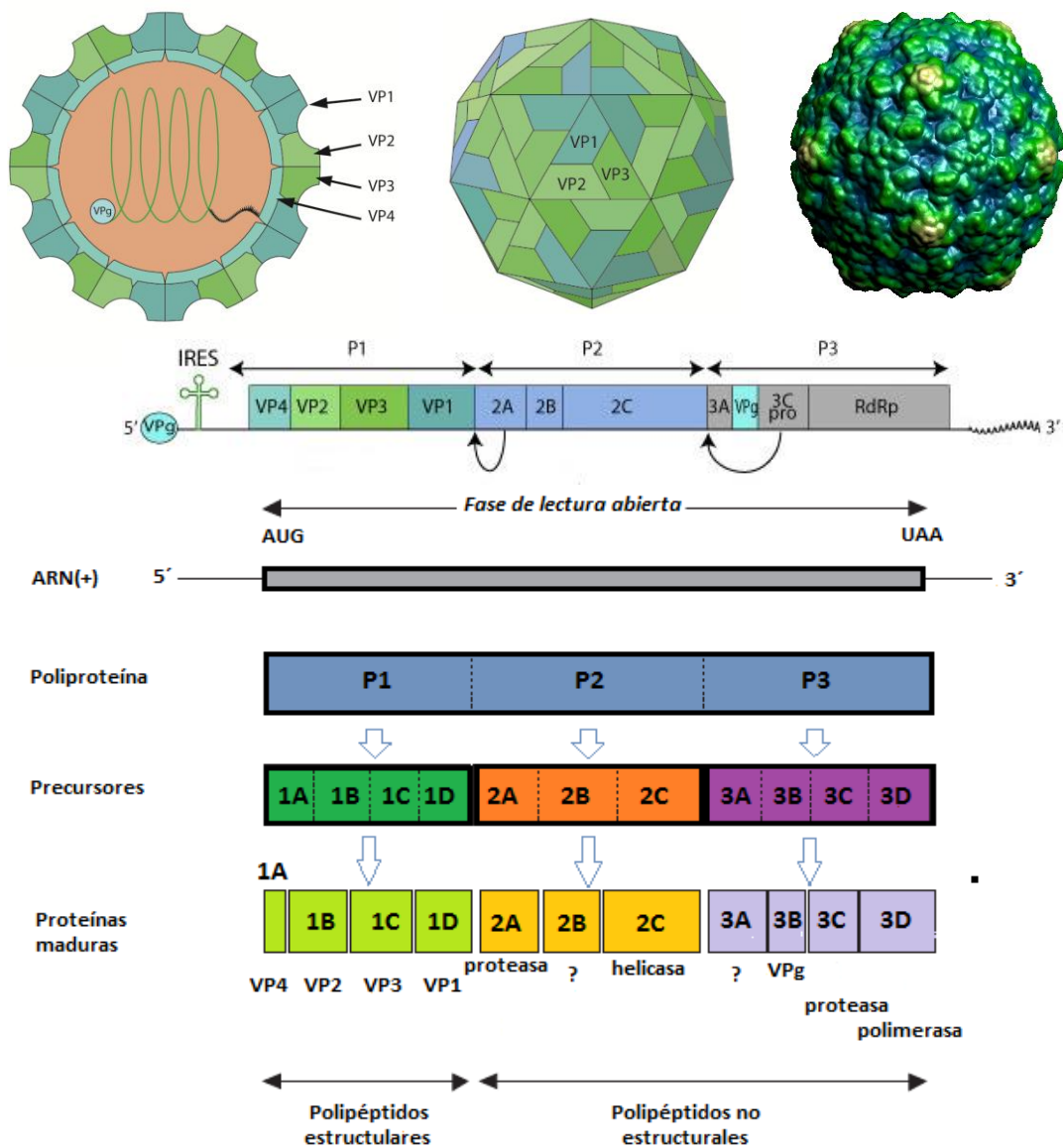


Figura 2. En la parte superior derecha se representa la estructura cristalográfica del VEEV (Fry y cols., 2003). En la parte superior izquierda, la cápsida icosaédrica externa del VEEV, constituida por 4 proteínas estructurales (ViralZone: www.expasy.org/viralzone, Swiss Institute of Bioinformatics). En la parte central, la imagen muestra la organización del genoma y la organización genética de sus poliproteínas (P1, P2 y P3). El ARN está organizado 5'VPg-RNC-Poliproteína-RNC-poli (A) 3'. RNC son regiones no codificantes que flanquean la poliproteína. En la parte inferior, esquema de la organización del genoma del VEEV y de los productos del procesamiento de la poliproteína viral. Las líneas verticales discontinuas corresponden a los sitios de procesamiento proteolítico (Jiménez-Clavero y cols., 2000a).

Dos de estas proteínas (2A y 3C) tienen actividad proteolítica y participan en el proceso de maduración de los polipéptidos virales. La proteína 2C presenta similitudes en su secuencia con helicasas y ATPasas, y es capaz de interactuar con membranas celulares, aunque su función exacta se desconoce, al igual que las funciones de 2B y 3A. El polipéptido 3B, o VPg, se une covalentemente al extremo 5' no codificante del ARN viral, participando en la replicación del mismo. Por último, la proteína 3D es la ARN polimerasa viral. La región codificante del ARN está flanqueada por dos regiones que no se traducen.

En el extremo 5' no codificante existe una región altamente estructurada, conocida como IRES (sitio interno de entrada al ribosoma), la cual es la región a la que se une el ribosoma celular para iniciar la traducción. En la región 3' no codificante también hay un segmento muy estructurado, posiblemente implicado en la replicación del ARN viral, seguido de una cadena de poliadeninas de longitud variable, similar a la que poseen los ARNm celulares (Escribano-Romero y cols., 2000).

3. Estructura de la cápsida viral y de sus proteínas

La cápsida del VEPV consta de 60 protómeros (subunidades), cada uno de ellos formado por cuatro cadenas polipeptídicas distintas (VP1, VP2, VP3 y VP4), procedentes del procesamiento del precursor P1 (*Figura 3*). Una proteasa viral inicialmente procesa dicho precursor P1 dando lugar a tres polipéptidos, VP0, VP3 y VP1 que se ensamblan formando un protómero. La unión de 5 protómeros formarán intermediarios pentaméricos, y doce pentámeros constituirán un provirión con forma icosaédrica y simetría T=1 que protegerá el ARN vírico. Posteriormente se producirá la encapsidación de la molécula de ARN, seguido de una protólisis autocatalítica del precursor VP0, dando lugar a VP2 y VP4, necesaria para producir virus infectivos. En el virión maduro, las proteínas VP1, VP2 y VP3 (33, 32 y 29 kDa, respectivamente (Tsuda y cols., 1987), se encuentran expuestas hacia la superficie, mientras que VP4 (7,5 kDa) se encuentra situada hacia el interior de la cápsida, interaccionando con el ARN viral.

Las proteínas VP1, VP2 y VP3 presentan una estructura terciaria muy conservada entre los picornavirus, consistente en un núcleo central hidrofóbico formado por ocho láminas β antiparalelas («barril β ») conectadas por bucles o *loops* de extensión variable. Dichas láminas β se denominan alfabéticamente B a I en función de su orden de aparición en la cadena polipeptídica y los bucles toman el nombre de las láminas β que los flanquean. Existen, además, dos hélices α internas, denominadas α A y α B, precediendo en la secuencia a las láminas β D y F, respectivamente. Muchos de los *loops* quedan expuestos hacia la superficie del virión. También se encuentran orientadas hacia la superficie las extensiones carboxi-terminales de las proteínas VP1, VP2 y VP3, mientras que los extremos amino-terminales se encuentran orientados hacia el interior.

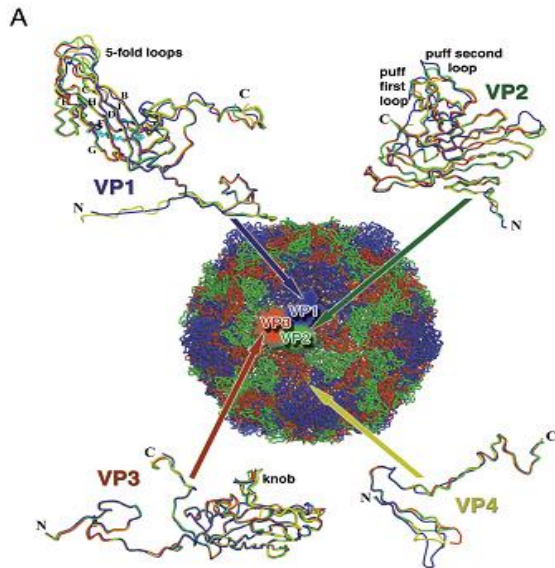


Figura 3. Estructura de VEVP. **A)** Representado centralmente está la cápsida del VEVP que comprende 60 copias de las proteínas VP1, 2, 3 y 4. Las proteínas se muestran de distintos colores, VP1 en azul, en verde VP2, VP3 en rojo y VP4 en amarillo (Fry y cols., 2003).

4. Estructura antigénica

La caracterización antigénica del VEVP se ha llevado a cabo mediante dos tipos de análisis:

- Secuenciación de variantes virales de escape a la neutralización por anticuerpos monoclonales (AcM), (mutantes MAR): se han identificado siete sitios de neutralización en la cápsida del VEVP, cinco sitios antigénicos identificados en el aislado japonés *H/376* (Kanno y cols., 1995) y dos nuevos identificados en el aislado italiano *ITL/9/93* (Nijhar y cols., 1999) (*Tabla 2*).
- Análisis serológico del reconocimiento de péptidos solapantes que contienen secuencias de aminoácidos correspondientes a las proteínas estructurales del virión (ELISA «pepscan») (Jiménez-Clavero y cols., 2000a) que ha permitido definir al menos otras siete regiones antigénicas en las proteínas de la cápsida, de las cuales al menos una está implicada en el proceso de neutralización *in-vitro* (Jiménez-Clavero y cols., 2001) (*Tabla 2*).

En la actualidad todas las cepas del VEVP pertenecen a un solo serotipo y grupo monofilético. Sin embargo, existe una variabilidad antigénica entre los aislados del VEVP (Brown y cols., 1973; Burrows y cols., 1974; Donaldson y cols., 1983). Los aislados pueden dividirse al menos en cuatro grupos filogenéticos distintos en base a los estudios realizados por secuenciación de una región del gen VP1 o 3BC (Brocchi y cols., 1997; Zhang y cols., 1999) (*Figura 4*).

Técnica empleada	Nombre	Proteína	Residuos implicados	Localización estructural
Mutantes MAR	Sitio 1	VP1	87, 88	Loop β B- β C
"	Sitio 2A	VP2	163	Puff β E- β F
"	Sitio 2B	VP2	154	Puff β E- β F
"	Sitio 3A	VP1	272, 275	C-terminal
"		VP3	60	«knob» β B
"		VP2	70	Loop β B- β C
"	Sitio 3B	VP2	233	Loop β B- β I
"		VP3	73, 76	Loop β B- β C
"	SD	VP1	261	C-terminal
"	SD	VP3	234	C-terminal
Pepscan	Region 1	VP2	42-61	N-terminal
"	Region 2	"	82-121	α A- β D y parte β D- β E
"	Region 3	VP3	1-40	N-terminal
"	Region 4	"	51-70	«knob» β B
"	Region 5	"	91-120	α A- β D
"	Region 6	VP1	1-40	N-terminal
"	Region 7	"	201-220	Loop β G ₂ . β H

Tabla 2. Principales sitios antigénicos identificados en la cápsida del VEP descritos por *Kanno y cols* (1995), *Nijhar y cols* (1999) y *Jiménez-Clavero y cols* (2000a).

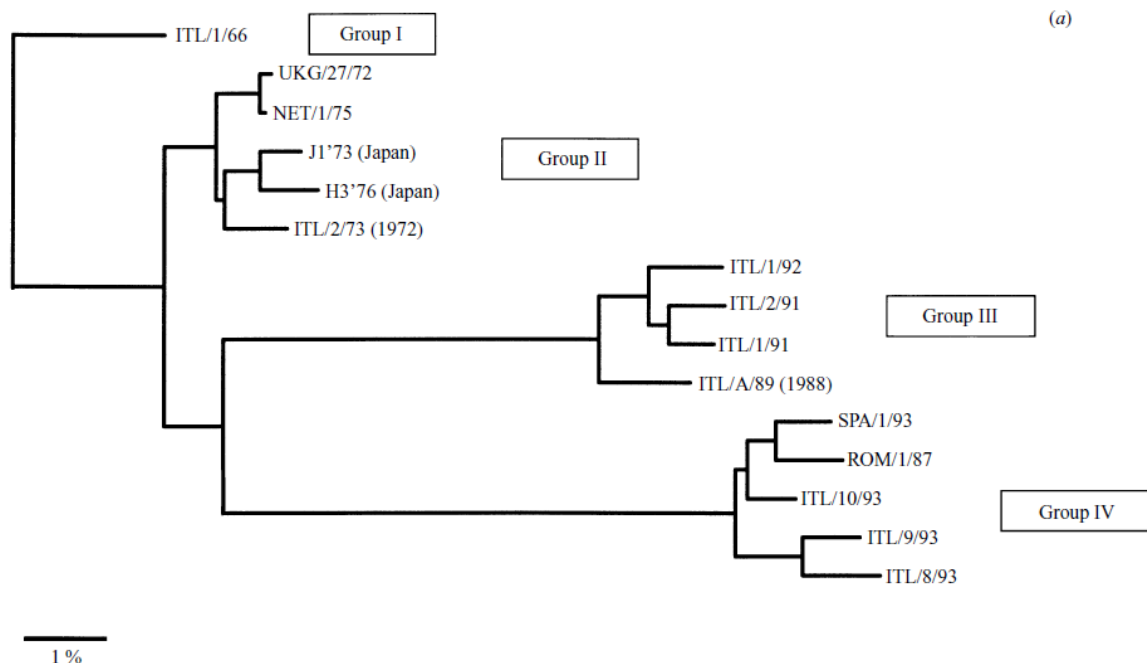


Figura 4. Árbol filogenético derivado del análisis de la proteína VP1 de aislados del virus de la EVP. El primer grupo está formado por el primer aislado descrito (ITL/1/66), mientras que el segundo comprende virus presentes en Europa y Japón entre 1972 y 1981. El tercer grupo engloba virus aislados entre diciembre de 1988 a junio de 1992. Los virus descritos entre 1987 y 1994 en Rumania, Países Bajos, Italia y España forman el cuarto grupo filogenético (Brocchi y cols., 1997).

5. Epidemiología

La EVP se considera altamente contagiosa para los cerdos de todas las edades con una tasa de morbilidad que pueden llegar al 80-100%, dependiendo de ciertos factores, como son, la virulencia de la cepa, tipo de finca y el tiempo entre la infección y la detección principalmente. La mortalidad es muy baja encontrando únicamente alta mortalidad en lechones recién nacidos de cerdas infectadas (Chu y cols., 1979). La susceptibilidad a la infección natural sólo se ha hallado en la especie porcina, tanto de la zona euro-asiática como americana (Wilder y cols., 1974). Sin embargo, en la faringe de ovejas las cuales mantuvieron un estrecho contacto con cerdos infectados, se detectaron altos títulos de virus, desarrollando niveles significativos de anticuerpos neutralizantes e indicando que el virus tenía capacidad para replicar en dicho hospedador sin que las ovejas mostraran signos clínicos de la infección. No obstante, esta especie no parece desempeñar un papel importante en la transmisión de la enfermedad (Burrows y cols., 1974). La infección experimental inducida en ratones recién nacidos es letal (Nardelli y cols., 1968; Kadoi., 1983). Aunque VEVP está estrechamente relacionado con virus humanos como el Coxsackie B5 y Echovirus 9, no se le considera un virus que implique un riesgo en Salud Pública debido a que no se han reportado casos de infección en humanos recientemente y que el virus ha ido perdiendo la capacidad para infectar células humanas disminuyendo su posible potencial zoonótico (Verdaguer y cols., 2003; Jiménez Clavero y cols., 2005).

La enfermedad puede transmitirse por contacto directo con animales infectados y/o sus excrementos (ruta fecal-oral) o por alimentos contaminados con el virus. Entornos contaminados con el virus de la EVP han demostrado ser tan infecciosos como la inoculación directa o el contacto con cerdos infectados, por ejemplo, vehículos no desinfectados correctamente utilizados para el transporte de cerdos. Sin embargo, la propagación por aerosol no es una característica de la transmisión (Herniman y cols., 1973; Dekker y cols., 1995). Un sistema de drenaje colectivo o el movimiento regular de cerdos infectados entre corrales incrementa la probabilidad de propagación (Dekker y cols., 2002).

La persistencia y la particularmente alta estabilidad del virus desempeñan un papel esencial en la epidemiología y en el control de la enfermedad (Lin y Kitching., 2000). El virus es resistente a los desinfectantes alcalinos o ácidos más comunes y también a detergentes y disolventes orgánicos como el éter y el cloroformo. Afectado por la desecación y la congelación, sin embargo puede sobrevivir entre 4 y 11 meses en un rango de pH de 2.5-12 y de temperatura de 12 °C a -20 °C.

La inactivación del virus es posible con altas concentraciones de químicos o tratamiento térmico, por ejemplo, 56 °C durante 1 hora o mediante el uso de desinfectante como hidróxido de sodio o cálcico combinado o no con detergentes, formaldehído (2%), e incluso alcohol al 70%, con tiempos de contacto apropiados (Terpstra., 1992; Turner y Williams., 1999).

Los cerdos infectados secretan el virus a través de su nariz y boca durante 2 semanas. Igualmente, pueden ser excretados en grandes cantidades en sus heces hasta 48 horas antes de la aparición de signos clínicos. El virus localizado en los tejidos, puede conllevar la contaminación de productos derivados del cerdo que pueden entrar en la cadena alimentaria cuando la enfermedad no se reconoce inmediatamente. Generalmente, la duración de la eliminación del virus desde las vesículas es al menos de 7 días (Dekker y cols., 1995) y no persisten en los tejidos más de 28 días. En contraposición, hay estudios experimentales con aislados europeos, que postulan infecciones persistentes durante más de tres meses después de la infección (Lahellec y cols., 1975; Lin y cols., 1998), aunque ha sido difícil para los autores reproducir nuevamente los resultados (Lin y cols., 2001). En determinadas condiciones que generen una situación de estrés, como puede ser la mezcla de cerdos, el virus puede reactivarse durante un corto período sin ser reconocido, sugiriendo que el estado de portador del virus es probablemente un inusual evento pero puede tener su importancia epidemiológica ya que dichos animales son una fuente indetectable de infección, y dificulta el control y erradicación de la EVP.

6. Patogénesis

El virus puede entrar a través de la piel lesionada, por las membranas mucosas del tracto digestivo o por la ingestión de secreciones o excretas de cerdos infectados (Chu y cols., 1979; Lai y cols., 1979; Mann y Hutchings., 1980).

El período de incubación suele ser de 2 a 7 días, pero puede ser mayor si la dosis de virus es pequeña. La replicación viral comienza en el sitio primario de infección, el tracto gastrointestinal, propagándose rápidamente por la vía linfática al torrente sanguíneo durante el 1º o 2º día post-infección, tanto en los cerdos infectados por contacto con ambientes contaminados como en cerdos inoculados experimentalmente (Dekker y cols., 1995).

Pueden encontrarse altos títulos de virus en las vesículas y en los tejidos, disminuyendo una vez que la respuesta de anticuerpos se establece después de la primera semana de enfermedad clínica. Asimismo, la presencia de anticuerpos neutralizantes circulantes confiere protección frente a una reinfección futura.

El tropismo del virus por los tejidos epiteliales es muy conocido pero los títulos del virus en el miocardio, cerebro, riñón y bazo son superiores a los títulos que alcanza en plasma o suero, lo que indica que probablemente puedan ser sitios de replicación del virus (Chu y cols., 1979; Lai y cols., 1979; Dekker y cols., 1995). Asimismo, el virus puede ser aislado en los ganglios linfáticos donde puede haber un alto título viral, quizás por ser un sitio de drenaje o debido a la replicación del virus en el mismo (Dekker., 2000).

Técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in-situ* pueden ser útiles para detectar los tejidos y células epiteliales o dérmicas infectados por el VEVP. A pesar de los avances, es necesario implementar más estudios con el fin de conocer que células están involucradas en la replicación del VEVP, lo que ayudaría a caracterizar el tropismo del virus en el hospedador (Mulder y cols., 1997; Lin y cols., 1998).

7. Signos clínicos

Los cerdos afectados pueden mostrar inapetencia durante un día o dos, pero no es un hallazgo constante. Entre el 1º y el 5º día después de la exposición al virus, la temperatura corporal puede elevarse a 41°C perdurando durante dos o tres días; no obstante, en ensayos experimentales con cepas europeas dicha pirexia nunca se observó (Lin y Kitching., 2000; Fernández-Pacheco y cols., 2012).

Inicialmente, aparecen zonas de epitelio blanquecino, seguido por la formación de vesículas alrededor de las bandas coronarias y en la piel de las partes inferiores de las extremidades, especialmente en los puntos de presión, como las rodillas. También pueden aparecer las vesículas en el hocico, específicamente en la superficie dorsal, en labios, lengua y glándulas mamarias, siendo relativamente raro en la cavidad oral. La ruptura de las vesículas descubre una úlcera superficial rojiza que libera un líquido de color pajizo. En algunos casos se han encontrado lesiones ulcerosas puntiformes en los labios inferiores, pero estas lesiones no son características de la enfermedad. La extensión de las lesiones puede permitir que la pared de la pezuña se separe de los tejidos subyacentes, siendo raro que se produzca el desprendimiento completo de la pezuña, como ocurre con la fiebre aftosa. Se han observado signos neurológicos, principalmente meningitis no supurativas en cerebro, tálamo, tronco cerebral y lóbulos olfatorios, en animales infectados en condiciones experimentales, acompañados de sintomatología nerviosa como escalofríos, inestabilidad, arqueo de la espalda y espasmos rítmicos (Lenghaus y cols., 1976; Chu y cols., 1979).

No existe evidencia de que las cerdas gestantes sean un factor de perpetuación y difusión de la infección aunque se haya aislado el virus en fetos abortados.

Experimentalmente, no es típico el aborto y es improbable que el virus infecte o atraviese la placenta (Watson., 1981).

Clínicamente, no es considerada una enfermedad muy grave, cursando con un moderado decaimiento general, una disminución del peso que se recupera en pocos días y la aparición de lesiones vesiculares en la mucosa bucal, nasal, hocico, piel de los espacios interdigitales de la almohadilla plantar, lo que genera cojeras, salivación y un debilitamiento general moderado en los cerdos infectados.

Normalmente, los cerdos infectados se recuperarán después de la fase aguda de la enfermedad, a las dos o tres semanas de adquirir la infección y con frecuencia, la única evidencia que se puede apreciar cuando se examinan el cerdo, es una línea horizontal oscura en las pezuñas donde su crecimiento fue interrumpido temporalmente (Lin y Kitching., 2000).

La enfermedad vesicular porcina puede ser subclínica, leve o severa dependiendo de la virulencia de la cepa y de las condiciones de cría, sin embargo, en los últimos años la infección subclínica ha sido la manifestación más observada. Las lesiones más graves se ven cuando los cerdos están alojados en hormigón, particularmente húmedo. Además, cerdos jóvenes tienden a mostrar signos clínicos más severos que los cerdos mayores (Dekker., 2000; OIE., 2008, Capítulo 2.8.9).

Las únicas lesiones *post-mortem* son las vesículas que pueden observarse en los cerdos vivos. Microscópicamente, las lesiones coinciden con las de la fiebre aftosa y las del exantema vesicular, y todas ellas se diferencian de las de la estomatitis vesicular. Las lesiones comienzan en el estrato espinoso originando una degeneración hidrópica y un edema intercelular. Las células epiteliales adoptan forma esférica y se van rompiendo, formando microvesículas en el interior donde se va acumulando líquido y en las que flotan células epiteliales desprendidas, bien aisladas ó en racimos. Las microvesículas confluyen formando vesículas mayores, que al romperse, pueden sufrir una infección bacteriana, y en consecuencia la infiltración de neutrófilos y macrófagos.

8. Respuesta inmune

La respuesta inmune a la infección por VEVV comienza rápidamente, desarrollando una respuesta inmunitaria primaria inicial con anticuerpos de isotipo IgM que están presentes en el suero del 50 % de los cerdos a los 4 dpi y que desaparecen tras unos 30-50 días. Anticuerpos de isotipo IgG se detectan en el 50% de los cerdos aproximadamente a los 12 dpi y pueden durar varios años (Brocchi y cols., 1995; Dekker y cols., 2002;

2000/428/CE). Del mismo modo, durante la infección por el virus se activa la inmunidad de las mucosas detectándose el isotipo IgA (De Clercq., 1998; Brocchi y cols., 1995).

La presencia de IgM, sola o junto con IgG, es una evidencia de infección reciente mientras que la detección de IgG sola sugiere una infección tardía (OIE., 2008, Capítulo 2.8.9).

Inoculaciones experimentales con el aislado POR04 mostraron resultados positivos en ELISA y VN a 5 dpi en el 100% de los casos (Fernández-Pacheco y cols., 2012).

Las crías nacidas de cerdas infectadas con el virus reciben anticuerpos maternos a través del calostro con una vida media de 30-50 días (Bellini y cols., 2010) pudiendo perdurar hasta casi los 6 meses de edad (Zimmerman y cols., 2012).

La existencia de un solo serotipo podría implicar que una infección previa o la vacunación con cualquier cepa del VEVP, confieran protección contra otra variante circulante.

9. Diagnóstico diferencial

La enfermedad vesicular porcina (EVP) cursa con un cuadro clínico que la hace indistinguible de otras enfermedades vesiculares, como: fiebre aftosa (FA), estomatitis vesicular (EV), exantema vesicular del cerdo (ExVC) y enfermedad vesicular idiopática (EVI) (Pasma y cols., 2008; OIE., 2008, Capítulo 2.8.9). Todas estas enfermedades se caracterizan por producir un cuadro clínico característico, muy parecido al virus de la EVP, resultando imposible diferenciarlas en campo. El diagnóstico de una enfermedad vesicular debe llevarse a cabo en todo caso mediante pruebas laboratoriales, y cualquier brote de enfermedad vesicular debe ser considerado en principio como FA, considerada una enfermedad altamente contagiosa con repercusiones económicas considerables, hasta que se demuestre la existencia de cualquier otro agente etiológico.

10. Pruebas laboratoriales: diagnóstico molecular y serológico

A nivel europeo, se han establecido procedimientos de diagnóstico, métodos de muestreo y criterios para la evaluación de los resultados de las pruebas de laboratorio con fines de confirmación y diagnóstico diferencial de la enfermedad vesicular porcina (2000/428/CE).

Las muestras de elección para el aislamiento del virus son el líquido vesicular y el epitelio vesicular embebido en *buffer* (50% de tampón fosfato 0,04 M y 50% de glicerol), sangre con anticoagulante (EDTA) recolectada en el periodo febril, muestras fecales,

hisopos faríngeos y nasales; y tejidos. En el caso de las pruebas serológicas, la muestra de elección sería suero de animales enfermos y de los animales que comparten los mismos corrales con la finalidad de detectar infecciones subclínicas.

El diagnóstico de laboratorio se puede establecer mediante el aislamiento del virus, la detección del mismo (sus antígenos virales), por la detección del ácido nucleico viral y por la detección de anticuerpos específicos frente al virus de la EVP.

Existen distintas líneas celulares porcinas de elección para el aislamiento del virus, entre ellas IBRS-2, PK-15, SK6 (líneas celulares renales porcinas), ST (línea celular testicular porcina), y células renales porcinas primarias y secundarias, donde el virus produce un efecto citopático (ECP) en las células infectadas entre 24 y 72 horas post-inoculación. El sobrenadante del cultivo celular con ECP se recoge y se realiza la identificación del virus mediante un ELISA tipo sándwich indirecto (ELISA-SI) de detección de antígeno (Ferris y Dawson., 1988) u otra prueba adecuada, como la RT-PCR.

Para la detección del genoma del virus se han desarrollado distintas técnicas basadas en la RT-PCR como: RT-PCR anidadas, inmuno-RT-PCR, ELISA-PCR, RT-LAMP, RT-PCR capilar, RT-PCR en tiempo real, RT-PCR cuantitativa, etc., de gran utilidad en su diagnóstico (Marquardt y Ohlinger., 1995; Niedbalski y cols., 1995; Keszy y cols., 1997; Lin y cols., 1997; Núñez y cols., 1998; Callens y De Clercq., 1999; Fallacara y cols., 2000; Lomakina y cols., 2004; Reid y cols., 2004ab; Blomström y cols., 2008; Niedbalski., 2009; McMenemy y cols., 2011). También se dispone de la técnica de RT-PCR múltiple y la detección por microarrays, que permite la detección específica mediante un único ensayo de las tres principales enfermedades vesiculares (FA, EVP y EV) en una sola reacción (Rasmussen y cols., 2006; Banér y cols., 2007; Fernández y cols., 2008; Jack y cols., 2009; Lung y cols., 2011).

La tipificación genética mediante la obtención y comparación de secuencias nucleotídicas de regiones del genoma vírico como el gen 1D, que codifica para la proteína estructural VP1, permite realizar estudios de epidemiología molecular con el fin de establecer relaciones filogenéticas entre los aislados de distintas regiones o épocas, permitiendo determinar el posible origen epizootológico (Brocchi y cols., 1997). Este tipo de estudio también se puede realizar mediante paneles de AcM que se utilizan como detector en el ELISA-SI, permitiendo caracterizar cepas de virus y crear los correspondientes dendrogramas.

En numerosas ocasiones se detecta la infección en una explotación debido a la presencia de Ac específicos frente al VEV, ya que con frecuencia cursa sin un cuadro clínico evidente, por lo que los análisis serológicos resultan de gran utilidad en los programas de vigilancia, control y erradicación de la enfermedad (RD 599/2011).

Numerosos métodos de ELISA han sido desarrollados para el diagnóstico serológico del virus de la EVP (Amstrong y Barnett., 1989; Lugovskaia y cols., 2010) pero el más empleado actualmente y recomendado por la OIE es el ELISA de competición que utiliza Ac monoclonales, ó MAC-ELISA (Brocchi y cols., 1995; Alonso y cols., 1995; Chenard y cols., 1998). En España se realiza en la actualidad una variante del mismo, el ELISA *sándwich* de bloqueo en fase líquida (ELISA-FL) (Zamora-Escribano., 1997). La técnica de confirmación serológica es la virus-neutralización (VN) (Golding y cols., 1976).

Además se ha desarrollado un ELISA específico de isotipos IgM e IgG que nos permite conocer si la infección es más o menos reciente, según la presencia o ausencia de anticuerpos IgM e IgG específicos frente al VEV (Dekker y cols., 2002).

11. Prevención y profilaxis

Aunque la EVP no suele causar mortalidad en adultos, la imposibilidad de diferenciarla clínicamente con la FA motiva que esté incluida en la lista de enfermedades de declaración obligatoria (EDO) de la Oficina Mundial de la Sanidad Animal (OIE) (RD 617/2007). Como consecuencia, las regiones afectadas sufren importantes pérdidas económicas ya que su declaración implica el cese de actividades comerciales. Entre las medidas que se deben establecer para prevenir la entrada e impedir la diseminación de EVP en los países libres destacan:

- Conocer la situación sanitaria a nivel mundial respecto a esta enfermedad, y sobre todo en los países con los que se mantienen relaciones comerciales y terceros países.
- Evaluar el riesgo de entrada y mantener programas de vigilancia en función del riesgo, unido a la implantación de normas de importación de cerdos y sus productos acordes con la situación epidemiológica del país exportador.
- Realizar un estricto control de los factores de riesgo, principalmente el movimiento de animales y de alimentos.

12. Control y erradicación

A nivel nacional se han dispuesto medidas generales y específicas de lucha contra la EVP (RD 650/1994 y su modificación en el RD 1314/2007). Entre las medidas sanitarias a adoptar destacan la eliminación de focos y el sacrificio de todos los animales en las explotaciones afectadas, un estricto control del movimiento de los animales y el establecimiento de zonas de protección y vigilancia. Con la finalidad de impedir o minimizar el riesgo de difusión de la enfermedad se han instaurado normas sanitarias tales como la implantación de medidas de limpieza y desinfección en las explotaciones afectadas, descontaminación de vehículos, fómites, destrucción de alimentos y mejora de las medidas de bioseguridad, unido a un programa de control serológico y encuestas epidemiológicas.

No existe tratamiento específico y hasta el momento no se ha desarrollado ninguna vacuna comercial frente al VEVP. Se han desarrollado vacunas experimentales para el control de la enfermedad en su forma monovalente (Gourreau y cols., 1975), en combinación con FA (Mitev y cols., 1978), y de subunidades (Jiménez-Clavero y cols., 1998). Las pruebas realizadas con virus vivo atenuado no han demostrado una protección suficiente frente al virus de campo y las cepas atenuadas podrían revertir a patógenas (Mowat y cols., 1974; McKercher y Graves., 1976). Por otro lado, las pruebas realizadas con vacunas inactivadas demostraron que, si bien no permitían la aparición de las lesiones y disminuían la diseminación del virus, no detienen completamente la infección (Manual práctico de operaciones en la lucha contra la EVP, 2008). En un futuro, el desarrollo de vacunas marcadas y vacunas ADN más seguras y efectivas podría jugar un importante papel en los programas de control, como herramienta para lograr de forma eficaz una disminución de la prevalencia de la EVP (Sun y cols., 2007).

SITUACIÓN EN ESPAÑA RESPECTO AL VIRUS DE LA EVP

Nuestro país realiza una intensa vigilancia epidemiológica sobre esta enfermedad, analizando alrededor de 1.700.000 muestras serológicas al año (2005) debido al riesgo que para España significa la introducción de este virus en la cabaña porcina (RD 599/2011). En el diagnóstico serológico de la enfermedad vesicular del cerdo se dan con cierta frecuencia **reacciones positivas falsas o singleton reactors (SR)**, siendo la etiología de estas reacciones incierta. Actualmente la combinación del ELISA con anticuerpos monoclonales, la VN y el ELISA específico de isotipo reducen el número de SR.

En general se admite que los mejores ensayos serológicos para la detección del VEVP tienen una especificidad de 99.5% (un falso positivo en 200 muestras analizadas) para las pruebas de rastreo serológico por **ELISA**, y del 99.95% (un falso positivo en 2000 muestras analizadas) para las pruebas de confirmación por **seroneutralización**. El total de muestras analizadas por VN durante el año 2005 en el Laboratorio Central de Veterinaria de Algete (LCV) fue de 8797, siendo positivas por VN (título superior a 1:40) 4348, que en porcentaje sería un 0.25% del total, 5 veces superior al resultado esperado (0.05%). El nº de VN-positivos ha permanecido constante en España en los últimos años: 2002: 7054; 2004: 10603; 2005: 8797 y 2006: 8535.

El manual europeo para el diagnóstico de la EVP (2000/428/CE) establece que una vez confirmado un caso seropositivo por técnicas de seroneutralización, debe realizarse un análisis epidemiológico que consiste en recoger muestras fecales porcinas en las explotaciones afectadas para examinar la presencia de VEVP en las mismas, por técnicas de aislamiento en cultivo celular y RT-PCR confirmatoria (confirmación virológica). El manual europeo igualmente indica que es necesario dar al menos dos pases ciegos en cultivo celular y confirmar por RT-PCR antes de concluir la ausencia de este virus en las heces. Todo este proceso demora los resultados entre dos y tres semanas desde el positivo serológico inicial hasta que se descarta la presencia de VEVP en la explotación, lo que conlleva en muchos casos severos perjuicios económicos a los ganaderos cuyas explotaciones se ven inmovilizadas durante ese periodo (Figura 5).

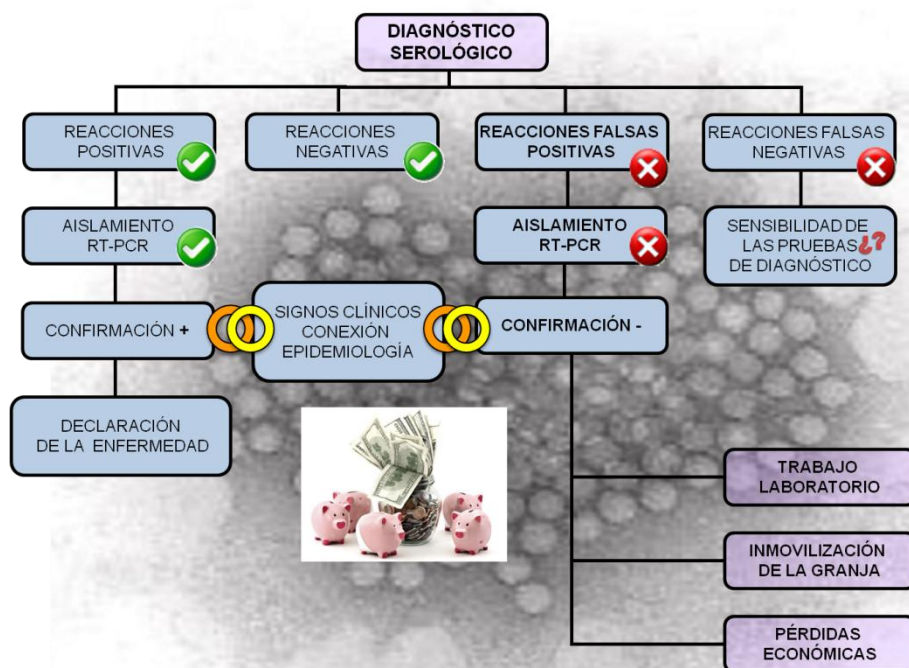


Figura 5. Diagrama representativo de los posibles resultados en el diagnóstico serológico (VN).

Estas pruebas serológicas están sujetas a unas normas de calidad y controladas por el **Laboratorio de Referencia Europeo para VEVP (IAHPL, Pirbright, Reino Unido)**, que anualmente analiza la homogeneidad de los resultados obtenidos por los distintos laboratorios nacionales.

1. Reacciones falsas positivas o “singleton reactors”

Se define como “*singleton reactors*” (SR) sueros que originan reacciones falso-positivas en las pruebas serológicas y que cumplen que:

- El aislamiento en heces es negativo.
- Los títulos de VN son generalmente bajos.
- No existe evidencia de la infección con VEVP en los animales de los que proceden ni en sus contactos.
- No se produce seroconversión en los contactos.
- Sólo una pequeña proporción de los sueros “SR” permaneces positivos en un segundo muestreo.
- En su inmensa mayoría resultan positivos con títulos bajos mediante el ELISA de IgM, y negativos cuando se analizan con el ELISA de IgG (DeClerq, 1998).

Este último patrón sin embargo se obtiene en los sueros de animales recientemente infectados con el VEVP, por lo que resulta conveniente volver a tomar una nueva muestra de estos animales para comprobar que días más tarde continúan sin aparecer anticuerpos de isotipo IgG frente al VEVP y que no se detectan nuevos animales positivos en la explotación.

Estos sueros ensayados en técnicas de electrotransferencia (o *Western blotting*) han mostrado diferentes patrones que van desde una reactividad negativa a una reactividad contra todas las proteínas del virus de la EVP, mientras que sueros positivos específicos al virus reaccionan casi exclusivamente con la proteína VP1 (Nijhar., 1997; Lin y cols., 2000).

Hasta el momento, el origen de estas reacciones falsas positivas permanece sin resolver. Algunos autores han investigado si estos SR se producen como resultado de una reacción cruzada con anticuerpos generados frente a otros agentes infecciosos debido a la existencia de epítomos compartidos. *Moonen y cols* demostraron que no se trata de reacciones cruzadas con otros enterovirus del grupo Coxsackie B5, al que pertenece el VEVP, y que, aunque humanos, pueden infectar ocasionalmente al cerdo (Garland y Mann.,

1974; Marquardt y Ohlinger., 1995; Moonen y cols., 2000; Borrego y cols., 2002). Así la circulación de coxsackie B5 en cerdos puede ser excluida como causa de dicho fenómeno.

Por otra parte, otros estudios demuestran que anticuerpos frente a *Mycoplasma sp* pueden reaccionar de forma cruzada con el VEVP, lo que sugiere que poseen epítomos estructuralmente muy similares (Jiménez-Clavero y cols., 2000b). Sin embargo, la alta prevalencia de anticuerpos anti-*Mycoplasma* en cerdo cuestiona que la infección con estos agentes sea la causa principal de la aparición de SR.

Otros autores creen que es poco probable que los enterovirus porcinos (PEV) sean los responsables de estas reacciones, ya que estos PEV no tienen reacción con anticuerpos monoclonales frente a VEVP en la técnica del ELISA (Marquardt y Ohlinger., 1995).

La reacción cruzada observada en los sueros SR parece residir fundamentalmente en anticuerpos del isotipo IgM, como se demostró en FA (Andersen., 1977), aunque el origen de estos anticuerpos aún no ha sido identificado.

2. Etiología de las reacciones cruzadas

El número de falsos seropositivos a VEVP observados en nuestro país sobrepasa la cifra de SR esperados (2000/428/CE), lo cual indica que, a los SR, presentes en baja frecuencia de forma aleatoria en cualquier población de cerdos, ha de añadirse algún factor más que dé cuenta de este número superior de falsos positivos. Existen dos posibles explicaciones a este hecho:

1) Que su causa en realidad sea una infección asintomática por VEVP, es decir, que no sean falsos, sino *verdaderos positivos*.

2) Que su causa sea la presencia de anticuerpos frente a otro agente infeccioso distinto del VEVP que *reaccione cruzadamente* con éste en las pruebas serológicas para el diagnóstico de este virus. La frecuencia de falsos positivos se incrementaría con la prevalencia de dicho agente infeccioso en la población estudiada.

A favor de la primera hipótesis se debe tener en cuenta que las infecciones por VEVP son frecuentemente asintomáticas, y que el virus es difícil de detectar en heces (muestra que, en ausencia de lesiones, es la designada como óptima para el aislamiento) debido al corto periodo de eliminación en los animales infectados, y a que a menudo están contaminadas por otros virus que podrían enmascarar al VEVP.

Por el contrario, tenemos que considerar que a pesar de la intensa vigilancia así como la mejora de las técnicas utilizadas, incluyendo la RT-PCR en tiempo real con sondas *TaqMan*, que incrementan la eficacia y sensibilidad de la técnica, e introduciendo procedimientos mejorados de extracción de ácidos nucleicos a partir de heces y purines, la presencia del VEVP en muestras fecales de explotaciones serológicamente positivas en nuestro país sigue siendo negativa. Tampoco se han descrito signos clínicos y epidemiológicamente no ha habido vínculos con otros brotes.

Asimismo, a favor de la segunda hipótesis se debe tener en cuenta la frecuente presencia en estas muestras fecales de virus distintos del VEVP. Los resultados de RT-PCR indican que son diferentes del VEVP y su presencia en heces que, al igual que el VEVP, se trata de virus entéricos, que utilizan la vía fecal-oral para su transmisión. Estos virus entéricos porcinos no vesiculares se pueden propagar en las mismas líneas celulares porcinas utilizadas en el aislamiento del VEVP. De hecho, podrían enmascarar la presencia de VEVP en las muestras fecales analizadas por aislamiento vírico.

VIRUS ENTÉRICOS PORCINOS EN ESPAÑA: NECESIDAD DE UN ESTUDIO DESCRIPTIVO

La vigilancia seroepidemiológica de la EVP en España nos indica que durante el proceso de confirmación virológica se aíslan virus entéricos distintos al VEVP, los cuáles serán denominados en esta tesis como *virus entéricos porcinos no vesiculares* (VEP-NV).

Estos VEP-NV son capaces de crecer en las mismas líneas celulares que el virus de la EVP, y en algunos casos, producir un ECP indistinguible del mismo.

Por lo tanto, se pone de manifiesto la necesidad de analizar la naturaleza de estos virus, su prevalencia en las explotaciones porcinas de nuestro país, desarrollar herramientas diagnósticas que permitan distinguirlos del VEVP, y en su caso, contribuyan a mejorar la eficacia del aislamiento, y finalmente, investigar la posibilidad de una relación antigénica de alguno de los VEP-NV con el VEVP. Además, conocer la distribución, epidemiología y patogenia de los VEP-NV hallados en España tendría un interés intrínseco, ya que podrían tener un papel en determinadas enfermedades del ganado porcino, e incluso en determinadas zoonosis.

Entre los virus entéricos porcinos que pueden detectarse en heces destacan los enterovirus-B, teschovirus, sapelovirus, rotavirus, adenovirus, astrovirus, kobuvirus, circovirus, calicivirus, coronavirus, virus de la hepatitis E, etc (Wyn-Jones y Sellwood., 2001; Reuter y cols., 2009; Boros y cols., 2011; Sozzi y cols., 2010) (*Tabla 3*).

La mayoría de ellos causan infecciones asintomáticas, pero otros son importantes patógenos para el ganado porcino y su presencia tiene graves consecuencias en el comercio internacional. Algunos, como el virus de la hepatitis E son zoonóticos (Clemente-Casares y cols., 2003; Pina y cols., 2000). Respecto a las infecciones asintomáticas, existen estudios previos que demuestran que en España circulan adenovirus (Maluquer de Motes y cols., 2004) y teschovirus (Jiménez-Clavero y cols., 2003), aparentemente no patogénicos, en las poblaciones porcinas, aunque no se dispone de datos sobre la prevalencia y distribución de estos virus en el ganado porcino de nuestro país. Estos virus, altamente persistentes en el medio ambiente, son además candidatos óptimos para ser utilizados como marcadores de contaminación fecal porcina en aguas (Jiménez-Clavero y cols., 2003; Hundesa y cols., 2006). Respecto a otros virus entéricos porcinos patogénicos, como rotavirus, calicivirus, parvovirus, astrovirus, coronavirus, entre otros, que producen principalmente diarreas y debilitamiento, existe una muy limitada información acerca de su epidemiología, salvo alguna excepción, en relación con su presencia en el ganado porcino de nuestro país (Villena y cols., 2003).

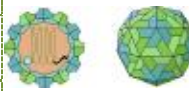
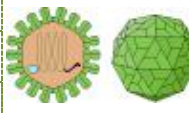
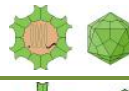

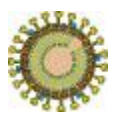
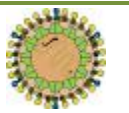


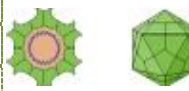



VIRUS	FAMILIA	GÉNERO	ESPECIE	SEROTIPOS/ GENOTIPOS	VIRIÓN
ARN mc (+)	Picornaviridae	G° Enterovirus	PEV-B ¹¹	PEV 9,10,14,15,16 y OEV-1	
			VEVP ¹²	EVP-1	
		G° Sapelovirus	PSV ¹³	PSV-1	
		G° Teschovirus	PTV ^{11,14,15}	PTV1 - PTV13	
		G° Kobuvirus	Aichi virus C ¹⁶	PKV-1	
		G° Pasivirus	SPaV ¹⁰	SPaV-1	
	G° Aphthovirus	VFA ⁸	O, A, C, Asia 1, SAT1, 2 y 3		
	Caliciviridae	G° Vesivirus	ExVC ²⁰	ExVC-1	
		G° Norovirus	NoV ¹⁷	Genogrupo II(11,18, 19 y Ch6)	
		G° Sapovirus	SV ¹⁸	Genogrupo III	
	Hepeviridae	G° Hepevirus	Virus de la hepatitis E ¹⁹	HEV-1	
	Astroviridae	G° Mamastrovirus	PAstV ²³	Linaje 1-5	
	Coronaviridae	G° Alphacoronavirus	PEDV ²⁴	Genogrupo I (1-3),II y III (Gen M y S)	
			TGEV ²⁵	TGEV-1	
G° Torovirus		PoTV ⁹	6 variantes		
Arteriviridae	G° Arterivirus	PRRSV ⁶	Variantes antigénicas europeas y americanas		
Flaviviridae	G° Pestivirus	VPPC ²¹	Genotipo 1-3 (Subgenotipos: 1.1-1.4; 2.1-2.3; 3.1-3.4)		
ARN bc	Reoviridae	G° Rotavirus	Rotavirus Porcino ²²	51 genotipos	
ADN mc	Circoviridae	G° Circovirus	PCV ³	Tipos PCV I y II	
	Parvoviridae	G° Parvovirus	PPV ²	PPV1-4	
	Anelloviridae	G° Etorquevirus	TTV ¹	TTV1 y 2	
ADN bc	Adenoviridae	G° Mastadenoviridae	PADV ⁷	PADV 1-6	
	Herpesviridae	G° Varicellovirus	HVP-1 ⁵	SuHV-1	
	Asfarviridae	G° Asfivirus	VPPA ⁴	22 genotipos (VP72)	

Tabla 3. Relación de las familias y géneros virales que pueden estar presentes en las heces de los cerdos.¹Cortey y cols., 2011; ²Cságola y cols., 2012; ³Allan y col., 2000; ⁴Boshoff y cols., 2007; ⁵Mettenleiter., 2000; ⁶Stadejek y cols., 2002; ⁷Nagy y cols., 2002; ⁸Bachrach., 1968; ⁹Pignatelli y cols., 2009; ¹⁰Sauvage y cols., 2011; ¹¹Boros y cols., 2012a; ¹²Zhang y cols. 1999; ¹³Kaku y cols., 2001; ¹⁴Zöll y cols., 2001; ¹⁵Cano-Gómez y cols., 2011b; ¹⁶Reuter y cols., 2009; ¹⁷Shen y cols., 2012; ¹⁸Jeong y cols., 2007; ¹⁹Di Bartolo y cols., 2012; ²⁰Neill y cols., 1995; ²¹Postel y cols.,2012; ²²Matthijnsens y cols., 2011; ²³Laurin y cols.,2011; ²⁴Song y Park .,2012; ²⁵O.I.E 2008, capítulo 2.8.11.

1. Familia *Picornaviridae*

La familia *Picornaviridae* engloba al menos 29 especies en 12 géneros que son conocidos por causar gran variedad de enfermedades en humanos y en animales, como son la hepatitis A, poliomielitis, resfriado común, enteritis, miocarditis, fiebre aftosa, etc (Knowles y cols., 2012; Minor y Muir., 2004) (Figura 6).

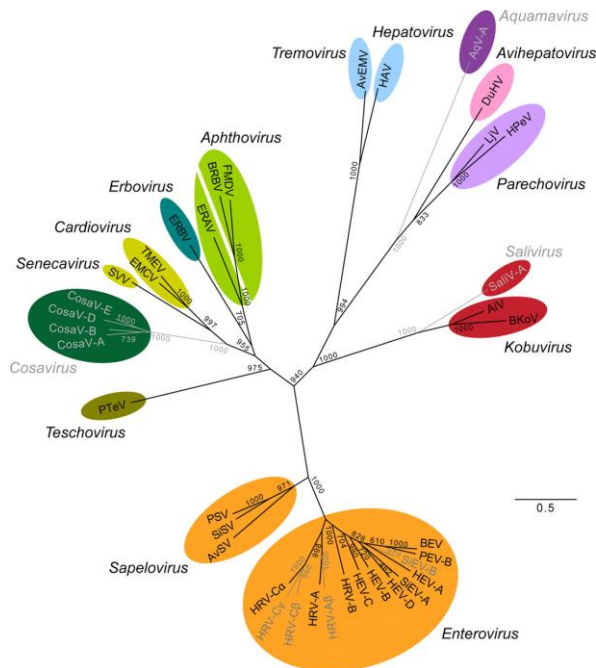


Figura 6. Representación filogenética de los géneros que constituyen la familia *Picornaviridae*. (<http://jvi.asm.org/content/86/7/3905/F2.expansion.html>)

Los picornavirus entéricos porcinos no vesiculares son patógenos comunes de la cabaña porcina, en la cual causan en la gran mayoría de los casos infecciones asintomáticas. Sin embargo, en ciertas ocasiones se ha asociado su presencia a lesiones dérmicas, problemas reproductivos, neumonía, diarrea, alteraciones en el SNC, etc (Knowles., 2006). Estos virus fueron previamente clasificados dentro del género *Enterovirus* y reclasificados en base a 1) su ECP, 2) sus propiedades de replicación en las células porcinas y 3) ensayos serológicos y moleculares; en 3 grupos o géneros (Knowles y cols., 1979; Kaku y cols., 2001; Zöll y cols., 2000):

- **Grupo I: Teschovirus** → Serotipos PTV1-PTV13 (anteriormente denominados PEV 1-7, 11-13) (Zöll y cols., 2001; Cano-Gómez y cols., 2011b; Boros y cols., 2012b).
- **Grupo II: Sapelovirus** → PSV-1(anteriormente denominado PEV-8) y sus variantes antigénicas 8a, 8b y 8c (Krumbholz y cols., 2002; Tseng y Tsai., 2007).
- **Grupo III: Enterovirus-B** → PEV9-10, PEV14-16 y OEV1 (anteriormente denominados PEV-B) (krumbholz y cols., 2002; Boros y cols., 2011, 2012ac).

Su estructura, organización genómica y proteica es similar a la del VEPV. Estos grupos engloban virus pequeños no envueltos, con un diámetro aproximado de 28-30nm, y una cápsida con simetría icosaédrica (Figura 7).

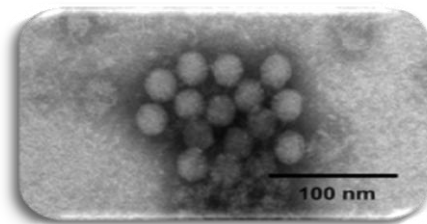


Figura 7. Microscopía electrónica de la cepa PTV-1/Haiti/2009 (PTV-1) (Deng y cols., 2012).

Poseen una única molécula de ARN monocatenaria de un tamaño de aproximadamente 7500 nucleótidos, de polaridad positiva, que actúa en la célula infectada como ARN mensajero. Su único sitio de lectura abierta está flanqueado por regiones no codificantes de ARN muy conservadas (3' y 5' RNC), importantes en el comienzo de la transcripción del ARN y su traducción. Al extremo 5' no codificante se le une una proteína viral (VPg). Este extremo contiene una región altamente estructurada, conocida como IRES (sitio interno de entrada del ribosoma). Su genoma, al igual que el VEVP, codifica una poliproteína con 3 regiones: la P1 que codifica 4 proteínas estructurales (VP1-VP4) y la P2 y P3 que codifica 7 proteínas no estructurales implicadas en la replicación (polimerasa viral). VP1, VP2 y VP3 están localizadas en la superficie de la cápsida viral y la proteína VP4 está situada en el interior del virión (véase apartado "*Estructura y organización genómica del VEVP*"). A diferencia del VEVP, de PSV y PEV-B, los PTV poseen una proteína denominada proteína L, con función desconocida, presente también en cardiovirus y aftovirus.

1.1 Género *Teschovirus*

Los únicos hospedadores naturales conocidos de los teschovirus son el cerdo doméstico y el jabalí y son altamente contagiosos (Lepine y cols., 1950; Boros y cols., 2012a). La mayoría de las cepas son apatógenas y se encuentran habitualmente en cerdos sanos (Morimoto y cols., 1962,1968; Buitrago y cols., 2010; Sozzi y cols., 2010; Prodelalová., 2011). Cepas históricas de serotipo 1, como son la cepa virulenta *Teschen o Zabreh* y su homóloga menos virulenta *Talfan*, han causado a lo largo de la historia numerosos brotes de la conocida como "*Encefalomiелitis por teschovirus*" (enfermedad de Teschen-Talfan), antes denominada "*Encefalomiелitis por enterovirus*".

Se caracteriza por un desorden grave en el SNC que cursa con la aparición de fiebre, hipersensibilidad, tremor, espasmos clónicos, ataxia, parálisis flácida parcial, que evoluciona a parálisis total, opistotonos, nistagmo y convulsiones (*Figura 8*). La muerte se produce a causa de la parálisis de los músculos respiratorios a los 3-4 días del comienzo de los síntomas.

Su primera aparición fue en 1929 en el distrito de Teschen (actual República Checa), extendiéndose por Europa y otros continentes entre los años 1940 y 1950, causando grandes pérdidas en la industria porcina (Trefny., 1930; Klobouk., 1931; Klobouk., 1936; Harding y cols., 1957; Doherty y cols., 1999).



Figura 8. Brote de encefalomyelitis por teschovirus en Haití (2011). Los animales presentaron alteraciones en el aparato locomotor, como parálisis del tercio posterior y ataxia (Deng y cols., 2012).

Formas más leves de encefalomyelitis en animales jóvenes causadas por el serotipo 1 y otros serotipos han sido declaradas a lo largo de los últimos años en Bielorrusia, Canadá, China, EE.UU, Haití, Japón, Letonia, Madagascar, Moldavia, Rumania, Rusia, Taiwán, Uganda y Ucrania (Pogranichniy y cols., 2003; Yamada y cols., 2004; Kouba., 2009; Bangari y cols., 2010; Salles y cols., 2011; Wang y cols., 2010; Zhang y cols., 2010; Chiu y cols., 2012; Deng y cols., 2012; OIE., 2008, capítulo 2.8.10). Los teschovirus son además responsables de fallos reproductivos como nacidos muertos, momificados e infertilidad (síndrome de SMEDI) (Dunne y cols.; 1965), problemas respiratorios, como rinitis y neumonía (Meyer y cols., 1966; Liebke y Schlenstedt., 1971), entéricos, como diarrea (Izawa y cols., 1962; Edington y cols., 1972), cardíacos, como miocarditis y pericarditis (Long y cols., 1966) y dérmicos (Knowles., 1988).

La encefalomyelitis por teschovirus fue categorizada por su importancia sanitaria y socioeconómica en lista B de la *Oficina Internacional de Epizootias* (OIE) hasta el año 2004, cuando fue excluida ya que había dejado de cumplir los criterios establecidos por dicho organismo (Comisión estándar de salud de animales terrestres, apéndice XXVIII (Enero 2005), http://www.oie.int/tahsc/eng/en_reports.htm).

El virus se elimina en las heces, orina y secreciones orales en grandes cantidades. Su transmisión es fecal-oral, directa o indirectamente desde cerdos infectados o agua y alimentos contaminados. Los fómites (botas, ropa o vehículos) permiten transportar el virus de unas granjas a otras fácilmente. Una de las características principales es que es un virus muy persistente, llegando a sobrevivir más de 5 meses en el ambiente (Mahnel y cols., 1977). Es resistente al calor, a pH entre 2 y 9, cloroformo, solventes lipídicos y a los desinfectantes comunes entre otros. Sin embargo se inactiva con radiación ionizante, fenol, hipoclorito sódico, etanol al 70% y con desinfectantes ácidos con iodóforos (OIE., 2008, capítulo 2.8.10).

El periodo de incubación es variable, entre 5-40 días aunque dependerá de la virulencia de la cepa (OIE., 2008, capítulo 2.8.10; CFSPH., 2009).

La mortalidad y la morbilidad son altas cuando los animales están afectados por una cepa altamente patógena, llegando incluso hasta el 90% en los primeros días, sin embargo, la infección por cepas menos virulentas causan una variable mortalidad y morbilidad.

Normalmente, la infección viral se limita al sistema digestivo y al tejido linfoide asociado (Placas de Peyer) incluyendo la tonsila, donde inicialmente replica (Long., 1985). Este es el caso de los lechones procedentes de cerdas inmunes, los cuales están protegidos con anticuerpos maternos, que serán reemplazados por los anticuerpos propios del lechón cuando desarrolle una inmunidad activa. Por otro lado, el virus puede difundirse a través del torrente sanguíneo (viremia) y alcanzar el SNC, multiplicándose en los nervios cuando no hay anticuerpos circulantes. Esta situación puede darse cuando la madre no ha tenido contacto con el virus, si el lechón no ha tomado el calostro o si el virus invade cerdas “naïve” por primera vez, por lo tanto, afectando a cerdos de todas las edades.

El diagnóstico diferencial incluye la enfermedad de Aujeszky (pseudorrabia), peste porcina clásica (forma aguda), peste porcina africana, encefalitis japonesa, encefalitis hemaglutinante, enfermedad de los edemas (enterotoxemia por *E.coli*), rabia, infección por sapelovirus, meningoencefalitis bacteriana (*S. Suis*), síndrome respiratorio y reproductor porcino (cepas altamente virulentas de PRRS), intoxicación por sal, plomo y pesticidas, toxinas y neuropatías nutricionales.

Los animales no presentan lesiones *post-mortem* destacables. Están presentes en algunos casos atrofia muscular y congestión de las meninges cerebroespinales y de la mucosa nasal.

Los análisis histopatológicos del SNC confirman una polioencefalomielitis multifocal no supurativa (Manuelidis y cols., 1954). Los cambios patológicos se observan en la materia gris del diencefalo, cerebelo, bulbo raquídeo y en los cuernos ventrales de la médula espinal. Las lesiones observadas se caracterizan por la presencia de manguitos perivasculares con infiltración de linfocitos y células plasmáticas, meningitis, gliosis, satelitosis, necrosis neuronal y neurofagia. Estas lesiones, aun no siendo patognomónicas, apoyan el diagnóstico de la enfermedad de Teschen-Talfan. El diagnóstico se puede confirmar mediante IHC, usando antisueros específicos o anticuerpos monoclonales, permitiendo relacionar los cambios patológicos con la localización del agente (Yamada y cols., 2004, 2007-2009; OIE; 2008, capítulo 2.8.10; Takahashi y cols; 2007; Bangari y cols., 2010; Salles y cols., 2011; Deng y cols., 2012) (Figura 9 y 10).

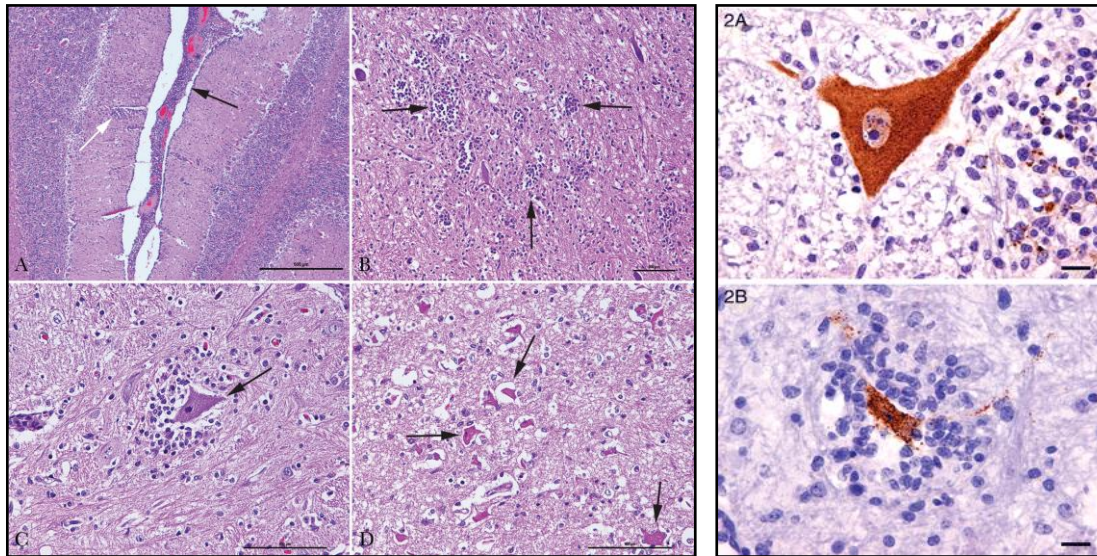


Figura 9. Análisis inmunohistopatológico del SNC de cerdos con infección por PTV. **A)** Cerebelo con infiltración de linfocitos y células plasmáticas en las meninges (flecha negra) y en la materia gris (flecha blanca)). Hematoxilina e eosina (HE). Barra = 600 μ m. **B)** Cerebro con nódulos gliales multifocales. HE. Barra = 100 μ m. **C)** Cerebro con neuronas rodeadas de células gliales (satelitosis). HE. Barra =100 μ m. **D)** Cerebro con necrosis neuronal y hipereosinofilia. HE. Barra = 100 μ m. (Deng y cols., 2012). **2A)** Citoplasma marcado de una neurona en la médula rostral con un punteado asociado a la glía adyacente. **2B)** Marcado punteado asociado a un nódulo glial (Salles y cols., 2011).

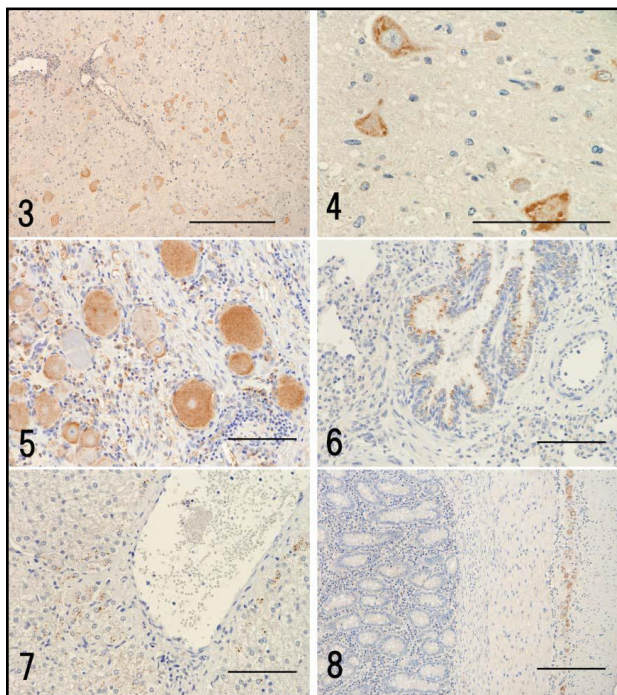


Figura 10. Inmunohistoquímica de un cerdo infectado con PTV (Yamada y cols., 2004).

3. Bulbo raquídeo. El antígeno es detectado en el citoplasma de la neurona. Barra=500 μ m.
4. Cuerno ventral de la médula espinal. El antígeno es detectado en el citoplasma de la neurona. Barra =200 μ m.
5. Ganglio espinal. El antígeno es detectado en el citoplasma de las células ganglionares. Barra =200 μ m.
6. Pulmón. El antígeno es detectado en las células epiteliales de los bronquiolos. Barra =200 μ m.
7. Hígado. El antígeno es detectado en el citoplasma de los hepatocitos. Barra=200 μ m.
8. Duodeno. El antígeno es detectado en el plexo nervioso mioentérico. Barra=400 μ m

La identificación del agente se puede establecer mediante:

- Aislamiento del virus en cultivo celular (PK-15 ó IBRS-2) (Madr., 1959; Mayr y Schwoebel., 1957).
- Detección de sus antígenos virales por inmunofluorescencia indirecta (Romanenko y cols., 1982; Auerbach y cols., 1994) o neutralización vírica con antisueros estándar. (Betts., 1960; Minor y cols., 1995).
- Detección del ácido nucleico viral mediante RT-PCR, RT-PCR anidada, RRT-PCR, RT-LAMP y RT-PCR múltiple (Zöll y cols., 2000; Palmquist y cols., 2002; Krumbholz y cols., 2003; Jiménez-Clavero y cols., 2003; Liu y cols., 2011; Cano-Gómez y cols., 2011a; Wang y cols., 2011; Zhang y cols., 2012).

Aún siendo las técnicas de RT-PCR las más utilizadas en el diagnóstico habitual, sin embargo ninguna de ellas había sido validada hasta ahora.

La caracterización molecular mediante la obtención y comparación de secuencias nucleotídicas de regiones que codifican para las proteína VP1, VP2 o la P1 completa del genoma vírico, permite la identificación de serotipos y realizar estudios de epidemiología molecular con el fin de establecer relaciones filogenéticas entre ellos (Zöll y cols., 2001; Kaku y cols., 2007; La Rosa y cols., 2006; Cano-Gómez y cols., 2011b).

Para realizar el diagnóstico serológico por seroneutralización es necesario tener las cepas estándar y sueros hiperinmunes monoespecíficos para todos los serotipos de PTV. Asimismo, un método alternativo para la detección y titulación de anticuerpos específicos frente a PTV es el ELISA (Hubschle y cols., 1983).

Las medidas sanitarias adoptadas para el control de esta enfermedad incluyen la cuarentena, el control de los movimientos, la eutanasia de los animales afectados y el seguimiento de los contactos así como la vacunación en anillo. Debido a la persistencia del virus en el medio ambiente, deben ser implantadas correctas medidas de limpieza y desinfección en las explotaciones afectadas antes de la reintroducción de los animales. Aunque la inmunoprofilaxis activa fue una medida importante para el control en el pasado (Klobouk., 1935; Traub., 1942), en la actualidad, comercialmente, no existen vacunas disponibles (Patente solicitada por *Boehringer Ingelheim Vetmedica*, inc; US20110150770A1 (Bautista y cols., 2011) ni tratamiento.

1.2 Género *Sapelovirus*

En la actualidad, el género *Sapelovirus* engloba 3 especies distinguibles por su especie hospedadora y su diversidad de secuencia: sapelovirus porcino (PSV), sapelovirus de simios (anteriormente conocido como SV2-like virus) y sapelovirus aviar (anteriormente conocido como picornavirus de pato TW90A) (Knowles y cols., 2012; Tseng y Tsai., 2007). Dos nuevas especies candidatas al G^o *Sapelovirus* han sido descubiertos en leones marinos californianos, tentativamente denominados Csl SapV-1 and -2 (Li y cols., 2011) y probablemente uno más en ratón (Phan y cols., 2011), ampliando el rango de hospedador de este género.

Históricamente, cepas del G^o *Sapelovirus* han sido causantes de alteraciones nerviosas tanto severas como leves, fallos reproductivos, neumonía y diarrea en el ganado porcino aunque no son frecuentes (knowles., 2006; Lan y cols., 2011) (Figura 11). Los cerdos afectados que se recuperan de la infección pueden todavía excretar el virus y suponer una fuente de infección. Además, estos virus son eliminados a través de las heces en cantidades considerables, y aislados en líneas celulares porcinas fácilmente (IBRS-2, PK-15 y MA-104) tanto en cerdos como en jabalíes sanos (Sozzi y cols., 2010, Buitrago y cols., 2010; Abe y cols., 2011; Prodelalová., 2012).

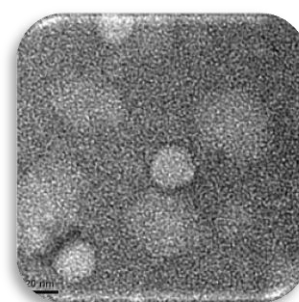


Figura 11. Microscopía electrónica de la cepa csh /China /2009 (PSV) (Lan y cols., 2011).

Únicamente existe un serotipo y el diagnóstico se realiza principalmente a través de técnicas moleculares de RT-PCR (Zöll y cols., 2000, Palmquist y cols., 2002; krumbholz y cols., 2003; La Rosa y cols., 2006; Abe y cols., 2011).

Las lesiones macroscópicas y las manifestaciones histopatológicas causadas por este agente son similares a las encontradas en infecciones por PTV u otras infecciones enterovirales (Lan y cols., 2011).

1.3 Género *Enterovirus B*

El género *Enterovirus B* porcino está constituido por 6 serotipos: enterovirus 9, 10, 14, 15, 16 (PEV-9, 10, 14, 15 y 16) y enterovirus ovino (OEV1) (Boros y cols., 2011; Boros y cols., 2012a; Boros y cols., 2012b; Moon y cols., 2012) (Tabla 4). Enterovirus porcinos B sólo han sido identificados en Italia, Gran Bretaña, Hungría, China, Japón, República Checa y Korea (Knowles y cols., 1979; Caracappa y cols., 1985; Honda y cols., 1990; Sozzi y cols., 2010; Boros y cols., 2011, 2012a; Zhang y cols., 2012, Moon y cols., 2012).

Nombre	Nombre propuesto *	Cepa prototipo	Hospedador
PEV-9	EV-G1	swine/UKG/410/73	Cerdo doméstico
PEV-10	EV-G2	swine/LP54/England/75	Cerdo doméstico
PEV-14	EV-G3	swine/K23/2008/HUN	Cerdo doméstico
PEV-15	EV-G4	wild boar/WBD/2011/HUN	Jabalíes
OEV-1	EV-G5	ovine/TB4-OEV/2009/HUN	Oveja
PEV-16	EV-G6	swine/2009/KOR	Cerdo doméstico

Tabla 4. Clasificación de las cepas prototipo del G^o *Enterovirus B*. * Actualmente su renombramiento está siendo evaluado por el comité ejecutivo de la ICTV (<http://ictvonline.org>).

Las infecciones por estos virus son comúnmente asintomáticas y las únicas lesiones asociadas con su infección son lesiones cutáneas (Knowles y cols., 1979,1988, 2006). Del mismo modo que PTV y PSV, los enterovirus-B son eliminados por heces y se puede llegar a su aislamiento en líneas celulares porcinas. Su detección en heces o en cultivo celular se realiza por técnicas de RT-PCR (Muscillo y cols., 1997; Zöll y cols., 2000; Krumbholz y cols., 2003; La Rosa y cols., 2006).

2. Familia Adenoviridae

La familia *Adenoviridae* ha sido recientemente dividida en 5 géneros, *Mastadenovirus*, *Atadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Siadenoviruses* y *Ichtadenovirus*, los cuáles integran adenovirus que infectan a humanos, rumiantes, aves, anfibios y peces (Harrach y Benko., 2007). El adenovirus porcino (PADV) fue descubierto y aislado por primera vez en 1964 en un cerdo con diarrea (Haig y cols., 1964).

Los PADV han sido clasificado dentro del G^o *Mastadenovirus*. Son virus no envueltos, con simetría icosaédrica (T: 25) y un genoma formado por una doble hebra de ADN de un tamaño aproximado de 34 Kb. Se han identificado al menos 7 serotipos (Clarke y cols., 1967; Derbyshire y cols., 1981; Nagy y cols., 2001; Kadoi, 1997a; Kadoi y cols., 1997b) y se ha demostrando que los serotipos PAD 1-3 tienen entre sí una relación filogenética más cercana, distanciándose de PAD 4-5 (Garwes y Xuan., 1989; Kleiboeker., 1994; Nagy cols., 2001). Dependiendo del serotipo, los PADV son capaces de propagarse en células porcinas de riñón, testículo, retina y tiroides entre otras (Dea y Elazhary., 1984a; Kasza., 1966; Mayr y cols., 1967).

Los adenovirus tienen una cápsida que consta de 240 cápsómeros con forma hexagonal (hexonas) y 12 con forma pentagonal (pentonas) (*Figura 12 A*). Las pentonas se localizan en los vértices y se componen de una base pentona y una fibra con un dominio globular que es un sitio de unión viral importante a una variedad de receptores celulares, tales como los receptores coxsackie-adenovirus (CAR) (Roelvink y cols., 1998), CD46 (Gaggar y cols., 2003) y ácido siálico (Burmeister y cols., 2004). El núcleo contiene 4 proteínas y su genoma viral contacta con 3 de ellas (polipéptido V, VII y μ). La cuarta proteína es la llamada proteína terminal y se une covalentemente (enlace fosfodiéster) al extremo 5' del ADN.

Su vía de transmisión es la fecal-oral, y debido a que la mayoría de las infecciones por adenovirus porcinos son asintomáticas, no se consideran patógenos de importancia económica en la industria porcina. Sin embargo, han sido asociados con encefalitis, neumonía y enteritis en cerdos (Shadduck y cols., 1967; Derbyshire., 1981). Tienen una amplia distribución mundial y una alta prevalencia, siendo posible su aislamiento a partir de animales aparentemente sanos en heces, aguas residuales, lodos y aguas tratadas, siendo considerados marcadores de contaminación fecal en el ambiente (Mahnel y Bibrack., 1966; Rasmussen., 1969; Maluquer de Motes y cols., 2004; Hundesa y cols., 2006, Wolf y cols., 2010; Viancelli y cols., 2012).

Los PADV son capaces de formar cuerpos de inclusión intranucleares en células epiteliales del intestino y en consecuencia producir la destrucción del epitelio provocando acortamiento de las vellosidades (Ducatelle y cols., 1982) (*Figura 12 B y C*). Los métodos para el diagnóstico de adenovirus incluyen la detección directa de los viriones por microscopía electrónica (Chandler., 1965), la virus-neutralización (Adair y McFerran., 1976), la inmunofluorescencia (Adair y cols., 1983; Dea y Azhary., 1984b) y la PCR (Puig y cols., 1994; Maluquer de Motes y cols., 2004; Wolf y cols., 2010; Hundesa y cols., 2009; Martínez-Martínez y cols., 2011).

En la actualidad, el interés de los PADV radica en su aplicación como vector viral en vacunas (Tuboly y cols., 1993; Reddy y cols., 1999) y en el potencial uso de adenovirus animales como vectores en inmunoterapia génica (Kremer y cols., 2000; Bachtarzi y cols., 2008; Thacker y cols., 2009) principalmente por ser muy inmunogénicos, por tener un amplio tropismo celular, por su facilidad de manipulación y por tener una baja toxicidad, entre otras propiedades.

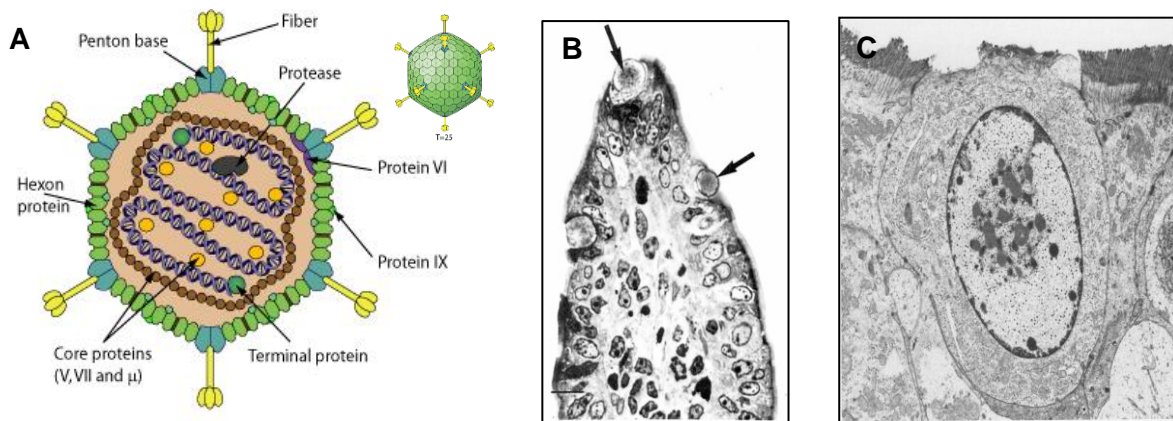


Figura 12. **A)** Cápsida icosaédrica externa del G^o Adenovirus (ViralZone: www.expasy.org/viralzone, Swiss Institute of Bioinformatics). **B)** Cuerpos de inclusión intranuclear en las vellosidades yeyunales (flechas) (Ducatelle y cols., 1982). **C)** Adenovirus infectando un enterocito en el íleon. Las partículas virales están presentes en el carioplasma del núcleo celular (punteado) (Sanford y Hoover., 1983).

APLICACIÓN DE NUEVAS TECNOLOGÍAS AL CONOCIMIENTO DE LOS VIRUS ENTÉRICOS PORCINOS

Los virus son las entidades biológicas más abundantes del planeta, con una estimación de $0,2 - 2,5 \times 10^{31}$ partículas víricas en la superficie terrestre y oceánica, respectivamente (Delwart., 2007). Su estudio se ha visto tradicionalmente dificultado por su enorme diversidad, su pequeño tamaño y su capacidad de evolucionar rápidamente. Sin embargo, la principal limitación en la investigación de las comunidades víricas deriva del hecho de que muchos virus no crecen o son difíciles de crecer en cultivos celulares, y en algún caso pese a ser cultivables, no producen ningún efecto citopático. Las técnicas de cultivo celular, microscopía electrónica y los modernos métodos de biología molecular (métodos basados en PCR, microarrays, etc.) han ayudado al conocimiento y la detección de virus a lo largo de los años. Pese a ello, es destacable la falta de un marcador filogenético común a todos los virus que pueda ser utilizado para examinar su diversidad e historia evolutiva, tales como los genes ARN ribosómico 16S y 18S que comúnmente se utilizan para procariotas y eucariotas.

En los últimos años, un nuevo enfoque está revolucionando la microbiología: la metagenómica o genómica de una comunidad ambiental (Handelsman y cols., 1998). La metagenómica evita la necesidad de aislamiento en cultivo de especies individuales, utilizando en su lugar técnicas analíticas y computacionales modernas para obtener un gran volumen de información genética de la comunidad completa de microorganismos.

Esta poderosa herramienta está ayudando a entender la diversidad microbiana mediante el conocimiento de la estructura de las comunidades y su dinámica, la identificación y distribución de los microorganismos, su cuantificación, sus relaciones filogenéticas y la caracterización de nuevas especies virales. Además, la mejora de los métodos de procesamiento y las técnicas de clonación, permite la evaluación de ambientes microbianos extremos e inhóspitos, como lagos antárticos o cuencas hipersalinas (López-Bueno y cols., 2009; Santos y cols., 2010).

Los estudios metagenómicos de comunidades víricas asociados a muestras animales pueden documentar la circulación de los virus conocidos y nuevos, facilitar la detección de virus emergentes y evaluar su patogenicidad y potencial zoonótico (Victoria y cols., 2008; Shan y cols., 2011). En la ciencia veterinaria, el uso de la metagenómica vírica ha aumentado sustancialmente durante la última década a través del avance de las nuevas herramientas moleculares y por medio de una mayor comprensión de la importancia de los virus de animales en el bienestar animal y humano (Blomström y cols., 2011).

Gracias a esta técnica, por ejemplo, se ha podido estudiar la implicación de un nuevo virus *boca-like* en el síndrome multisistémico de desmedro post-destete (PMWS) (Blomström y cols., 2009), la detección de un nuevo astrovirus como causante del síndrome de la sacudida en el visón (Blomström y cols., 2010), la correlación del virus de la parálisis aguda con el colapso de las colonias en las abejas (Cox-Foster y cols., 2007) y el descubrimiento de un nuevo orthobunyavirus, el virus Schmallerberg en bovino (Hoffmann y cols., 2011), entre otros.

OBJETIVOS

En el curso del programa de serovigilancia epidemiológica del virus de la enfermedad vesicular porcina (EVP) llevado a cabo en el territorio nacional, fueron investigadas una colección de muestras fecales de granjas, en las cuáles había una sospecha serológica de EVP durante los años 2004-2005, de acuerdo al manual para el diagnóstico de la EVP en la Unión Europea (*Decisión de la Comisión 2000/428/CE*). Durante ese periodo, **610** muestras fecales porcinas procedentes de animales sin sintomatología clínica de 10 comunidades autónomas, fueron analizadas. Siguiendo el método para aislamiento vírico detallado en el *Manual de la OIE sobre animales terrestres 2008*, se obtuvieron **216** cultivos celulares que presentaron ECP compatible con el virus de la EVP. Sin embargo la detección del genoma vírico del VEVP por RRT-PCR específica fue negativa, concluyendo que dichos aislados eran virus entéricos porcinos no vesiculares (VEP-NV) y que la sospecha serológica no era atribuible al VEVP.

La existencia de una gran variedad de virus que son eliminados por vía fecal, pone de manifiesto la necesidad de circunscribir el estudio a entidades virales que cumplen los siguientes criterios:

- Crecer en las mismas líneas celulares utilizadas habitualmente para el aislamiento del VEVP, por lo tanto virus entéricos porcinos capaces de replicar y producir ECP.
- Ser prevalentes en las heces porcinas de animales sanos.

Por lo tanto, teniendo en cuenta estas premisas, se pone de manifiesto la necesidad de analizar la naturaleza de estos virus, su prevalencia en las explotaciones porcinas de nuestro país, desarrollar herramientas diagnósticas que permitan distinguirlos del VEVP, y en su caso, ayuden a aislarlo, y finalmente, investigar la posibilidad de una relación antigénica de alguno de los VEP-NV con el VEVP que pudiera interferir en su diagnóstico serológico y molecular.

Asimismo, el conocimiento de la distribución, epidemiología y patogenia de estos virus entéricos porcinos no vesiculares citopáticos (VEP-NVC) tendría un interés intrínseco, ya que podrían tener un papel en determinadas enfermedades del ganado porcino en España.

Para ello se nos plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo 1. Determinación de la naturaleza de los VEP-NVC aislados:

- **Identificación de las especies víricas presentes en los aislados, mediante las herramientas moleculares disponibles.**
- **Validación del método de RT-PCR en tiempo real para la detección molecular de todos los serotipos conocidos de teschovirus.**
- **Caracterización genotípica de los teschovirus identificados, empleando nuevas técnicas moleculares desarrolladas específicamente para este fin. Análisis filogenéticos y evolutivos basados en la proteína estructural VP1. Estudio comparativo de los diferentes métodos disponibles para la caracterización molecular de los teschovirus.**
- **Estudio de virus entéricos en jabalíes salvajes en España.**

Objetivo 2. Caracterización de un nuevo genotipo y/o serotipo de G⁰Teschovirus aislado en España (PTV-12): tropismo, patogenicidad y protección cruzada con respecto a un serotipo heterólogo del mismo género (PTV-1).

Objetivo 3. Aplicación de nuevas tecnologías al conocimiento de los virus entéricos porcinos mediante secuenciación masiva de nueva generación (*Next Generation Sequencing*).

Objetivo 4. Rastreo epidemiológico del tipo de VEP-NV más abundante en España (Teschovirus). Determinación de la posible correlación con la serología positiva a VEVP.

Objetivo 5. Análisis inmunoquímico de la reacción cruzada: ensayos de ELISA y virus-neutralización con antisueros específicos, dirigidos a demostrar o descartar la hipótesis de la reacción cruzada entre el VEVP y los VEP-NV.

Objetivo 6. Neutralización de la interferencia de los VEP-NV en la técnica de aislamiento del VEVP en cultivo celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

1. Líneas celulares

Para la realización del aislamiento de los distintos virus, titulaciones y técnicas serológicas se emplearon las siguientes líneas celulares (*Tabla 5*):

LÍNEA CELULAR	ESPECIES	ÓRGANO	ORIGEN	PROCEDENCIA
IBRS-2	Porcina	Riñón	Epitelial	Centro Pan-Americano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA-OPAS/OMS), Rio de Janeiro (Brasil)
PK-15	Porcina	Riñón	Epitelial	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, EE.UU. Catálogo Nº CCL-33
PS-EK	Equina	Riñón	-	Department of Virology and Antiviral Therapy, Universidad of Jena (Alemania)

Tabla 5. Líneas celulares empleadas en cultivos celulares y técnicas serológicas.

2. Mantenimiento de las líneas celulares:

- **DMEM** (*Bio-Whittaker*): Medio esencial mínimo de *Eagle* modificado por *Dulbecco*. Fue empleado para el cultivo de las 3 líneas celulares empleadas. Se suplementó con L-glutamina (*Bio-Whittaker*) (2 mM de concentración final), 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA 100X, *Bio-Whittaker*) y penicilina-estreptomina (*Bio-Whittaker*) (50 U penicilina/ml; 50 µg estreptomina/ml) constituyendo el denominado "medio completo".
- **Suero Fetal Bovino (SFB)** (*Gibco*): Inactivado a 56 °C durante 30 min. Se empleó al 10% (V/V) en el mantenimiento de las líneas celulares y entre un 2.5% y un 5% para crecimiento de virus, titulación de los mismos y en sero/virus-neutralización.
- **Tripsina-EDTA** (0.05% Tripsina-EDTA (1X), *Gibco*): Empleada para el desprendimiento del tapiz confluyente al realizar los pases de mantenimiento.

3. Otros reactivos empleados:

- **PBS 1X** (*Bio-Whittaker*): Tampón salino fosfatado sin calcio ni magnesio, estéril, utilizado en la preparación de los macerados de heces, órganos e hisopos orales.
- **Sacarosa (C₁₂H₂₂O₁₁)** (*Merk*): Disacárido empleado en la preparación de los colchones en el proceso de semipurificación vírica por ultracentrifugación.

4. Cepas virales

Los aislados víricos empleados en esta tesis se recogen en la *tabla 6*.

GÉNERO	VIRUS	SEROTIPO	AISLADO	ORIGEN GEOGRÁFICO	AÑO DE AISLAMIENTO	PROCEDENCIA DEL AISLADO ^a
Teschovirus	PTV	PTV-1	PS34	Pennsylvania (EE.UU)	1965	ATCC
		PTV-1	Tirol	Tirol (Austria)	1961	DVAT-UJ
		PTV-1	1626/89	Arnsberg(Alemania)	1989	"
		PTV-2	O3b	Ohio(EE.UU)	1964	"
		PTV-3	O2b	Ohio(EE.UU)	1964	"
		PTV-4	PS 36	Pennsylvania (EE.UU)	1965	"
		PTV-5	F 26	East Anglia(Reino Unido)	1958	IAHPL
		PTV-6	PS 37	Pennsylvania (EE.UU)	1967	ATCC
		PTV-7	WR2	Washington, D.C (EE.UU)	1957	"
		PTV-8	UKG 173/74	Essex (Reino Unido)	1974	DVAT-UJ
		PTV-9	Vir 2899/84	Arnsberg(Alemania)	1984	"
		PTV-10	12/15 Ge	Bad Langensalza (Alemania)	1980	"
PTV-11	Dresden	Dresden(Alemania)	1963	"		
PTV-12	CC25	Granada(España)	2006	LCV-CISA		
Sapelovirus	PSV	PSV	PS-27	Pennsylvania (EE.UU)	1965	ATCC
Enterovirus	PEV-B	PEV-B1	UKG/410/73	Reino Unido	1973	IAHPL
		PEV-B2	LP54/UK/75		1975	
	VEVP	-	UKG/27/72 POR04	Reino Unido Reigueira de Bidoeira de Cima Distrito Leiria (Portugal)	1972 2004	IAHPL
Aftovirus	VFA	FMDV-O	O1/Campos/BRA 1/58	Campos (Brasil)	1958	Panaftosa
Pestivirus	VPPC	-	Alfort 187	Francia	1987	IFV
Adenovirus	PADV	PADV-5	030-PDV	-	-	NVSL
Varicellovirus	ADV	-	Phylaxia	-	-	CISA
Vesiculovirus	VEV	Indiana	Colorado/42	Colorado, EE.UU	1942	IAHPL
Artevirus	VPRRS	-	5710	España	1991	Hipra
Coronavirus	CoV	PEDV	Wey'87	-	1987	FVL
Circovirus	PCV	PCV-2	2881	-	-	Hipra

Tabla 6. Cepas de referencia y aislados víricos usados en la realización de esta tesis. ^a ATCC: Colección de tipos celulares de América, Manassas, EE.UU; CISA: Centro de Investigación en Sanidad Animal, Madrid (España); DVAT-UJ: Departamento de Virología y Terapia Antiviral, Universidad de Jena (Alemania); FVL: Facultad de Veterinaria de León (España); HIPRA: Laboratorios Hipra, Barcelona (España); IAHPL: Instituto de Salud Animal, Pirbright (Reino Unido); IFV: Instituto de Virología, Hannover (Alemania); LCV: Laboratorio Central de Veterinaria, Madrid (España); NVSL: Laboratorios y Servicio Veterinario Nacional (USDA) Ames, (EE.UU); Panaftosa: Centro Pan-Americano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA-OPAS/OMS), Rio de Janeiro (Brasil).

5. Muestras experimentales y de campo

5.1 Muestras virológicas

El estudio se inició a partir de una colección de muestras fecales porcinas (n= 600) que habían sido previamente analizadas para el diagnóstico de la enfermedad vesicular del cerdo (en el curso del plan de vigilancia nacional para esta enfermedad), por técnicas virológicas tales como el aislamiento en cultivo celular y la confirmación por RT-PCR durante los años 2004-2006. Como resultado del aislamiento se creó una viroteca de virus entéricos porcinos no vesiculares (VEP-NV, n: 206) que fue cedida por el **Laboratorio Central de Veterinaria de Algete** (LCV, Madrid).

A esta colección se le sumaron otros virus entéricos porcinos no vesiculares (n=10) recogidos durante los años 2006-2009 y aislados en el **CISA** (CISA-INIA, Madrid) que habían sido analizados por los mismos motivos que los anteriores. También heces porcinas (n=48) fueron cedidas para los estudios de especificidad y sensibilidad diagnóstica. Además, muestras fecales (n= 7) procedentes de la inoculación experimental de cerdos con el VEVP (aislado *POR04*) fueron cedidas para los estudios de neutralización de la interferencia en el aislamiento viral.

Las heces porcinas, procedentes de animales de cebo de la provincia de Segovia (n=10), fueron cedidas por el *Dr. Mateo del Pozo Vegas* para llevar a cabo un estudio metagenómico (apartado 5 de la sección “Métodos”).

El **Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell’Emilia Romagna (IZSLER)** (Brescia, Italia) cedió para su estudio 34 aislados víricos italianos que formaron parte de los estudios de caracterización (Sozzi y cols., 2010).

La **Estación Biológica de Doñana** (EBD, Huelva) suministró 63 muestras fecales de jabalíes, recogidas durante los años 2007 (n= 28) y 2011 (n= 35), en el Parque Nacional y Natural de Doñana y que formaron parte de estudios específicos de detección y caracterización molecular.

5.2 Muestras serológicas

En los estudios serológicos se empleó una colección de sueros del año 2008 (n=1248) procedentes del **Laboratorio Central de Veterinaria de Algete** (LCV, Madrid) que habían sido previamente analizadas para el diagnóstico de la enfermedad vesicular del cerdo por técnicas serológicas (ELISA y virus-neutralización, VN).

6. Materiales de referencia utilizados como control serológico y virológico

6.1 Materiales de control serológico

Como muestras de control en las pruebas serológicas establecidas se emplearon una colección de antisueros de referencia específicos para las cepas de referencia de *Teschovirus* (PTV1-PTV7), *Sapelovirus* (PSV) y *Enterovirus-B* (PEV9 y PEV10) procedentes del **Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER)** (Brescia, Italia).

El **National Veterinary Service Laboratories** (Ames, Iowa, EE.UU) suministró el antisuero de referencia específico para la cepa de referencia de *Adenovirus* (030-PDV).

Los sueros positivos y negativos de referencia, muestras fecales y los controles necesarios empleados en los estudios serológicos para la enfermedad vesicular porcina fueron cedidos por el *grupo de enfermedades emergentes y transfronterizas* del **CISA**.

6.2 Materiales de control virológico

Los aislados de referencia del género *Teschovirus*, *Sapelovirus*, *Enterovirus* (*Enterovirus-B* y virus de la enfermedad vesicular porcina) y *Adenovirus* fueron utilizados como controles en las distintas técnicas moleculares y en las pruebas serológicas descritas en esta tesis (*Tabla 6*).

Un concentrado de partículas víricas a partir de heces de origen porcino junto con un clon que inserta el fragmento específico para adenovirus porcino fue cedido por el **Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología** (UAB, Barcelona).

En los estudios de especificidad para validación de métodos moleculares de detección se emplearon ARN de distintos virus porcinos de interés veterinario procedentes de la viroteca del *grupo de enfermedades emergentes y transfronterizas* del **CISA** (*Tabla 6*).

La **Facultad de Veterinaria de León** cedió el aislado de coronavirus porcino, CV-777 (cepa Wey 1/87) que fue empleado como control específico en la técnica molecular de detección del virus de la diarrea vírica porcina (VDEP) (*Tabla 6*).

MÉTODOS

1. MÉTODOS VIROLÓGICOS

1.1 Preparación de las muestras para el aislamiento y la extracción de ácidos nucleicos

- **Macerados fecales:** La homogenización se llevó a cabo en un triturador de tejidos “*Tissue-Lyser*” (*Qiagen*) partiendo de aproximadamente 0,1 g de material fecal diluido en 900 µl de PBS 1X , durante 4 min a 30 Hz (ciclos/s), clarificándose posteriormente mediante centrifugación a 600 x *g* durante 10 min a 4°C. A continuación, el sobrenadante se recogió para la extracción del ácido nucleico o el aislamiento vírico. En este último caso, el sobrenadante se sometió a una filtración esterilizante mediante un filtro con un diámetro de poro de 0,20 µm (*Sartorius Stedim Biotech, ministart®*).
- **Órganos:** se seccionó una porción de órgano de aproximadamente 0,1 g y se procedió de la misma manera que para las muestras fecales.
- **Sangre entera:** Se recogió en tubos con EDTA estériles de 5 ml. No se realizó ningún procedimiento antes de su extracción.
- **Hisopos orales:** Las muestras de exudado oral fueron tomadas con hisopos estériles, y sumergidas en 1 ml de PBS estéril durante 30 min. A continuación, se separó una muestra homogénea para su tratamiento posterior.

1.2 Aislamiento y propagación viral en cultivos celulares

Las inoculaciones se llevaron a cabo sobre monocapas de células en cultivo (*Tabla 5*) al 90% de confluencia preferiblemente procedente de pases cortos (1:2 ó 1:3) para evitar el envejecimiento de las células. El volumen del inóculo varió en función del recipiente usado: 100-200 µl en P24 (2cm²/pocillo), 250-500 µl en F12.5 (12.5 cm²/frasco), 500 µl -1 ml en F.25 (25 cm²/frasco), 1-2 ml en F.75 (75 cm²/frasco) y 2-4 ml en F.150 (150 cm²/frasco). Inoculación (“pase”): Se retiró parte del medio de cultivo y se añadió el inóculo correspondiente, cubriendo suficientemente el tapiz celular. El proceso de adsorción viral se llevó a cabo durante 1 h y 30 min en agitación continua suave, a 37°C. Pasado este tiempo se procedió a retirar el inóculo junto con el medio de cobertura únicamente en el 1º pase en el caso del virus de la enfermedad vesicular porcina. Sin embargo, para VEP-NV no se retiró el inóculo. En pases sucesivos (2º y 3º pases) el inóculo no se retiró. Para finalizar, se

suplementó con medio al 2% de SFB atemperado a 37°C, continuando la incubación a 37°C y 5% de CO₂ hasta observar el efecto citopático (ECP) en todo el tapiz.

El ECP varió en tiempo y aspecto dependiendo del tipo viral y generalmente se observó entre las 24-72 horas post-inoculación dependiendo del inóculo de partida, procediéndose a su recogida y congelación a -70°C. A continuación, para recuperar los virus propagados de esta forma, estos cultivos infectados fueron descongelados, divididos en alícuotas y clarificados por centrifugación suave (600 x g durante 10 min a 4°C), listos para su siguiente pase (hasta un máximo de tres), titulación ó inoculaciones experimentales.

1.3 Neutralización de la interferencia de los VEP-NV en la técnica de aislamiento del virus de la EVP en cultivo celular

Se preparó un cóctel incluyendo los antisueros de referencia para PTV disponibles (serotipos 1-9 y 11), antisuero de referencia para adenovirus, y antisueros frente a cepas de campo de teschovirus 2 y 6. Los antisueros fueron empleados a diluciones neutralizantes frente a sus virus homólogos. Este cóctel fue empleado para neutralizar virus fecales citopáticos que podrían acompañar al VEVP en heces porcinas, y por tanto interferir en el aislamiento del VEVP en cultivo. Para ello se seleccionaron muestras de heces obtenidas de cerdos inoculados experimentalmente con VEVP (aislado *POR04*), y que ya venían infectados en origen con teschovirus y adenovirus, en un experimento previo llevado a cabo por el *grupo de enfermedades emergentes y transfronterizas* del **CISA**. Las muestras fueron tomadas a distintos tiempos del experimento (0, 5, 7 y 9 días post-inoculación, [dpi]).

En placas de microtitulación conteniendo monocapas semiconfluentes (90%) de células IBRS-2 se inoculó un volumen de 200 µl /pocillo de cada muestra de macerado de heces (apartado 1.1 de esta sección). Cada muestra se incubó en 3 condiciones diferentes, 1) con 25 µl de antisuero pre-inmune de conejo (C2, -7dpi) (placa control preinmune), 2) con 25 µl del cóctel de antisueros (placa de ensayo) y 3) con 25 µl de medio completo (placa control sin suero). Como control de citotoxicidad se incluyeron células sin infectar, conteniendo el cóctel o suero preinmune a las diluciones del ensayo. Finalmente se incluyó un control de células sin tratamiento.

El aislamiento viral se hizo de la misma manera ya descrita previamente en el apartado 1.2 de esta sección. Para la identificación del virus responsable del ECP se emplearon RT-PCR en tiempo real para el VEVP con control interno (β -actina), una RT-PCR en tiempo real específica para PTV y una RT-PCR múltiple de PTV y EVP (apartado 3.3 de métodos moleculares).

1.4 Titulación viral por dilución límite (DICT₅₀)

La determinación del título vírico de cada preparación utilizada en esta tesis se llevó a cabo siguiendo el método descrito por *Reed y Muench* (Reed y Muench, 1938). Se prepararon diluciones decimales (de 10^{-1} a 10^{-8}) del aislado vírico en medio completo. En la placa de microtitulación se dispensaron 25 μ l de medio de cultivo en cada pocillo, se inocularon 8 pocillos con 25 μ l de cada dilución y se añadió 50 μ l por pocillo de una suspensión de células renales porcinas (aprox. 5×10^5 por ml) (*Tabla 5*). Se incubaron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ hasta observar el desarrollo del efecto citopático, hasta un máximo de 8 días post-inoculación. El porcentaje de SFB final de la placa fue entre 2.5-5%. Las placas se valoraron cuando no se registraron más cambios en el estado de las células, contabilizando los pocillos con ECP para cada dilución de virus y se calculó el título vírico expresado en dosis infectivas al 50% en cultivo tisular, DICT₅₀.

1.5 Obtención de antisueros policlonales monoespecíficos por inmunización de conejos

1.5.1 Propagación de los virus a emplear como antígenos

Los aislados víricos se propagaron en cultivo celular (IBRS-2) de la misma manera ya descrita en el apartado 1.2 de esta sección, hasta obtener un volumen final de 250-300ml por cada aislado. Cuando se observó el ECP máximo (generalmente entre el 1^o-2^o día) se congelaron a -70°C y se descongelaron para centrifugar a 2450 x g (SORVALL RC6+ Centrifuge, rotor F14-6x250y; *Thermo Scientific*) durante 30 min a 4°C recogiendo el sobrenadante para proceder a su inactivación.

1.5.2 Inactivación de los virus con BEI

Se preparó el BEI 0.1M (etilenimina binaria) a partir de BEA 0.1M (2-bromoetilamina hidrobromuro e hidróxido sódico 0.2N) junto con un indicador de pH betanaftol-violeta (1%). La ciclación de BEA a BEI, indicada por el viraje a color naranja del betanaftol violeta, se obtuvo mediante incubación de la mezcla en un baño a 37°C (30 min - 1 h), agitando periódicamente. Para inactivar cada preparación vírica se adicionó BEI 0.1M recién preparado hasta un 6% del volumen total de la mezcla, incubando posteriormente en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas y cambiando la suspensión de recipiente a las 12 horas. Para neutralizar el BEI, se añadió a la suspensión vírica inactivada un 2% de

solución estéril de tiosulfato sódico 1M con el fin de hidrolizar los restos del inactivante (Bahnmann., 1990).

La efectividad del proceso se verificó haciendo 3 pases ciegos en cultivo celular (IBRS-2) con 1 ml de sobrenadante inactivado, comprobando al 3º día post-inoculación la ausencia de ECP que nos indicaba una correcta inactivación del virus. Los virus inactivados se filtraron por 0.45 µm de diámetro de poro (*Sartorius Stedim Biotech, ministart®*).

1.5.3 Concentración y semipurificación

El sobrenadante de cada preparación de virus inactivado fue tratado con NaCl 0.5M y 8% (p/v) de polietilenglicol (PEG) respecto al volumen inicial de antígeno, dejándolo en agitación a 4°C durante una noche. A continuación, se centrifugó a 2450 x g durante 30 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el depósito (pellet) en PBS 1X, concentrando la preparación en un volumen 15-20 veces inferior respecto del volumen inicial de antígeno. Posteriormente, se volvió a clarificar durante 30 min y a 1500 x g a 4°C. El sobrenadante clarificado fue sometido a ultracentrifugación a través de un colchón de 1.5 ml de sacarosa al 25% (p/v) diluida en PBS 1X, en una centrífuga Sorvall WX ultra Series con un rotor SW41Ti durante 2 h a 150.900 x g. El *pellet* obtenido se dejó embebido una noche a 4°C en PBS 1X, concentrando 100 veces con respecto al volumen de partida inicial. Al día siguiente se resuspendió y se guardó a -70°C hasta su uso.

La concentración de proteína presente en el precipitado se analizó por medio del *kit* comercial *BCA TM Protein Assay* de *Pierce*. Se empleó un análisis por SDS-PAGE para identificar las proteínas de los virus presentes en las preparaciones, y se estimó el grado de concentración alcanzado en las preparaciones de antígenos víricos inactivados así obtenidas (con respecto a la concentración inicial) empleando RRT-PCR (cuantitativa) y RT-PCR (semi-cuantitativa) (Apartado 3.3.1 de métodos moleculares; Palmquist y cols., 2002).

1.5.4 Inmunización de conejos con los antígenos víricos

1.5.4.1 Inoculación de antígenos víricos

Para la obtención de antisueros específicos, conejos *New Zealand White*, de doce semanas de edad fueron inoculados subcutáneamente como se detalla a continuación:

- Inmunización con antígenos víricos infectivos (n= 8): se inoculó 1 ml/animal de sobrenadante de cultivo de los aislados víricos de campo CC70, CC78, CC79, CC80 y de referencia PTV8, PTV9 y PTV11, sin inactivar.

- Inmunización con antígenos víricos inactivados (n= 3): se inoculó una concentración de 50 µg de antígeno vírico inactivado y semipurificado (preparado como se describe en el apartado anterior) emulsionado con adyuvante de *Freund* completo (aislados de referencia PTV8 y PTV9; y PSV de campo CC13SW).
- Inmunización de control (n=3): se inóculo 1ml/animal de sobrenadante de cultivo celular clarificado (IBRS-2).

Posteriormente, para potenciar la respuesta de anticuerpos, se re-inoculó por vía subcutánea con los mismos inóculos empleados en la primera inoculación, utilizando en este caso adyuvante incompleto de *Freund* para emulsionar los antígenos víricos inactivados (Tabla 7).

TIEMPO POST- INOCULACIÓN (dpi)	PROCEDIMIENTO	RECOGIDA DE MUESTRAS	PROCESAMIENTO
(-7)	ACONDICIONAMIENTO	SANGRE(SUERO)	SERONEUTRALIZACIÓN
0	1ª INOCULACIÓN: virus infectivo y virus inactivado semipurificado con adyuvante de <i>Freund</i> completo	“ ”	“ ”
14			
21	2ª INOCULACIÓN: virus infectivo y virus inactivado semipurificado con Adyuvante de <i>Freund</i> incompleto	“ ”	“ ”
33-34	SACRIFICIO	“ ”	“ ”

Tabla 7. Cronograma con los pasos llevados a cabo en la producción de anticuerpos monoespecíficos policlonales frente a distintos virus del G^o *Teschovirus* y *Sapelovirus*.

La experiencia se realizó en las instalaciones del animalario de nivel de contención biológica 3 (NCB-3) del CISA, conforme a la legislación vigente en materia de bioseguridad, ética en experimentación animal y bienestar animal y fue aprobada por el *Comité de Ética y Bienestar Animal* del INIA (apartado 6, experimentación animal).

1.5.4.2 Recogida y procesamiento de sangre

Se tomaron muestras de sangre de la vena marginal de la oreja a 15 y 33-34 dpi. Entre los días 33 y 34 dpi se procedió al sacrificio de todos los animales. Las muestras fueron recogidas en tubos sin anticoagulante y se procesaron de la manera descrita en el apartado 2.1 de esta sección. Posteriormente, estos sueros fueron titulados por la técnica de seroneutralización frente a virus homólogos y heterólogos (apartado 2.2).

2. MÉTODOS SEROLÓGICOS

2.1 Preparación de las muestras para serología

• **Sueros:** Las muestras de sangre fueron recogidas en tubos sin anticoagulante para posteriormente separar el suero mediante incubación durante 1 hora a 37°C seguido de una noche a 4°C, tras lo que se recogió el suero y se clarificó por centrifugación a 600 x g durante 10 min a 4°C. A continuación fueron inactivados durante 30 min a 56°C y almacenados a -20°C a la espera de su uso.

Siempre que fue posible, las muestras fueron procesadas inmediatamente, y el remanente fue conservado a -70°C.

2.2 Seroneutralización

Todos los sueros analizados por esta técnica fueron previamente tratados como se describe en el apartado 2.1. Aquellos sueros que habían sido recogidos ó ensayados en condiciones no estériles fueron sometidos a un tratamiento con cloroformo (5%) con el fin de impedir contaminaciones bacterianas en el proceso, dejando un reposo de 30 min y recogiendo la fase superior que porta el suero limpio.

Se prepararon diluciones seriadas de la muestras serológicas en medio completo en el rango 1:5-1:10.240) en función de las necesidades del estudio. En los pocillos de las placas de microtitulación empleadas se mezcló 1 volumen (25 µl) de la dilución sérica con 1 volumen idéntico de una suspensión viral que contenía 100 DICT₅₀ del virus de estudio. Como control de infectividad se incorporaron a cada placa 4 diluciones que contenían 0.1, 1, 10 y 100 DICT₅₀ del virus en un volumen final de 50 µl. Se incubaron 1 hora a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ y se añadió 50 µl de una suspensión de células renales porcinas a una concentración aproximada de 5 x 10⁵ células por ml en una concentración final de SFB del 2.5-5%. La incubación se realizó a 37°C durante 3-7 días dependiendo del virus en estudio. El análisis se consideró válido cuando en el control de virus se observó un ECP total en los pocillos de 100 y 10 DICT₅₀ mientras que en 1 DICT₅₀ sólo se observó ECP en la mitad de los pocillos inoculados. En ningún caso deben estar afectados los pocillos con 0.1 DICT₅₀. Como control positivo se usó el antisuero de referencia correspondiente o antisueros específicos de campo, y como controles negativos, sueros negativos de cerdo y/o conejo.

Se consideró título de neutralización al inverso de la dilución más alta de suero que consiguió neutralizar completamente el ECP del virus.

2.3 Elisa sándwich de bloqueo en fase líquida (ELISA-FL) para EVP

En los estudios realizados en esta tesis se optó por utilizar el ELISA *sándwich* de bloqueo en fase líquida empleado en el programa de vigilancia epidemiológica de la EVP en España, originalmente descrito en la tesis doctoral de Zamora-Escribano (Zamora-Escribano, 1997), y modificado por Paloma Fernández-Pacheco, del *grupo de enfermedades emergentes y transfronterizas* del CISA (datos no publicados). La modificación consistió en utilizar el anticuerpo monoclonal (AcM) 9B11 (específico frente al virus de la EVP), conjugado directamente con peroxidasa de rábano. De este modo se simplificó el método, pues ya no es necesaria una incubación adicional con un anticuerpo secundario conjugado, acortando de esta manera el tiempo de ejecución del ELISA. Brevemente, se preparan dos placas de microtitulación: una constituye la *fase sólida*, y está tapizada con anticuerpo policlonal específico y saturada con tampón de bloqueo, mientras que la otra es la *fase líquida* en la que se mezcla una dilución de antígeno de VEVP (cepa de referencia UKG/27/72) inactivado con BEI (como se describe en el apartado 1.5.2 de esta sección) con las muestras de suero a analizar diluidas en tampón de bloqueo, incubando la mezcla durante 1 h a 37°C. Tras ello, se transfiere la fase líquida a la placa que constituye la *fase sólida* y se incuba durante 1 h a 37°C. Finalmente, la *fase sólida* se lava, se le añade AcM 9B11 conjugado con peroxidasa, se incuba durante 1 h a 37°C, se lava de nuevo y se revela la presencia de anticuerpo unido al antígeno inmovilizado en la fase sólida por adición de sustrato cromogénico (TMB), deteniendo la reacción con ácido sulfúrico 2N. La presencia de anticuerpos frente al VEVP en la muestra reduce sensiblemente la lectura colorimétrica, al bloquear la unión del AcM 9B11 al antígeno.

2.4 Análisis estadísticos

Con la finalidad de conocer si existe una correlación entre serología obtenida a PTV y los falsos positivos serológicos procedentes del programa de serovigilancia del virus de la EVP, los resultados obtenidos por seroneutralización para ambos virus fueron analizados usando modelos lineales generalizados (GLM). Este tipo de modelos se utiliza cuando los datos que se pretende analizar no tienen una distribución normal y/o la varianza no es constante. Este es el caso de las variables de prevalencia de anticuerpos o infección. En estos casos la variable *respuesta* (infectado/no infectado) se puede modelar como una variable binaria con una distribución de error binomial. En el caso de enfermedades infecciosas, es bastante común que existan diferencias en la varianza debido a que en las explotaciones afectadas se puede encontrar un número más o menos elevado de casos y

este valor será 0 en las no infectadas. Se analizó la prevalencia considerando como variable *respuesta* la positividad/negatividad a PTV (suero con título mayor/menor de 1:40). En este modelo hemos usado un error distribuido binomialmente y un *link logit*. El origen geográfico (Comunidad Autónoma) y el tener o no anticuerpos a EVP se incluyó como factores fijos en el análisis. El análisis fue llevado a cabo con el paquete estadístico SAS 9.1 con el procedimiento GENMOD (SAS Institute 2000).

3. MÉTODOS MOLECULARES

3.1 Extracción de ácidos nucleicos

Para la obtención de ácidos nucleicos (ARN y ADN) de muestras de campo y experimentales procedentes de preparaciones de órganos, hisopos orales, sangre, macerados de heces y aislados virales en cultivo celular, se utilizó el robot de extracción automática *Biosprint 15 (Qiagen)* y el *Kit comercial Biosprint 15 DNA blood* siguiendo las instrucciones del fabricante. Se modificó el protocolo inicial en las muestras destinadas a extracción de ARN por adición de 1 µl de ARN portador (*carrier*) destinado a incrementar el rendimiento de la purificación. Los volúmenes de partida fueron 100 y 200 µl, eluyendo el ARN en un volumen final de 100 µl de agua desionizada (calidad “MilliQ”) estéril.

En particular, las 34 muestras fecales utilizadas en los estudios de caracterización (apartado 5.1 de muestras virológicas) fueron extraídas mediante el reactivo Trizol siguiendo esencialmente el protocolo descrito en el *kit TRIzol®LS Reagent (Ambion)*.

Como control de extracción positiva se emplearon diluciones de los sobrenadantes virales de referencia analizados previamente con las técnicas de PCR de destino, con el fin de obtener una banda nítida por electroforesis y un valor de ciclo umbral (en el caso de las técnicas en tiempo real) de 31 ± 2 . Como control de extracción negativa se usó 100-200 µl de agua desionizada (“MilliQ”) estéril.

3.2 Amplificación de ácidos nucleicos

En cada amplificación se incluyó un control positivo de reacción y un control negativo que permitió verificar la efectividad del proceso de reacción. El material genético extraído de los controles positivos de extracción fue usado como control positivo de reacción, previa confirmación de que se obtenían los resultados esperados por RRT-PCR y RT-PCR convencional, como se describe anteriormente (véase extracción de ácidos nucleicos).

Como control negativo de reacción se empleó el agua del *kit* comercial *One-step RT-PCR* (Qiagen). Los oligonucleótidos fueron suministrados por las casas comerciales *Applied Biosystems* y *Roche*.

Las RT-PCR en tiempo real se realizaron en el equipo Mx3005P de *Stratagene* y las RT-PCR convencionales en termocicladores *MJ Research PTC-100* y *Applied Biosystems ABI 2700*.

3.3 Métodos de RT-PCR y PCR para la detección de genoma vírico

3.3.1 Técnica de RT-PCR en tiempo real para la detección de teschovirus

Para la detección del genoma de teschovirus optamos por una RT-PCR en tiempo real (RRT-PCR) diseñada para amplificar una pequeña parte de la región no codificante 5' (Jiménez-Clavero y cols., 2003) (*Tabla 8 y figura 13*).



Figura 13. Localización de los cebadores y de la sonda según la cepa prototipo *Talfan* (nº de acceso *GenBank* AF231769).

CEBADOR Y SONDA	SECUENCIA (5'→3')	REGIÓN	POSICIÓN EN EL GENOMA (nt) ^a	TAMAÑO	T _m (°C)
PTV-F	CACCAGCGTGGAGTTCCTGTA		329-349		
PTV-R	AGCCGCGACCCTGTCA	5'NTR	379-394	66	60
PTV-S1	FAM-TGCAGGACTGGACTTG-MGB		356-372		

Tabla 8. Descripción de los cebadores y la sonda específicos para la amplificación de virus del G^o *Teschovirus*; ^a La posición corresponde a la región 5'NTR de la cepa prototipo *Talfan* (nº de acceso *GenBank* AF231769).

La sonda es una sonda TaqMan-MGB (*Minor Grove Binder*), que está doblemente marcada (emisor-FAM-MGB-aceptor). El grupo MGB estabiliza el ADN, aumentando la temperatura de fusión (T_m) de la sonda, lo que permite el empleo de sondas más cortas aumentando así su sensibilidad y estabilidad, y facilitando la localización de regiones conservadas en genomas altamente variables. Si ambos fotocromos están unidos a la sonda, el emisor no emite señal, pero cuando la sonda híbrida con la secuencia de interés durante la reacción de PCR, la actividad exonucleasa (3'→5') de la enzima Taq-polimerasa, separa al fotocromo emisor del resto de la sonda, permitiendo la emisión de una señal

CEBADOR Y SONDA	SECUENCIA (5'→3')	REGIÓN	POSICIÓN EN EL GENOMA (nt) ^a	TAMAÑO	T _m (°C)
2B-I	CGAGAAACCTAGTACCACCATGAA		252-275		
2B-V	CGGTGACTCATCGACCTGATC	5'NTR	312-332	81	60
2B-S	FAM-TCGCTCCGCACAACCCAGTG-TAMRA		289-309		

Tabla 9. Descripción de los cebadores y la sonda específicos para la amplificación de virus de la enfermedad vesicular porcina. ^a La posición corresponde a la región 5'NTR de la cepa del VEPV UKG/ 27/ '72 (nº de acceso GenBank X54521).

El protocolo se optimizó usando el *kit QuantiTect Probe RT-PCR* (Qiagen). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 25 µl que contenía: 1x *Quantitect Probe RT-PCR master mix* (Tris-Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 8 mM MgCl₂, dNTP mix, Carboxi-X-Rodamina-ROX (fluoróforo de referencia) y *HotStartTaq® ADN* polimerasa), una concentración final de 0.9 µM para SB-I y 0.3 µM para SB-V; 0.2 µM de la sonda *TaqMan-TAMRA*, 0.25 µl de *Quantitect RT mix* (*Omniscript®* y *Sensiscript®* Reverso-Transcriptasas), 5 U de inhibidor de RNasas y 10 µl de ARN viral. El proceso de amplificación se llevó a cabo siguiendo el mismo programa de incubación descrito anteriormente para la RRT-PCR de teschovirus.

3.3.3 Técnica de RT-PCR en tiempo real para la detección del virus de la enfermedad vesicular porcina con control interno (β-actina)

Se adaptó el método descrito en el apartado anterior para utilizar un control interno basado en la detección de ARN de la β-actina, un gen celular expresado constitutivamente y ampliamente conservado en vertebrados. La amplificación del ARN del VEPV se llevó a cabo utilizando los cebadores 2B-I y 2B-V y la sonda 2B-S (*Tabla 9*), mientras que para la amplificación del ARN de un fragmento del gen de la β-actina celular se emplearon los *cebadores* (ACT-F y ACT-R) y sonda (ACT-P) descritos previamente (Toussaint y cols., 2007) (*Tabla 10*). La sonda ACT-P se marcó en este caso en el extremo 5' con ROX, incorporando en el extremo 3' una molécula aceptora no fluorescente denominada *Black Hole quencher* (BHQ), lo que permitió la detección diferencial y simultánea del genoma del VEPV y el ARNm de la β-actina. El protocolo y las condiciones de la RRT-PCR dúplex fueron los mismos que los mencionados en el apartado anterior, salvo en 3 detalles: 1) el *kit* utilizado fue *QuantiTect Multiplex RT-PCR NR* (Qiagen), 2) los *primers* ACT-F y ACT-R se utilizaron a 0.2 µM final, y 3) la sonda *TaqMan* ACT-P se usó a 0.1 µM final. En este caso, la lectura de fluorescencia se llevó a cabo al final de cada ciclo en los canales FAM (VEPV) y ROX (β-actina) (Fernández-Pinero J, procedimiento no publicado).

CEBADOR Y SONDA	SECUENCIA (5'→3')	POSICIÓN EN EL GENOMA (nt) ^a
ACT-F	CAGCACAATGAAGATCAAGATCATC	1005-1029
ACT-R	CGGACTCATCGTACTCCTGCTT	1135-1114
ACT-P	ROX-TCGCTGTCCACCTTCCAGCAGATGT-BHQ	1081-1105

Tabla 10. Cebadores y sonda empleados para la detección del control interno (β -actina), descrito por *Toussaint y cols* (2007) incluidos en la RRT-PCR de VEP. La sonda ACT-P incluye una modificación sobre el protocolo original, estando marcada en el extremo 5' con el fluoróforo ROX en lugar de FAM y con la molécula BHQ en lugar de TAMRA (carboxi-tetra-metil-rodamina)^a. Posición en el gen de la β -actina bovina (nº de acceso *GenBank* AY141970).

3.3.4 Técnica de RT-PCR para la detección de teschovirus y sapelovirus

Con el fin de poder detectar infecciones por teschovirus ó sapelovirus y co-infecciones por ambos en una misma preparación virológica, se seleccionó un método de RT-PCR múltiple descrito previamente, que permite diferenciar ambos tipos de virus en base al tamaño del producto de la amplificación, y usando una única pareja de cebadores (*Palmquist y cols.*, 2002). Esta RT-PCR amplifica una región altamente conservada (5'NTR) del genoma de ambos virus y proporciona la sensibilidad y especificidad requerida para el estudio (*Figura 15 y Tabla 11*).

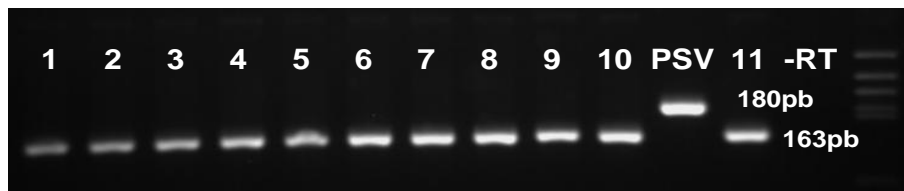


Figura 15. Amplificación de los 11 serotipos de referencia de PTV y el único serotipo conocido de PSV.

CEBADOR	GÉNERO	SECUENCIA (5'→3')	REGIÓN	POSICIÓN EN EL GENOMA (nt) ^a	TAMAÑO (PTV)	TAMAÑO (PSV)	T _m (°C)
1222-F	TESCHOVIRUS	GTGGCGACAGGGTACAGAAGAG	5'NTR	236-398	163	180	56
1223-R	SAPELOVIRUS	GGCCAGCCGCGACCCTGTCAG					

Tabla 11. Descripción de los cebadores específicos para la amplificación de virus del G⁰ *Teschovirus* y *Sapelovirus*.^a La posición corresponde a la región 5'NTR de la secuencia de teschovirus *F65* (nº de acceso *GenBank* AJ011380).

El protocolo se adaptó al *kit* comercial *One-Step RT-PCR* (*Qiagen*): 2 μ l de ARN, 1X *Buffer* [Tris-Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 2.5 mM MgCl₂], 0.2 mM dNTPs, 1X solución Q; 0.4 μ M de cada oligonucleótido, 5 U de inhibidor de RNasa (*Applied Biosystems*) y 1 μ l de mezcla de enzimas (*Omniscript*[®] y *Sensiscript*[®] Reverso-Transcriptasas, *HotStartTaq*[®]ADN polimerasa) hasta un volumen final de 25 μ l.

La transcripción reversa y la amplificación del ADN fueron llevadas en un solo paso siguiendo el procedimiento descrito por el autor: 30 min a 50°C, 15 min a 95°C, 40 ciclos de 60s a 94°C, 60s a 56°C y 60s a 72°C y finalmente 10 min a 72°C.

3.3.5 Técnica de RT-PCR para la detección de enterovirus-B (PEV-9 y 10)

En la detección del grupo de virus pertenecientes al G^o *Enterovirus* (Enterovirus 9 y 10) se emplearon dos métodos de RT-PCR que amplificaban dos regiones, una región conservada (5'NTR) y la región que codifica para la proteína VP1 (Tabla 12). Las RT-PCR se llevaron a cabo siguiendo los protocolos descritos por los autores (Muscillo y cols., 1997; La Rosa y cols., 2006).

CEBADOR	SECUENCIA (5'→3')	REGIÓN	TAMAÑO	Tm (°C)
38-F	TTTAGGATCCTCCGCCCCCTGAATGCG	5'NTR	169	51
37-R	ATCTAAGCTTGTACCATAAGCAGCCA			
1284-F	AATGCTAGTGATGARRGCATG	VP1	299	54
1287-R	GGYGGCAAATACATAACCTGTA			

Tabla 12. Cebadores específicos para la amplificación parcial de la región no codificante 5' descritos por *Muscillo y cols* (1997) y la región codificante (VP1) descrito por *La Rosa y cols* (2006) para el G^o *Enterovirus-B*.

3.3.6 Técnica de RT-PCR convencional para la detección de teschovirus, sapelovirus y enterovirus-B

Como método comparativo en los ensayos de validación de la RT-PCR en tiempo real para el G^o *Teschovirus*, se seleccionaron 3 parejas de oligonucleótidos que independientemente, amplificaban virus del G^o *Teschovirus*, *Sapelovirus* y *Enterovirus-B*.

Las RT-PCR fueron llevadas a cabo siguiendo el protocolo propuesto por R. Zöll y colaboradores, omitiendo el 2^o paso de PCR anidada (Zöll y cols., 2000) (Tabla 13).

CEBADOR	GÉNERO	SECUENCIA (5'→3')	REGIÓN	POSICIÓN EN EL GENOMA (nt)	TAMAÑO	Tm (°C)
Pev-1a Pev-1-b	TESCHOVIRUS	AGTTTTGGATTATCTTGTGCCC CCAGCCGCGACCCTGTCAGGCAGCAC	5'NTR	76-97 ^a 371-396	321	55
Pev-8a Pev-8b	SAPELOVIRUS	CCCTGGGACGAAAGAGCCTG CCTTAAAGTAAGTAGTAAAGGG	3D-RdRp	31-50 ^b 392-413	383	"
Pev-9a Pev-9b	ENTEROVIRUS-B	GTACCTTTGTACGCCTGTTTTA ACCCAAAGTAGTCGGTTCCGC	5'NTR	66-87 ^c 536-556	491	"

Tabla 13. Descripción de los cebadores descritos para la amplificación de distintos virus de la familia *Picornaviridae*. ^a La posición corresponde a la región 5'NTR (región no codificante 5') de la secuencia *F65* (n^o de acceso *GenBank* AJ011380). ^b La posición corresponde a la región 3D-RdRp (ARN polimerasa) de la secuencia *V13* (n^o de acceso *GenBank* AJ001391). ^c La posición corresponde a la región 5'NTR de la secuencia *UKG 410/73* (n^o de acceso *GenBank* AF363453).

3.3.7 Técnica de PCR para la detección de adenovirus porcino

Para la amplificación del genoma de adenovirus porcino se optó por una PCR anidada que amplificaba una parte de la región codificante de la hexona (una de las proteínas de la cápsida de los adenovirus) siguiendo el protocolo descrito por los autores (Maluquer de Motes y cols., 2004) (Figura 16 y Tabla 14).

CEBADOR	SECUENCIA (5'→3')	REGIÓN	POSICIÓN EN EL GENOMA (nt) ^a	TAMAÑO	T _m (°C)
PALF	GATGTCATGGAYAACGTCAAC	Hexona	20627–20647	612	54
PARF	CACGGAGGAGTCRAACTGGATG		21217–21238		
PALN	TACTGCMAGTTYCACATCCAGGT		20711–20733	344	57
PARN	GGAATGGAGATGGGCAGGTT		21035–21054		

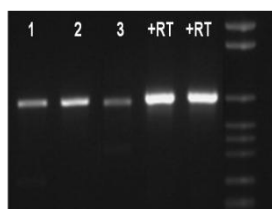


Tabla 14. Descripción de los cebadores específicos descritos para la amplificación parcial de la región de la hexona de adenovirus porcino. ^a La posición corresponde a la región de la hexona de la secuencia *IAF* (serotipo 3) (nº de acceso *GenBank* AJ237815).

Figura 16. Control positivo de la 1ª reacción (clon) junto con 3 aislados positivos (material de control virológico apartado 6.2).

3.3.8 Técnica de RT-PCR múltiple para la detección del virus de la enfermedad vesicular porcina, teschovirus y sapelovirus

Esta RT-PCR se desarrolló específicamente para su uso en el experimento de neutralización de la interferencia de los VEP-NV en la técnica de aislamiento del virus de la EVP en cultivo celular (apartado 1.3, dentro de esta sección). Los oligonucleótidos descritos por *Palmquist y cols* (2002) fueron usados para la amplificación de teschovirus y sapelovirus (apartado 3.3.4). En el caso de VEPV los cebadores fueron descritos por *Nuñez y cols* (1998) (Tabla 15). Para los distintos ensayos de RT-PCR se empleó el *kit* comercial *One-step RT-PCR* (*Qiagen*). Cada mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 25 µl que contenía: 2 µl de ARN, 1X *Buffer* [Tris-Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 2.5 mM MgCl₂], 1X solución Q; 0.2 mM dNTPs, 0.3 µM de cada oligonucleótido, 5 U de inhibidor de RNasa (*Applied Biosystems*), y 1 µl de mezcla de enzimas (*Omniscript®* y *Sensiscript®* Reverso-Transcriptasas, *HotStartTaq®ADN* polimerasa). El programa de incubación en un paso fue el siguiente: 30 min a 50°C, 15 min a 95°C, 40 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 57°C y 30 s a 72°C y finalmente 7 min a 72°C.

CEBADOR	GÉNERO	SECUENCIA (5'→3')	REGIÓN	POSICIÓN EN EL GENOMA (nt) ^a	TAMAÑO (PTV-PTV)	TAMAÑO (EVP)	T _m (°C)
1222-F	TESCHOVIRUS	GTGGCGACAGGGTACAGAAGAG	5'NTR	236-398	163		57
1223-R	SAPELOVIRUS	GGCCAGCCGCGACCCTGTCTAG			180		
SA3-I	ENTEROVIRUS	TAAGGGTAACCTGCACTGGTGG	3D			207	
SS6-V	(EVP)	GGCCAACCTTTGAGGAGGCAATC					

Tabla 15. Descripción de los cebadores específicos para la amplificación de virus de los G^{OS} *Teschovirus*, *Sapelovirus* y *Enterovirus* (EVP). ^a La posición corresponde a la región 5'NTR (región no codificante 5') de la secuencia de teschovirus F65 (nº de acceso GenBank AJ011380).

Se comprobó la especificidad de la pareja SA3-I / SS6-V y 1222-F/ 1223-F con las cepas de referencias para el G^{OS} *Teschovirus* y *Sapelovirus* y con la cepas de referencia para el VEVP, respectivamente. Se preformaron las RT-PCR individuales y en conjunto comprobando una igualdad de sensibilidad de la RT-PCR múltiple con respecto a las RT-PCR individuales para el serotipo 4 de referencia para PTV (*PS36*), el aislado de referencia de sapelovirus (*PS27*) y la cepa *POR04* del VEVP.

3.3.9 Técnica de RT-PCR para la detección del coronavirus porcino

Para la detección del genoma del virus de la diarrea epidémica porcina (VDEP) se utilizó una técnica de RT-PCR descrita por *Ben Salem y cols* (2010), llevando a cabo únicamente la retrotranscripción y la 1ª PCR. El protocolo se adaptó al *kit* comercial *One-step RT-PCR (Qiagen)* (Tabla 12), siguiendo el protocolo descrito en el punto 3.3.8, variando la cantidad de cebadores a 0.6 µM. El programa de temperaturas fue: 30 min a 50°C, 15 min a 95°C, 40 ciclos de 60 s a 94°C, 1 min a 60°C y 1 min a 72°C y finalmente 7 min a 72°C (Tabla 16 y figura 17).



Figura 17. Diluciones del control positivo utilizado (CV777) (material de control virológico apartado 6.2).

CEBADOR	SECUENCIA (5'→3')	REGIÓN	POSICIÓN EN EL GENOMA (nt) ^a	TAMAÑO	T _m (°C)
M1	GAATTTTACATGGAATATCATACTGACGATACTACTTGT	Gen M	25748–25773	450	60
M2	CGCCAGTAGCAACCTTATAGCCCTCT		26133-26159		

Tabla 16. Descripción de los cebadores específicos para la amplificación de virus de diarrea epidémica porcina (VDEP) ^a La posición corresponde al gen M de la secuencia del coronavirus porcino CV777 (nº de acceso GenBank NC 003436).

3.4 Métodos para la caracterización molecular de aislados víricos por amplificación y secuenciación

3.4.1 Caracterización de aislados del G^o *Teschovirus*

3.4.1.1 Amplificación y secuenciación de la proteína VP1 de aislados del G^o *Teschovirus*

Para la caracterización de los aislados identificados como pertenecientes al G^o *Teschovirus* por los métodos de RT-PCR (convencional y/o en tiempo real), se usó un alineamiento de genoma completo con 71 aislados para diseñar oligonucleótidos destinados a amplificar la región que codifica para la proteína VP1. Para abordar la gran variabilidad existente en la región VP1 y zonas flanqueantes (VP3-2A) entre los genotipos y cepas descritas hasta la fecha, se diseñaron 4 parejas de cebadores externos. Con el fin de mejorar la secuenciación posterior, cebadores internos fueron diseñados para cada una de las RT-PCR exceptuando la pareja 3I-3V. Las RT-PCR se emplearon de manera secuencial, de tal manera que si no había amplificación con una pareja, se continuaba con otra y así sucesivamente hasta completar las cuatro RT-PCR. Como controles del proceso se usaron los aislados de referencia (*Tabla 17*).

CEBADOR E IDENTIFICADOR	SECUENCIA (5'→3')	REGIÓN	POSICIÓN EN EL GENOMA (nt) ^a	TAMAÑO	T _m (°C)	CONTROLES DE PCR
RT-PCR(1)						
2I (ida)	CCYGGCTCACCATCACARGCAG	VP1	2379-2400	989	58	PTV2,4,6,8 y 10
2V (vuelta)	GCYGGRTCTTTYAAAATTTGGTAC		3343-3367			
2II (interno)	GTTGCTGTGMGGGCDATGCCTGC		2748-2770			
2IV (interno)	TATGCTGTTGGYAGCACTGTYG		2979-3001			
RT-PCR(2)						
1I (ida)	CCYAAITCACCATCYTTGGCTG	VP1	2379-2400	1007	54	PTV1 y 11
1V (vuelta)	TCRCAMAGRGCATCAACTGCTGG		3363-3385			
1II (interno)	GTTGCTGTGAGAGTRATGCCRGC		2748-2770			
1IV (interno)	GAMACATATGGYACTGARCATG		2953-2972			
RT-PCR(3)						
7I (ida)	CTGTGTGGCAGTATACCAATTTGGC	VP1	2347-2371	974	58	PTV7 y 9
7V (vuelta)	GTTTTCTTCGACATCTCCTGCTTGC		3296-3320			
7II (interno)	GTTCCACCTGGCAGTGGATGGGC		2823-2845			
7IV (interno)	GCTTCCACGTAAGGAAGGCAATGC		2907-2931			
RT-PCR(4)						
3I (ida)	GTCTTTGCTGGRGAAGATTATGTG	VP1	2415-2438	964	58	PTV3
3V (vuelta)	GGGCYTCKACTGCTGGYTCTTTC		3356-3378			

Tabla 17. Descripción de los cebadores específicamente diseñados para la secuenciación de la proteína VP1 de los aislados españoles de teschovirus porcinos en esta tesis; ^a La posición corresponde a la región de la proteína VP1 del aislado *Talfan* (nº de acceso *GenBank* AF2317698).

Para los distintos ensayos de RT-PCR se empleó el *kit* comercial *One-step RT-PCR* (Qiagen), siguiendo el protocolo descrito en el punto 3.3.8, variando la cantidad de cebadores que en todos los casos fue de 0.6 μ M. El programa de temperaturas fue: 30 min a 50°C, 15 min a 95°C, 40 ciclos de 30 s a 94°C, 1 min a una temperatura específica según la pareja de cebadores de 54 y 58 °C y 1 min a 72°C (Tabla 17) y finalmente 7 min a 72°C.

Adicionalmente a las 4 RT-PCR descritas, 2 parejas de cebadores se diseñaron exclusivamente para mejorar la secuenciación de la región VP1 de 3 aislados de teschovirus en jabalíes. Las condiciones del proceso fueron idénticas a las anteriores, modificando exclusivamente la temperatura de anillamiento, que en este caso fue de 60°C (Tabla 18).

CEBADOR	SECUENCIA (5'→3')	REGIÓN	POSICIÓN EN EL GENOMA (nt) ^a	TAMAÑO	T _m (°C)
5I (ida)	GGCAGTACTCAAACCTTAGCATCAC	VP1	2353-2376	579	60
5IV (vuelta)	GCTTCCAGGTAAATGATGGGAGCG		2098-2931		
5II (ida)	GTGAGAGCAATGCCAATGAGCCC		2754-2776	623	
5V (vuelta)	GGCATCAACTGCTGGGTCTTTC		3356-3376		

Tabla 18. Descripción de los cebadores adicionales específicamente diseñados para la secuenciación de la proteína VP1 de los aislados españoles de teschovirus en jabalíes. ^a La posición corresponde a la región de la proteína VP1 del aislado del F26 (nº de acceso *GenBank* AF296090).

3.4.1.2 Amplificación y secuenciación de la proteína VP2 de aislados del G^o *Teschovirus*

Como alternativa en la caracterización de los aislados españoles se empleó una pareja de oligonucleótidos descritos previamente por *Kaku y cols* (2007) que estaban diseñados para amplificar todos los genotipos del G^o *Teschovirus*. El protocolo se adaptó al *kit* comercial *One-step RT-PCR* (Qiagen) y el programa de temperaturas fue similar al descrito para la VP1 (apartado 3.4.1.1), variando únicamente la temperatura de anillamiento (Tabla 19). El protocolo adaptado amplificó todos los virus de referencia del G^o *Teschovirus* (PTV1-12).

CEBADOR	SECUENCIA (5'→3')	REGIÓN	POSICIÓN EN EL GENOMA (nt) ^a	TAMAÑO ^b	T _m (°C)
VP2-337F-puff	CACCARYTGCTTAARTGYKGTGG	VP2	1206-1229	~359	51
VP2-654R-puff	CACAGGGTTGCTGAAGARTTTGT		1542-1564		

Tabla 19. Descripción de los cebadores empleados para la secuenciación parcial de la proteína VP2 de los aislados españoles de teschovirus porcino; ^a La posición corresponde a la región de la proteína VP2 del aislado *Talfan* (nº de acceso *GenBank* AF2317698); ^b El tamaño indicado del amplicón corresponde al del aislado *Talfan* pero difiere en otros genotipos.

3.4.2 Caracterización de aislados del G^o *Sapelovirus* por amplificación y secuenciación de la proteína VP4

Para la caracterización molecular de aislados del G^o *Sapelovirus* procedentes de cerdo doméstico y jabalí, se diseñó 1 pareja de cebadores destinados a amplificar la región que codifica para la proteína VP4. Las condiciones del proceso fueron idénticas a las anteriores modificando exclusivamente la temperatura de anillamiento, que en este caso fue de 56°C. El programa de incubación fue el siguiente: 30 min a 50°C, 15 min a 95°C, 40 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a 56°C y 30 s a 72°C y finalmente 7 min a 72°C (*Tabla 20*).

CEBADOR	SECUENCIA (5'→3')	REGIÓN	POSICIÓN EN EL GENOMA (nt) ^a	TAMAÑO ^b	T _m (°C)
SVP4 (Ida)	CCATGGCATAYGTGGAAGGGAAG	VP4	603-626	343 ^b -355	56
SVP4 (Vuelta)	CCTTYGCTGCRTCRTGTGTGTTGTTA		922-945		

Tabla 20. Descripción de los cebadores diseñados para la secuenciación de la región que codifica para la proteína VP4 completa de los aislados españoles de sapelovirus porcino; ^a La posición corresponde a la región de la proteína VP4 del aislado V13 (nº de acceso *GenBank* NC_003987); ^b El tamaño del amplicón corresponde al del aislado V13 pero en otros aislados hay una inserción de 4 aminoácidos.

3.4.3 Método para el análisis de la secuencia completa del genoma del aislado CC25 perteneciente al G^o *Teschovirus*

En vista de los resultados obtenidos por análisis de la secuencia de la VP1 de los aislados españoles de teschovirus, en particular la del aislado CC25, que posiblemente constituyera un nuevo serotipo, se diseñaron 15 parejas de *primers* para completar las secuencias obtenidas con las parejas VP2-337F-puff- VP2-654R-puff (Kaku y cols., 2007) y 2I, 2V, 2II y 2IV (apartado 3.4.1.1) y obtener su genoma casi completo (*Tabla 21*).

Las condiciones de las RT-PCR fueron similares a lo descrito anteriormente (apartado 3.4.1.1) usando el *kit* comercial *One-step RT-PCR* (*Qiagen*), exceptuando las temperaturas de anillamiento que fueron específicas dependiendo de la pareja de primer usada (*Tabla 21*).

3.5 Visualización de los productos de amplificación

Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% ó 3 % (*Agarose MP y MS, Roche*), dependiendo del tamaño del amplicón, con bromuro de etidio (BrEt, *Amresco*®).

NOMBRE DEL CEBADOR	SECUENCIA (5'→3')	REGIÓN	POSICIÓN EN EL GENOMA (nt) ^a	TAMAÑO	T _m (°C)
NTR1 (ida)	ATTAGACCTCGGACTTCTGTTGTG	NTR 5'	101-124	315	55°C
NTR2 (vuelta)	CTATACAAAGTACAGACGGCCAGC		392-415		
L3 (ida)	CACCAGCATGGAGTTCCTGTAT	L	329-350	424	55°C
L4 (vuelta)	TATTACCCAGTGTCCAGAA		731-752		
VP4I (ida)	TRGTTTGYGATKTTGARCTTGA	VP4	652-673	310	50°C
VP4V2 (vuelta)	TGAATRATATCYACTCTRCTGACA		937-961		
AA.F1 (ida)	CACAGACGCAGTTGACCTTCC	VP4-VP2	779-800	510	58°C
AA.R1 (vuelta)	GCAAACACGCCTAGACAACCAC		1267-1288		
VP2-337F (ida)•	CACCARYTGCTTAARTGYKGTGG	VP2	1206-1229	359	51°C
VP2-654R (vuelta)•	CACAGGGTTGCTGAAGARTTTGT		1542-1564		
VP2F (ida)	GGTGGAATATCTCCTCAGTCTTTG	VP2-VP3	1485-1508	1090	55°C
VP1R (vuelta)	TCTCTACTGCAAGAGGAATGGG		2552-2574		
VP1IF (ida)	GAACACCYAGCGTTGACATMAATG	VP2-VP3	1666-1689	909	60°C
VP1R (vuelta)	TCTCTACTGCAAGAGGAATGGG		2552-2574		
2I (ida)♦	CCYGGCTCACCATCACARGCAG	VP1	2379-2400	989	58°C
2V (vuelta)♦	GCYGGRTCTTTYAAAAATTTGGTAC		3344-3367		
2II (internos)♦	GTTGCTGTGMGGGCDATGCCTGC		2748-2770		
2IV (internos)♦	TATGCTGTTGGYAGCACTGTYG		2980-3001		
BB.F1 (ida)	CATTGCAAATCCAGATACAGAG	2A-2B	3195-3216	590	58°C
BB.R1 (vuelta)	GAGCTCACGTCTTGCAATGGTC		3763-3784		
2BI17 (ida)	AGAAAGAAGGGTGTGTTGTGG	2B-2C	3658-3679	508	58°C
2CV18 (vuelta)	AGCATTCTYGCAAGCATCTCAG		4144-4165		
CCF1 (ida)	GATCCCACTCGTCTGAACCA	2C	4074-4094	963	60°C
CCR1 (vuelta)	GGGCTTTGCTGGCTTTGTTG		5017-5036		
F1-4666 (ida)	GAGAATTGCAGAGACGCCAG	2C-3A-3B	4666-4685	511	60°C
R1-5195 (vuelta)	GTCACGCACAAACAGGACAG		5195-5176		
3BI22 (ida)	ATTGARGARATYCTTGAGCC	3B-3C	4917-4937	668	50°C
3CV23 (vuelta)	CCTTTCAYARTCCAGCATC		5565-5584		
DD.F1 (ida)	AGCTAACATGGAATGGAAGGAC	3C	5087-5110	723	58°C
DD.R1 (vuelta)	GGATCTAAATGTGAGAGAGCAGCA		5786-5809		
3CI24 (ida)	ATSTGGTCTGGTGARTGYCTCC	3C-3D	5442-5463	873	58°C
3DV25 (vuelta)	AGCTGATCCTGTYTTCCAYCC		6294-6314		
EE.F1 (ida)	GTTGAAGGAATTGATGGCTTGG	3D	5976-5997	565	58°C
EE.R1 (vuelta)	CAAGGCGGTAAGTCTCGTCATC		6519-6540		
3DI26 (ida)	GATGTRGCAGGGTTTGGGCA	3D-NTR 3'	6216-6235	828	58°C
NTRV27 (vuelta)	AATGAACATRTCYCGCCACTCCTC		7020-7043		

Tabla 21. Descripción de los cebadores específicamente diseñados para la secuenciación del genoma completo de un aislado del PTV (CC25). Valores de T_m calculados según 2xAT+4xGC. ^a La posición corresponde con la posición en el genoma de la cepa F65 (nº de acceso *GenBank* NC_003985). ♦ Oligonucleótidos descritos en el apartado 3.4.1.1; • Oligonucleótidos diseñados por *Kaku y cols* (2007).

3.6 Purificación del ADN y secuenciación

Para la caracterización molecular, si los resultados eran satisfactorios (banda nítida a la altura deseada), dichos amplicones se enviaban a secuenciar utilizando los mismos cebadores de los ensayos de RT-PCR.

En el caso que fuera necesario, y sólo para mejorar la secuencia en su parte interna, dicha secuenciación se amplificaba con cebadores internos.

El ADN amplificado fue purificado con el *kit ExoSAP-IT (GE Healthcare)*. A continuación, se secuenció bidireccionalmente por técnicas automáticas usando un *kit dideoxy, Big Dye Terminator (versión 3.1) Cycle Sequencing Kit*, en un secuenciador *ABI 3730 XL DNA Analyzer*. Todo ello fue llevado a cabo por el servicio de secuenciación del CISA-INIA.

El análisis y ensamblaje de las secuencias fue realizado mediante los programas informáticos *Seqscape (Applied Biosystems)* y *SeqMan program (DNASTAR, Lasergene)*.

Posteriormente, las secuencias consenso obtenidas fueron utilizadas en análisis filogenéticos.

3.7 Análisis filogenéticos y filogeográficos

3.7.1 Análisis filogenéticos de la proteína VP1 del G⁰ *Teschovirus*: aislados porcinos españoles

Las secuencias nucleotídicas consenso obtenidas por análisis molecular de la proteína VP1 de los teschovirus, fueron alineadas manualmente siguiendo como modelo un alineamiento de 71 secuencias de teschovirus cedido por el *Dr. Roland Zöll*. Dicho alineamiento fue recortado con el fin de incluir únicamente la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína VP1 completa. Para evitar la ambigüedad de este alineamiento y preservar la información útil, las posiciones que contenían huecos (*gaps*) y regiones hipervariables fueron excluidas mediante un análisis por codones usando los parámetros por defecto del programa *GBlocks v0.91b (Castresana., 2000)*. La selección del mejor modelo de sustitución nucleotídica fue calculado mediante el programa *MrAIC (Nylander y cols., 2004)* de acuerdo a los criterios *AIC*, *AICc* y *BIC*. La reconstrucción filogenética se procesó a través del programa *Beast package v1.4.7 (Bayesian evolutionary analysis sampling trees)* (Drummond y cols., 2007). Este software nos permitió hacer una inferencia filogenética comparando dos modelos: reloj molecular estricto (*strict molecular clock*) y reloj relajado no correlacionado *lognormal (relaxed-clock uncorrelated lognormal)*. Las tasas medias de evolución de la VP1 en teschovirus (sustituciones nucleotídicas por sitio y año) y el ancestro común para el grupo de los teschovirus y sus dos principales clados (tiempo de divergencia) fueron estimados en base a la información temporal y espacial usando el método *Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC)* disponible en el programa *Beast*. El MCMC fue

ejecutado durante 30 millones de generaciones, tomando muestras cada 3000 generaciones. El árbol fue visualizado con el programa *TRACER v1.4* (Drummond y cols., 2007) y *FigTree v1.3.1* (<http://tree.bio.ed.ac.uk>).

3.7.2 Análisis filogenéticos de la proteína VP1 del G^o *Teschovirus*: aislados porcinos italianos

Para comparar dos metodologías filogenéticas similares, una basada en el análisis de secuencias parciales de VP1 descritas por *Sozzi y cols* (2011) y la otra en secuencias completas de VP1 obtenidas en esta tesis, se construyó un alineamiento compuesto por 90 secuencias nucleotídicas, que incluyó 28 secuencias italianas que codificaban para la VP1 completa, obtenidas exclusivamente para este fin, según la metodología descrita anteriormente (apartado 3.4.1.1 de esta sección). El árbol filogenético fue inferido usando el método *Neighbor-Joining*, la distancia evolucionaria fue calculada usando el método de sustitución nucleotídica *Kimura 2-parámetros* y el soporte de las ramas fue calculado utilizando un valor de *bootstrap* con 1000 réplicas (Guindon y Gascuel., 2003; Posada., 2008). Las posiciones que contenían *gaps* fueron eliminadas del análisis contribuyendo al mismo 774 posiciones. El análisis fue conducido y visualizado por el programa *MEGA 5.05* (Tamura y cols., 2011).

3.7.3 Análisis filogenéticos de la proteína VP1 de G^o *Teschovirus*: aislados de jabalíes

Las secuencias de teschovirus precedentes de jabalíes fueron analizadas mediante análisis bayesianos llevados a cabo con el programa *MrBayes 3.2* (Huelsenbeck and Ronquist., 2001; Ronquist y cols., 2012). El alineamiento se realizó manualmente incluyendo 140 secuencias publicadas en la base de datos de *Genbank*. El modelo de sustitución nucleotídica utilizado fue el GTR+G+I, con 4 categorías de gamma. La convergencia se logró con 700.000 generaciones ($\sigma^2 < 0.05$), tomando muestras cada 1000 generaciones y desechando el 25% de los árboles (*burn-in 250*). El árbol consenso fue visualizado con *FigTree v1.3.1* (<http://tree.bio.ed.ac.uk>).

El árbol filogenético para el G^o *Sapelovirus* fue inferido y visualizado usando el método de máxima verosimilitud implementado en *MEGA 5.05* (Tamura y cols 2011). La selección del mejor modelo de sustitución aminoacídica fue calculado mediante el programa *ProtTest 2.4 server* (Abascal y cols., 2005) eligiendo el JTT+I y el soporte de las ramas fue calculado utilizando un valor de *bootstrap* con 1000 réplicas (Guindon y Gascuel., 2003;

Posada., 2008). El alineamiento se realizó manualmente incluyendo 15 secuencias aminoacídicas publicadas en la base de datos de *Genbank*.

3.7.4 Análisis filogenéticos de la poliproteína (P1) del G^o *Teschovirus*: aislado CC25 (PTV-12)

El análisis se realizó a partir de 74 secuencias publicadas en la base de datos *Genbank*. Los 75 genomas fueron alineados con el programa *Clustal X 2.0.12* (Thompson y cols., 1997; Larkin y cols., 2007) siendo posteriormente recortado con el fin de obtener un alineamiento que englobará únicamente la secuencia de nucleótidos que codifica la poliproteína P1 completa. El árbol filogenético fue inferido y visualizado usando el método de máxima verosimilitud implementado en *MEGA 5.05* (Tamura y cols., 2011). La selección del mejor modelo de sustitución nucleotídica fue calculado mediante el programa *jModeltest* eligiendo el GTR+G+I, con 4 categorías de gamma y el soporte de las ramas fue calculado utilizando un valor de *bootstrap* con 1000 réplicas (Guindon y Gascuel., 2003; Posada., 2008).

4. MÉTODOS HISTOLÓGICOS

4.1 Preparación de las muestras para su estudio microscópico

Los órganos y tejidos recogidos en las necropsias programadas (apartado 6.2.3 de esta sección) fueron fijados con formol (formalina tamponada neutra al 10%) durante 48 h a T^a ambiente. A continuación fueron cortados y depositados en casetes, siendo posteriormente embebidos en parafina líquida formando bloques que serían cortados para obtener secciones de 3-4 μ m. Estas secciones fueron colocadas en portaobjetos y teñidas con hematoxilina-eosina (HE).

4.2 Inmunohistoquímica

Las secciones embebidas en parafina de la válvula ileocecal fueron sometidas a un desparafinado en xileno (4 x 5 min), seguido de una hidratación con etanol al 100% durante 5 min. Las peroxididasas endógenas fueron bloqueadas por tratamiento con metanol absoluto al 3% de H₂O₂ durante 30 min, rehidratando las muestras posteriormente con etanol. Las secciones fueron pretratadas con citrato de sodio 10 mM y pH 9.0, a 95-100°C durante 3 min. Una vez enfriadas las secciones fueron lavadas con H₂O destilada y TBS 1X para posteriormente ser incubadas con un suero de cabra (*Goat Serum S-1000, Vector Labs®*) diluido al 10% en TBS1X durante 30 min para bloquear la unión inespecífica de

inmunoglobulinas. Como anticuerpo primario se utilizó anticuerpos policlonales anti-PTV de conejo (sueros de referencia PTV1-7) y como anticuerpo secundario un anti-conejo de cabra biotinilado (*E0432, Dako®*) a una dilución 1:200.

La detección se realizó con estreptavidina ligada a peroxidasa y se reveló con el cromógeno carbazol. Finalmente las muestras fueron contrateñidas con HE y observadas al microscopio.

Los métodos histológicos fueron llevados a cabo por el servicio de anatomía patológica del CISA.

5. METODOLOGÍA ESPECÍFICA EMPLEADA EN LOS ESTUDIOS DE METAGENÓMICA

Los protocolos utilizados para la generación de los metagenomas virales se describen en *Thurber y cols (2009)* y *López-Bueno y cols (2009)*. El esquema del flujo de trabajo se detalla en la *figura 20*.

5.1 Preparación de las partículas víricas

5.1.1 Extracción de las partículas víricas a partir de heces porcinas

Una mezcla de 25 g de heces porcinas (apartado 5.1 de la sección “Materiales”) fue diluido 1:10 en PBS 1X conteniendo 0.75% (p/v) de albúmina bovina (*BSA, Sigma-Aldrich*) a un pH 7.2 (*Victoria., 2008*). Este tampón fue previamente filtrado empleando filtros de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0.22 μM (*Sartorius stedim biotech*). La muestra se procesó por duplicado, uniéndose ambas preparaciones al final, obteniendo un volumen aproximado de 500 ml.

La muestra así procesada se homogeneizó por agitación magnética constante durante 2 h, seguido de una clarificación inicial de forma progresiva por centrifugación, recogiendo el sobrenadante en cada etapa para aplicarlo a la siguiente, mediante el siguiente procedimiento: 1ª centrifugación a 1500 x *g* durante 5 min, 2ª centrifugación a 3000 x *g* durante 5 min, 3ª centrifugación a 7000 x *g* durante 15 min y 4ª centrifugación a 10000 x *g* durante 10 min.

Posteriormente se realizaron dos filtraciones manuales con jeringa (10 ml) usando secuencialmente filtros de 0.45 μM y de 0.22 μM de tamaño de poro (poliestersufona hidrofílica, *Pall Life Sciences*), con frecuentes cambios de filtro para evitar su colmatación. El volumen final fue aproximadamente de 300 ml.

5.1.2 Purificación y concentración de las partículas víricas

El método para purificar y concentrar las partículas víricas fue la ultracentrifugación en colchón de sacarosa. El colchón consistió en una solución de 1M Tris, 100 mM NaCl y 25% (p/v) de sacarosa, y se preparó en el momento de su uso, esterilizándose por filtración (filtros de 0.22 μ M de acetato de celulosa, *Sartorius stedim biotech*). En el fondo del tubo de centrifuga se depositó un volumen de 10 ml del colchón y sobre él, muy lentamente, se depositó el sobrenadante del paso anterior hasta completar un volumen de 35 ml por tubo de ultracentrífuga. En paralelo se procesó de igual manera agua desionizada (MilliQ) estéril (preparación de control o “blanco”). Los tubos así preparados fueron sometidos a ultracentrifugación (rotor SW28) a 65.000 x *g* durante 16 h a 4°C. Finalizado el proceso, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento usando 1 ml de tampón 20mM Tris a pH 7.5 previamente esterilizado por filtración (0.22 μ M de tamaño de poro, poliestersufona hidrofílica, *Pall Life Sciences*). Al final del proceso se obtuvo un volumen de 2 ml de concentrado de partículas víricas y 1 ml de preparación de control.

5.1.3 Eliminación de ácidos nucleicos contaminantes

5.1.3.1 Tratamiento con nucleasas

Para eliminar ácidos nucleicos contaminantes no encapsidados, las preparaciones se sometieron a un tratamiento específico con nucleasas: 500 U/ml DNasa I, 10 μ g/ml RNasa A, 100 U/ml nucleasa S7 (*Roche*) (*Tabla 23*). Para el correcto funcionamiento de estas nucleasas se preparó un tampón 10X como se detalla en la *tabla 22*. Las muestras tratadas se incubaron 30 min a 37 °C. Las nucleasas se inactivaron tratando con 12 mM EDTA pH 8 (*Merck*) y 2 mM EGTA pH 8 (*Sigma*) en hielo durante 5 minutos. A continuación se trató con Proteinasa K 200 μ g/ml (*Qiagen*) y SDS 0,5% (*BioRad*) durante 1h a 45°C.

BUFFER	ALMACENAMIENTO	CONCENTRACIÓN FINAL	FUNCIÓN	EN 2 ML
Buffer (nucleasas)	400mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM NaCl, 60mM MgCl ₂ y 10 mM CaCl ₂ (10x)	40mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM NaCl, 6mM MgCl ₂ y 1mM CaCl ₂ (1x)	Necesario para la actividad enzimática de las nucleasas	200 μ l

Tabla 22. Resumen del almacenamiento y concentraciones del tampón requerido en el tratamiento con nucleasas.

NUCLEASA	VIALES	ALMACENAMIENTO	VOLUMEN	TRATAMIENTO	EN 2 ML
DNasa I recombinante grado I	10000 U (2 viales)	100 U/μl (resuspender en 100 μl de <i>buffer</i> Tris 20mM y MgCl ₂ 1mM pH 7.5)	10 μl y 15 μl (-80°C) de 100 U/μl	500 U/ml	10 μl
RNasa A	25 mg (actividad endonucleasa >50 U/mg Lyo)	100 μg/μl (resuspender en 250 μl de <i>buffer</i> 10 mM Tris-HCl pH 7.5 y 15mM NaCl, 100°C durante 15 min y enfriar a T ^a ambiente)	20 μl (-20°C) de 10 μg/μl	10 μg/ml	2 μl
Nucleasa S7	21.270 U/mg (actividad específica del liofilizado)	212.7 U/μl (resuspender en 100 μl de <i>buffer</i> Tris 20mM y MgCl ₂ 1mM pH 7.5)	10 μl y 15 μl (-80°C) de 212.7 U/μl	100 U/ml	1 μl (aprox.)

Tabla 23. Resumen de la reconstitución, almacenamiento y concentraciones de las nucleasas requeridas.

5.2 Purificación de los ácidos nucleicos: viroma ADN y viroma ARN

Se procedió a dividir la preparación en 2 alícuotas destinadas a la obtención de ADN vírico (“*viroma ADN*”) y otras 2 alícuotas para ARN vírico (“*viroma ARN*”). Se almacenó a -80°C una alícuota de respaldo de cada tipo (la muestra “*viroma ARN*” fue previamente mezclada con 3 volúmenes de Trizol). La preparación “blanco” fue procesada y almacenada del mismo modo.

5.2.1 Purificación y cuantificación de ADN vírico (*viroma ADN*)

Para purificar el ADN de la preparación se empleó el método del fenol-cloroformo-isoamílico (Maniatis y cols., 1982). El ADN así purificado fue precipitado en presencia de etanol-acetato sódico como se describe en Maniatis y cols (1982), empleando glicógeno de ostra (*Roche*) como *carrier* (evitando así el uso de carriers basados en ácidos nucleicos, que interferirían en el análisis metagenómico), a una concentración de 20 μg/μl, suficiente para precipitar pequeñas cantidades de ADN ó ARN. El glicógeno fue tratado con nucleasas con el fin de evitar la contaminación con los ácidos nucleicos preexistentes en el mismo. Se resuspendió el sedimento en 15 μl de Tris 10 mM, esterilizado por filtración (filtro de 0.22 μm *Pall Life Sciences*). El ADN vírico de la preparación anterior se cuantificó espectrofotométricamente (*NanoDrop 1000 Spectrophotometer*).

Con el fin de mejorar la pureza de la preparación de ADN vírico, parte de la misma se volvió a precipitar, guardando el remanente a -70°C. El sedimento fue resuspendido en 30 μl de Tris 10 mM previamente filtrado en filtros de 0.22 μm y cuantificado de nuevo por

espectrofotometría (*NanoDrop 1000 Spectrophotometer*). La concentración de ADN de la muestra enviada a secuenciar fue de 668.6 ng/μl, con una relación de absorbancias 280/260 nm de 1.89.

5.2.2 Purificación de ARN viral (*viroma ARN*)

El ARN de la muestra se sometió a extracción con Trizol siguiendo el protocolo descrito en el *kit TRIzol@LS Reagent (Invitrogen)* y usando 20 μg de glicógeno de ostra como *carrier*. Finalmente, se resuspendió en 30 μl Tris 10 mM previamente esterilizado por filtración (0.22 μm de poro) y se incubó en un termobloque durante 13 min a 57.5°C. Para evitar su degradación a causa de la presencia de ribonucleasas, la preparación fue tratada con 20 U de inhibidor recombinante de RNasas (*RNasa OUT*, 40 U/ μl, *Sigma*) calentándose a 50°C durante 10 min. El RNA resultante se preservó a -70°C.

Debido a que el sistema de purificación del ARN empleado (Trizol) no es suficientemente selectivo, pudiendo existir trazas de ADN en la preparación de ARN obtenida, se realizó un tratamiento con 10 U de DNasa I recombinante libre de RNasas (*Roche*) en el tampón suministrado por el fabricante, incubando durante 10 min a T^a ambiente e inactivando a continuación la enzima con 8 mM EDTA. Para evitar la interferencia del EDTA en el proceso posterior de retrotranscripción, el ARN resultante se precipitó (descripción en apartado 5.2.1), y resuspendió en 20 μl de agua estéril libre de ARN-ADN.

5.3 Amplificación al azar de ARN viral por *amplificación con un único oligonucleótido e independiente de secuencia (SISPA)*

Con el fin de amplificar el material obtenido para cumplir con los requerimientos de muestra del análisis metagenómico se realizó una amplificación no selectiva de ácidos nucleicos usando un único oligonucleótido, que da como resultado fragmentos de ADNc con un tamaño y secuencias heterogéneos (Reyes y Kim., 1991). Para ello, se utilizó el *kit Superscript™ III First-Strand Synthesis System* para RT-PCR (*Invitrogen*).

Como controles del proceso se utilizaron: la muestra “blanco” llevada en paralelo, un control positivo de reacción (10 ng de ARN de una línea celular humana, *HeLa*) y un control negativo de reacción consistente en agua desionizada (Milli-Q) estéril.

NOMBRE	SECUENCIA (5'→3')	Tm(°C)	TAMAÑO
FR26RV-N	GCCGGAGCTCTGCAGATATCNNNNNN	-	-
FR20RV	GCCGGAGCTCTGCAGATATC	65	-

Tabla 24. Cebadores para SISPA.

Para la amplificación SISPA se procedió en los siguientes pasos:

- ❖ **Síntesis de la primera hebra de ADN complementario (ADN_c):** 1 µl de ARN vírico fue usado como molde para la retro-transcripción. La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 10 µl que contenía: 0.5 µM del primer FR26RV-N purificado por HPLC (*Tabla 24*), 1 mM de dNTPs y agua libre de RNasas y DNasas. El termociclador fue precalentado hasta alcanzar 65°C y la mezcla incubada durante 5 min. Tras dos min en hielo se añadieron 10 µl de: 1X RT *buffer*, 5 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 2 U inhibidor recombinante de RNasas y 10 U de transcriptasa reversa *Superscript III* y se incubaron consecutivamente 10 min a 25°C, 60 min a 50°C y 3 min a 94°C. A continuación la preparación se mantuvo en hielo (4°C). Al final del proceso, el ARN vírico se transformó en ADN complementario de cadena sencilla (ADN_cs).
- ❖ **Eliminación del ARN molde:** Para aumentar la sensibilidad de la amplificación se eliminó el ARN que no se había retro-transcrito de la muestra de ADN_c. Para ello se añadió 1U de RNasa H (*Invitrogen*) y se incubó durante 3 min a 94°C.
- ❖ **Síntesis de la segunda hebra de ADN complementario (ADN_c):** En la reacción de síntesis de la 2ª hebra de ADN_c se empleó el cebador restante de la reacción de retro-transcripción y 2.5 U de la polimerasa *Klenow Fragment exo⁻ 3'→5'* (*Biolabs*). A continuación se incubó 1 h a 37°C y 10 min a 75°C. Así, el ADN_cs pasó a ADN_c de cadena doble (ADN_{cd}).
- ❖ **Amplificación del ADN_c de doble cadena:** Aprovechando la incorporación al azar del oligonucleótido FR26RV-N durante los pasos de ARN a ADN_cs y posteriormente a ADN_{cd}, se utilizó el oligonucleótido FR20RV para su amplificación inespecífica. Para ello, se utilizó el *kit Expand High Fidelity PLUS PCR System (Roche)* que incluye una polimerasa de muy alta fidelidad, en la amplificación del ADN_{cd}. La mezcla de reacción se preparó en un volumen de 50 µl conteniendo: 5 µl de ADN del paso anterior, 0.2 mM dNTPs, 0.8 µM cebador universal FR20RV (*tabla 24*), 2.5 mM MgCl₂, 1X *buffer* sin MgCl₂, 2.5 U de la mezcla de enzimas *Expand High Fidelity*. El programa de incubación en este paso fue: 2 min a 94°C, 40 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 65°C y 2 min y 30 s a 72°C y finalmente 7 min a 72°C.

❖ **Purificación:** Los amplicones obtenidos en el paso anterior se sometieron a una purificación por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5% (*Invitrogen*) con BrEt (*Amresco®*) empleando el *kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)* siguiendo el protocolo detallado por el fabricante (*Figura 18*). Brevemente, se aplicó al gel (pocillos grandes) 60 µl del producto amplificado tras electroforesis lenta y se recortó el *smear* obtenido entre 0.5-3 kb, del cual se extrajo el ADN mediante el kit mencionado, cargando la misma columna hasta un número máximo de 7 veces con el fin de concentrar la muestra. Para mejorar la purificación y eliminar restos de agarosa, los lavados con los tampones específicos se repitieron 2 veces. Finalmente, el producto purificado fue eluído en agua estéril libre de RNasas y DNasas, y cuantificado por espectrofotometría (*NanoDrop 1000 Spectrophotometer*). La concentración de ADN en la muestra enviada fue de 150 ng/µl, con una relación de absorbancias 260/280 de 1.80.

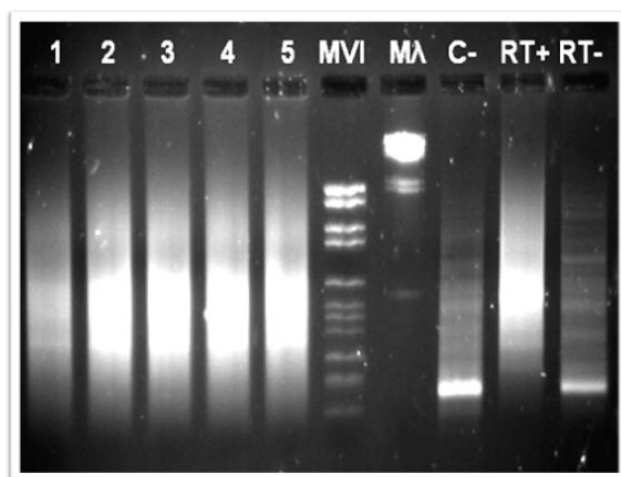


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5% con BrEt de 5 reacciones procedentes de la amplificación del ADNc de doble cadena (1-5). C-: control negativo del proceso; RT+: ADN procedente de la línea celular humana, HeLa; RT-: control negativo de reacción consistente en agua desionizada (Milli-Q) estéril.

5.4 Visualización del ADN viral

1 µl de cada preparación de ADN (tanto procedente de virus ADN como de virus ARN) se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2% (*Agarose MP, Roche*) con BrEt (*Amresco®*) siguiendo el procedimiento habitual (apartado 3.5 de esta sección) (*Figura 19*)

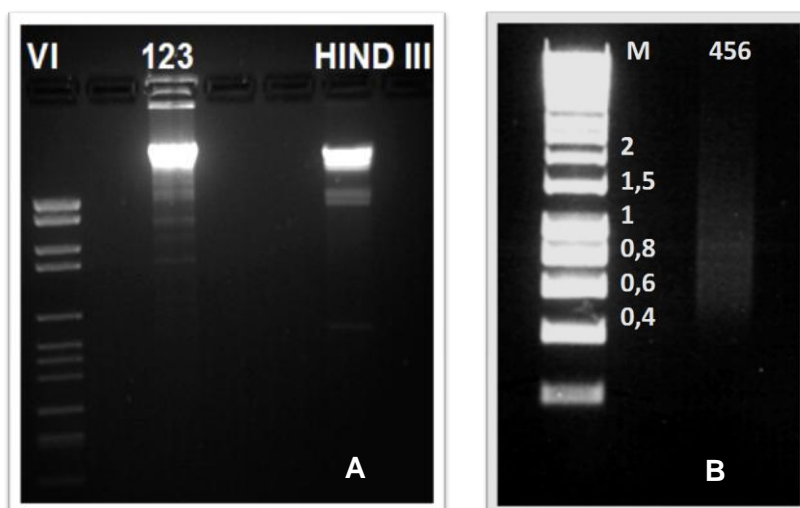


Figura 19. A) Electroforesis en gel de agarosa al 2% con BrEt de 1 μ l de la muestra “viroma ADN”. B) Electroforesis en gel de agarosa al 2% con BrEt de 1 μ l del producto purificado de la muestra “viroma ARN”.

5.5 Control de presencia de secuencias contaminantes de genomas eucariotas, bacterianos y de secuencias virales específicos en las preparaciones

Tres diluciones decimales de cada preparación fueron analizadas para examinar la presencia de virus pertenecientes a distintas familias (*Tabla 25*) con el fin de comprobar la eficacia del proceso y la conservación de la diversidad vírica antes de enviar las muestras a análisis por pirosecuenciación.

Para ello se emplearon los protocolos de PCR citados en la *tabla 25* y se eliminó el paso de retrotranscripción en el protocolo de RT-PCR para los virus ARN.

CONTROLES DEL PROCESO		REFERENCIA
Análisis de virus ADN (Muestra ADN)		
Fam <i>Circoviridae</i>	Circovirus porcinos (tipo I y II)	Agüero y cols (2000ab)
Fam <i>Adenoviridae</i>		
• G ^o <i>Mastadenovirus</i>	Adenovirus porcino	Maluquer de Motes y cols (2004)
Fam <i>Asfaviridae</i>		
• G ^o <i>Asfivirus</i>	Virus de la peste porcina africana	Agüero y cols (2003)
Análisis de virus ARN (Muestra ARN)		
Fam <i>Picornaviridae</i>		
• G ^o <i>Enterovirus</i>	Sapelovirus porcino	Apartado 3.3.3.3
• G ^o <i>Teschovirus</i>	Teschovirus porcino	Cano-Gómez y cols (2011a)
• G ^o <i>Kobuvirus</i>	Kobuvirus porcino	Reuter y cols (2009)
Análisis para ADN procariota y eucariota		
β -actina		Toussaint y cols (2007)
16S ribosomal		Lane y cols (1991)

Tabla 25. Técnicas moleculares empleadas en el proceso de control viral de las muestras finales en metagenómica.

5.5.1 Control de la diversidad vírica y de la contaminación genómica y bacteriana

La eficacia del proceso de purificación de genomas virales quedó de manifiesto por la escasa amplificación de ADN de origen procariótico y eucariótico. El análisis de la presencia de virus ADN en la muestra *viroma ADN* mediante PCR específicas confirmó la presencia de adenovirus y circovirus porcinos. Por otro lado, la PCR para el virus de la PPA fue negativa. El análisis de la presencia de virus ARN en la muestra *viroma ARN* mediante PCR específicas confirmó la presencia de teschovirus y sapelovirus porcinos. Por otro lado, la PCR específica para kobuvirus porcino fue negativa.

5.6 Pirosecuenciación y análisis metagenómico

Las preparaciones descritas fueron enviadas a un servicio externo (*Lifesequencing S.L.*, Paterna, Valencia), donde se llevó a cabo el proceso de secuenciación masiva (pirosecuenciación) en el secuenciador *Genome Sequencer FLX (454-Roche)*. Brevemente, el proceso se basa en realizar una amplificación clonal de cada fragmento de ADN, previamente anclado a nanoesferas. Esta amplificación se lleva a cabo en microgotas de aceite donde se desarrolla una PCR en emulsión de las hebras de ADN acopladas a nanoesferas. Cada una de estas nanoesferas, con las secuencias amplificadas, se introduce en nanopocillos junto a los nucleótidos y las enzimas pertinentes.

Al unirse cada uno de los nucleótidos a la secuencia amplificada emite un pirofosfato, que reacciona con la luciferasa emitiendo un haz de luz. La intensidad del haz de luz es distinta para cada uno de los nucleótidos, lo cual permite conocer la composición de la secuencia y compararlo con las secuencias existentes en las bases de datos.

5.7 Análisis de las secuencias

Las secuencias obtenidas por secuenciación masiva (apartado 5.6) fueron analizadas en la plataforma de análisis de metagenomas *MG-RAST* (<http://metagenomics.anl.gov>).

Las secuencias se compararon con distintas bases de datos que incluyen *SEED*, *M5R* y *Genbank* usando como parámetros, un valor ϵ máximo de $1e^{-5}$, una identidad mínima del 60 % y una longitud mínima de 15 aminoácidos y nucleótidos alineados. La asignación taxonómica se basó en la mejor similitud encontrada. Además, para evaluar el grado de contaminación de ADN bacteriano, las secuencias se compararon con las bases de datos de ARN ribosómico (*greengenes*, *LSU* y *SSU*) usando los mismos parámetros y

valores descritos anteriormente para la asignación taxonómica. Para estos análisis no se tuvieron en cuenta los valores de calidad. Las secuencias repetidas se filtraron a través del programa *cdHIT* (<http://weizhong-lab.ucsd.edu>) usando los parámetros por defecto.

Las secuencias de los viomas de ARN fueron recortadas en 26 nucleótidos en los extremos 3' y 5' utilizando herramientas disponibles en *Galaxy* (<https://main.g2.bx.psu.edu/root>). Este procesado se llevó a cabo con el fin de eliminar la secuencia del oligonucleótido (FR26R-N) utilizado en el proceso de amplificación. Las secuencias procesadas fueron ensambladas con *CLC Genomics Workbench Trial v.5.0* (www.clcbio.com/products/clc-genomics-workbench), usando una identidad mínima del 98 % y una longitud de secuencia del 80%. La identidad de los *contigs* ensamblados fue analizada mediante los programas *Blastn* y *Blastx* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).

Finalmente, los *contigs* que incluían regiones comunes de la VP1 y VP2 de la familia *Reoviridae* (género *Rotavirus*) fueron alineados mediante el programa *ClustalW2* (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2) usando como referencia secuencias depositadas en *Genbank* (Rotavirus de cerdo serogrupos A y C).

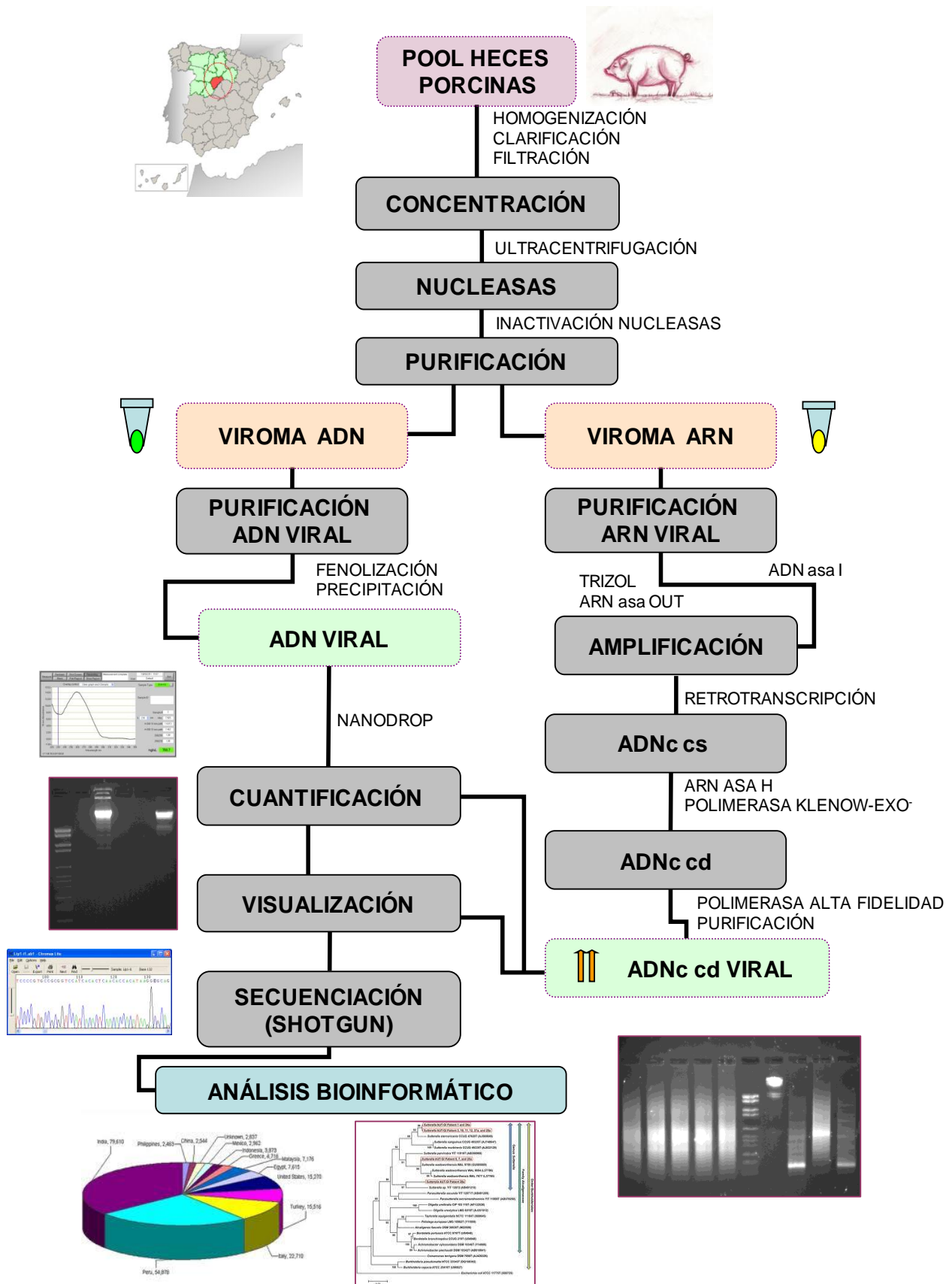


Figura 20. Esquema del flujo de trabajo en metagenómica en esta tesis.

6. ENSAYOS *IN-VIVO*: EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

6.1 Aspectos generales de la experimentación animal realizada

Todos los ensayos que implicaron experimentación animal se realizaron conforme a la legislación vigente y en particular, de acuerdo al *Real Decreto 1201/2005*, del 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, y la *Ley 32/2007*, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio; y fueron aprobados por los *Comités de Ética y Bienestar Animal* del INIA (Ref. 2011-012).

Todas las experiencias *in-vivo* se llevaron a cabo en las instalaciones del animalario de alta seguridad biológica (NCB-3) del CISA-INIA, alojando a los animales en boxes separados (grupo control y grupo inoculado) para evitar el contacto entre ellos, siguiendo los protocolos de bioseguridad establecidos en el centro y la normativa de bienestar animal. Además se tuvo en cuenta la *Decisión 2008/650/CE* de la Comisión, de 30 de julio de 2008, que modifica el anexo I de la *Directiva 82/894/CEE* del Consejo relativa a la notificación de las enfermedades de los animales, incluyendo ciertas enfermedades en la lista de enfermedades de declaración obligatoria y eliminando de la lista a la **encefalomielitis enterovírica porcina** (enfermedad de Teschen-Talfan).

Para la realización de las inoculaciones experimentales se seleccionaron 9 cerdos (raza *minipig* - cerdo de *Sach*) del núcleo genético de cría de animales de experimentación CTT “*La Chimenea*” perteneciente al *Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario* (IMIDRA). Los animales tenían una edad entre 3 y 4 meses, un peso medio de 20 kg y aproximadamente el 50% eran hembras y el otro 50% machos (*Tabla 26*). En las experiencias realizadas se realizó un control diario de los signos clínicos de enfermedad incluyendo una toma diaria de la temperatura rectal.

CERDOS MINIPIG				
CROTAL	F.NACIMIENTO	HAPLOTIPO	SEXO	KG
3201	06/07/2011	AAxAC	H	16,5
3202	06/07/2011	AAxAC	H	17
3208	09/07/2011	AAxAD	M	23
3217	10/07/2011	CCxAD	H	21
3218	10/07/2011	CCxAD	H	21
3219	10/07/2011	CCxAD	M	18
3220	10/07/2011	CCxAD	M	18,5
3221	10/07/2011	CCxAD	M	22
3232	15/07/2011	DDxAD	M	21,5



Tabla 26. Características de los animales utilizados en las inoculaciones experimentales.

Figura 21. Alojamiento en las instalaciones del animalario de alta seguridad biológica NSB-3 del CISA.

6.2 Estudio del tropismo y la patogenicidad de 1 nuevo serotipo del G⁰ Teschovirus (aislado CC25) en la especie de destino (Cerdo de Sach (Minipig))

6.2.1 Inoculación

Con el fin de reproducir lo más fielmente posible la transmisión natural de la infección, 6 cerdos fueron inoculados por vía oral (V.O) con una dosis de 3 ml de virus infectivo (aislado CC25) a un título aproximado de $10^{7.0}$ DICT₅₀/ml. El aislado CC25 (serotipo 12) fue propagado en cultivo de células IBRS-2 como se detalla en el apartado 1.2, siendo el inóculo usado un 5^o pase en cultivo celular. En paralelo y como grupo control, 3 cerdos fueron inoculados por vía oral con una dosis de 3 ml de sobrenadante de cultivo celular de la línea celular IBRS-2.

6.2.2 Control previo: análisis serológicos y moleculares

Estudios moleculares genéricos por RRT-PCR para el G⁰ *Teschovirus* detectaron en casi todas las heces de los animales testados material genético. Ante la imposibilidad de encontrar explotaciones negativas a PTV, debido a la alta prevalencia del mismo, los animales fueron seleccionados en función de sus datos serológicos. Para ello, sueros recogidos de los animales de estudio fueron enfrentados a los siguientes aislados: CC25 (serotipo 12), CC77 (serotipo 2) y 1626/89 (serotipo 1) con el fin de seleccionar animales con serología negativa.

Por lo tanto, el grupo de estudio seleccionado tuvo serología negativa, siendo positivos a PTV en las pruebas moleculares.

6.2.3 Recogida y procesamiento de las muestras

En la recogida de las muestras fue necesario implementar un protocolo de tranquilización de los animales. Las sedaciones se llevaron a cabo con Tiletamina-Zolazepam (*Zoletil 100®*) a una dosis de 5-10 mg/kg junto con sulfato de atropina (*Atropina®*) por vía intramuscular a dosis de 0.4 mg/kg.

La duración del experimento fue de 21 días a partir de la inoculación, recogiendo muestras de sangre (vena yugular), suero, hisopo oral y heces a tiempos determinados (0, 2, 4, 7, 10, 14, 17 y 21 días post-infección). Todas estas muestras fueron procesadas como se detalló en el apartado 1.1 y 2.1 de métodos virológicos y serológicos respectivamente. Los ácidos nucleicos extraídos de sangre, hisopo oral y heces fueron analizados por RRT-PCR de teschovirus (apartado 3.3.1 de esta sección).

Los sueros fueron analizados usando la técnica de seroneutralización frente al virus CC25 (apartado 2.2, métodos serológicos).

Se programaron 2 necropsias a 14 dpi y 21 dpi con el fin de conocer el tropismo y la patogenicidad del aislado estudiado y 1 necropsia de un animal control a 21 dpi. En las necropsias se tomaron muestras de los siguientes órganos: cerebro (región: diencéfalo), cerebelo, bulbo raquídeo, médula espinal cervical, estómago, duodeno, íleon (región: placas de peyer), colón, ganglios mesentéricos (en ocasiones cercanos a unión ileocecal), tonsila, ganglio linfático submandibular, bazo, hígado, pulmón, páncreas y riñón.

La eutanasia de los animales fue llevada a cabo con pentobarbital sódico (*Dolethal®*) a una dosis teórica de 200 mg/kg por vía intravenosa (según recomendación de la *Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio, SECAL*).

Cuatro cerdos inoculados con CC25 y dos cerdos control fueron reservados sin eutanasiar para el siguiente experimento (apartado 6.3 de esta sección).

6.3 Estudio de protección cruzada heteróloga conferida por una infección previa por el aislado CC25, serotipo 12 frente a una infección posterior por el aislado *Teschen-Tirol*, serotipo 1

6.3.1 Inoculación

Cuatro cerdos previamente inoculados con el aislado CC25 (serotipo 12) (apartado 6.2), fueron desafiados con una dosis de 3 ml de virus infeccioso (*Teschen-Tirol*) a un título aproximado de $10^{7.0}$ DICT₅₀ /ml por vía oral. La cepa *Teschen-Tirol* (serotipo 1) fue propagada en PS-EK como se detalla en el apartado 1.2 (se desconoce el historial de pases de esta cepa).

En paralelo y como grupo control de virulencia del virus *Teschen-Tirol*, dos cerdos que habían sido mantenidos como controles en el experimento anterior (apartado 6.2) fueron inoculados por V.O con una dosis de 3 ml y un título aproximado de $10^{7.0}$ DICT₅₀/ml.

6.3.2 Recogida y procesamiento de las muestras

La duración del experimento fue de 21 días a partir de la 2^o inoculación, recogiendo muestras de sangre (suero) de la vena yugular, a tiempos concretos (0, 2, 4, 7, 10, 14, 17 y 21 días post-infección). Los sueros fueron analizados usando la técnica de seroneutralización frente al aislado CC25 y *Teschen-Tirol* (apartado 2.2, métodos serológicos). Una vez finalizado esos 21 días los animales fueron sacrificados como se detalla en el apartado 6.3.2.

RESULTADOS

1. Determinación de la naturaleza de los virus entéricos porcinos no vesiculares citopáticos aislados (VEP-NVC)

1.1 Estudios sobre virus entéricos porcinos no vesiculares citopáticos en España

Partiendo de **216** aislados víricos procedentes del programa de serovigilancia epidemiológica del virus de la enfermedad vesicular porcina (EVP) llevado a cabo en el territorio nacional, y que habían resultado negativos a la RT-PCR para el virus de la EVP (sección “Objetivos”), se inició un análisis cuyo objetivo principal fue la identificación de esos aislados empleando para ello técnicas de PCR y RT-PCR específicas para la detección de diferentes virus entéricos porcinos capaces de producir ECP (*Figura 22*).

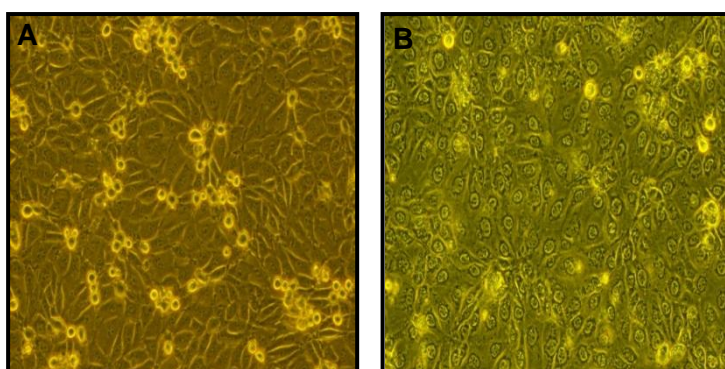


Figura 22. Imágenes de cultivos celulares (IBRS-2) que presentan efecto citopático (ECP):

A) ECP típico de virus del G⁰ *Teschovirus*, *Sapelovirus* y *Enterovirus-B*, donde las células infectadas se tornan refringentes y redondeadas

B) ECP típico de ciertos aislados del G⁰ *Teschovirus*, con engrosamiento de la membrana nuclear y rotura de la membrana citoplasmática.

La especificidad intrínseca de las técnicas de detección molecular (descritas en sección métodos de RT-PCR y PCR para la detección de genoma vírico, apartados 3.3.1, 3.3.4, 3.3.5 y 3.3.7) llevadas a cabo a lo largo de este estudio fue evaluada mediante el análisis de los ácidos nucleicos extraídos de sobrenadantes de cultivo infectados con las diferentes cepas virales de referencia, como se detalla en la *Tabla 27*.

VIRUS	AISLADO	SEROTIPO	RRT-PCR ¹	RT-PCR ²	RT-PCR ³	PCR ⁴
Teschovirus	PS34	PTV-1	+	+(163)	-	-
	O3b	PTV-2	+	+(163)	-	-
	O2b	PTV-3	+	+(163)	-	-
	PS 36	PTV-4	+	+(163)	-	-
	F 26	PTV-5	+	+(163)	-	-
	PS 37	PTV-6	+	+(163)	-	-
	WR2	PTV-7	+	+(163)	-	-
	UKG 173/74	PTV-8	+	+(163)	-	-
	Vir 2899/84	PTV-9	+	+(163)	-	-
	12/15 Ge	PTV-10	+	+(163)	-	-
	Dresden	PTV-11	+	+(163)	-	-
Sapelovirus	PS-27	PSV	-	+(180)	-	-
Enterovirus-B	UKG/410/73	PEV-B1	-	-	+(169)	-
	LP54/UK/75	PEV-B2	-	-	+(169)	-
Adenovirus	030-PDV	PADV-5	-	-	-	+(612)

Tabla 27. Resumen de la especificidad de las distintas RT-PCR y PCR empleadas en el estudio. RRT-PCR¹: RT-PCR en tiempo real para PTV; RT-PCR²: RT-PCR convencional múltiple para PSV y PTV; RT-PCR³: RT-PCR convencional para PEV-B; PCR⁴: PCR convencional para PAD. Entre paréntesis se detalla el tamaño de la banda observada para cada PCR convencional.

Para poder realizar el estudio, se planificó la aplicación seriada de estas herramientas de la siguiente manera:

- Inicialmente se aplicó a las muestras una RT-PCR en tiempo real específica para el G^o *Teschovirus* (Jiménez-Clavero y cols., 2003). De las 216 muestras examinadas por esta técnica, **105** resultaron positivas, lo que suponía que el **48.6 %** de los aislados víricos sometidos a estudio eran teschovirus.
- Seguidamente se ensayó una RT-PCR convencional múltiple que era capaz de diferenciar entre los géneros *Teschovirus* y *Sapelovirus* (Palmquist y cols., 2002). De las 216 muestras examinadas, **56** fueron positivas para teschovirus (**26%**) y **20** para sapelovirus (**9.3 %**), sin llegarse a detectar ninguna coinfección.
- En tercer lugar, se usó una RT-PCR convencional específica para el G^o *Enterovirus-B* porcino (Muscillo y cols., 1997; La Rosa y cols., 2006), sin obtener resultados positivos para enterovirus-B en ningún caso.
- Finalmente, una RT-PCR convencional anidada específica para el G^o *Adenovirus* porcino (Maluquer de Motes y cols., 2004), que detectó **7** muestras positivas (**3.2%**). Una de las muestras fue positiva para PTV y para PAD, lo que sugiere una coinfección en dicha muestra.

Los resultados indicaban que la prevalencia mayor recaía en el G^o *Teschovirus*, seguido de los géneros *Sapelovirus* y *Adenovirus* (Figura 23).

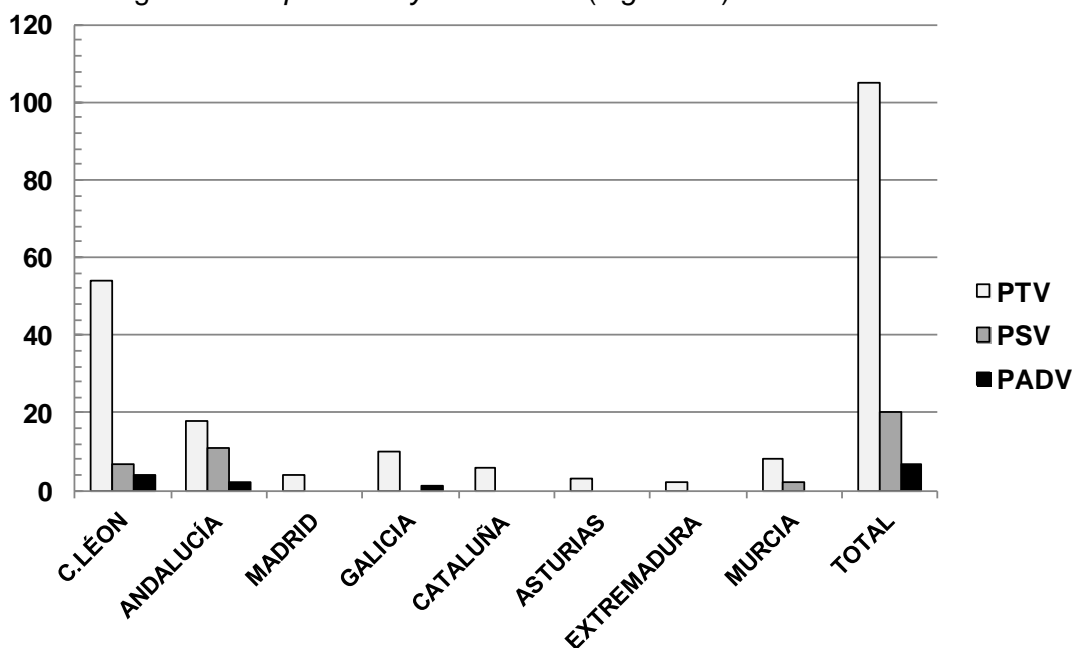


Figura 23. Gráfica representativa de la distribución geográfica de los 3 géneros de virus entéricos porcinos detectados en el estudio.

No se observó ningún signo de enfermedad asociado con la presencia de estos virus citopáticos. Por lo tanto, los individuos infectados deben ser considerados portadores asintomáticos.

En resumen, este estudio, focalizado principalmente en las familias *Picornaviridae* y *Adenoviridae*, determinó la naturaleza de **132** virus entéricos porcinos (**61.1% de total**). Sin embargo, **85** aislados no pudieron ser identificados (**38.9%**) (*Figura 24*) con las herramientas moleculares utilizadas. De ellos, 34 aislados fueron ensayados para el virus de la diarrea vírica epidémica (*Fam. Coronaviridae*) (apartado 3.3.9 de métodos moleculares), obteniéndose en todos los casos resultados negativos (Ben Salem y cols., 2010). El resto (n=51) no pudieron ser analizados por agotamiento o pérdida de las muestras.

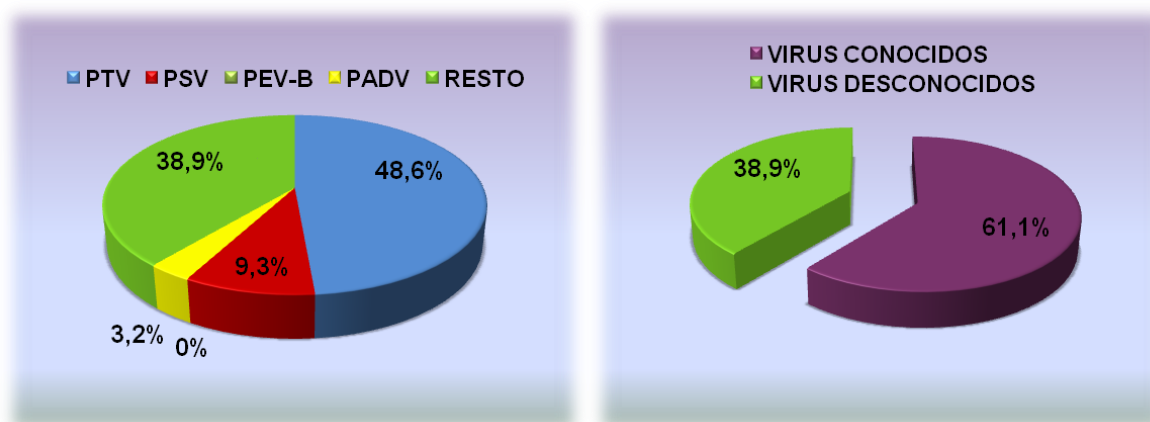


Figura 24. Gráficas representativas de los porcentajes de virus entéricos porcinos conocidos y desconocidos

La distribución geográfica de estos 132 virus entéricos identificados a nivel de género comprende ocho de las diez Comunidades Autónomas (CC.AA) estudiadas: Andalucía, Castilla y León, Madrid, Galicia, Cataluña, Extremadura, Murcia y Asturias (*Figura 22*).

La mayor parte de estos resultados han sido publicados por *Buitrago y cols* (2010).

1.2 Validación de la RT-PCR en tiempo real para detección molecular de todos los serotipos conocidos de teschovirus

Todas las pruebas se desarrollaron según el protocolo descrito en el apartado 3.1.1 de métodos moleculares.

1.2.1 Determinación de la especificidad analítica

Con el objetivo de conocer la especificidad del ensayo y estudiar posibles falsos positivos se analizaron los virus de referencia, crecidos en cultivo celular, representativos de los 11 serotipos de PTV, y una selección de 11 virus porcinos, que podrían ser similares

estructuralmente, estar presentes en el mismo tipo de muestras o producir sintomatología parecida a la causada por el G⁰ *Teschovirus*. Entre ellos se ensayaron 3 géneros pertenecientes a la familia *Picornaviridae* como *Sapelovirus*, *Enterovirus* y *Aftovirus* y otras especies víricas de importancia en el ganado porcino (*Tabla 28*). La integridad de los ácidos nucleicos de los virus ensayados se comprobó por la amplificación de dichas muestras con sus RT-PCR y PCR específicas.

Los resultados del ensayo de especificidad analítica confirmaron que la RRT-PCR es específica para el G⁰ *Teschovirus* y todos sus serotipos, no amplificando el material genético del resto de los virus ensayados (*Tabla 28*).

Por último, se analizaron los ácidos nucleicos obtenidos de las líneas celulares no infectadas (PK-15 y IBRS-2), las mismas empleadas para el crecimiento viral de las cepas de referencia de teschovirus, sin detectarse señal de fluorescencia en los ensayos de RRT-PCR.

VIRUS	SEROTIPO	AISLADO	RRT-PCR (Ct)
PTV	PTV-1	PS34	28,27
"	PTV-2	O3b	24,28
"	PTV-3	O2b	23,62
"	PTV-4	PS 36	23,49
"	PTV-5	F 26	24,04
"	PTV-6	PS 37	25,80
"	PTV-7	WR2	23,23
"	PTV-8	UKG 173/74	23,87
"	PTV-9	Vir 2899/84	25,63
"	PTV-10	12/15 Ge	27,21
"	PTV-11	Dresden	26,47
PSV	PSV-1	PS-27	No Ct
PEV-B	PEV-B1	UKG/410/73	No Ct
"	PEV-B2	LP54/UK/75	No Ct
VEVP	-	UKG/27/72	No Ct
VFA	FMDV-O	O1/Campos/BRA 1/58	No Ct
VPPC	-	Alfort 187	No Ct
PADV	PADV-5	030-PDV	No Ct
ADV	-	Phylaxia	No Ct
VEV	Indiana	Colorado/42	No Ct
PRRSV	-	5710	No Ct
PCV	PCV-2	2881	No Ct

Tabla 28. Ensayos de especificidad analítica de la RRT-PCR (Jiménez-Clavero y cols., 2003), analizando las cepas de referencia de PTV (dilución 10⁻³) y otros tipos virales de interés veterinario que afectan al ganado porcino.

1.2.2 Determinación de la sensibilidad analítica

Para evaluar la sensibilidad de la RRT-PCR, se emplearon suspensiones víricas de las cepas de referencia de todos los serotipos de PTV, PSV y PEV-B previamente titulados

en la línea celular IBRS-2 (*Tabla 29*). Se llevó a cabo la extracción de ARN siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.1 de métodos moleculares y a partir de este ARN se prepararon diluciones decimales (10^{-3} - 10^{-8}) que servirían de molde en la RRT-PCR.

En un estudio comparativo, las mismas diluciones fueron analizadas en paralelo mediante los dos métodos de RT-PCR convencionales descritos como herramientas moleculares para la detección de infecciones de teschovirus en el manual de diagnóstico de la OIE (Zöll y cols., 2000; Palmquist y cols., 2002; OIE., 2008, capítulo 2.8.10). Estas RT-PCR fueron realizadas como se detalla en el apartado de métodos moleculares 3.3.4 y 3.3.6. Aunque el 2º método se describe como una RT-PCR anidada, la 2ª reacción no se llegó a realizar por la alta susceptibilidad de contaminación cruzada en este tipo de reacciones.

El límite de detección de la RT-PCR en tiempo real fue de 10^{-6} - 10^{-7} correspondiente a 0.06-7.4 DICT₅₀/ml, dependiendo del serotipo de teschovirus (*Tabla 29*).

La sensibilidad para la detección de PTVs conseguida empleando la técnica de RT-PCR convencional descrita por Palmquist y cols (2002) fue de un orden de magnitud inferior a la obtenida con la RT-PCR en tiempo real. Sin embargo, la diferencia es mayor, cuando se compara con el método descrito por Zöll y cols (2000), de 1-3 órdenes de magnitud dependiendo del serotipo (*Tabla 29*). Excepcionalmente, las tres técnicas mostraron una sensibilidad similar para el serotipo 10. La *figura 25* muestra los resultados del ensayo de sensibilidad comparada para el serotipo 2 (*aislado O3b*).

CEPA VIRAL	TÍTULO VIRAL (DICT ₅₀ /ml) ^a	RRT-PCR		RT-PCR	
		Límite de detección* (DICT ₅₀ /ml)	Eficiencia ^d (%)	(PTV/PSV) ^b	(PTV/PSV/PEV-B) ^c
				Límite de detección* (DICT ₅₀ /ml)	Límite de detección* (DICT ₅₀ /ml)
PTV-1 (PS34)	6,25E+05	0.63	92.78	6.3	63.0
PTV-2 (O3B)	7,40E+07	7.4	87.49	74.0	74.0
PTV-3 (O2B)	9,00E+06	0.9	94.50	9.0	9.0
PTV-4 (PS36)	6,85E+06	0.69	91.25	6.9	6.9
PTV-5 (F26)	2,65E+06	0.3	100.3	3	300
PTV-6 (PS37)	5,10E+07	5.1	97.16	51.0	51.0
PTV-7 (WR2)	7,75E+06	0.78	97.75	7.8	7.8
PTV-8 (UKG/173/74)	1,54E+06	0.15	99.37	1.5	1.5
PTV-9 (VIR2899/84)	6,30E+05	0.063	86.77	0.63	0.63
PTV-10 (12/15Ge)	9,20E+05	0.92	91.78	0.92	0.92
PTV-11 (Dresden)	9,20E+06	0.92	110.3	9.2	9.2

Tabla 29. Ensayos de sensibilidad analítica de la RRT-PCR del G^o *Teschovirus*. ^a Título viral expresado en DICT₅₀/ml= dosis infectivas en cultivo tisular; ^b y ^c Comparación de la sensibilidad analítica (detección límite) de la RRT-PCR (Jiménez-Clavero y cols., 2003) con los dos métodos de detección de teschovirus propuestos por la OIE (Zöll y cols., 2000; Palmquist y cols., 2002). ^d La eficiencia del ensayo se calculó en base a la ecuación: $E = 10^{(-1/\text{pendiente})} - 1$. * Límite de detección: concentración viral en DICT₅₀/ml correspondiente a la dilución mayor detectada por cada método empleado.

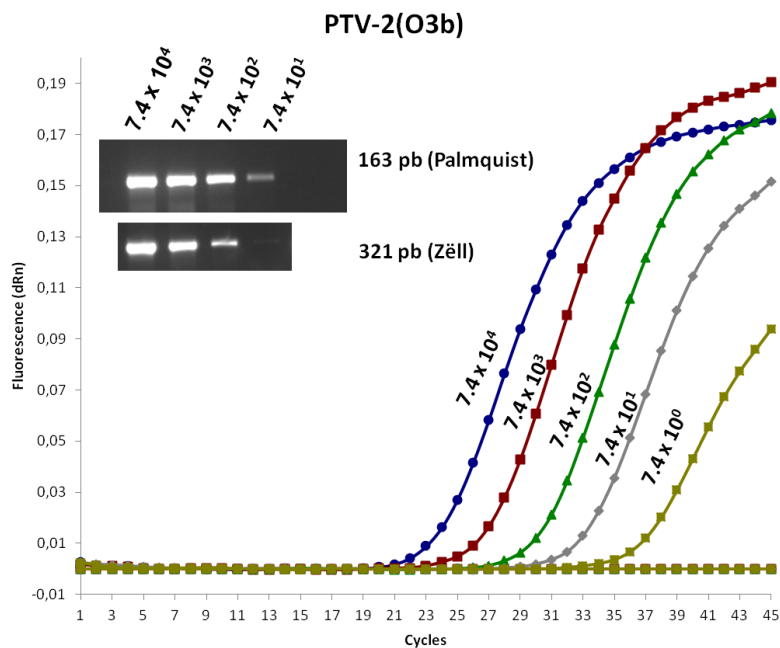


Figura 25. Comparación de sensibilidad de la RRT-PCR (Jiménez-Clavero y cols., 2003) y RT-PCR convencionales descritas por la OIE (Zöll y cols., 2000; Palmquist y cols., 2002) para la detección del aislado O3b (PTV-2).

Analizando las curvas obtenidas, se evaluaron la linealidad y la eficiencia (E). Las curvas estándares obtenidas para cada serotipo mostraron coeficientes de correlación (R) que variaban entre 0.9891-0.9993 (Figura 26). La eficiencia del ensayo osciló entre 86.77-110.3% (media: 95.4%; desviación estándar: 6.7) (Tabla 29).

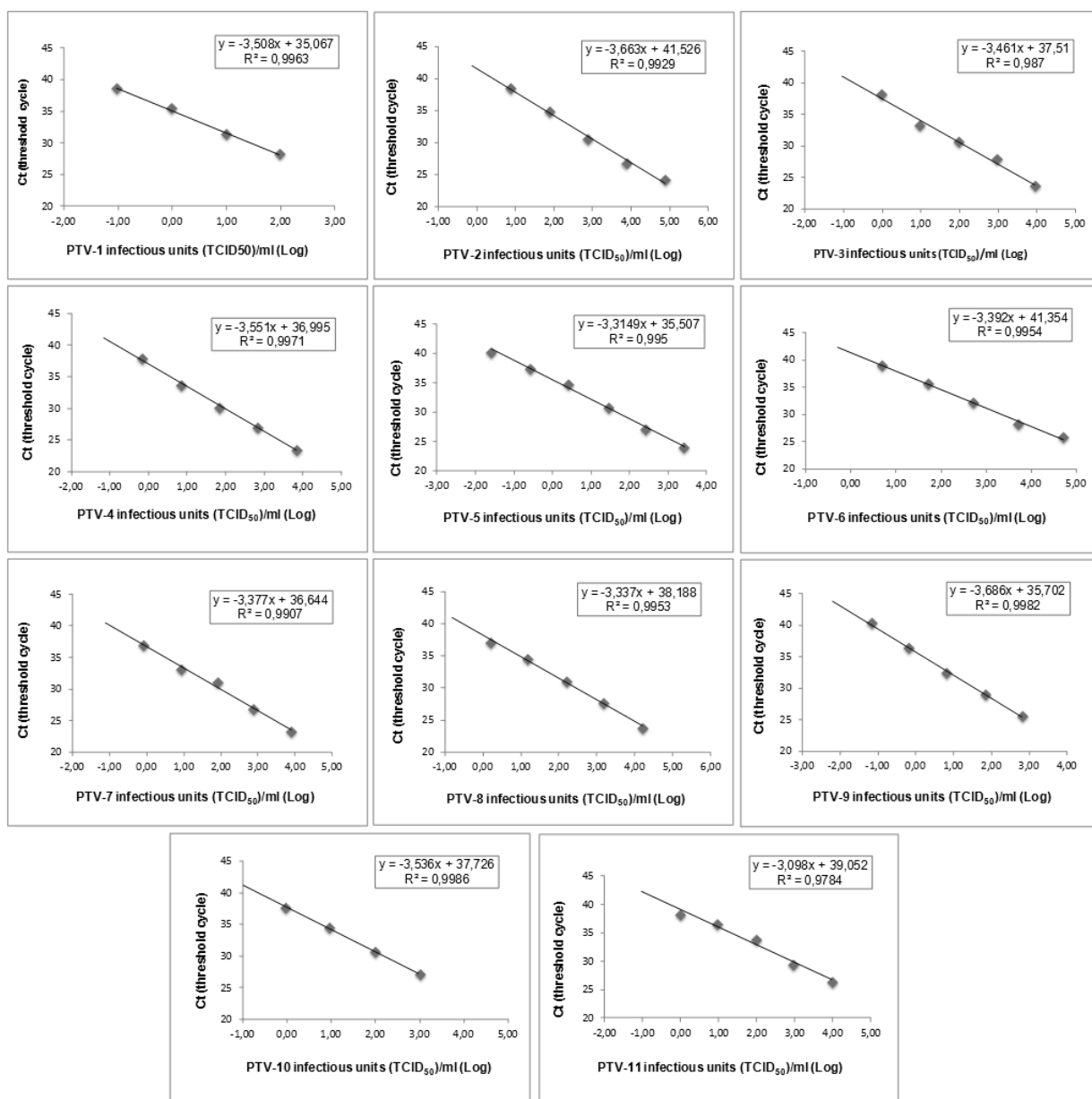


Figura 26. Curvas estándares obtenidas para los 11 serotipos de referencia de teschovirus.

1.2.3 Ensayos de especificidad y sensibilidad diagnóstica

Con motivo de evaluar la sensibilidad y especificidad diagnóstica en muestras porcinas, un panel de 48 muestras fecales (apartado 1.1 de métodos virológicos) procedentes del programa de vigilancia de enfermedades porcinas implementado en España, fueron analizadas por RRT-PCR (Jiménez-clavero y cols., 2003) y RT-PCR convencional (Palmquist y cols., 2002). Ambos métodos fueron capaces de detectar positividad en 17 de las 48 muestras examinadas, obteniendo en el ensayo de tiempo real un valor de Ct entre 30-38, mostrando ambos idéntica especificidad y sensibilidad diagnóstica.

Por otro lado, 10 muestras de purines procedentes de distintas granjas de la provincia de Segovia recogidas en 2006, fueron examinadas con objeto de testar la capacidad del método evaluado en este tipo de muestras. En todas las muestras se obtuvo un resultado positivo por los dos métodos descritos anteriormente.

Por último, la utilidad de la RRT-PCR para la detección de PTV en los VEP-NVC aislados en cultivo celular quedó demostrada con los resultados que se muestran en el apartado de resultados 1.1, donde se obtuvieron 105 sobrenadantes positivos de 216 analizados (48.61%).

1.3 Caracterización molecular de los aislados españoles del G^o *Teschovirus* (VP1)

1.3.1 Identificación molecular y correlación con el serotipo

Aunque la correlación entre genotipo y serotipo en el G^o *Teschovirus* ha sido establecida previamente, en esta tesis se empleará el término “genotipo” cuando se hable de métodos moleculares y el término “serotipo” cuando se hable de técnicas serológicas.

Uno de nuestros objetivos dentro de la identificación de los virus entéricos porcinos era poder llegar a caracterizar, no sólo a nivel de género, sino también a nivel de genotipo.

En el presente estudio, se propone un análisis completo del gen que codifica para la proteína VP1, incluyendo la región C-terminal, que alberga una alta variabilidad. Para ello, se diseñaron una serie de *primers* y RT-PCR ya descritas en epígrafe 3.4.1.1. Como ya se ha mencionado anteriormente, 105 aislados virales fueron positivos en las prueba de amplificación por RRT-PCR, y de ellos, 82 fueron analizados con el fin de obtener secuencias completas de la proteína VP1. Las CC.AA estudiadas se detallan en la *figura 29*.

El gen de la VP1 fue amplificado con éxito en **71** de los **82** aislados positivos a teschovirus examinados, obteniéndose su secuencia completa en **64 (78%)** de ellos. Sin embargo, la amplificación falló en 11 de las muestras, lo que nos lleva a categorizar dichas muestras como teschovirus no tipificables ni detectables con los métodos aplicados (**13.4%**).

Como una primera aproximación a la identificación serotípica, las secuencias de VP1 obtenidas fueron comparadas con las secuencias disponibles en la base de datos de *Genbank* mediante el programa *Blast*. Las identidades nucleotídicas y aminoacídicas oscilaron entre el 83-96% y el 85-98%, respectivamente, y se correspondieron con 8 de los 11 serotipos conocidos de teschovirus.

La aplicación de las RT-PCR (1-4) confirmó los siguientes resultados (*Tabla 30*):

- El genotipo 2 fue el más prevalente (53.1%), detectándose en todas las CC.AA. estudiadas (Figura 27).
- El genotipo 6 (18.8%) fue el 2º más prevalente, detectándose en varias CC.AA., seguido del serotipo 4 (9.4%) que únicamente se detectó en Castilla y León (Figura 27).
- De los 11 genotipos conocidos, los genotipos 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 y 11 fueron identificados en este estudio. No se detectaron los genotipos 3, 9 y 10.
- Se identificaron 3 aislados españoles (CC25, CC47 y CC81) homólogos entre sí y con una cepa italiana denominada *swine/IT/136514/2007* (GQ502334), en principio caracterizada como genotipo 2 por Sozzi y cols (2010) (Tabla 31). Sin embargo, la homología con el genotipo 2 no parece suficiente, lo que indicaría que se trata de un nuevo genotipo, aún no descrito, que será denominado en esta tesis **PTV-12** (Figura 28). Este punto examina en mayor detalle en el apartado 2 de esta sección.

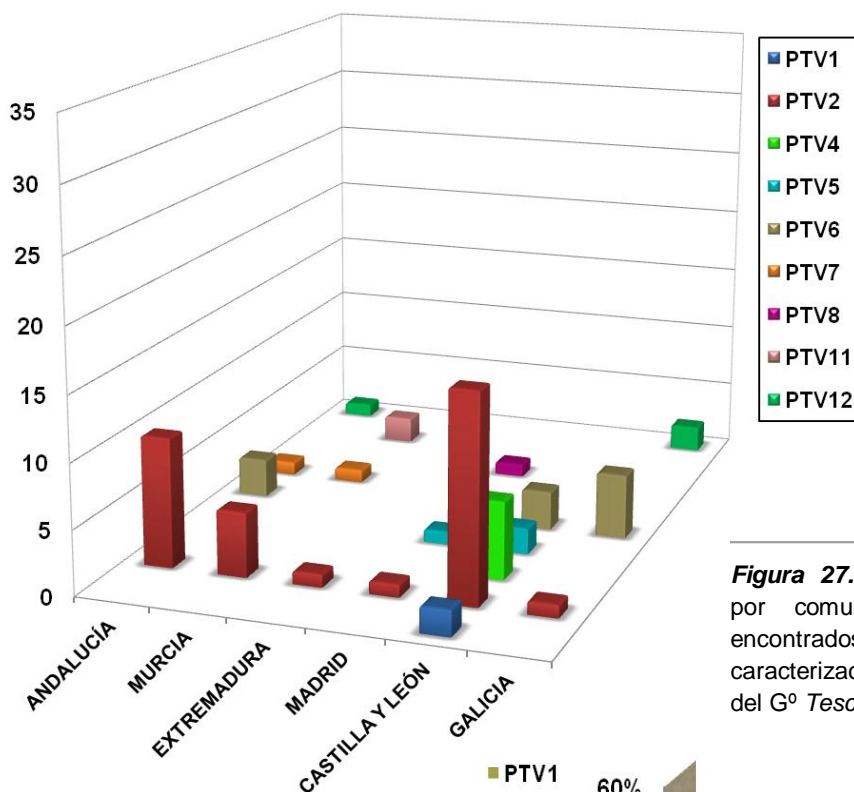
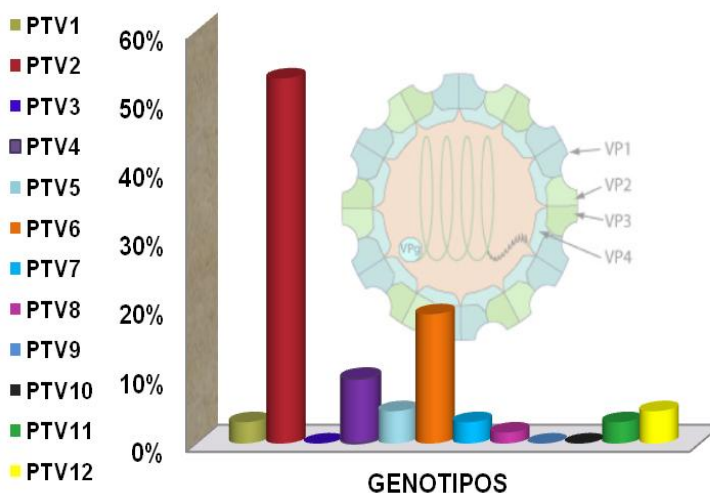



Figura 27. Representación geográfica por comunidades de los genotipos encontrados en el ensayo de caracterización molecular de los aislados del G^o Teschovirus

Figura 28. Representación de los genotipos encontrados en el ensayo de caracterización molecular de los aislados del G^o Teschovirus.



- El análisis efectuado reveló que el tamaño de la secuencia nucleotídica y aminoacídica, con respecto a la cepa de referencia *F65* (NC_003985) variaba en función del genotipo detectado, de tal manera que los genotipos 2, 6, 8 y 12, que formaban el subgrupo III tenían una inserción de 2 aminoácidos, con un tamaño de 792 nt y 264 aa respectivamente, mientras que el genotipo 4 solamente mostraba una inserción. El genotipo 1 conservaba el tamaño nucleotídico y por lo tanto aminoacídico con su homólogo, sin embargo el genotipo 11 tenía una inserción, con un tamaño de 789 nt y 263 aa. Los genotipos 5 y 7, pertenecientes al subgrupo II, presentaban el mismo tamaño que la cepa de referencia, a excepción de un aislado del genotipo 5, que mostró una delección con respecto a sus homólogos (*Tabla 30*).



Método de amplificación ^a	Subgrupo ^b	Tamaño VP1 (nt) ^c	Genotipo	Nº de aislados	% sobre el total	Áreas geográficas ^d
RT-PCR(2)	I	786	PTV-1	2	3.1	II
"	"	789	PTV-11	1	1.6	V
RT-PCR(1)	III	792	PTV-2	34	53.1	I, II, III, IV, V, VI
"	"	789	PTV-4	6	9.4	II
"	"	792	PTV-6	12	18.8	I, II, VI
RT-PCR(4)	"	"	PTV-8	1	1.6	III
RT-PCR(1)	"	"	PTV-12 ^e	3	4.7	I, VI
RT-PCR(1)(3)	II	783-786	PTV-5	3	4.7	II, III
RT-PCR(3)	"	786	PTV-7	2	3.1	V, VI

Figura 29. Representación geográfica de las CC.AA. estudiadas en la caracterización molecular de los aislados del G^o *Teschovirus*.

Tabla 30. Resultados obtenidos por la aplicación de las RT-PCR desarrolladas para la caracterización molecular de los aislados pertenecientes al G^o *Teschovirus*. ^a Las RT-PCR (1-4) corresponden con las descritas en el apartado de métodos virológicos 3.4.1.1.; ^b Clasificación de los teschovirus en subgrupos formulada por Zöll y cols (2001); ^c nt: nucleótidos; ^d Ver mapa 1; ^e Nuevo genotipo denominado PTV-12.

NOMBRE DEL AISLADO ^a	ÁREA GEOGRÁFICA	IDENTIFICADOR EN GENBANK ^b	GENOTIPO ASIGNADO	TAMAÑO REGIÓN VP1	Cepa de PTV con mayor homología		
					SIMILITUD (%) (nt ^c)	SIMILITUD (%) (aa ^d)	IDENTIFICADOR EN GENBANK
CC1	VI	JF723984	2	792	96	97	AF296110
CC2	VI	JF723985	2	792	96	97	AF296110
CC3	II	JF723986	2	792	91	95	AY392534
CC4	II	JF723987	2	792	91	95	AY392534
CC5	II	JF723988	2	792	91	95	AY392534
CC6	VI	JF723989	6	792	90	96	AF296116
CC9	VI	JF723990	6	792	90	96	AF296116
CC11	II	JF723991	4	789	91	95	AF296111
CC12	II	JF723992	4	789	91	95	AF296111
CC14	II	JF723993	4	789	83	85	AF296112
CC16	VI	JF723994	6	792	88	96	AF296115
CC18	IV	JF723995	2	792	87	92	AF296108
CC19	II	JF723996	2	792	90	93	AY392533
CC20	II	JF723997	4	789	90	95	AF296111
CC21	VI	JF723998	2	792	90	96	AY392533
CC22	VI	JF723999	2	792	90	96	AY392533
CC23	II	JF724000	1	786	90	97	AY392553
CC25	VI	JF724001	12	792	89	97	GQ502334
CC26	VI	JF724002	2	792	87	92	AF296109
CC27	VI	JF724003	7	786	88	93	AF296092
CC28	VI	JF724004	2	792	96	97	AF296110
CC29	VI	JF724005	2	792	96	97	AF296110
CC30	III	JF724006	8	792	91	95	AF296118
CC35	II	JF724007	1	786	90	97	AY392555
CC36	II	JF724008	6	792	88	97	AF296115
CC37	II	JF724009	2	792	90	94	GU446660
CC38	II	JF724010	6	792	88	97	AF296115
CC40	II	JF724011	5	786	87	90	GQ293233
CC41	II	JF724012	5	786	86	90	GQ293233
CC42	III	JF724013	5	783	85	91	GQ293236
CC43	III	JF724014	2	792	95	96	AF296110
CC44	II	JF724015	2	792	93	95	AF296110
CC45	II	JF724016	2	792	95	96	AF296110
CC47	I	JF724017	12	792	89	97	GQ502334
CC48	I	JF724018	6	792	90	96	AF296116
CC49	I	JF724019	2	792	95	96	AF296110
CC50	I	JF724020	6	792	90	96	AF296116
CC51	I	JF724021	6	792	90	96	AF296116
CC59	VI	JF724022	2	792	94	97	AF296110
CC60	VI	JF724023	2	792	90	93	AY392533
CC63	II	JF724024	4	789	83	86	AF296111
CC65	II	JF724025	4	789	83	86	AF296111
CC67	II	JF724026	2	792	87	92	AF296109
CC68	II	JF724027	2	792	89	98	AF296115
CC70	II	JF724028	2	792	90	95	AF296087
CC71	VI	JF724029	2	792	87	91	AF296109
CC72	I	JF724030	6	792	90	96	AF296116
CC73	II	JF724031	6	792	89	98	AF296115
CC74	II	JF724032	2	792	91	95	AY392534
CC75	II	JF724033	2	792	91	95	GQ293229
CC76	II	JF724034	2	792	91	95	GQ293229
CC77	II	JF724035	2	792	87	91	AF296109
CC78	II	JF724036	2	792	87	91	AF296109
CC79	I	JF724037	6	792	90	96	AF296116
CC80	VI	JF724038	2	792	87	91	AF296109
CC81	I	JF724039	12	792	89	97	GQ502334
CC82	V	JF724040	11	789	88	95	AF296096
CC83	V	JF724041	7	786	88	94	AF296092
CC85	V	JF724042	2	792	91	96	AY392533
CC86	V	JF724043	2	792	91	96	AY392533
CC87	VI	JF724044	2	792	87	91	AF296109
CC88	V	JF724045	2	792	91	96	AY392533
CC89	V	JF724046	2	792	91	96	AY392533
CC90	V	JF724047	2	792	91	96	AY392533

Tabla 31. Aislados españoles de teschovirus porcino: distribución geográfica, caracterización genotípica, tamaño de la región que codifica para la proteína VP1 y comparación de su identidad con las cepas de la base de datos de *Genbank* mediante el programa *Blast*. ^{a,b} Los aislados son identificados con un nombre y un n° de identificador en *Genbank*; nt^c: nucleótidos aa^d: aminoácidos.

1.3.2 Análisis filogenético

Un alineamiento múltiple de 125 secuencias (64 secuencias españolas y 61 secuencias de *Genbank*), que englobaba 795 posiciones, fue sometido a un procesado por *GBlock* que eliminó ciertas posiciones no útiles. Finalmente el análisis filogenético englobó 762 posiciones (95% del inicial). Se seleccionó el modelo de sustitución GTR+I+G como mejor modelo evolutivo, el cual fue usado en los siguientes análisis (descripción en métodos virológicos 3.7.1). Se construyó un árbol filogenético usando análisis bayesiano (*Figura 30*). Como *outgroup* se seleccionó una cepa del G⁰ *Coxsackievirus*, por su estrecha relación con el grupo en estudio.

La representación filogenética mostró una agrupación en 12 *clusters* principales, 11 de ellos se correspondían con los 11 serotipos ya conocidos de teschovirus, sin embargo los 3 aislados, no bien definidos en los estudios de homología, formaban un clúster diferenciado. A la vista de estos resultados, este nuevo grupo constituiría un nuevo serotipo (PTV-12), como se demuestra en el apartado 2 de esta sección, incrementando por consiguiente el número de genotipos definidos para el género *Teschovirus*.

1.3.3 Estimación de los índices de sustitución nucleotídica y los tiempos de divergencia para el G⁰ *Teschovirus* por análisis de la región VP1

Usando las secuencias datadas de los 11 genotipos conocidos, publicadas en *Genbank*, de las cuales existe información espacio-temporal, junto con las nuevas secuencias identificadas en este estudio, se determinaron los índices de sustitución nucleotídica y el ancestro común para el G⁰ *Teschovirus*. Bajo un modelo de reloj molecular relajado (*relaxed uncorrelated lognormal clock*), la tasa de sustitución media de evolución de la VP1 estimada osciló de 2.03×10^3 a 2.95×10^3 sustituciones nucleotídicas por sitio y año (sn/s/a) con una media de 2.46×10^3 . El origen estimado para el ancestro común (tMRCA) para el género *Teschovirus* fue aproximadamente hace 500 años (intervalo de 385-659 años). Para el clado que incluye los serotipos 1, 3, 10 y 11 se situó hace 200 años aproximadamente (intervalo de 180-273 años), mientras que el 2^o clado (serotipos 2, 4, 6, 8 y 12) parece originarse más tempranamente, aproximadamente hace 400 años (intervalo de 335-526 años) (*Figura 31*).

El árbol filogenético obtenido indica que los teschovirus se dividen en 2 cladogramas principalmente. El primer clado incluye dos grupos diferenciados que contienen los genotipos 1 y 11 por una parte, y los genotipos 3 y 10 por otra. A este 1^o grupo monofilético

se le ha denominado subgrupo I (Zöll y cols., 2000). El segundo clado incluye el resto de los genotipos, y está formando por grupos monofiléticos bien diferenciados y sustentados con altos valores tanto de *bootstrap* como de probabilidad posterior. La monofilia entre los genotipos 2, 4, 6, 8 y 12 está bien definida, formando el denominado subgrupo III, que a su vez evoluciona en 2 grupos independientes, por una parte el genotipo 2 y por otra los genotipos 4, 6, 8 y 12. Sin embargo, los genotipos 5,7 y 9, que formarían el denominado subgrupo II, no establecen una relación filogenética clara.

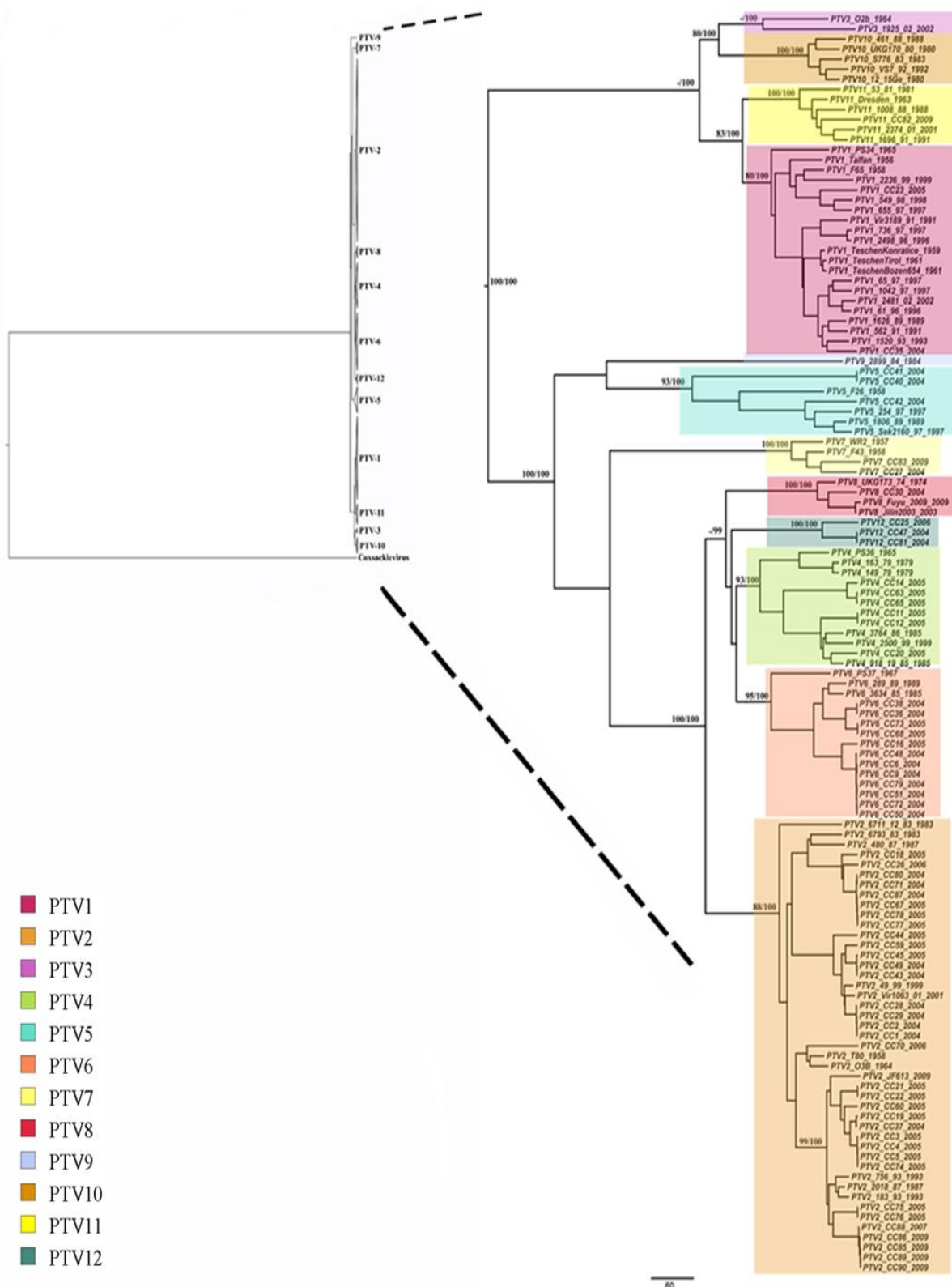


Figura 30. Relación evolutiva entre los aislados españoles de teschovirus porcino derivadas del análisis filogenético llevado a cabo mediante análisis bayesiano con el programa *Beast*. En la esquina superior izquierda, se representa el árbol filogenético comprimido relacionando los distintos genotipos de teschovirus con un representante del G^o *Coxsackievirus* (*outgroup*). Los 12 genotipos o *clusters* están representados por colores. Los valores de probabilidad posterior se muestran al inicio de cada nodo.

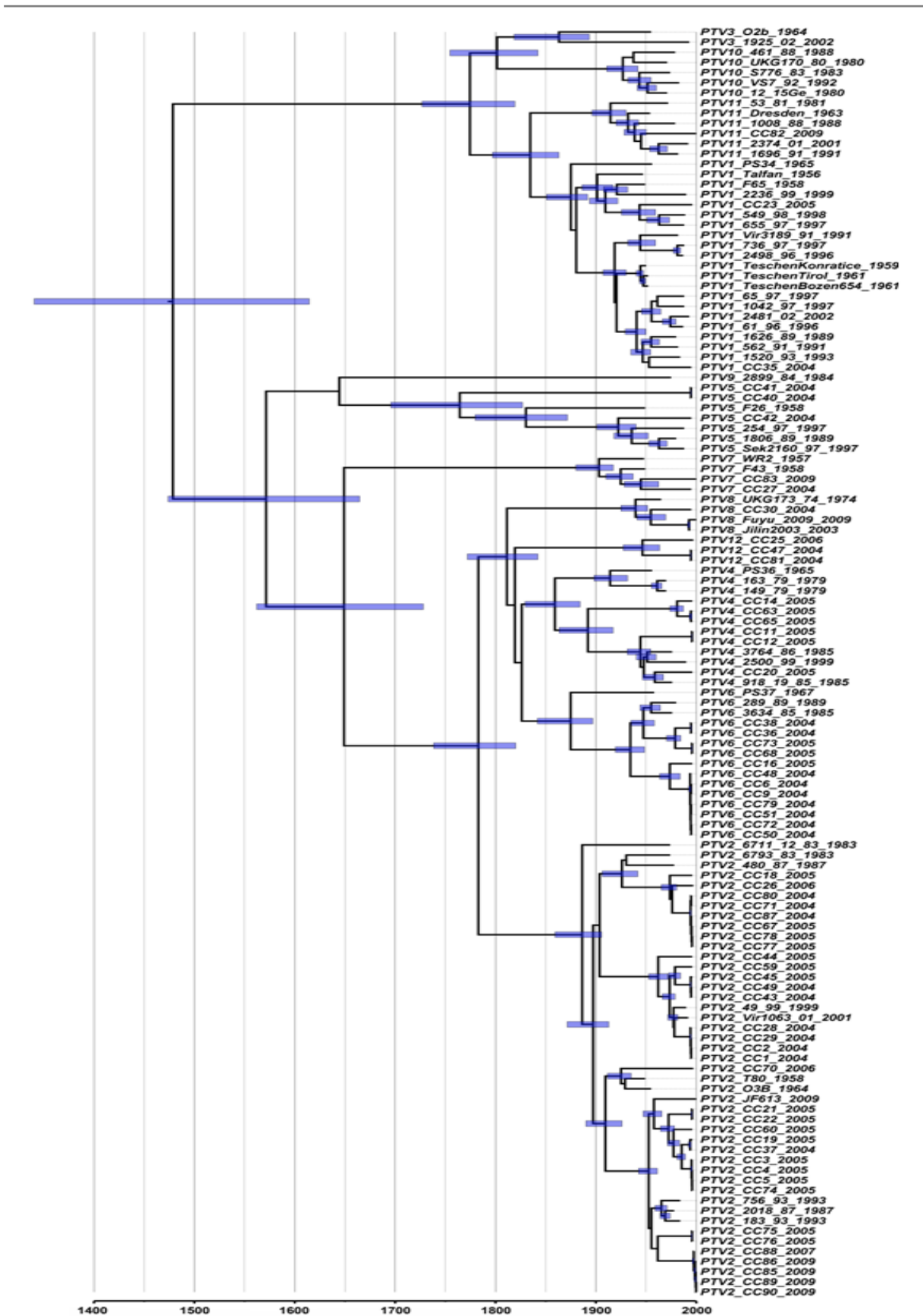


Figura 31. Relación filogenética inferida usando métodos bayesianos bajo un modelo de reloj molecular relajado (*uncorrelated lognormal*) usando datos espacio-temporales de la región VP1 completa. La escala de tiempo representa el tiempo hasta el presente. Las barras azules corresponden al intervalo más corto que contiene el 95% de los valores muestreados (95%HPD). Los valores de probabilidad posterior no son mostrados.

1.3.4 Comparación de dos métodos de caracterización molecular del G^o *Teschovirus*: VP1c vs. VP2p

Con el propósito de contrastar nuestro método de caracterización molecular de teschovirus que amplificaba la proteína VP1 completa (VP1c, véase apartado anterior), se seleccionó una estrategia molecular alternativa que amplificaba la proteína VP2 de manera parcial (VP2p) (Kaku y cols., 2007). Se analizaron por ambos procedimientos 68 teschovirus aislados en España: 57 ya descritos previamente para la VP1, 1 aislado con secuencia parcial de VP1 y 10 aislados negativos para la VP1 pero positivos en la RT-PCR en tiempo real.

Se obtuvieron resultados homogéneos en 31 de los 58 aislados positivos a VP1c, coincidiendo el genotipo cuando se realizaba un análisis de identidad de secuencia mediante el programa *Blast*, tanto por VP1 como por VP2p. Sin embargo, se detectaron resultados discordantes en 13 de los aislados (13/44, 29.55%), lo que indicaba que cada aislado, estaba coinfectado con 2 genotipos distintos, y que su detección dependía de la sensibilidad del método empleado. Mientras que el proceso de amplificación por VP2p resultó ineficaz en 5 aislados, en otros 9 aislados falló el proceso de secuenciación. El estudio comparativo llevado a cabo con los aislados españoles (n=68), muestra una mayor sensibilidad de la técnica basada en VP1c (58/68, 85.29%) con respecto a la que se basa en VP2p (45/68, 66.18%). Además, los aislados clasificados por VP2p como PTV9 presentan un % de identidad nucleotídica muy bajo pudiendo indicar la existencia de un genotipo distinto a los ya conocidos (*Tablas 32 y 33*).

A la vista del valor de *Ct* obtenido por RRT-PCR, 3 de los 10 aislados deberían amplificarse con alguno de los métodos propuestos, sin embargo, sólo en uno de ellos se consigue, aplicando el método de genotipado por VP2p. Por lo tanto, tenemos 2 aislados positivos a PTV, no tipificables por ninguno de los procedimientos (*Tabla 32*).

AISLADO	RT-PCR(AMPLIFICACIÓN VP1)				RT-PCR (AMPLIFICACIÓN VP2)			
	GENOTIPO	IDENTIDAD (nt)	IDENTIFICADOR EN GENBANK	TAMAÑO	GENOTIPO	IDENTIDAD (nt)	IDENTIFICADOR EN GENBANK	TAMAÑO
CC17		NO AMPLIFICA (CT:33,25)				NO AMPLIFICA*		
CC24		NO AMPLIFICA (CT:21,44)				NO AMPLIFICA*		
CC31		NO AMPLIFICA (CT:32,6)				NO AMPLIFICA*		
CC39		NO AMPLIFICA (CT:33,81)				NO AMPLIFICA*		
CC46		NO AMPLIFICA (CT:14,65)			PTV9	81%	AF296094	309
CC53		NO AMPLIFICA (CT:34,4)				NO AMPLIFICA*		
CC54		NO AMPLIFICA (CT:34,7)				NO AMPLIFICA*		
CC55		NO AMPLIFICA (CT:33,6)				NO AMPLIFICA*		
CC56		NO AMPLIFICA (CT:22,46)				NO AMPLIFICA*		
CC57		NO AMPLIFICA (CT:34,25)				NO AMPLIFICA*		

Tabla 32. Resultados del estudio comparativo de caracterización molecular de teschovirus mediante secuenciación de la región VP1 y VP2 parcial de 10 aislados españoles * El procedimiento se repitió 2 veces.

AISLADO	RT-PCR(AMPLIFICACIÓN VP1)				RT-PCR (AMPLIFICACIÓN VP2)			
	GENOTIPO	IDENTIDAD (nt)	IDENTIFICADOR EN GENBANK	TAMAÑO	GENOTIPO	IDENTIDAD (nt)	IDENTIFICADOR EN GENBANK	TAMAÑO
CC1	PTV2	96%	AF296110	792	PTV2	95%	AF296110	315
CC2	PTV2	96%	AF296110	792	PTV2	95%	AF296110	315
CC4	PTV2	91%	AY392534	792	BANDA DÉBIL			
CC3	PTV2	91%	AY392534	792	PTV2	90%	AY392534	315
CC5	PTV2	91%	AY392534	792	PTV2	90%	AY392534	315
CC6	PTV6	90%	AF296116	792	PTV9	81%	AF296094	309
CC7	PTV6	90%	AF296116	759*	PTV9	81%	AF296095	309
CC9	PTV6	90%	AF296116	792	NO AMPLIFICA*			
CC11	PTV4	91%	AF296111	789	BANDA DÉBIL			
CC12	PTV4	91%	AF296111	789	PTV4	90%	AF296111	318
CC14	PTV4	82%	AF296112	789	PTV4	81%	AF296112	315
CC16	PTV6	88%	AF296115	792	PTV6	92%	AF296115	315
CC18	PTV2	87%	AF296108	792	PTV2	86%	AF296110	315
CC19	PTV2	90%	AY392533	792	PTV2	91%	AY392534	315
CC20	PTV4	90%	AF296111	789	PTV4	90%	AF296111	302*
CC21	PTV2	90%	AY392533	792	PTV2	90%	AY392534	315
CC22	PTV2	90%	AY392533	792	PTV2	90%	AY392534	315
CC23	PTV1	90%	AY392553	786	PTV1	91%	AY392554	315
CC25	PTV12	89%	GQ502334	792	PTV12	100%	JN859128	315
CC26	PTV2	87%	AF296109	792	PTV2	87%	AY392542	315
CC27	PTV7	88%	AF296092	786	PTV7	86%	AF296092	318
CC28	PTV2	96%	AF296110	792	BANDA DÉBIL			
CC29	PTV2	96%	AF296110	792	BANDA DÉBIL			
CC30	PTV8	91%	AF296118	792	PTV8	89%	AF296118	315
	PTV2	95%	AF296110	772*				
CC35	PTV1	90%	AY392555	786	PTV1	89%	AY392555	312
CC36	PTV6	88%	AF296115	792	PTV5	86%	HQ020381	315
CC37	PTV2	90%	GU446660	792	PTV1	89%	AY392555	312
CC38	PTV6	88%	AF296115	792	FALLA LA SECUENCIACIÓN.SECUENCIAS DOBLES			
CC40	PTV5	87%	GQ293233	786	PTV5	85%	GQ293233	321
CC41	PTV5	86%	GQ293233	786	PTV5	85%	GQ293233	321
CC42	PTV5	85%	GQ293236	783	PTV1	90%	AY392554	312
CC43	PTV2	95%	AF296110	792	PTV2	88%	AF296107	315
CC44	PTV2	93%	AF296110	792	NO AMPLIFICA*			
CC45	PTV2	95%	AF296110	792	BANDA DÉBIL			
CC47	PTV12	89%	GQ502334	792	PTV12	86%	JN859128	315
CC48	PTV6	90%	AF296116	792	PTV9	81%	AF296094	309
CC49	PTV2	95%	AF296110	792	PTV9	81%	AF296094	309
CC50	PTV6	90%	AF296116	792	FALLA LA SECUENCIACIÓN.SECUENCIAS DOBLES			
CC51	PTV6	90%	AF296116	792	FALLA LA SECUENCIACIÓN.SECUENCIAS DOBLES			
CC59	PTV2	94%	AF296110	792	BANDA DÉBIL			
CC60	PTV2	90%	AY392533	792	PTV2	91%	AY392534	315
CC63	PTV4	83%	AF296111	789	NO AMPLIFICA*			
CC65	PTV4	83%	AF296111	789	NO AMPLIFICA*			
CC68	PTV6	89%	AF296115	792	PTV6	91%	AY392546	315
CC70	PTV2	90%	AF296087	792	NO AMPLIFICA*			
CC71	PTV2	87%	AF296109	792	PTV9	81%	AF296094	309
CC72	PTV6	90%	AF296116	792	PTV12	86%	JN859128	315
CC73	PTV6	89%	AF296115	792	PTV2	91%	AY392534	315
CC74	PTV2	91%	AY392534	792	PTV2	90%	AY392534	315
CC75	PTV2	91%	GQ293229	792	PTV2	92%	AY392534	315
CC76	PTV2	91%	GQ293229	792	PTV2	93%	AY392534	315
CC77	PTV2	87%	AF296109	792	PTV2	87%	AF296110	315
CC78	PTV2	87%	AF296109	792	PTV2	87%	AF296110	315
CC79	PTV6	90%	AF296116	792	PTV9	81%	AF296094	309
CC80	PTV2	87%	AF296109	792	PTV1	90%	AY392554	312
CC81	PTV12	89%	GQ502334	792	PTV9	81%	AF296094	309
CC82	PTV11	88%	AF296096	789	PTV11	90%	GQ293238	316
CC83	PTV7	88%	AF296092	786	PTV7	83%	AF296092	316

Tabla 33. Resultados del estudio comparativo de caracterización molecular de teschovirus mediante secuenciación de las regiones VP1 y VP2 parcial de 58 aislados españoles. *Secuencias parciales ** El procedimiento se repite 2 veces. Los aislados en negrita representan resultados discordantes entre ambos métodos. Los aislados encasillados en gris son los 3 aislados clasificados como PTV-12 por la VP1 completa.

1.3.5 Comparación de dos métodos de caracterización molecular del G^o *Teschovirus*: VP1p vs. VP1c

Con el propósito de seguir contrastando nuestro método de caracterización molecular de teschovirus basado en la amplificación y secuenciación completa de la proteína VP1 (VP1c), se escogió, para comparar, una segunda estrategia molecular alternativa que amplificaba la proteína VP1 de manera parcial (VP1p). Esta estrategia había sido empleada en un estudio previo descrito por *Sozzi y cols* (2011), en el que se caracterizaron 34 teschovirus aislados en Italia usando 2 parejas de primers diseñadas por *La Rosa y cols* (2006). Los mismos aislados fueron analizados por nuestro método usando las 4 RT-PCR descritas en este estudio, y los resultados obtenidos con ambas técnicas fueron comparados.

La comparación efectuada mostró que en 17 de los 34 aislados analizados por ambas técnicas los resultados obtenidos coincidieron, es decir, cuando se realizaba un análisis de identidad de secuencia mediante el programa *Blast*, el genotipo resultante era el mismo, con valores comprendidos entre 86-93% y 91-98% de homología nucleotídica y aminoacídica en el análisis de VP1c, respectivamente. Sin embargo, se obtuvieron resultados discordantes en 10 de los aislados analizados por ambas técnicas, lo cual puede atribuirse a los siguientes motivos:

- En 6 muestras se encontró que había una coinfección con 2 genotipos distintos, y, como ya se indicó anteriormente en el estudio comparativo entre VP1c y VP2p, su amplificación dependía de la sensibilidad del método empleado. La mayoría de las coinfecciones encontradas en estas muestras pudieron ser identificadas y tipificadas, y fueron las siguientes: PTV1-PTV11; PTV1-PTV12, PTV5-PTV8, PTV8-PTV11 y PTV2-PTV12. Únicamente una de las muestras (268632/2006) presentó una coinfección de PTV10 con un genotipo desconocido, el cuál presentaba una homología aminoacídica del 75 % comparada con las cepas conocidas, lo que sugería la detección y caracterización de un nuevo genotipo.
- Los aislados 27811-06 y 136514-07, clasificados por *Sozzi y cols* (2010) (empleando VP1p) como un grupo separado dentro del genotipo 2, fueron reclasificados dentro del genotipo PTV12, descrito en esta tesis (apartado 1.3 de esta sección).

- Los aislados 270869-06 y el 275836-06, junto con uno de los virus hallados en la muestra coinfectada (268632-06), formaron un *cluster* diferenciado del resto de genotipos y sustentado por un alto *bootstrap*, apoyando la existencia de un nuevo genotipo, y posible serotipo, dentro del género *Teschovirus*, lo que permitió reclasificar los aislados previamente asignados como PTV-7 por Sozzi y cols (2010) en un nuevo grupo distinto de los demás serotipos. A este nuevo cluster se le denominará putativamente en este estudio **PTV-14**.

Por otro lado, en 3 de los 34 aislados no se obtuvieron resultados positivos con ninguna de las 4 RT-PCRs diseñadas para amplificar la VP1c. Además en 4 de los 34 aislados la calidad de los datos de secuencia obtenidos fue deficiente, debido a la obtención de eferogramas con dobles secuencias.

El análisis filogenético corroboró los resultados de homología de todos los aislados analizados y demostró la existencia de un nuevo *cluster* (apartado 3.7.2 de métodos moleculares). Del mismo modo, la inclusión en el alineamiento de secuencias de aislados españoles de serotipo 12 resultó esencial en la reclasificación de los aislados italianos homólogos (*Figura 32*). Los resultados de identidad y clasificación genotípica se resumen en la *tabla 34*.

AISLADO	RT-PCR VP1 parcial					RT-PCR VP1 completa			
	CEPA CON MAYOR HOMOLOGÍA ^a					CEPA CON MAYOR HOMOLOGÍA			
	IDENTIFICADOR GENBANK	IDENTIFICADOR GENBANK	IDENTIDAD % (nt)	IDENTIDAD % (aa)	GENOTIPO VP1p	IDENTIFICADOR GENBANK	IDENTIDAD % (nt)	IDENTIDAD % (nt)	GENOTIPO VP1c
267800/2006	GQ247878	AF296099	86	95	PTV1	AF296099	88	95	PTV1
272799/2006	GQ247879	GQ502318	99	100	PTV1	JF724017 (CC47)	88	92	PTV12
273216/2006	GQ502318	GQ247879	99	100	PTV1		BANDA DÉBIL		
280329/2006	GQ502319	AF296101	90	98	PTV1	JF724000 (CC23)	92	97	PTV1
266543/2006	GQ502320	GQ502326	92	97	PTV2		BANDA FUERTE.MALA SECUENCIACIÓN		
268624/2006	GQ502321	AF296107	90	92	PTV2	JF724028 (CC70)	88	92	PTV2
270947/2006	GQ502322	AY392533	92	96	PTV2		BANDA FUERTE.MALA SECUENCIACIÓN		
272217/2006	GQ502323	AY392533	90	98	PTV2	JF723998(CC21)	89	96	PTV2
273188/2006	GQ502324	GQ502326	91	97	PTV2	JF724014 (CC43)	86	94	PTV2
274566/2006	GQ502325	AF296107	87	96	PTV2	JF723998(CC21)	89	96	PTV2
277081/2006	GQ502326	GQ502332	92	99	PTV2	JF724014 (CC43)	86	95	PTV2
278811/2006	GQ502327	GQ502334	87	95	PTV2	JF724017 (CC47)	87	92	PTV12
280327/2006	GQ502328	GQ502325	88	95	PTV2		BANDA FUERTE.MALA SECUENCIACIÓN		
280605/2006	GQ502329	AY392533	91	95	PTV2	JF723998(CC21)	93	98	PTV2
281874/2006	GQ502330	AY392533	90	96	PTV2	JF723998(CC21)	89	96	PTV2
70693/2007	GQ502331	GQ502322	91	94	PTV2	JF724017 (CC47)	87	90	PTV12
77378/2007	GQ502332	GQ502326	92	99	PTV2	JF724014 (CC43)	87	93	PTV2
88291/2007	GQ502333	AF296110	88	92	PTV2	JF724014 (CC43)	87	93	PTV2
136514/2007	GQ502334	GQ502327	88	95	PTV2	JF724001 (CC25)	88	94	PTV12
210936/2006	GQ502335	AF296089	86	91	PTV4	GQ293231	86	91	PTV4
25018/2006	GQ502336	AF296114	91	95	PTV5		NO AMPLIFICA		
273171/2006	GQ502337	AF296090	78	85	PTV5	JF724006 (CC30)	88	96	PTV8
142073/2007	GQ502338	AF296116	91	97	PTV6		NO AMPLIFICA		
270869/2006	GQ502339	GQ502340	90	94	PTV7	JF724041 (CC83)	72	75	PTV14 ¿?
275836/2006	GQ502340	GQ502339	90	94	PTV7	JF724041 (CC83)	72	75	PTV14¿?
24114/2006	GQ502341	GQ502342	100	100	PTV8	JF724006 (CC30)	88	94	PTV8
25623/2006	GQ502342	GQ502341	100	100	PTV8	JF724006 (CC30)	88	94	PTV8
82717/2007	GQ502343	AF296093	90	95	PTV8	AF296093	89	95	PTV8
24305/2006	GQ502344	GQ502345	89	98	PTV10	AY392548	89	95	PTV10
268632/2006	GQ502345	AY392548	92	98	PTV10	JF724041 (CC83)	71	74	PTV14¿?
147746/2007	GQ502346	GQ502347	90	97	PTV11	JF724006 (CC30)	88	95	PTV8
277121/2006	GQ502347	AF296121	90	95	PTV11	JF724040(CC82)	88	96	PTV11
268602/2006	GQ502348	GQ502349	99	100	PTV11	AF296103	89	95	PTV1
						AF296096	91	95	PTV11
268641/2006	GQ502349	GQ502348	99	100	PTV11		NO AMPLIFICA		

Tabla 34. Resultados del estudio comparativo de caracterización molecular de teschovirus mediante secuenciación de la región VP1 completa y parcial de 34 aislados italianos. Los aislados en negrita representan resultados discordantes entre ambos métodos. Los aislados encasillados en gris claro, son los resultados discordantes entre ambos métodos q no presentan una homología clara con ninguna cepa ya publicada en Genbank. Los aislados encasillados en gris oscuro, representan los aislados reclasificados en esta tesis.

^a Resultados descritos por Sozzi y cols (2010).

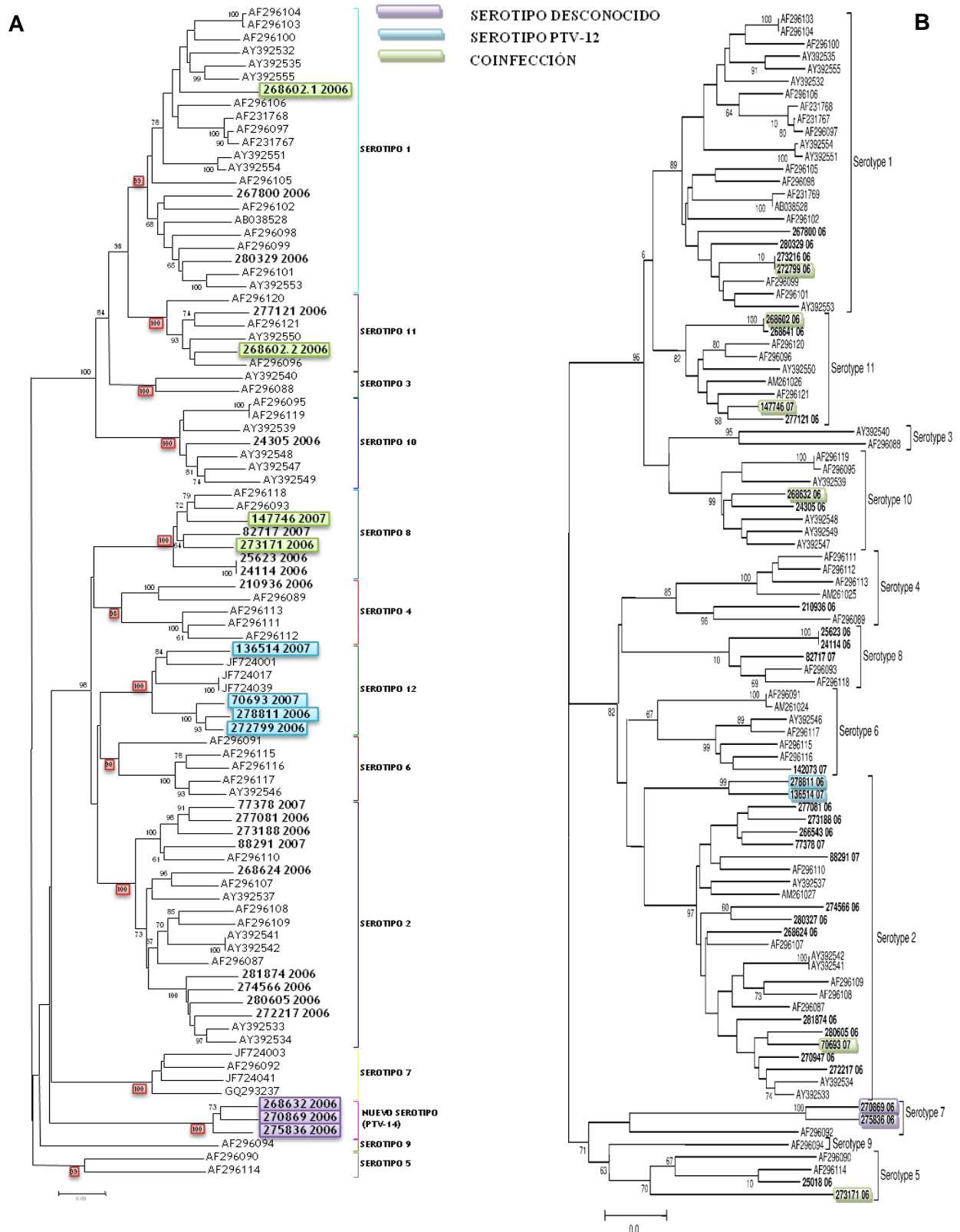


Figura 32. Filogenia comparativa de caracterización molecular de teschovirus mediante secuenciación de la región VP1 completa y parcial de 28 aislados italianos (negrita). **A)** Filogenia de la VP1 completa de teschovirus usando la misma metodología que Sozzi y cols (2010). El árbol fue construido con el método estadístico *Neighbour-joining* usando como modelo de sustitución *kimura 2-parámetros* con 1000 pseudoreplicas. **B)** Filogenia de la VP1 parcial de teschovirus publicado por Sozzi y cols (2010). Las cepas coloreadas representan las diferencias significativas con respecto a la secuenciación completa de la VP1. En ambos árboles sólo se muestra valores de *bootstrap* mayores al 60%.

1.4 Estudio de virus entéricos en jabalíes salvajes (*Sus scrofa*) en España

1.4.1 Identificación molecular de teschovirus y sapelovirus en heces de jabalíes

Atendiendo a los resultados anteriores, en los que los sapelovirus (PSV) y teschovirus (PTV) fueron los géneros más frecuentemente encontrados en heces porcinas en España, se inició un estudio en heces de jabalí con los siguientes objetivos:

- Verificar su papel como hospedador de ambos virus en España y determinar su abundancia relativa.
- Realizar el aislamiento vírico en cultivo celular.
- Caracterizar los aislados víricos a nivel de serotipo y determinar su relación filogenética con los aislados porcinos descritos hasta la fecha.

Para ello se recogieron muestras fecales de jabalíes en un entorno alejado del hábitat humano (para minimizar el riesgo de contaminación con virus de origen porcino doméstico) como es el Parque Nacional y Natural de Doñana, en 2007 y 2011. Para la detección molecular se optó por una RT-PCR convencional capaz de diferenciar ambos virus en función del tamaño del amplicón obtenido (Palmquist y cols., 2002). Del mismo modo, las muestras fueron examinadas por RRT-PCR para el virus de la enfermedad vesicular porcina (Reid y cols., 2004a; Toussaint y cols., 2007) (sección de métodos moleculares, apartado 3.3.3).

Los resultados obtenidos del análisis de los macerados fecales indicaban que 32 de las 63 muestras analizadas estaban infectadas con virus del G^o *Teschovirus* (51%) y de ellas 4 (6.3%) mostraban coinfección con ambos tipos de virus (PTV y PSV) (Figura 33 y tabla 35). Por otra parte, todas las muestras fueron negativas en el análisis del virus de EVP.

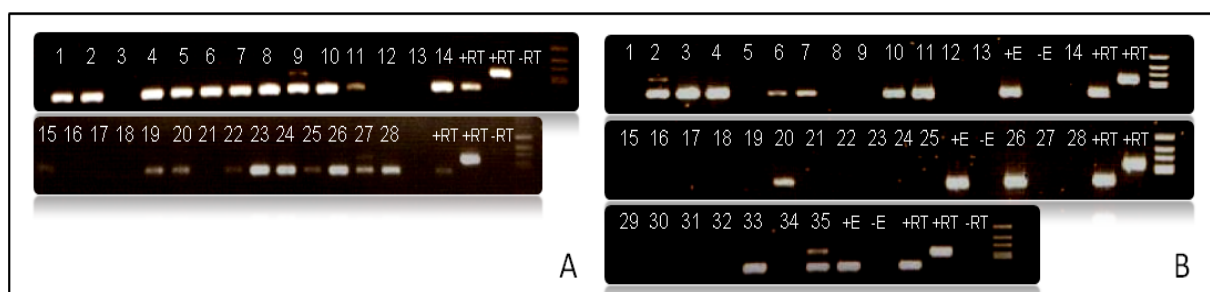


Figura 33. Geles al 3% de agarosa como resultado de la amplificación por RT-PCR descrita por Palmquist y cols (2002) para las 28 y 35 muestras fecales de jabalíes recogidas en 2007(A) y 2011(B), respectivamente.

En la tipificación de dichas muestras se emplearon, por un lado, las técnicas de caracterización molecular de teschovirus basadas en: 1) amplificación parcial de la proteína VP2 y 2) amplificación completa de la proteína VP1 (descrita en el apartado 1.3 de esta sección), y por otro lado, para la tipificación molecular de sapelovirus (de los que en la actualidad está descrito un único serotipo), se diseñaron unos *primers* específicos para amplificación de la proteína VP4 completa (métodos moleculares, apartado 3.4.2).

Los macerados de heces positivos para PSV (n^{os}: 9 y 27 [2007]; 2 y 35 [2011]) dieron lugar a amplicones del tamaño esperado por la RT-PCR de VP4 obteniéndose secuencias completas en los 4 casos (*Tabla 35*). La homología nucleotídica y aminoacídica observada entre las muestras 2 y 35 fue del 100% en ambos casos, y de un 89% y 99% entre éstas y el aislado porcino *GR8DSW* (JX091646), respectivamente. Las muestras 9 y 27 también mostraron una homología nucleotídica y aminoacídica del 100% y del 86% y 98% con respecto al aislado porcino *CC32SW* (JX091644), respectivamente.

Los macerados de heces positivos para PTV fueron analizados por las RT-PCR descritas para caracterización molecular sin obtener resultados positivos en ningún caso (*Tabla 35*).

GÉNERO	REGIÓN	REFERENCIA	MUESTRAS FECALES EXAMINADAS					ID GENBANK
			AÑO	Nº MUESTRAS ANALIZADAS	PTV +	PSV+	PTV+ PSV+	
Detección RT-PCR								
Teschovirus	5'NTR	Palmquist y cols 2002	2007	28	19	0	2	7
Sapelovirus			2011	35	9	0	2	24
TOTALES				63	28	0	4	31
Caracterización molecular (PTV-PSV)								
Teschovirus	VP2	kaku y cols 2007	2007	21	0			
			2011	11	0			
Teschovirus	VP1	Cano-Gómez y cols 2011	2007	21	0			
			2011	11	0			
Sapelovirus	VP4	En este estudio	2007	2			2	JX091639-
			2011	2			2	JX091642
TOTALES					0		4	

GÉNERO	REGIÓN	REFERENCIA	AÑO	Nº MUESTRAS ANALIZADAS	AISLAMIENTO VÍRICO			ID GENBANK
					ECP+	PTV+	PSV+	
Detección RT-PCR								
Teschovirus	5'NTR	Palmquist y cols 2002	2007	21	2	0	0	
Sapelovirus			2011	11	4	4	0	
TOTALES				32	6	4	0	
Caracterización molecular (PTV)								
Teschovirus	VP2	kaku y cols 2007	2007	4		0		
			2011			0		
Teschovirus	VP1	En este estudio	2007			0		JX069832-
			2011	4		3		JX069834
TOTALES						3		

Tabla 35. Resultados obtenidos en el estudio de teschovirus y sapelovirus en jabalíes salvajes. En la parte superior se representa los resultados obtenidos de las muestras fecales examinadas. En la parte inferior se muestra los resultados obtenidos del aislamiento vírico llevado a cabo en el estudio.

El aislamiento vírico se efectuó como se detalla en la parte de metodología 1.2. De las 63 muestras analizadas, solamente 6 mostraron un ECP claro (9.52 %), de ellas 4 recogidas en 2011 y 2 en 2007. Se examinaron los sobrenadantes del cultivo de estos 6 aislados víricos mediante RT-PCR para teschovirus y sapelovirus, resultando que 4 fueron positivos a PTV, mientras que los aislados de las 2 muestras restantes, (ambas de 2007), fueron negativos tanto para PSV como para PTV, concluyéndose que correspondían a virus diferentes a los estudiados.

Los resultados de tipificación de los teschovirus aislados de jabalíes fueron los siguientes (*Tabla 35*):

- Los aislados 4,7 y 10 (2011) fueron positivos para la RT-PCR.1 (2I-2V), obteniendo una secuencia casi completa con gran similitud con el serotipo 5. La RT-PCR que amplifica la proteína VP2 no obtuvo resultados satisfactorios.
- Uno de los aislados resultó negativo en todas las RT-PCR de tipificación ensayadas.
- Para mejorar la secuenciación del amplicón obtenido mediante la RT-PCR.1, se diseñaron primers específicos para el serotipo 5 (apartado 3.4.1.1 de métodos moleculares). De esta forma se obtuvieron 3 secuencias completas de la VP1 (783 nt) con una homología del 100% entre los aislados 4 y 10; y del 99,8 % entre éstas y el aislado 7. Del mismo modo, la mayor homología nucleotídica y aminoacídica encontrada fue del 89% y el 95%, respectivamente, con respecto al aislado español CC42 (JF724013).
- Las 3 secuencias de VP1 de teschovirus de jabalíes fueron incluidas en el análisis filogenético realizado con todas las secuencias de este tipo disponibles, trabajo que se describe en el apartado siguiente.

1.4.2 Análisis filogenético de las secuencias de teschovirus y sapelovirus

El análisis filogenético realizado con las secuencias obtenidas de teschovirus de jabalíes confirmó la relación de éstos con el aislado CC42 (*Figura 34*) pasando a formar parte del *cluster* que engloba a aislados de genotipo 5. Por otra parte, la relación filogenética entre las diferentes cepas de sapelovirus no pudo ser resuelta porque no existen grupos monofiléticos definidos cuando se analiza la proteína VP4. Sin embargo, sí que existe una mayor proximidad de los aislados 9 y 27 con el aislado porcino español CC32SW (JX091644), al igual que los aislados 2 y 35 presentan una proximidad mayor con el aislado GR8DSW (JX091646), ambas cepas porcinas españolas aisladas en 2006 (Asturias) y 2004 (Granada), respectivamente (*Figura 35*).

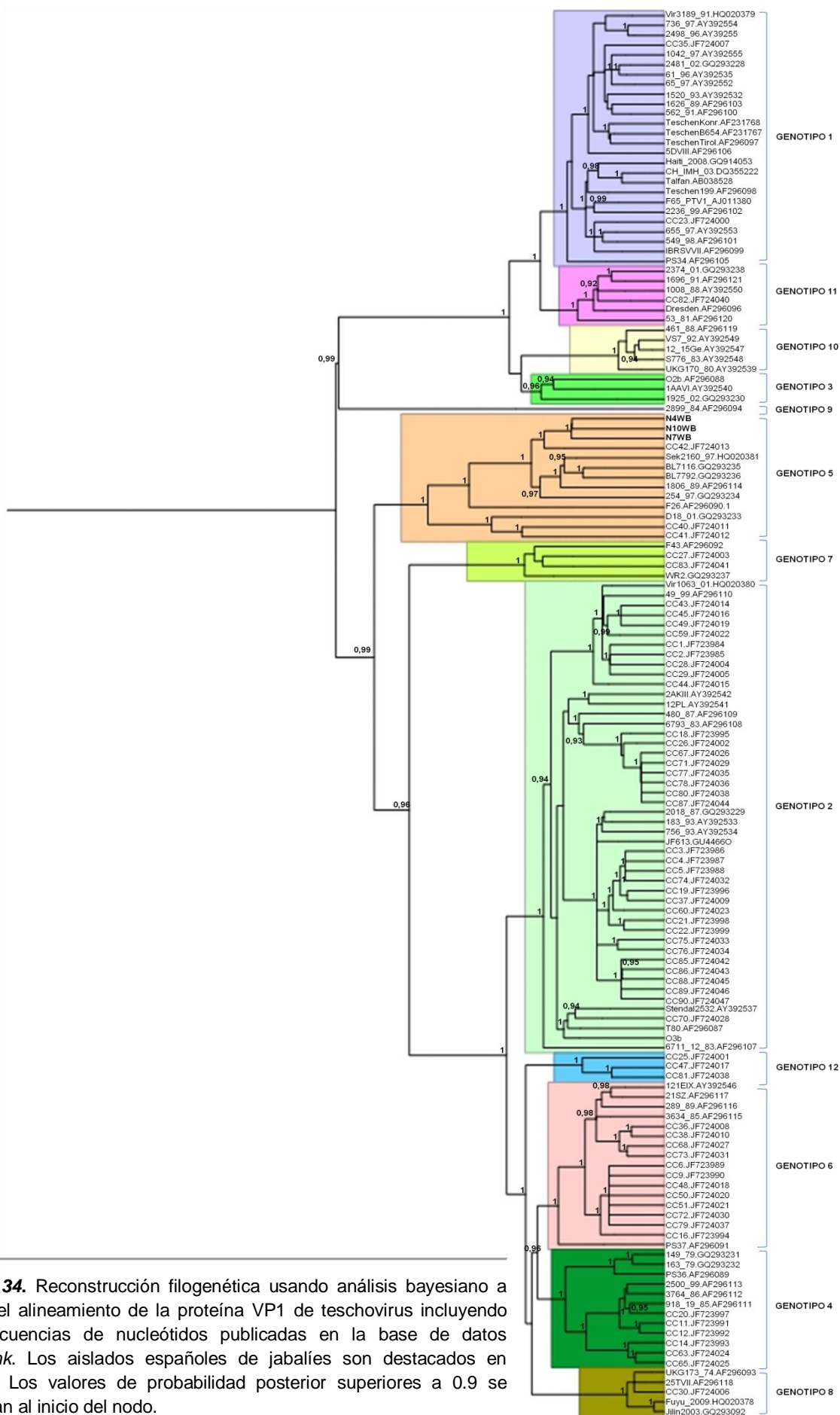


Figura 34. Reconstrucción filogenética usando análisis bayesiano a partir del alineamiento de la proteína VP1 de teschovirus incluyendo 140 secuencias de nucleótidos publicadas en la base de datos Genbank. Los aislados españoles de jabalíes son destacados en negrita. Los valores de probabilidad posterior superiores a 0.9 se muestran al inicio del nodo.

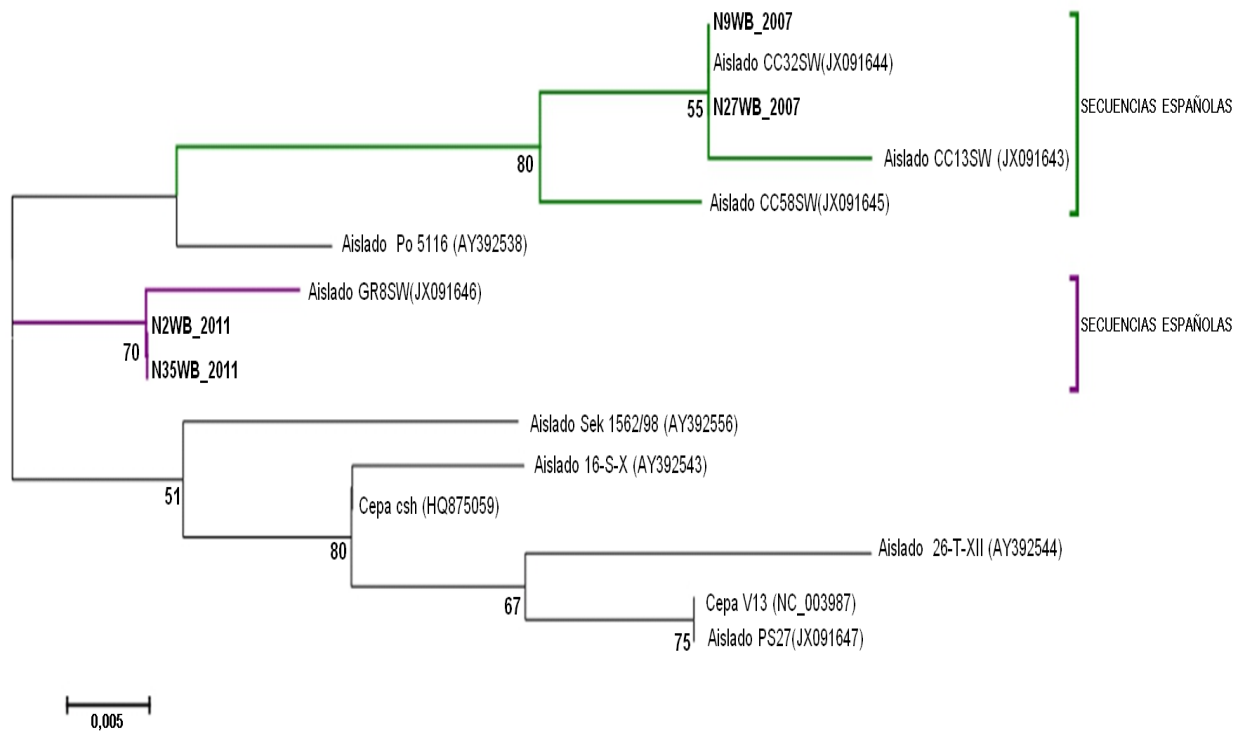


Figura 35. Árbol filogenético construido con el método de máxima verosimilitud a partir del alineamiento de la proteína VP4 de sapelovirus incluyendo 11 secuencias de aminoácidos publicadas en la base de datos *Genbank*. Los aislados españoles de jabalíes son destacados en negrita. Los valores de *bootstrap* se muestran al inicio del nodo.

2. Caracterización de un nuevo genotipo / serotipo de teschovirus aislado en España: Teschovirus-12. Tropismo, patogenicidad y protección cruzada

2.1 Caracterización genotípica: secuenciación del genoma completo

Con el objeto de realizar un estudio filogenético más exhaustivo utilizando la poliproteína estructural completa (P1), se llevó a cabo la secuenciación casi completa de uno de los representantes que formaban el nuevo cluster diferenciado denominado PTV-12. Para ello se seleccionó el aislado CC25 (Identificador en *Genbank*: proteína VP1: JF724001; genoma parcial: JN859128) y se ensayaron las RT-PCR como se describe en el apartado 3.4.3 de métodos moleculares. Como resultado, se obtuvo una secuencia de 6904 nucleótidos que englobaba parcialmente las regiones no codificantes 5' y 3', y completamente la región codificante de las proteínas L, P1, P2 y P3.

2.2 Análisis de homología nucleotídica y aminoacídica

Con la finalidad de conocer la similitud del nuevo genotipo con los genotipos ya descritos, se realizó un análisis de similitud de la región menos conservada (P1) a nivel nucleotídico y aminoacídico. Esta región es idónea para diferenciar y tipificar a los teschovirus (Zöll y cols., 2001). Del mismo modo, se comparó el genoma completo obtenido con las secuencias disponibles en *Genbank*. Los resultados con respecto a la región P1 indicaban una mayor homología a nivel nucleotídico y aminoacídico con aislados de genotipo 2, 4, 6 y 8 (todos ellos pertenecientes al subgrupo III), mostrando una identidad máxima entre el 81-82% y 86-87%, respectivamente. Estos porcentajes nos indicaban que, pese a la similitud encontrada, el nuevo genotipo difiere de forma significativa con respecto a los genotipos 2, 4, 6 y 8. Con respecto a los genotipos 1, 3, 5, 7, 9, 10, 11 y 13 las identidades fueron aún menores (75-79%). Sin embargo, las diferencias globales con los demás genotipos disminuyeron cuando comparamos el genoma completo a nivel nucleotídico, obteniendo valores comprendidos entre 85-86%. Esta mayor homología se explica porque la poliproteína P2 y P3 están más conservadas que la región P1 en todos los genotipos de teschovirus (*Tabla 36*).

Las diferencias nucleotídicas y aminoacídicas, las cuáles eran similares a las encontradas cuando se compara genotipos distintos, indicaban claramente que nos encontrábamos ante un genotipo nuevo y posiblemente ante un serotipo distinto a los estudiados previamente.

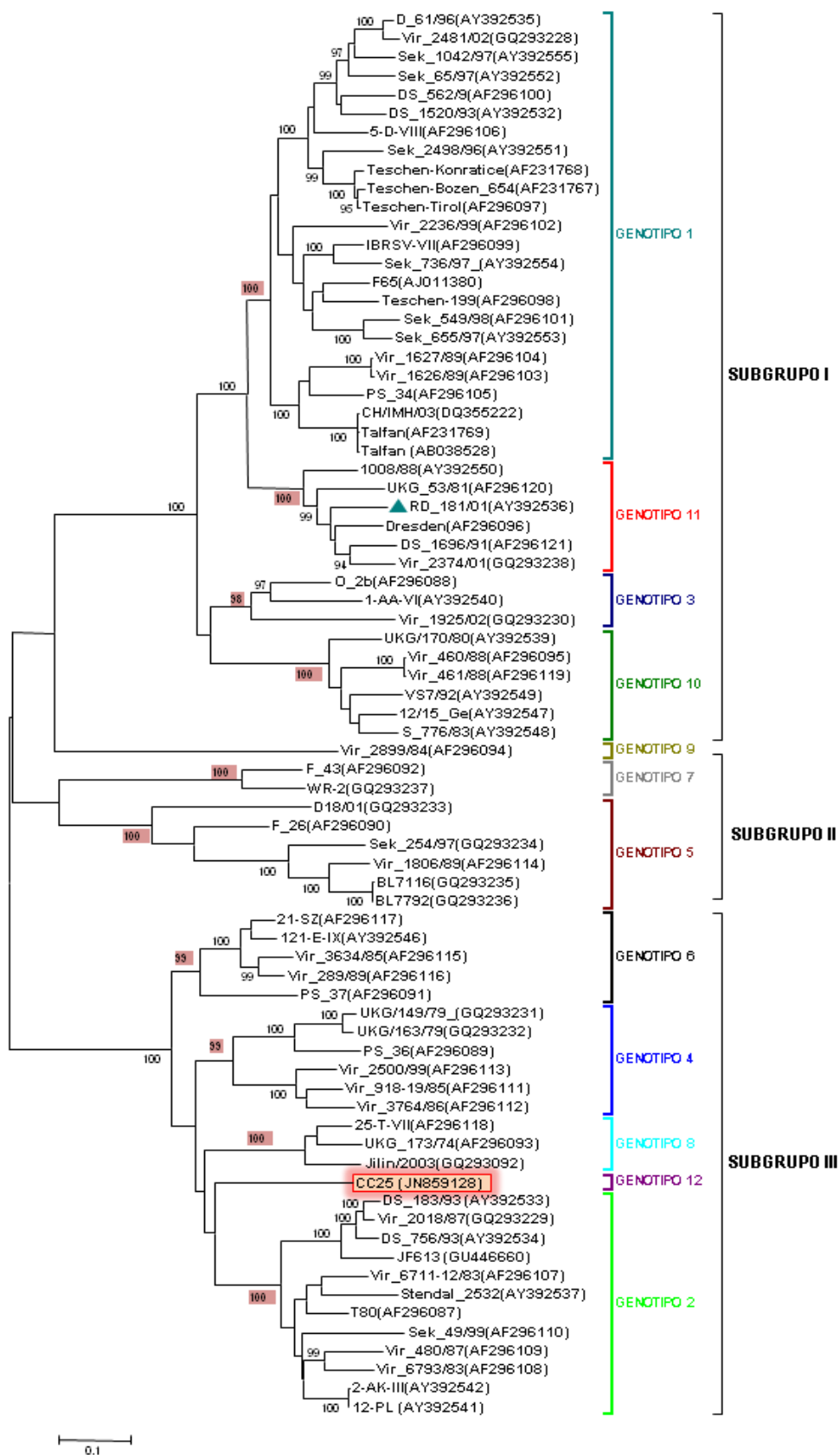
IDENTIFICADOR	DESCRIPCIÓN	GENOTIPO	COBERTURA	IDENTIDAD MÁXIMA	IDENTIFICADOR	DESCRIPCIÓN	GENOTIPO	COBERTURA	IDENTIDAD MÁXIMA
AY392541	Aislado 12-PL	PTV2	100%	82%	AF296093	Cepa UKG 173/74	PTV8	100%	86%
AF296116	Cepa Vir 289/89	PTV6	99%	82%	AF296118	Cepa 25-T-VII	PTV8	99%	86%
AY392542	Aislado 2-AK-III	PTV2	100%	82%	AF296087	Cepa T80	PTV2	99%	86%
AF296107	Cepa Vir 6711-12/83	PTV2	100%	82%	AF296089	Cepa PS36	PTV4	100%	85%
AF296113	Aislado 121-E-IX	PTV6	99%	82%	AF296115	Cepa Vir 3634/85	PTV6	99%	85%
AF296109	Cepa PS36	PTV4	98%	82%	AF296091	Cepa PS37	PTV6	99%	85%
AY392546	Aislado DS 183/93	PTV2	96%	82%	AF296109	Cepa Vir 480/87	PTV2	98%	85%
GQ293231	Cepa UKG/149/79	PTV4	99%	81%	JN710381	Cepa Jilin/2003/2	PTV8	97%	85%
AF296093	Cepa Vir 480/87	PTV2	100%	81%	HQ020378	Cepa Fuyu 2009	PTV8	97%	85%
AF296089	Cepa UKG 173/74	PTV8	99%	81%	GQ293092.2	Cepa Jilin/2003	PTV8	96%	85%
AF296110	Cepa Jilin/2003/2	PTV8	96%	81%	AF296108	Cepa Vir 6793/83	PTV2	95%	85%
GQ293229	Cepa Fuyu 2009	PTV8	96%	81%	AF296113	Cepa Vir 2500/99	PTV4	94%	85%

IDENTIFICADOR	DESCRIPCIÓN	GENOTIPO	COBERTURA	IDENTIDAD MÁXIMA
AAR31753	Aislado 12-PL	PTV2	100%	87%
AAR31754	Aislado 2-AK-III	PTV2	100%	87%
AAK12401	Cepa Vir 6711-12/83	PTV2	100%	87%
AAK12402	Cepa Vir 6793/83	PTV2	100%	87%
AEQ67397	Cepa Jilin/2003/2	PTV8	100%	87%
AEL29703	Cepa Fuyu 2009	PTV8	100%	87%
AAK12405	Cepa Vir 918-19/85	PTV4	100%	87%
AAK12407	Cepa Vir 2500/99	PTV4	100%	87%
AAR31758	Aislado 121-E-IX	PTV6	100%	87%
AAK12411	Aislado 21-SZ	PTV6	100%	87%
AAK12385	Cepa PS37	PTV6	100%	86%
ACT65996.2	Cepa Jilin/2003	PTV8	100%	86%

Tabla 36. Análisis comparativo de homología del genoma del aislado CC25 (PTV12). En la parte superior se compara la poliproteína P1 a nivel nucleotídico (izquierda) y aminoacídico (derecha), con los aislados y cepas publicados en la base de datos de *Genbank*. En la parte inferior izquierda, se compara la secuencia del genoma (6904 nt) del aislado CC25 (GC) a nivel nucleotídico, del mismo modo al descrito anteriormente.

2.3 Análisis filogenético de la región P1

De igual manera a la mostrada en los análisis filogenéticos con la proteína VP1, la representación filogenética de la poliproteína P1 mostraba una agrupación en un *cluster* bien diferenciado que correspondía con el aislado CC25 (*Figura 36*). Por lo tanto, y a la vista de los resultados filogenéticos llevados a cabo, tanto de la proteína VP1 como P1 completa, el aislado CC25 se corresponde con un nuevo genotipo, denominado **Teschovirus-12** (PTV12) (www.picornaviridae.com).



Figuras 36. Análisis filogenético de la poliproteína P1 de teschovirus. El nuevo genotipo fue designado como CC25 seguido de su identificador de *Genbank* (rectángulo rojo). El resto de genotipos englobados en el árbol aparecen en **negrita** con un identificador y un nombre descrito en la base de datos *Genbank*. Las líneas de colores delimitan los genotipos mientras que las líneas negras definen los grupos dentro del G⁰ *Teschovirus*. Los valores de *bootstrap* superiores al 90 % son mostrados en cada nodo.

2.4 Estudios *in-vivo*: Estudio del tropismo y la patogenicidad del aislado CC25 (PTV12) en su hospedador natural. Estudio de protección cruzada

Con el objetivo principal de demostrar que el aislado CC25 pertenecía a un serotipo diferente a los descritos con anterioridad, y a su vez conocer su posible patogenicidad, tropismo tisular y el desarrollo de protección cruzada, se realizaron ensayos de inoculación experimental usando como modelo de estudio cerdos de la raza *minipig* (Cerdo de Sach).

Tal como se describe en la sección “métodos” (apartado 6.2.1) se inocularon 6 cerdos con una dosis alta del aislado CC25. En paralelo y como grupo control, 3 cerdos fueron inoculados de la misma manera con sobrenadante de cultivo celular de la línea celular IBRS-2 (Figura 37).

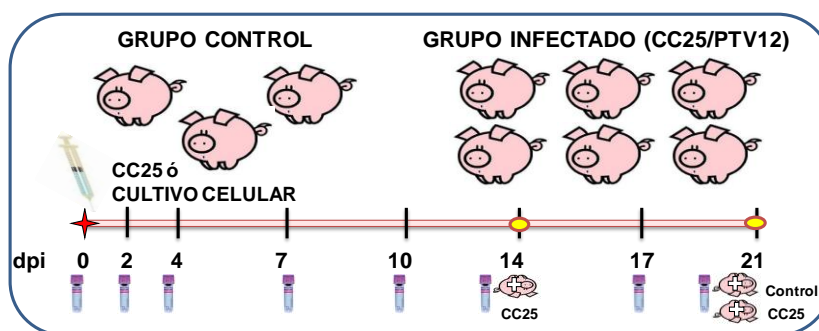


Figura 37. Diagrama representativo de la inoculación y del muestreo en el estudio del aislado CC25 (PTV12).

En el transcurso de dicho experimento, los animales inoculados con el aislado CC25 permanecieron asintomáticos, sin desarrollar los signos clínicos atribuibles a la enfermedad de Teschen-Talfan. La temperatura corporal fue medida puntualmente, sin detectar picos de fiebre ni en los controles ni en los animales infectados (Figura 38).

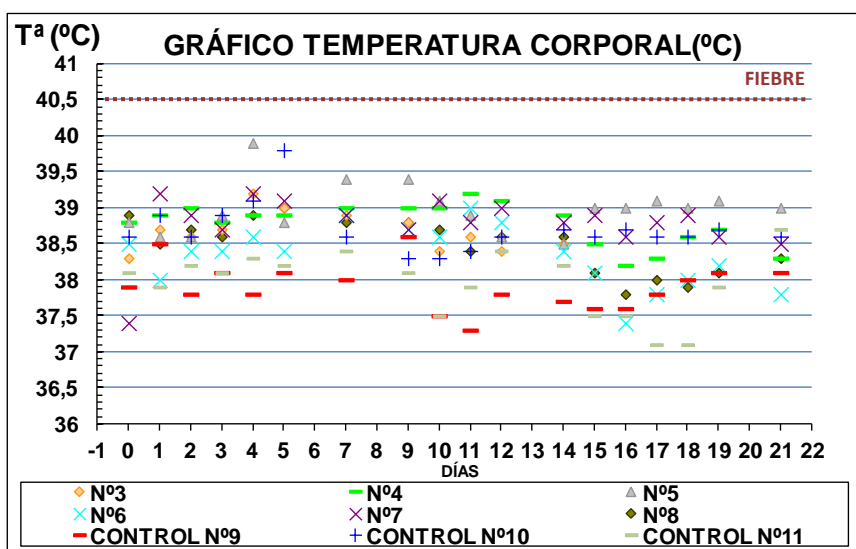


Figura 38. Gráfica detallada de las temperaturas tomadas durante la duración del experimento de inoculación del aislado CC25.

2.4.1 Caracterización serológica

Los animales inoculados con CC25 comenzaron a desarrollar AcN detectables a 4 dpi. La seroconversión se observó a partir del 7 dpi, alcanzando un título medio aproximado de 1:2450 a 14 dpi, decreciendo levemente entre los 17 y 21 dpi. Los controles se mantuvieron negativos durante todo el muestreo (*Figura 39*).

Estos datos indican que la inoculación vía oral desencadenó una infección en los animales inoculados, que desarrollaron una respuesta inmune de base humoral con altos títulos de anticuerpos neutralizantes frente al aislado CC25 (PTV12).

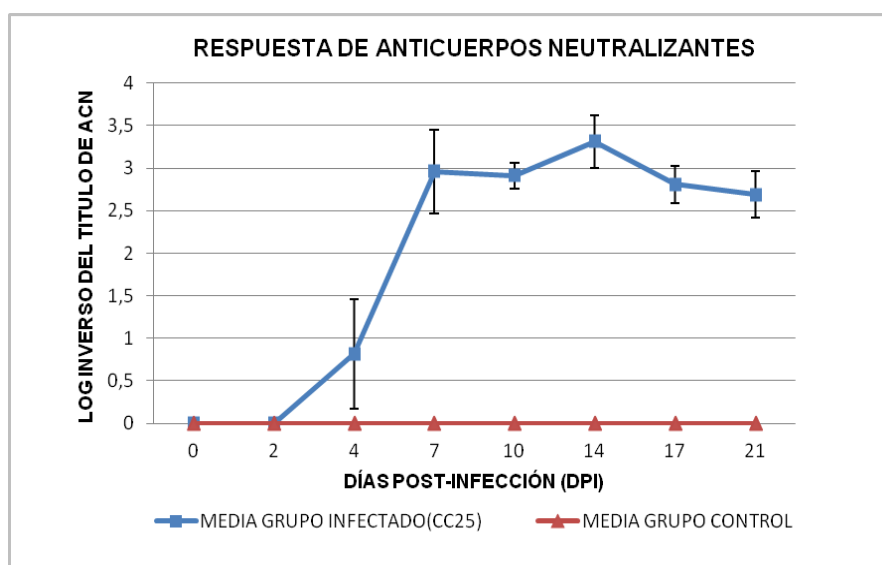


Figura 39. Respuesta inmune de base humoral, representada como media del logaritmo inverso del título de anticuerpos neutralizantes, desarrollada por los animales inoculados con el aislado CC25 (PTV12) (línea azul) y del grupo control del experimento (línea roja). Como antígeno se empleó el mismo aislado empleado en la inoculación (CC25). Las barras de error (línea negra) representan la desviación estándar de los datos.

2.4.1.1 Pruebas de neutralización del aislado CC25 con antisueros específicos frente a cepas víricas de referencia y de campo

El aislado CC25 fue enfrentado a antisueros específicos frente a cepas de referencia de distintos serotipos de teschovirus, sapelovirus y enterovirus-B, exceptuando el serotipo 10, para el cual no se disponía de antisuero específico. A su vez, se ensayaron también antisueros específicos obtenidos frente a distintos aislados de campo españoles. Los resultados nos indicaban que ninguno de los antisueros empleados fue capaz de neutralizar al virus de manera específica (en algunos casos se observó una débil neutralización que sólo podía ser atribuida a una reacción cruzada entre serotipos o géneros) (*Tabla 37*). Estos resultados demuestran que el aislado CC25 pertenece a un serotipo de teschovirus diferente a los descritos previamente.

ANTISUEROS DE REFERENCIA	CEPA HOMÓLOGA	TÍTULO VN CON CC25 (PTV12)	TÍTULO VN CON CEPA HOMÓLOGA	ANTISUEROS DE REFERENCIA Y DE CAMPO	CEPA HOMÓLOGA	TÍTULO VN CON CC25 (PTV12)	TÍTULO VN CON CEPA HOMÓLOGA
AS.PTV1	PS34	≤1:10	1:5120	AS.PTV8	UKG 173/74	≤1:10	1:640
AS.PTV2	O3b	1:20	1:5120	AS.PTV11	Dresden	≤1:10	1:320
AS.PTV3	O2b	≤1:10	1:5120	AS.PTV8	UKG 173/74	1:10	1:640
AS.PTV4	PS 36	1:10	≥1:1280	AS.PTV9	Vir 2899/84	≤1:10	1:320
AS.PTV5	F 26	≤1:10	≥1:1280	AS.PTV9	Vir 2899/84	1:40	≥1:5120
AS.PTV6	PS 37	≤1:10	1:10240	AS.PTV8	UKG 173/74	1:40	1:2560
AS.PTV7	WR2	≤1:10	≥1:1280	AS.PTV2	CC80	1:10	1:120
AS.PSV	PS-27	≤1:10	1:640	AS.PTV2	CC70	≤1:10	1:120
AS.PEV9	UKG/410/73	≤1:10	1:10240	AS.PTV2	CC78	1:10	≥1:1280
AS.PEV10	LP54/UK/75	≤1:10	1:80	AS.PTV6	CC79	≤1:10	1:160
AS.PAD	030-PDV	≤1:10	ND	AS.PSV	13M	1:40	1:5120

Tabla 37. Resultados de la VN de los antisueros de referencia y de campo específicos para el G⁰ *Teschovirus*, *Sapelovirus* y *Enterovirus-B* frente al aislado CC25 (PTV12) y su cepa homóloga. PTV: *Teschovirus*; PSV: *Sapelovirus*; PEV: *Enterovirus*. En negrita se destacan resultados de neutralización débil (comparados con los títulos obtenidos frente a las cepas homólogas), y que son interpretados como reacciones inespecíficas.

2.4.1.2 Pruebas de neutralización de cepas de referencia para el género *Teschovirus* con sueros positivos a CC25

Se seleccionaron sueros positivos de dos animales que habían sido inoculados con el aislado CC25 (14 dpi). Dichos sueros fueron enfrentados a las 11 cepas virales de referencia del G⁰ *Teschovirus*. Los títulos de AcN obtenidos frente a cepas heterólogas fueron en todos los casos menores que los obtenidos frente a la cepa homóloga (Tabla 38). Sin embargo, se observaron títulos relevantes de AcN en el suero del animal N^o6, principalmente frente a PTV1, PTV2 y PTV8, y en menor medida frente a PTV4, PTV6 y PTV10. Igualmente, el suero del animal N^o8 neutralizó a PTV1 y en menor medida a PTV10 (Tabla 38). A la vista de estos resultados se analizaron los sueros recogidos previamente a la inoculación, frente a PTV1 (cepa *Teschen-Tirol*) obteniéndose títulos de AcN de 1:10 (animal N^o6) y 1:20 (animal N^o8). Los sueros de estos mismos animales recogidos a 7, 14 y 21 dpi mostraron seroconversión frente a la cepa *Teschen-Tirol* (PTV1) (títulos ≥ 1:80). Al mismo tiempo, al menos uno de los cerdos empleados como control sufrió esta misma seroconversión.

A la vista de estos resultados, se puede afirmar que los sueros de animales infectados con CC25 neutralizan con mayor intensidad a la cepa homóloga, si bien es cierto que se observan neutralizaciones relevantes frente a cepas heterólogas, algo que no puede atribuirse a neutralización cruzada, que ya fue descartada en el apartado anterior.

SUERO	PTV1 (PS34)	PTV2 (O3b)	PTV3 (O2b)	PTV4 (PS36)	PTV5 (F26)	PTV6 (PS37)	PTV7 (WR2)	PTV8 (UKG170/83)	PTV9 (Vir2899/84)	PTV10 (12/15 Ge)	PTV11 (Dresden)	PTV12 (CC25)
ANIMAL N°6	1:320	1:640	1:20	1:80	1:40	1:80	1:10	1:160	1:40	1:80	1:20	1:2560
ANIMAL N°8	1:320	1:20	≤1:10	1:10	1:20	1:20	≤1:10	≤1:10	1:10	1:40	1:20	1:640

Tabla 38. Resultados de la VN de sueros porcinos procedentes del experimento de inoculación del aislado CC25 (PTV12) frente a cepas víricas de referencia del G^o *Teschovirus*. PTV: *Teschovirus*. En gris se muestra el título de AcN frente a la cepa homóloga. En negrita se destacan resultados de neutralización significativa frente a cepas heterólogas, que fueron repetidos, confirmándose el resultado.

2.4.2 Detección del virus en sangre, saliva y heces

Se analizó la presencia de teschovirus por RRT-PCR (apartado 3.3.1 de métodos moleculares) en muestras de sangre, hisopo oral y heces de cerdos inoculados y controles, recogidas durante el experimento. El genoma vírico fue detectado únicamente a 2 dpi en sangre en uno de los animales inoculados con CC25 (N°7), indicando que la viremia comenzaba tempranamente y que rápidamente desaparecía. El virus fue detectado en saliva a 2, 4 y 7 dpi en todos los inoculados, y a día 14 en dos de ellos (N^{os} 4 y 6), siendo indetectable a 17 y 21 dpi. Ello muestra que en un estado inicial este virus es eliminado por saliva, desapareciendo paulatinamente. Todos los controles permanecieron negativos en sangre e hisopo oral.

En heces los resultados deben valorarse teniendo en cuenta que, previamente al experimento, el análisis de las muestras fecales por RRT-PCR demostró la presencia de teschovirus en la mayor parte de los animales seleccionados para el experimento. Recordemos también que la serología previa fue negativa para PTV. Con estas premisas, el análisis de heces reveló la presencia de virus en todos los animales inoculados a lo largo de todo el experimento, excepto en un caso en que no se detectó a los 14 dpi, posiblemente debido a la escasa cantidad de muestra recogida. En dos de los tres controles no fue detectado genoma vírico en ninguna de las muestra recogidas a lo largo del experimento. Sin embargo, en un tercer control se detectó genoma vírico en heces hasta el día 7 dpi. Igualmente, los resultados del análisis de heces al inicio del experimento (día "0") deben interpretarse con precaución, puesto que el método de recogida de muestras ese día (hisopo fecal) difirió del resto (heces) debido a la baja sensibilidad obtenida y a la poca cantidad de muestra tomada en el primer caso. Todos los resultados se resumen en la *tabla 39*.

GRUPO		DPI	0*	2	4	7	10	14	17	21
CONTROL	9	Sangre	-	-	-	-	-	-	-	-
		Heces	-	-	-	-	-	-	-	-
		H.oral	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	Sangre	-	-	-	-	-	-	-	-
		Heces	33,62	30,93	28,4	35,9	-	-	-	-
		H.oral	-	-	-	-	-	-	-	-
	11	Sangre	-	-	-	-	-	-	-	-
		Heces	-	-	-	-	-	-	-	-
		H.oral	-	-	-	-	-	-	-	-
CC25	3	Sangre	-	-	-	-	-	-	-	-
		Heces	37,04	24,69	31,24	27,44	35,74	33,84	-	-
		H.oral	-	38,84	34,71	34,44	-	-	-	-
	4	Sangre	-	-	-	-	-	-	-	-
		Heces	-	29,89	28,79	28,12	35,67	26,17	27,52	31,91
		H.oral	-	34,54	35,04	38,16	-	34,48	-	-
	5	Sangre	-	-	-	-	-	-	-	-
		Heces	-	35,52	29,25	26,57	28,85	28,34	26,61	30,64
		H.oral	-	34,46	32,96	34,87	-	-	-	-
	6	Sangre	-	-	-	-	-	-	-	-
		Heces	-	25,66	28,57	27,48	35,52	29,19	27,76	29,86
		H.oral	-	34,98	29,93	38,97	-	34,86	-	-
	7	Sangre	-	38,17	-	-	-	-	-	-
		Heces	-	35,42	29,7	27,36	32,16	28,88	29,61	31,68
		H.oral	-	38,6	33,16	36,85	-	-	-	-
	8	Sangre	-	-	-	-	-	-	-	-
		Heces	-	25,87	25,26	28,72	37,16	-	39,82	34,8
		H.oral	-	39,19	34,35	37,48	-	-	-	-

Tabla 39. Resumen de los datos obtenidos (Ct) por RRT-PCR frente a PTV en sangre, saliva y heces tras su inoculación con el aislado CC25 (Jiménez-Clavero y cols., 2003). *Muestreo de heces por hisopo fecal; -: Negativo.

2.4.3 Estudio del tropismo y la patogenicidad

Según el cronograma descrito en el apartado 6.2.3 de ensayos *in-vivo*, dos animales del grupo infectado (14 y 21 dpi) y un control (21 dpi) fueron sacrificados, recogiendo muestras para análisis moleculares, serológicos y anatomopatológicos siguiendo los procedimientos rutinarios.

2.4.3.1 Lesiones macroscópicas

En la inspección externa, ninguno de los 3 animales presentó alteraciones destacables. A nivel interno, todos ellos presentaron lesiones hepáticas compatibles con pseudocicatrices producidas por la migración de las larvas del nematodo *A. Suum*, conocidas comúnmente como manchas de leche. Además, se observó una dilatación cardíaca del ventrículo derecho, posiblemente de origen congénito por el alto grado de consanguinidad establecido en dicho núcleo porcino.

Por otro lado, se observó una destacada inflamación e hiperemia de la mucosa del estómago y del duodeno proximal principalmente, atribuible en parte a condiciones

ambientales y de manejo que pueden provocar situaciones de estrés en los animales. El control mostró un bazo aumentado de tamaño y congestivo. Únicamente los animales infectados presentaron un aumento de tamaño de los ganglios linfáticos mediastínicos y traqueo-bronquiales y de los ganglios linfáticos mesentéricos del aparato digestivo, principalmente los yeyunales. El resto de los órganos no presentó lesiones destacables (Figura 40).

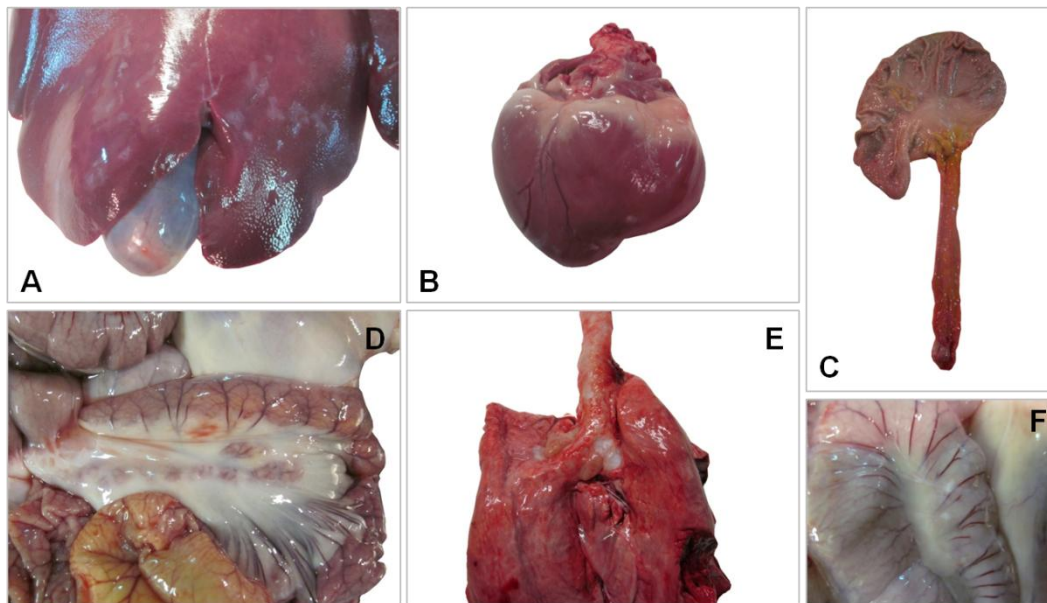


Figura 40. Lesiones macroscópicas. **A)** Hígado con una lesión secundaria debido a la migración del nematodo *Ascaris suum*. **B)** Cardiopatía con dilatación del ventrículo derecho. **C)** Enteritis y Gastritis. **D)** Ganglios linfáticos mediastínicos y yeyunales aumentados de tamaño. **E)** Ganglios linfáticos mediastínicos bronquiales aumentados de tamaño. **F)** Ingurgitación de circulación digestiva.

2.4.3.2 Lesiones microscópicas

El estudio histopatológico del sistema nervioso central (SNC) no mostró alteraciones de interés (Figura 41).

Los linfonodos mesentéricos de los animales inoculados presentaron una hiperplasia folicular linfoide con incremento del tamaño del centro germinativo donde se aprecia aumento del número de células blásticas linfocitarias. Las placas de Peyer mostraron una imagen reactiva discreta en el animal control, a diferencia de los animales inoculados que presentaron a los días 14 y 21 dpi una progresiva reacción en los folículos linfoides, consistente en incremento del centro germinativo y formación de medialunas linfocitarias más evidentes en el 21 dpi. El estudio histopatológico de las tonsilas no reveló diferencias significativas entre animales control y problema. Sin embargo, en núcleos de linfoblastos de los folículos linfoides de la tonsila del animal inoculado N°3 se identificaron masas

eosinofílicas, esféricas, rodeadas de un halo refringente, identificadas como cuerpos de inclusión víricos, y compatibles con centros activos del ciclo vírico intracelular de teschovirus (PTV-12) (*Figura 42*).

El estudio del sistema digestivo mostró imágenes histológicamente normales. Sin embargo, el animal control, en el intestino delgado observamos fusión de las vellosidades intestinales, descamación e infiltrado inflamatorio que afecta principalmente a la región apical. En paralelo se observó hiperplasia de los folículos de placas de Peyer, lesiones compatibles con una enteritis catarral inespecífica (*Figura 43*).

El estudio inmunohistoquímico confirmó la presencia de proteínas víricas en los enterocitos de la válvula ileocecal del animal nº4 inoculado. En contraposición, no se detectó el virus en el animal control. Asimismo, en la lámina propia de la mucosa intestinal se apreció la presencia de células con morfología macrofágica marcadas mediante la técnica inmunohistoquímica en su citoplasma celular (*Figura 44*).

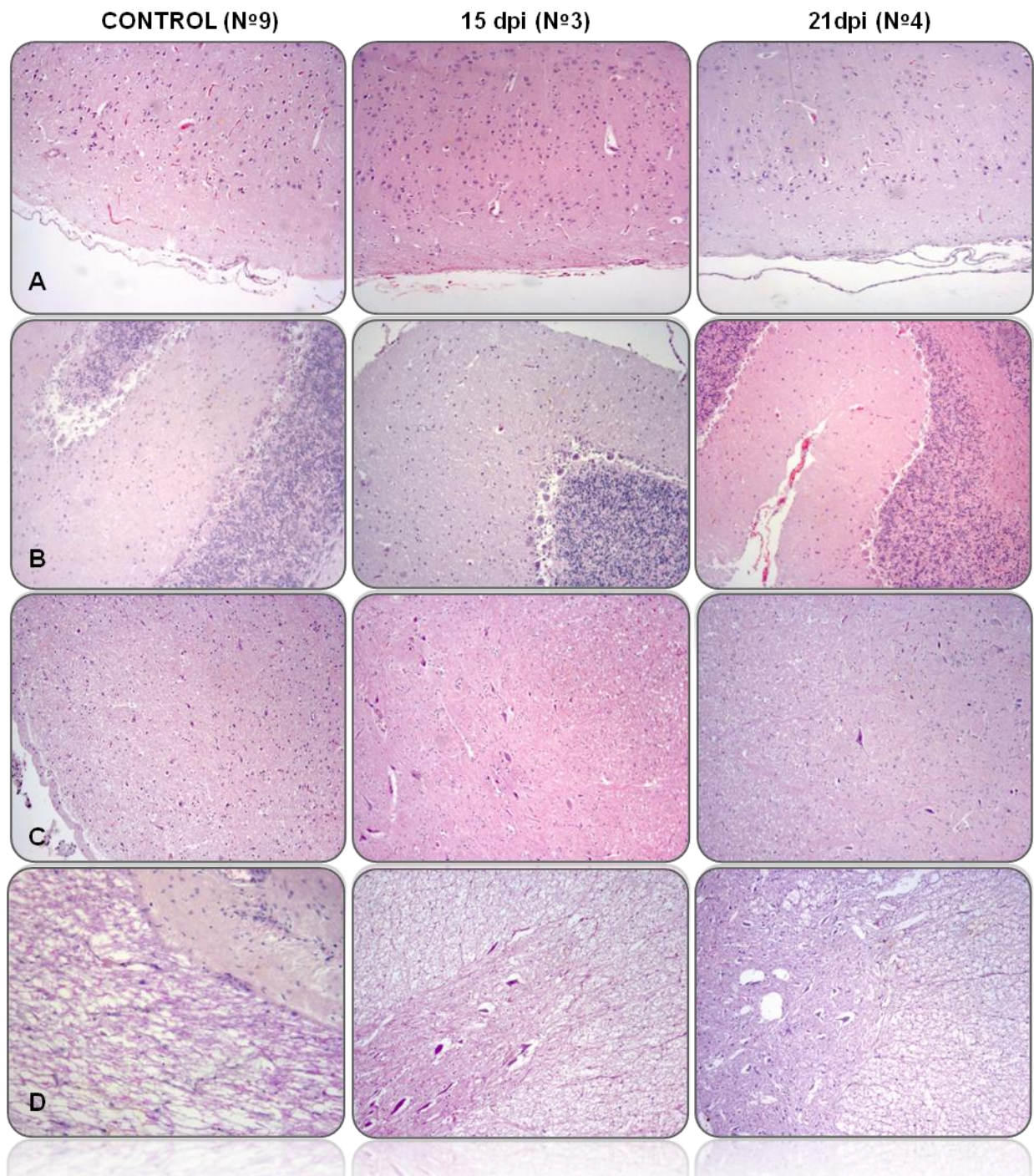


Figura 41. Estudio histopatológico del sistema nervioso central (SNC) de los cerdos inoculados con el aislado CC25 (Nº3 y 4, PTV-12) y del control del experimento (Nº9). Secciones de diferentes tejidos de SNC. Tinción realizada con HE.

- A) Corteza cerebral (10X)
- B) Cerebelo(10X)
- C) Bulbo raquídeo (10X)
- D) Médula espinal cervical (20X)

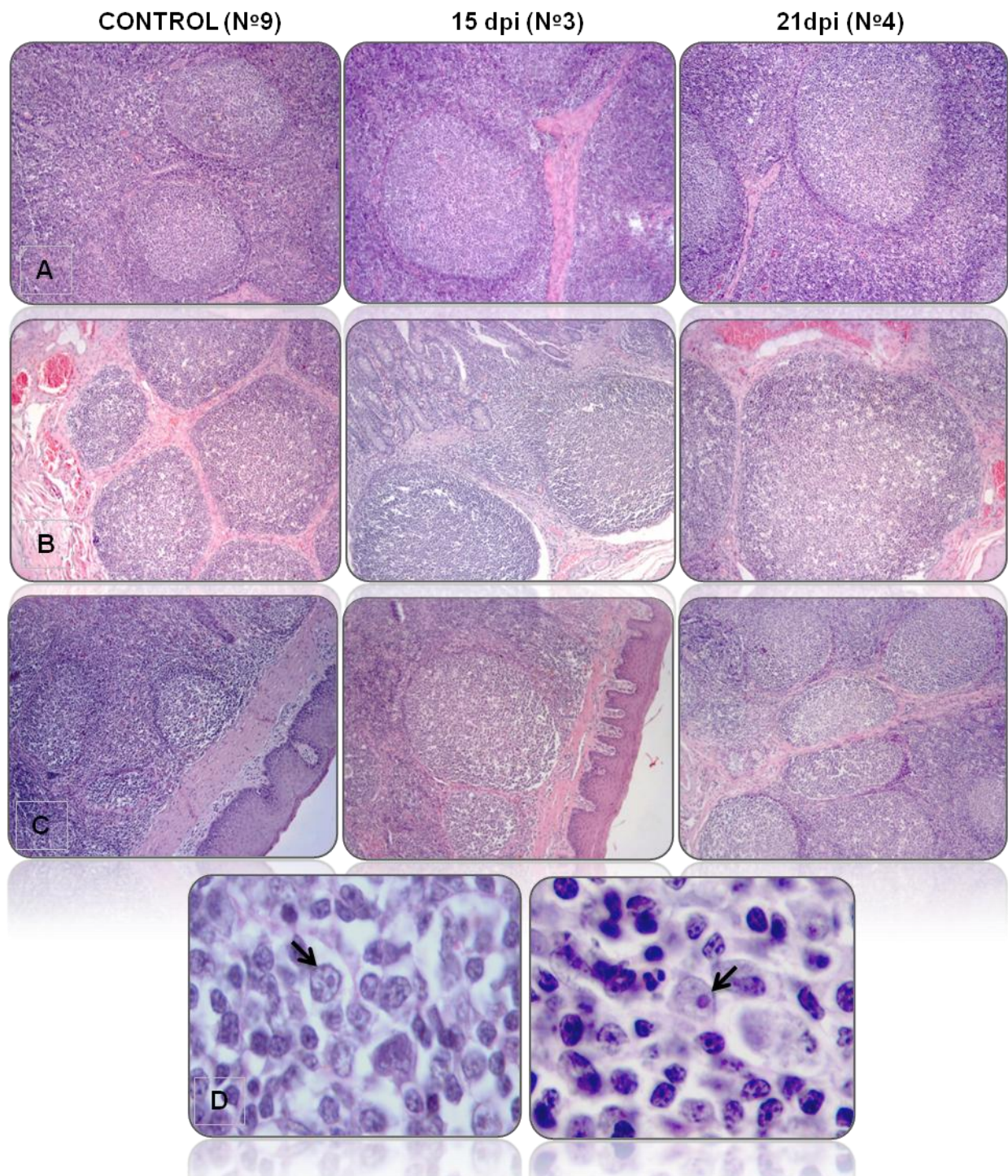


Figura 42. Estudio histopatológico del sistema linfoide (SL) de los cerdos inoculados con el aislado CC25 (N°3 y 4, PTV-12) y del control del experimento (N°9). Secciones de diferentes tejidos del SL. Tinción realizada con HE.

- A) Linfonodo mesentérico (20X)
- B) Placas de Peyer (10X-10X-20X)
- C) Tonsila (10X)
- D) Cuerpos de inclusión (Tonsila, N°3) (flecha negra) (100X)

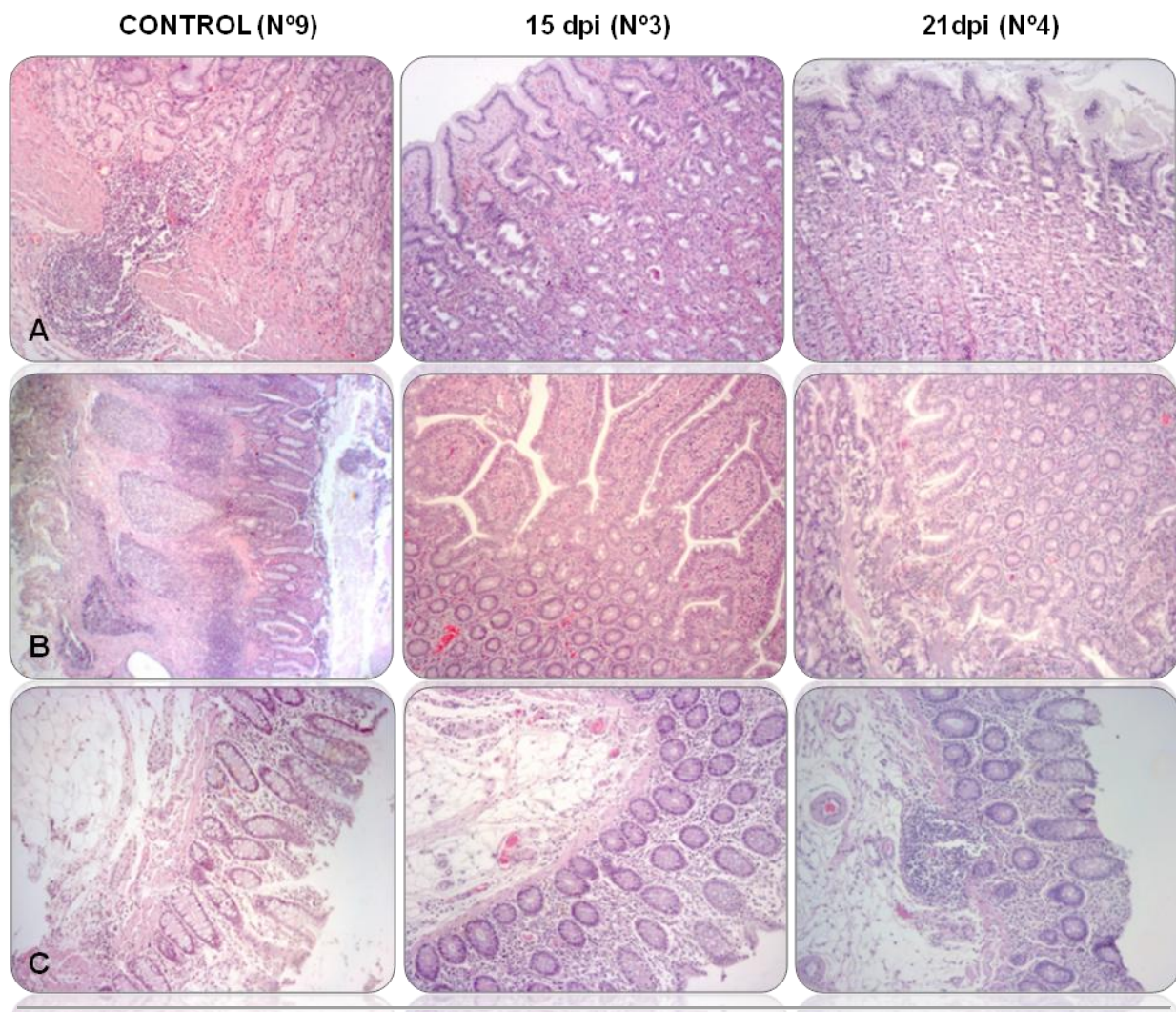


Figura 43. Estudio histopatológico del sistema digestivo (SD) de los cerdos inoculados con el aislado CC25 (N°3 y 4, PTV-12) y del control del experimento (N°9). Secciones de diferentes tejidos de SD. Tinción realizada con HE. **A)** Estómago (10X); **B)** Intestino delgado (duodeno) (10X-4X-4X); **C)** Colon (10X).

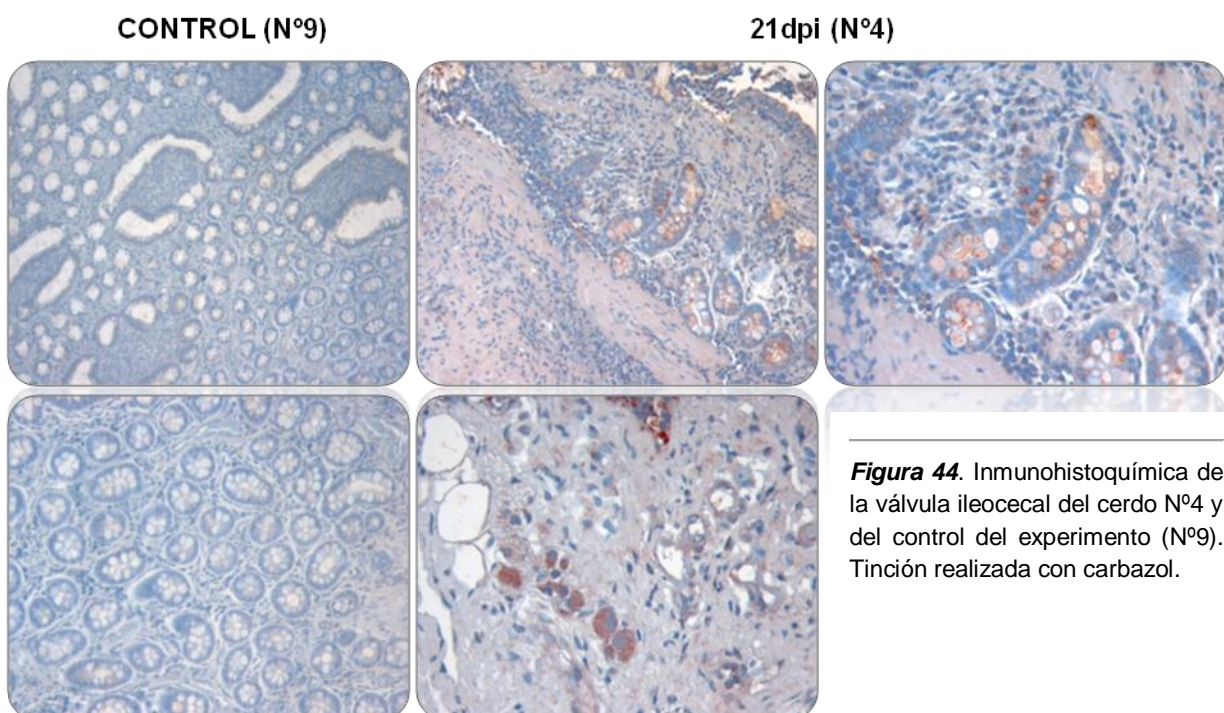


Figura 44. Inmunohistoquímica de la válvula ileocecal del cerdo N°4 y del control del experimento (N°9). Tinción realizada con carbazol.

2.4.3.3 Tropismo tisular del aislado CC25

Se analizaron muestras de los órganos y tejidos de los animales sacrificados (apartado anterior), tal y como se describe en la sección de métodos, apartado 6.2.3. La RRT-PCR específica para la detección de teschovirus reveló la presencia de genoma vírico únicamente en los sistemas digestivo y linfático. En ningún caso se detectó genoma vírico en sistema nervioso, pulmón, riñón, hígado y páncreas. Sin embargo, aisladamente se detectó genoma viral en el íleon (placas de Peyer) en el control N°9, posiblemente debido a una infección previa por teschovirus, a nivel de campo en este animal (*Tabla 40*).

DPI	IDENTIFICACIÓN					
	SISTEMA NERVIOSO	CEREBRO	CEREBELO	BULBO RAQUÍDEO	MÉDULA ESPINAL CERVICAL	
14	ANIMAL N°3 (CC25)	-	-	-	-	
21	ANIMAL N°4 (CC25)	-	-	-	-	
21	ANIMAL N°9(CONTROL)	-	-	-	-	
	SISTEMA LINFOIDE	ÍLEON(PLACAS DE PEYER)	GG.LINFÁTICO MESENTÉRICO	TONSILA	GG.LINFÁTICO SUBMANDIBULAR	BAZO
14	ANIMAL N°3 (CC25)	28,13	30,19	-	36,47	-
21	ANIMAL N°4 (CC25)	35,57	28,48	34,71	34	-
21	ANIMAL N°9(CONTROL)	30,88	-	-	-	-
	SISTEMA DIGESTIVO	ESTÓMAGO	DUODENO		COLON	
14	ANIMAL N°3 (CC25)	-	-		38,06	
21	ANIMAL N°4 (CC25)	37,02	-		36,22	
21	ANIMAL N°9(CONTROL)	-	-		-	
	OTROS ÓRGANOS	PULMÓN	PÁNCREAS	HÍGADO	RIÑÓN	
14	ANIMAL N°3 (CC25)	-	-	-	-	
21	ANIMAL N°4 (CC25)	-	-	-	-	
21	ANIMAL N°9(CONTROL)	-	-	-	-	

Tabla 40. Resumen de los datos obtenidos al analizar por RRT-PCR para detección de genoma de PTV una selección de tejidos de animales sacrificados a distintos días post-inoculación (dpi) del aislado CC25 (Jiménez-Clavero y cols., 2003). Los resultados se expresan en Ct (ciclo umbral). Un resultado negativo (Ct>41) se expresa con un guión ("-").

2.4.4 Estudio de protección cruzada frente a un serotipo heterólogo (aislado *Teschen-Tirol*, serotipo 1)

Con la finalidad de conocer si la infección con serotipo 12 confiere protección cruzada frente al desafío con un serotipo heterólogo, 4 cerdos previamente infectados con el aislado CC25 (serotipo 12), fueron desafiados con una dosis infectiva del aislado *Teschen-Tirol* (serotipo 1), como se detalla en el apartado 6.3.1 de ensayos in-vivo (*Figura 45*).

Estudios anteriores realizados en animales de experimentación (Mayr., 1962) probaron que la cepa *Teschen-Tirol* inducía lesiones en el SNC, siendo clasificada como cepa virulenta.

En paralelo y como grupo control de la virulencia del virus *Teschen-Tirol*, los 2 cerdos empleados como control en el experimento anterior fueron inoculados de igual modo que el grupo desafiado.

En el transcurso de dicho experimento, los animales inoculados con la cepa *Teschen-Tirol* no desarrollaron los signos clínicos esperados. La temperatura corporal fue medida puntualmente sin detectarse pirexia ni en los controles ni en los animales infectados (Figura 46).

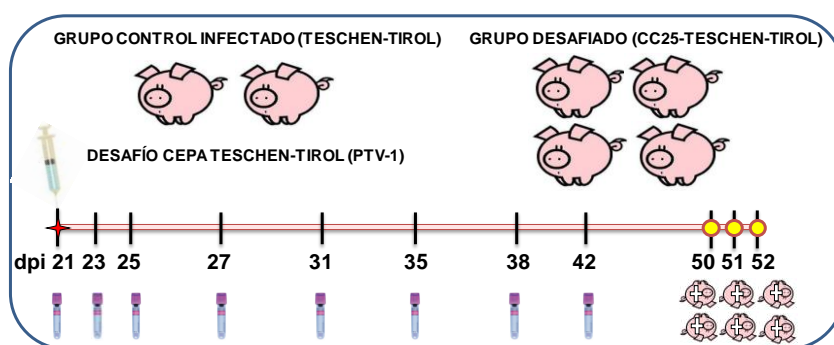


Figura 45. Diagrama representativo del desafío con la cepa *Teschen-Tirol* y del muestreo en el estudio de protección cruzada del aislado CC25 (PTV12).

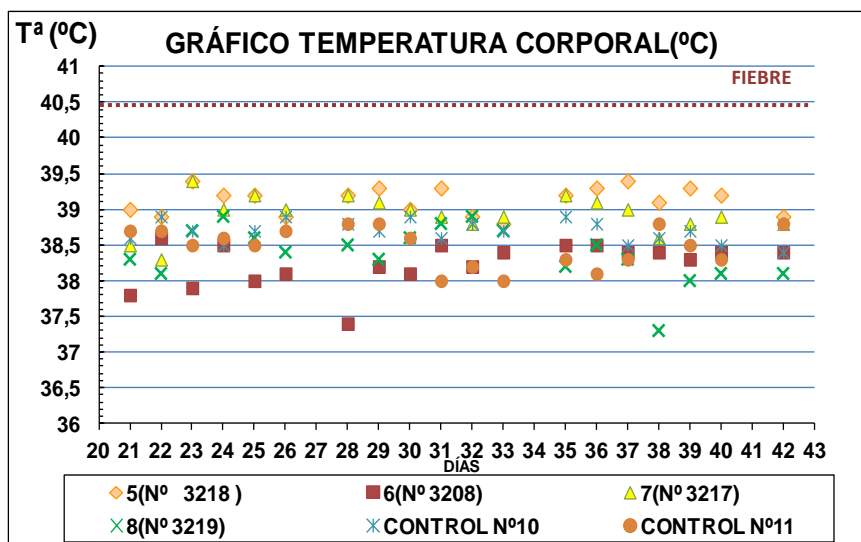


Figura 46. Gráfica detallada de las temperaturas tomadas durante la duración del experimento de protección cruzada.

2.4.4.1 Estudios serológicos

Como ya fue señalado en el apartado 2.4.1.2 los animales objeto del estudio presentaban inicialmente títulos bajos de AcN frente a la cepa *Teschen-Tirol*. El día del desafío los animales infectados previamente con CC25 presentaban un título medio de AcN de 1:60 a la cepa *Teschen-Tirol*, y un título medio de AcN aproximado de 1:550 al aislado CC25. De igual manera, el grupo control mostró un título medio de AcN de 1:30 a la cepa *Teschen-Tirol* y un título medio de AcN $\leq 1:10$ al aislado CC25 (*Figura 48.3 y 48.4*).

La seroconversión en el grupo control (inoculado solamente con el virus *Teschen-Tirol*) se observó a partir de 7^o día tras el desafío (28 dpi en el ensayo completo) alcanzando un título medio aproximado de AcN de 1:960 en el 10^o día tras el desafío (31 dpi en el ensayo completo). El título de AcN se mantuvo a 14, 17, 21 y 29 dpi. La seroconversión en el grupo desafiado se observó a partir del 7 dpi (28 dpi del ensayo completo), alcanzando un título medio aproximado de AcN de 1:1040 a 10 dpi (31 dpi del ensayo completo), manteniendo estos títulos prácticamente iguales a 14, 17, 21 y 29 dpi (*Figura 47.1*).

Estos datos indican que la inoculación de la cepa *Teschen-Tirol* vía oral desencadenó una infección en todos los animales inoculados, independientemente de que hubieran sido previamente infectados por CC25, mostrando una respuesta inmune de base humoral con altos títulos de anticuerpos neutralizantes frente a la cepa *Teschen-Tirol*. Por lo tanto, los AcN desarrollados frente al aislado no patógeno CC25, no impidieron la infección por la cepa *Teschen-Tirol*, descartándose en este caso la protección cruzada entre el serotipo 12 (CC25) y el serotipo 1 (*Teschen-Tirol*).

Por otro lado, los sueros pertenecientes al grupo control inoculado con *Teschen-Tirol* no presentaron reacción cruzada *in-vitro* cuando se enfrentaron al aislado CC25, mostrando en todos los casos títulos de anticuerpos $\leq 1:10$. Este resultado confirmaba la ausencia de protección cruzada entre ambos serotipos (*Figura 47.2*).

Además, la reactividad serológica leve observada con la cepa *Teschen-Tirol* desde el día 0dpi hasta el 21 dpi, no fue suficiente para impedir el desencadenamiento de la respuesta inmune tras el desafío con la misma cepa (*Figura 48.3*).

Cuando se midieron los títulos de AcN frente al aislado CC25 en el grupo desafiado, se encontró que éstos no variaron significativamente en el tiempo. Debido a que no existe interferencia serológica entre ambos virus, se puede asegurar que la infección por el aislado CC25 confirió a estos animales una respuesta humoral de carácter neutralizante duradera hasta el momento del sacrificio (50 dpi) con títulos medios de AcN de 1:880 (Figuras 47.2 y 48.4).

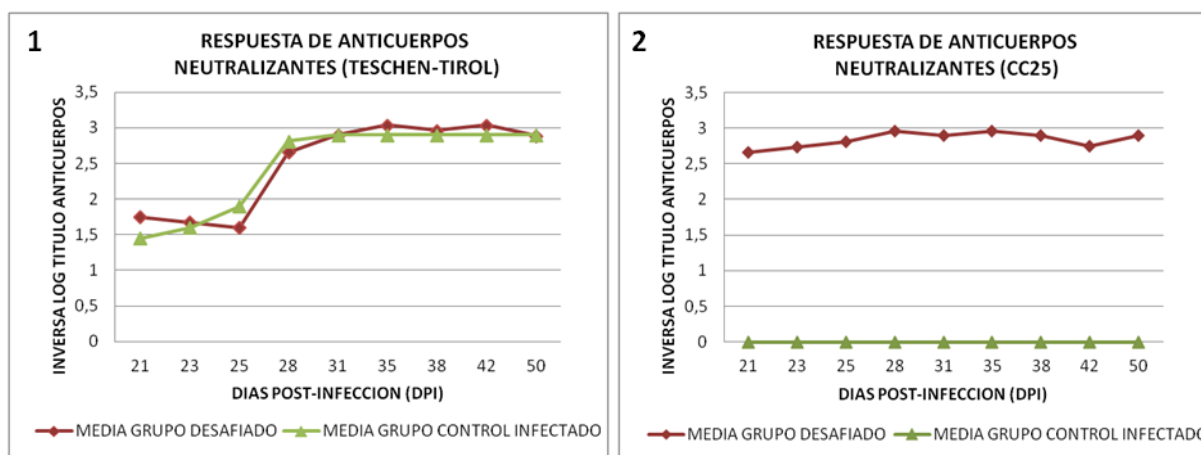


Figura 47. 1) Representación de la respuesta inmune de base humoral (AcN) desarrollada por los animales inoculados con la cepa *Teschén-Tirol* (PTV1) frente a la cepa *Teschén-Tirol*. **2)** Representación de la respuesta inmune de base humoral (AcN) de los animales inoculados con la cepa *Teschén-Tirol* (PTV1) frente al virus heterólogo CC25 (PTV12).

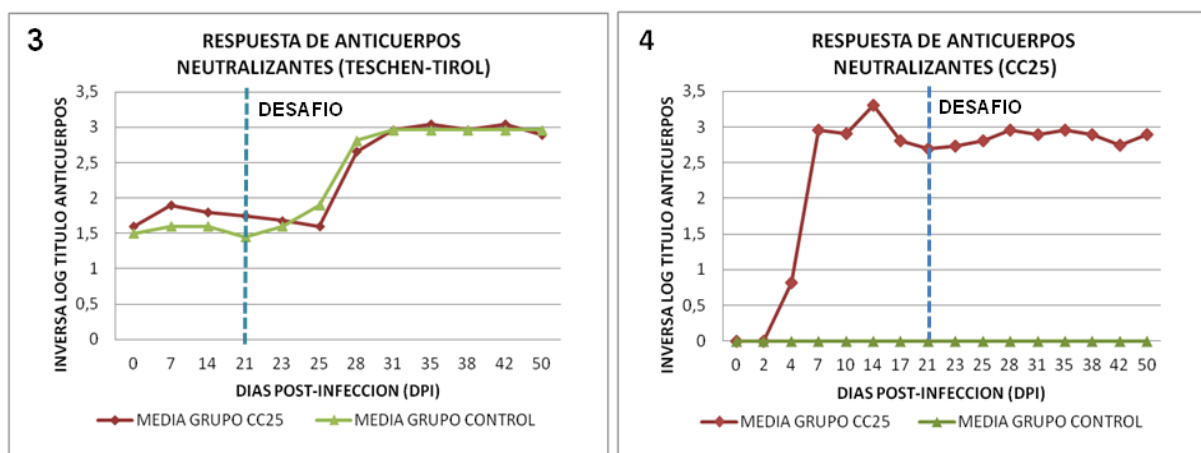


Figura 48. 3) Representación de la respuesta inmune de base humoral (AcN) desarrollada a lo largo de todo el ensayo frente a la cepa *Teschén-Tirol* (PTV1). **4)** Representación de la respuesta inmune de base humoral (AcN) desarrollada a lo largo de todo el ensayo frente a la cepa CC25 (PTV12).

3. Aplicación de nuevas tecnologías al conocimiento de los virus entéricos porcinos mediante secuenciación masiva de nueva generación (*Next Generation Sequencing*)

3.1 Análisis de las secuencias

La secuenciación masiva de los genomas de virus de ADN nos proporcionó 32.273 secuencias con un total de 15.549.272 pares de bases y una longitud media de secuencia de 481 nt. En el caso de los genomas de virus de ARN obtuvimos un mayor número de secuencias: 40.427, pero con una longitud media muy inferior a la esperada (196 nt). Posteriormente, el proceso de filtrado de secuencias repetidas redujo el número de secuencias a **30.736** y **23.182**, para virus ADN y virus ARN, respectivamente (*Tabla 41*).

		ADN	ARN
MG-RAST ^a	Nº lecturas	32.273	40.427
	Nucleótidos	15.549.272	7.943.019
	Longitud media (bp)	481 ± 171	196 ± 160
	GC (%)	39 ± 8 %	54 ± 11 %
cdHit ^b	Duplicados (Nº lecturas)	1.537	23.182
	Porcentaje (%)	4.76	42.66
	Nº lecturas final	30.736	23.182
M5RNA ^c ARNr	Nº Secuencias	3	4
	Rango de Valor -e	1e ⁻⁴²	1e ⁻²² - 1e ⁻²⁶

Tabla 41. Parámetros de las secuencias generadas en los metagenomas de virus de ARN y ADN. ^{a,c} MG-RAST y M5RNA: (<http://metagenomics.anl.gov>); ^b cdHit: (<http://weizhong-lab.ucsd.edu>).

Mediante la comparación de las secuencias obtenidas con bases de datos detectamos una clara predominancia de secuencias desconocidas sin similitudes conocidas (68% y 82% en los viromas de ADN y ARN respectivamente). Un porcentaje importante de las secuencias estaban relacionadas con bacterias pese al prácticamente despreciable número de secuencias con similitudes por bases de datos específicas de ARN ribosómico bacteriano (*Tabla 41*). Los viromas de ADN y ARN de las heces de cerdos contenían 747 y 3501 secuencias que pudieron ser asignadas al dominio Virus, respectivamente (*Figura 49*).

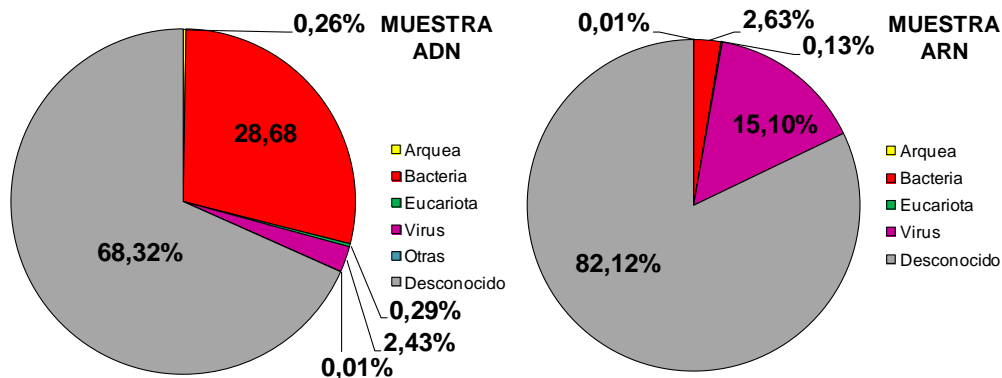


Figura 49. Distribución taxonómica por dominios derivada del análisis en MG-RAST de los dos grupos de secuencias de estudio.

La distribución taxonómica de las secuencias víricas del **viroma de ADN** mostró una gran abundancia de bacteriófagos del orden *Caudovirales* (familias *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae*), mientras que las familias *Mimiviridae* y *Phycodnaviridae* estaban representadas en un porcentaje muy inferior. La única familia de virus con vertebrados como hospedadores fue *Adenoviridae* con 20 secuencias (*Figura 50*).

El **viroma de ARN** estaba dominado por secuencias de la familia *Reoviridae* (género *Rotavirus*; 98%) seguido por secuencias relacionadas con miembros de la familia *Picornaviridae* (géneros *Teschovirus*, *Sapelovirus* y *Enterovirus B*), *Picobirnaviridae* y *Astroviridae*. También encontramos un número bajo pero significativo de secuencias pertenecientes a las familias de virus de ADN: *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* y *Microviridae* (*Figura 50*).

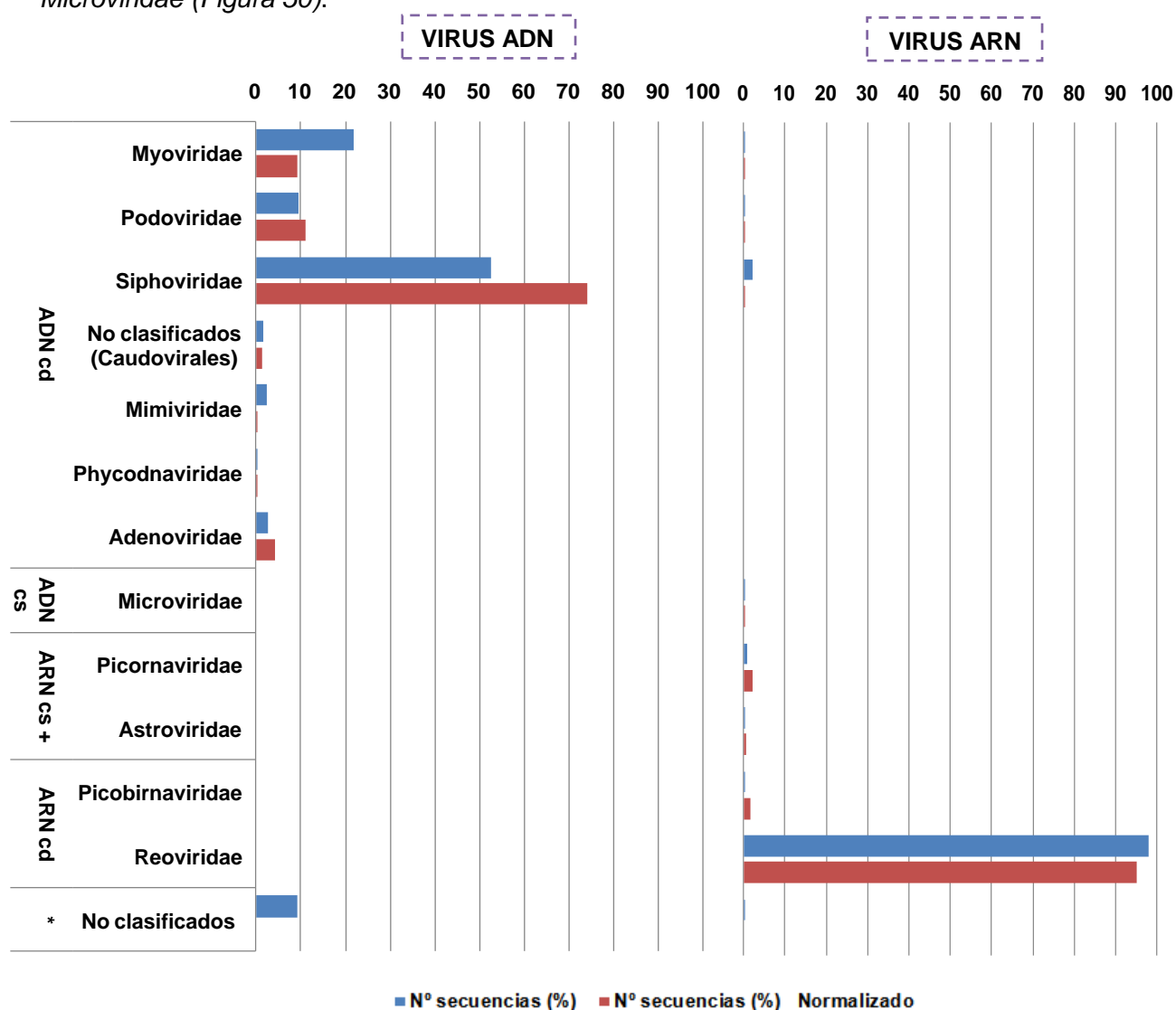


Figura 50. Distribución taxonómica por familias virales derivada del análisis en *MG-RAST*. El porcentaje de secuencias asignadas a cada familia viral se muestra en color azul y el porcentaje de genomas obtenido tras normalizar el número de secuencias en función del tamaño del genoma se muestra en color rojo.

3.2 Análisis de los contigs

El ensamblaje de las secuencias del viomas de ARN generó 60 *contigs*, con longitudes de secuencia comprendidas entre 4721 nt y 300 nt. De ellos, 13 pertenecen al género *Rotavirus*, 14 al G^o *Posavirus* y 1 al G^o *Enterovirus-B* (Tabla 42). No fue posible obtener contigs de los G^o *Teschovirus* y *Sapelovirus* ni de las familias *Picobirnaviridae* y *Astroviridae* debido al bajo número de secuencias.

Además, el genoma casi completo del G^o *Posavirus* pudo ser reconstruido con 3 de los 14 contigs, con una longitud de unos 8000 nucleótidos (no se muestran los datos).

El resto de los *contigs* no presentó una similitud con secuencias publicadas en *Genbank*. Si estos contigs forman parte de virus nuevos de identidad desconocida, está por determinar.

GÉNERO	CONTIG	LONGITUD (nt)	Nº LECTURAS	COBERTURA	SIMILITUD ^a (%) (valor -e)	SIMILITUD ^b (%) (valor -e)	REGIÓN	DESCRIPCIÓN
Rotavirus	4	2508	807	63,1	91%	96%	VP3	Rotavirus A
Rotavirus	5	2089	50	4,7	87%	95%	VP1	Rotavirus C
Rotavirus	7	1857	1209	127,6	93%	99%	VP2	Rotavirus A
Rotavirus	12	1088	35	6,3	87%	98%	VP2	Rotavirus C
Rotavirus	15	937	28	5,9	79 % (3e ⁻¹⁶⁰)	77%(6e ⁻¹⁶⁰)	VP7	Rotavirus C
Rotavirus	19	835	5	1,2	90%	91% (1e ⁻¹⁴²)	VP1	Rotavirus A
Rotavirus	20	828	574	135,9	95%	99%(6e ⁻¹⁷⁹)	VP2	Rotavirus A
Rotavirus	25	730	9	2,4	75% (4e ⁻⁸⁵)	72% (2e ⁻¹²⁹)	VP4	Rotavirus C
Rotavirus	29	685	693	198,3	91%	97%(4e ⁻¹¹³)	NSP3 (VP7)	Rotavirus
Rotavirus	32	574	19	6,5	91%	100%(1e ⁻¹²³)	VP1	Rotavirus A
Rotavirus	44	428	3	1,4	87%(1e ⁻³⁴)	98% (1e ⁻¹⁵)	VP1	Rotavirus C
Rotavirus	48	400	7	3,4	87% (3e ⁻¹²⁰)	91%(8e ⁻⁸²)	VP1	Rotavirus C
Rotavirus	53	361	476	258,4	93% (2e ⁻¹⁴³)	97%(2e ⁻⁷²)	NSP3 (VP7)	Rotavirus A
Posavirus*	1	4721	124	5,2	90%	95%	-	Posavirus 1
Posavirus*	2	4242	348	16,1	90%	92%	-	Posavirus 1
Posavirus*	9	1475	21	2,8	90%	88%	-	Posavirus 1
Posavirus*	11	1164	54	9,1	90%	94%	-	Posavirus 1
Posavirus*	17	864	107	24,3	89%	90% (3e ⁻¹⁷⁸)	-	Posavirus 1
Posavirus*	21	780	104	26,1	91%	83%(7e ⁻¹³¹)	-	Posavirus 1
Posavirus*	22	773	16	4,8	90%	89% (4e ⁻¹⁴¹)	-	Posavirus 1
Posavirus*	23	750	42	11	79%	70% (2e ⁻⁹⁷)	-	Posavirus 1
Posavirus*	24	737	10	2,7	91%	94%(2e ⁻¹⁵¹)	-	Posavirus 1
Posavirus*	40	428	3	1,4	91% (2e ⁻¹⁵⁸)	79%(1e ⁻¹¹)	-	Posavirus 1
Posavirus*	42	440	6	2,7	91% (2e ⁻¹⁵⁸)	88%(1e ⁻⁸¹)	-	Posavirus 1
Posavirus*	47	412	83	39,5	84% (3e ⁻¹⁰⁶)	78%(1e ⁻⁵³)	-	Posavirus 1
Posavirus*	51	374	51	26,7	93% (6e ⁻¹⁵³)	94%(7e ⁻⁷⁶)	-	Posavirus 1
Posavirus*	54	334	6	3,5	89% (8e ⁻¹⁰⁷)	96%(6e ⁻⁵²)	-	Posavirus 1
Enterovirus	27	701	6	1,7	79% (8e ⁻¹²²)	91%(2e ⁻¹⁵⁵)	-	Enterovirus B

Tabla 42. Análisis de los contigs derivados del viroma ARN. ^a : % de similitud determinada por *Blastn*; ^b : % de similitud determinada por *Blastx*; valor-e: probabilidad de que la homología de las secuencias sea debida al azar. * Nuevo género perteneciente al orden *Picornavirales* descrito por *Shan y cols* (2011).

El alineamiento de las secuencias de los *contigs* con similitud por los genes que codifican las proteínas estructurales VP1 y VP2 de rotavirus porcino, nos permitió comprobar la coexistencia de genomas de los serogrupos A y C del G^o *Rotavirus* en nuestro metagenoma (Tabla 43). Así los *contigs* 5 y 32 se alinean con la misma región de la proteína VP1 de rotavirus y sólo comparten un 52% de identidad de aminoácido presentando similitudes superiores al 90 % por rotavirus C y A respectivamente. De igual modo, los *contigs* 7 y 12 se alinean con la misma región de la proteína VP2 y sólo comparten un 49% de identidad y de nuevo presentan similitudes superiores a 90% por rotavirus A y C respectivamente.

		ROTAVIRUS A	ROTAVIRUS C	VP1	
		AEL20335 (1088 aa)	P26190 (1082 aa)	CONTIG 5 (630 aa)	CONTIG 32 (190 aa)
ROTAVIRUS C	P26190 (1082 aa)	46%	-	94%	53%
ROTAVIRUS A	AEL20335 (1088 aa)	-	46%	51%	99%
VP1	CONTIG 5 (630 aa)	51%	94%	-	52%
	CONTIG 32 (190 aa)	99%	53%	52%	-
		ROTAVIRUS A	ROTAVIRUS C	VP2	
		AEL20331 (890 aa)	ADC40901 (884 aa)	CONTIG 7 (604 aa)	CONTIG 12 (223 aa)
ROTAVIRUS C	ADC40901 (884 aa)	47%	-	45%	97%
ROTAVIRUS A	AEL20331 (890 aa)	-	47%	97%	49%
VP2	CONTIG 7 (604 aa)	97%	45%	-	49%
	CONTIG 12 (223 aa)	49%	97%	49%	-

Tabla 43. Análisis de similitud derivado del alineamiento de *contigs* (aa) identificados como rotavirus para las proteínas VP1 y VP2 y de cepas de referencia depositadas en la base de datos *Genbank*. Los resultados se representan en porcentaje (%).

4. Rastreo seroepidemiológico del tipo de VEP-NVC más abundante en España (Teschovirus). Determinación de la posible correlación con la serología positiva a VEVP

Los resultados de identificación y tipificación molecular de virus entéricos porcinos no vesiculares en España expuestos en el apartado 1 de esta sección mostraron, una destacada abundancia de virus pertenecientes al G^o *Teschovirus*, destacando entre ellos el serotipo 2. Ello hacía de este virus un candidato adecuado para comenzar un estudio de rastreo seroepidemiológico con el fin de comprobar si existía alguna correlación entre la presencia de este virus y la reactividad positiva en la prueba de la virus-neutralización al VEVP (SR)¹. Por otro lado, serológicamente existe un cierto nivel de reactividad cruzada entre los serotipos de los teschovirus, siendo más elevada, lógicamente, entre aquellos más similares filogenéticamente, como por ejemplo, aquéllos pertenecientes al subgrupo III, que engloba a los serotipos 2, 4, 6, 8 y 12. De los 64 teschovirus tipificados en este estudio, 56 (87.5%) pertenecían a este subgrupo. Esto significa que al examinar serológicamente AcN frente a una cepa de serotipo 2 se está rastreando serológicamente a la mayoría de serotipos de PTV detectados en el estudio, y que probablemente reflejan a la mayoría de teschovirus circulantes en España. Es importante señalar que antes de este estudio no había datos acerca de la seroprevalencia frente a estos virus en la cabaña porcina de nuestro país.

Se analizó la presencia de AcN frente a PTV2 (aislado CC77, procedente de Castilla y León) en una colección de 1248 sueros (*Tabla 44 y figura 51*), procedentes del programa de vigilancia sanitaria serológica de la enfermedad vesicular porcina, recolectados en el año 2008, y que fue solicitada específicamente para este fin al LCV de Algete. Esta colección consistía en aproximadamente un 50% de “singleton reactors”, tal como fue requerido para este estudio. Estos sueros procedían de 7 comunidades autónomas: Baleares, Aragón, Extremadura, Castilla y León, Castilla La Mancha, Andalucía y Murcia. La colección no es representativa de la seroprevalencia real de falsos positivos (SR), ni globalmente ni por CC.AA., ya que un requerimiento previo fue que hubiera aproximadamente igual número de positivos que de negativos serológicos al VEVP, y éstos fueron seleccionados al azar. Este hecho debe tenerse en cuenta en la interpretación de los resultados que se presentan a continuación.

¹ A lo largo de esta tesis los positivos serológicos a VEVP tendrán la consideración de “*singleton reactors*” o “*falsos positivos*” ya que en todos los casos los análisis confirmatorios por técnicas moleculares y cultivo celular para el VEVP, dieron resultado negativo.

Las 1248 muestras serológicas fueron analizadas en el laboratorio de origen (LCV-Algete) por virus-neutralización frente al VEV (cepa UKG/27/72). Los resultados se resumen en la *tabla 44* y en la *figura 51*.

TÍTULO DE ANTICUERPOS (AcN)	RESULTADO	VEVP		PTV2	
		Nº	%	Nº	%
≤ 1:20	Negativo	656	52,6	357	28,6
1:40	Dudoso	142	11,4	302	24,2
1:80	Positivo débil	105	8,4	280	22,4
≥ 1:160	Positivo	345	27,6	309	24,8
Total positivos + dudosos		592	47,4	891	71,4

Tabla 44. Resultados de los análisis de VN frente a VEV y a PTV2 (CC77). AcN: Anticuerpos neutralizantes.

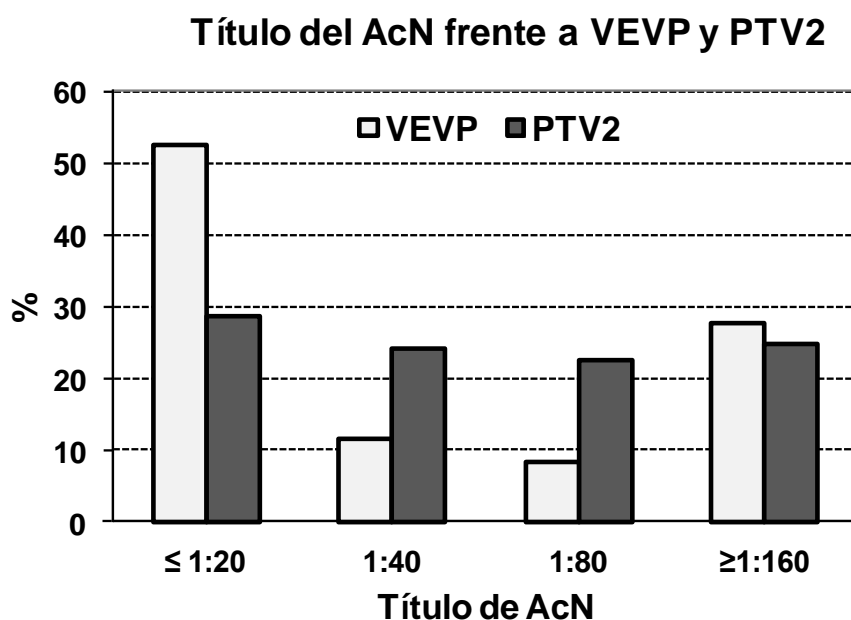


Figura 51. Resumen de los resultados de VN frente a VEV y PTV2, agrupados según el título de AcN.

La distribución específica por CC.AA. de los sueros frente al VEVP y frente a PTV se detalla en las *tablas 45 y 46*, respectivamente.

CC.AA	BALEARES	ARAGÓN	EXTREMADURA	C.LEÓN	C.LA MANCHA	ANDALUCÍA	MURCIA	TOTALES	%
MUESTRA +	110	100	218	35	7	42	80	592	47,4
MUESTRA -	0	15	415	47	63	22	94	656	52,6
TOTAL	110	115	633	82	70	64	174	1248	100
% TOTAL	8,8	9,2	50,7	6,6	5,6	5,1	13,9	100	
≤1:20	0	15	415	47	63	22	94	656	
% REGIÓN	0,0	13,0	65,6	57,3	90,0	34,4	54,0		
% TOTAL	0,0	1,2	33,3	3,8	5,0	1,8	7,5		52,6
1:40	6	6	77	17	3	7	26	142	
% REGIÓN	5,5	5,2	12,2	20,7	4,3	10,9	14,9		
% TOTAL	0,5	0,5	6,2	1,4	0,2	0,6	2,1		11,4
1:80	11	8	45	10	3	5	23	105	
% REGIÓN	10,0	7,0	7,1	12,2	4,3	7,8	13,2		
% TOTAL	0,9	0,6	3,6	0,8	0,2	0,4	1,8		8,4
≥1/160	93	86	96	8	1	30	31	345	
% REGIÓN	84,5	74,8	15,2	9,8	1,4	46,9	17,8		
% TOTAL	7,5	6,9	7,7	0,6	0,1	2,4	2,5		27,6

Tabla 45. Resultados y distribución específica por CC.AA. de los sueros objeto de estudio frente al virus de la enfermedad vesicular porcina (*cepa UKG/27/72*). La tabla detalla las muestras positivas, negativas por CC.AA. y asociadas a títulos específicos de seroneutralización tanto en porcentajes por región como respecto del total (n: 1248); ≤ 1:20: negativo; 1:40: dudoso; 1/80: positivo débil; ≥ 1/160: positivo.

CC.AA	BALEARES	ARAGÓN	EXTREMADURA	C.LEÓN	C.LA MANCHA	ANDALUCÍA	MURCIA	TOTALES	%
MUESTRA +	100	90	435	62	48	44	112	891	71,4
MUESTRA -	10	25	198	20	22	20	62	357	28,6
TOTAL	110	115	633	82	70	64	174	1248	100
% TOTAL	8,8	9,2	50,7	6,6	5,6	5,1	13,9	100	
≤1:20	10	25	198	20	22	20	62	357	
% REGIÓN	9,1	21,7	31,3	24,4	31,4	31,3	35,6		
% TOTAL	0,8	2,0	15,9	1,6	1,8	1,6	5,0		28,6
1:40	15	25	171	17	20	15	39	302	
% REGIÓN	13,6	21,7	27,0	20,7	28,6	23,4	22,4		
% TOTAL	1,2	2,0	13,7	1,4	1,6	1,2	3,1		24,2
1:80	26	24	142	20	12	16	40	280	
% REGIÓN	23,6	20,9	22,4	24,4	17,1	25,0	23,0		
% TOTAL	2,1	1,9	11,4	1,6	1,0	1,3	3,2		22,4
≥1/160	59	41	122	25	16	13	33	309	
% REGIÓN	53,6	35,7	19,3	30,5	22,9	20,3	19,0		
% TOTAL	4,7	3,3	9,8	2,0	1,3	1,0	2,6		24,8

Tabla 46. Resultados y distribución específica por CC.AA. de los sueros objeto de estudio frente al PTV2 (*aislado CC77*). La tabla detalla las muestras positivas y negativas, por CC.AA., así como sus títulos específicos de seroneutralización tanto en porcentajes por región como respecto al total (n: 1248); ≤ 1:20: negativo; 1:40: dudoso; 1/80: positivo débil; ≥ 1/160: positivo

Con los datos de títulos de AcN obtenidos del análisis por VN de la colección de sueros estudiada, se propuso comprobar si existía una correlación estadística entre la presencia/título de AcN específicos frente a EVP y frente a PTV. Para ello se realizó un análisis estadístico dirigido específicamente a aceptar o rechazar la hipótesis de la existencia de reacción cruzada entre ambos virus, teniendo en cuenta la CC.AA y la presencia o ausencia de anticuerpos a EVP, y su posible relación con la presencia o ausencia de anticuerpos frente PTV, como se describe en el apartado 2.4 de métodos serológicos.

Los resultados nos indicaron que existían diferencias entre las CC.AA. en la prevalencia de PTV (chi-cuadrado=29.58, 6 grados de libertad, $p<0.0001$) debido a que valores de $p<0.05$ indican que la relación era significativa. Por otra parte, los análisis estadísticos confirmaban que no había asociación entre tener AcN a EVP y tenerlos a PTV (chi-cuadrado=1.28, 1 grado de libertad, $p=0.26$).

5. Análisis inmunoquímico de la reacción cruzada: cros-neutralización con antisueros específicos (VN y ensayos de ELISA), dirigidos a demostrar o descartar la hipótesis de la reacción cruzada entre el VEVP y los VEP-NVC

5.1 Análisis de seroneutralización de VEVP empleando antisueros específicos frente a VEP-NV

5.1.1 Obtención de antisueros policlonales específicos en conejos

Para realizar estos estudios se disponía de una colección de antisueros frente a las cepas de referencia de los virus PTV1-7, PSV-8, PEV9-10 y PADV. Para aquellas cepas de referencia frente a las que no se disponía de antisueros (PTV8, PTV9 y PTV11), así como frente a algunos aislados españoles de campo (CC70, CC78, CC79, CC80) se obtuvieron antisueros por inmunización en animales de experimentación (apartado 1.5 de métodos virológicos).

Se utilizaron antígenos inactivados derivados de cepas de PTV-8, PTV-9 y PSV (CC13SW). La valoración de la cantidad de proteína obtenida se estimó en 93.62 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para PTV-8, 68.48 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para PTV-9 y 173.10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para CC13SW (PSV) según el kit *BCA TM Protein Assay* de *Pierce* (Gráfica 10).

Estas concentraciones fueron suficientes para inmunizar con 50 µg cada conejo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 1.5.4 de métodos virológicos. Además la RRT-PCR específica (Jiménez-Clavero y cols., 2003) para PTV determinó que, en base a los valores de Ct obtenidos, el ARN viral presente después de la semipurificación se había concentrado unas 100 veces, mientras que la RT-PCR para PSV (Palmquist y cols., 2002) determinó una concentración de 1000 veces, respecto al del *stock* de virus inicial. A la vista de los resultados, el protocolo usado para concentrar y semipurificar funcionó correctamente para el G⁰ *Sapelovirus*, no siendo tan eficaz para el G⁰ *Teschovirus* (Figura 52).

El resto de los virus seleccionados (PTV11, CC70, CC78, CC79, CC80) que igualmente fueron inactivados y semipurificados, no alcanzaron una concentración adecuada de proteína lo suficientemente inmunógena para producir la respuesta esperada, por lo que se optó por inocular estos virus en su forma activa, sin inactivar ni semipurificar.

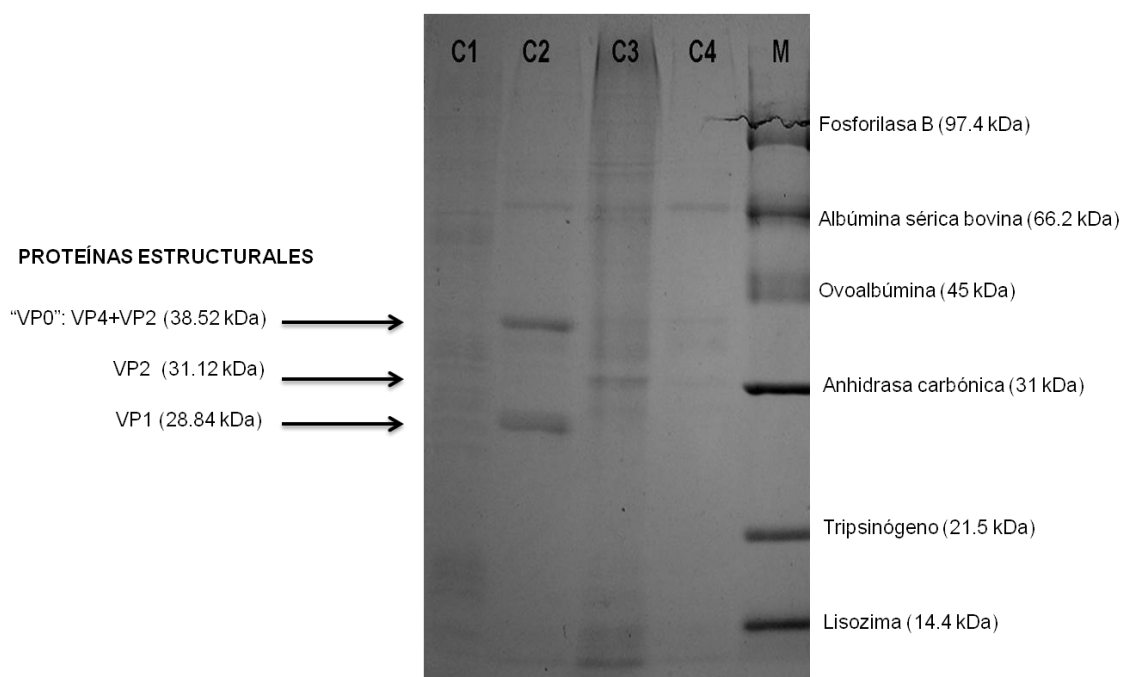


Figura 52. Análisis en gel SDS-PAGE al 12.5% y posterior tinción con *Coomassie* de las siguientes preparaciones: PSV (C2: 13CCSW) y PTV (C3: PTV8; C4: PTV9) inactivados y semipurificados. C1: control de células sin infectar (IBRS-2). Se utilizó como marcador un patrón de proteínas de bajo peso molecular.

Los antisueros producidos en conejo en esta tesis, así como los antisueros frente a cepas de referencia de VEP-NV de que se disponía en el laboratorio, fueron analizados mediante titulación por virus-neutralización frente a las cepas homólogas (Tabla 47).

ANTISUERO	AISLADO	TITULO	ANTISUERO	AISLADO	15dpi	33-34dpi
AS. PTV1	PS34	1:5120	AS. PTV2	CC80	1:80	1:120
AS. PTV2	O3b	1:5120	AS. PTV2	CC70	1:40	1:120
AS. PTV3	O2b	1:5120	AS. PTV2	CC78	1:320	≥1:1280
AS. PTV4	PS 36	≥1:1280	AS. PTV6	CC79	1:320	1:160
AS. PTV5	F 26	≥1:1280	AS. PTV8	UKG 173/74	1:320	1:640
AS. PTV6	PS 37	1:10240	AS. PT11	Dresden	1:160	1:320
AS. PTV7	WR2	≥1:1280	AS. PTV8	UKG 173/74	1:640	1:640
AS. PSV	PS-27	1:640	AS. PTV9	Vir 2899/84	1:320	1:320
AS. PEV9	UKG/410/73	1:10240	AS. PTV9	Vir 2899/84	1:1920	≥1:5120
AS. PEV10	LP54/UK/75	1:80	AS. PSV	CC13SW	1:3840	1:5120
			AS. PTV8	UKG 173/74	1:640	1:2560

Tabla 47. A la izquierda, se resumen los títulos de anticuerpos neutralizantes frente a las cepas homólogas de teschovirus 1-7, sapelovirus y enterovirus-B (antisueros de referencia disponibles al inicio de esta tesis). A la derecha se detallan los resultados obtenidos con los antisueros producidos para esta tesis en conejos frente a las cepas de referencia de los serotipos PTV8, PTV9 y PTV11 y cepas de campo españolas de teschovirus (PTV2 Y PTV6) y sapelovirus (CC13SW) a 15dpi y a 33-34dpi.

5.1.2 Seroneutralización con aislados del virus de la EVP

Se realizaron pruebas de seroneutralización con el panel de antisueros frente a los VEP-NV descrito en el apartado anterior, enfrentando cada antisuero a dos aislados distintos del virus de la enfermedad vesicular porcina, uno de referencia (*UKG/72/72*) y otro aislado recientemente (*POR04*), que presentaban títulos virales de 5.5×10^5 y 7.4×10^6 DICT₅₀/ml, respectivamente. Ninguno de los antisueros utilizados (incluyendo antisueros con altos títulos neutralizantes frente a las distintas cepas de referencia -así como algunas de campo- de PTV, PSV, PEV y PADV) logró neutralizar a ninguna de las dos cepas del VEP probadas ($\leq 1:10$), es decir, los anticuerpos neutralizantes presentes en esos antisueros no presentaron ningún tipo de neutralización cruzada frente a VEP. Por lo tanto, es muy improbable que los falsos positivos encontrados en las pruebas de seroneutralización al virus de la EVP puedan atribuirse a los VEP-NV analizados en este estudio, debido a que a la vista de los resultados, no existe reacción cruzada entre ellos.

Por otro lado, cabía la posibilidad de que la reacción cruzada se restringiera a una respuesta humoral inmadura, en la que predominara el isotipo IgM. Aprovechando el experimento de inoculación de las cepas *CC25* (PTV12) y *Teschen-Tirol* (PTV-1), descrito en el apartado 2 de esta sección, se seleccionaron sueros procedentes de aquellas inoculaciones experimentales recogidos en los primeros días del experimento y al final del mismo (*Tabla 48*), para realizar un ensayo dirigido a comprobar si alguno de ellos era capaz de neutralizar a la cepa *UKG/27/72 in-vitro*.

Asimismo, podía probarse si la neutralización cruzada tenía lugar con el nuevo serotipo de PTV descrito en esta tesis (PTV12), no incluido en el análisis anterior por no existir antisuero de referencia aún frente a esta cepa.

Como resultado, en todos los casos la neutralización observada fue irrelevante ($\leq 1:20$, *Tabla 48*), concluyéndose que los anticuerpos tanto IgM como IgG sintetizados en respuesta a la infección por ambos serotipos de teschovirus (1 y 12), no neutralizaron a la cepa prototipo del virus de la enfermedad vesicular porcina.

Nº6 (PTV12)	TÍTULO VN (EVP)	Nº11 (PTV1)	TÍTULO VN (EVP)	
0 dpi	1:5	0 dpi	1:10	} IgM
2 dpi	$\leq 1:5$	2 dpi	1:10	
4 dpi	1:5	4 dpi	1:10	
7 dpi	$\leq 1:5$	7dpi	1:20	
10 dpi	$\leq 1:5$	10 dpi	1:10	} IgG
21 dpi	1:10	21 dpi	1:10	
50 dpi	1:5	31 dpi	1:10	

Tabla 48. Seroneutralización del aislado UKG/27/72 por los sueros porcinos procedentes de las inoculaciones experimentales de los aislados CC25 (PTV12) y Tirol-Teschen (PTV1).

5.1.3 Seroneutralización con cepas de PTV-PSV-PEV-B

A la inversa que en el ensayo anterior, se quiso comprobar si un suero positivo, un positivo débil y cuatro sueros negativos respecto al virus de EVP tenían alguna capacidad neutralizante frente a cepas de referencia y de campo para PTV, PSV y PEV-B. Los resultados se resumen en la *tabla 49*.

Los resultados indicaban que el suero límite y el suero positivo neutralizaban en cierta medida a distintos aislados de PTV y PSV, tanto de campo como de referencia. A diferencia de este resultado, los aislados PEV-B no fueron neutralizados por estos sueros. El suero negativo a la EVP también lo fue para los virus ensayados. Sin embargo, el suero comercial y el suero donante, negativos también a la EVP, neutralizaron las cepas con las que fueron desafiados en todos los casos. Por lo tanto, y teniendo en cuenta los resultados de la abundancia de PTV y la inexistente reacción cruzada demostrada entre los VEP-NV estudiados y el virus de la EVP, los resultados solamente pueden ser atribuidos a una infección previa que coexiste, cuando los animales son desafiados, con el virus de la EVP en la producción experimental de sueros controles porcinos, encontrándose anticuerpos neutralizantes frente a VEP-NV y la EVP en un mismo suero.

IDENTIFICACIÓN	EVP		PTV1	PTV2	PTV3	PTV4	PTV5	PTV6	PTV7
	UK-72	POR-04	PS34	O3B	O2B	PS-36	F26	PS-37	WR2
Suero negativo EVP	≤1:10	≤1:10	≤1:10	≤1:10	≤1:5	1:10	1:10	≤1:5	≤1:5
Suero límite EVP	1:40	1:40	≤1:10	1:20	1:40	1:20	1:15	1:20	≤1:5
Suero positivo EVP	1:1280	1:1280	1:15	1:240	1:80	1:30	1:30	1:40	1:10
Suero comercial	≤1:10	≤1:10	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	1:120	n.a
Suero C-45	≤1:10	≤1:10	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
Suero donante	≤1:10	≤1:10	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
IDENTIFICACIÓN	PTV8	PTV9	PTV10	PTV11	PSV	PEV9	PEV10	PTV DE CAMPO	
	UKG/173/74	VIR2899/84	12/15Ge	DRESDEN	PS-27	UKG/410/73	LP54/UK/75	CC81	CC80
Suero negativo EVP	≤1:5	n.a	n.a	≤1:5	≤1:5	≤1:5	≤1:5	≤1:5	≤1:5
Suero límite EVP	1:30	n.a	n.a	1:7.5	1:40	≤1:5	≤1:5	≤1:5	1:15
Suero positivo EVP	1:30	n.a	n.a	1:20	1:60	≤1:5	≤1:5	≤1:5	1:60
Suero comercial	1:80	n.a	n.a	1:40	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
Suero C-45	1:15	n.a	n.a	1:15	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
Suero donante	1:40	n.a	n.a	1:80	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
IDENTIFICACIÓN	TESCHOVIRUS DE CAMPO						PSV DE CAMPO		
	CC79	VALL8A	CC78	CC87	CC70		CC13SW		
Suero negativo EVP	≤1:5	≤1:5	≤1:10	≤1:5	1:10		≤1:10		
Suero límite EVP	1:10	≤1:5	n.a	≤1:5	n.a		n.a		
Suero positivo EVP	1:80	1:15	≥1:20	1:20	≥1:80		≥1:20		
Suero comercial	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a		n.a		
Suero C-45	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a		n.a		
Suero donante	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a		n.a		

Tabla 49. Resultado de las pruebas de seroneutralización frente a distintas cepas y aislados de PTV, PSV y PEV-B (referencia y campo) empleando los sueros de referencia experimentales porcinos (negativo, límite y positivo) usados en la prueba de virus-neutralización y ELISA del virus de la EVP, y 2 sueros comerciales (comercial y C-45) y un suero de cerdo (donante). n.a: no analizado.

5.2 Análisis de antisueros específicos para VEP-NV por la técnica de ELISA sándwich de bloqueo en fase líquida para el virus de la EVP

Como prueba adicional, para comprobar si la reacción serológica falsamente positiva al VEVP en la técnica oficial de ELISA podría deberse a algún tipo de reactividad cruzada con los VEP-NV, todos los antisueros frente a los VEP-NV descritos en el apartado 5.1.1, fueron ensayados por duplicado en el ELISA *sándwich* de bloqueo en fase líquida para la detección de anticuerpos específicos de la enfermedad vesicular porcina (ELISA-FL), como se detalla en el apartado 2.3 de métodos serológicos.

Como resultado, todos los sueros problema tuvieron valores de absorbancia mayores al *cut off* obtenido (Control +: 0.051; Control + débil: 0.146; Control -: 0.726; Control de antígeno: 0.833; *cut off*: 0.417), descartándose que existan anticuerpos frente a los VEP-NV en los antisueros ensayados, que tengan reactividad alguna frente a los antígenos del VEVP empleados en el ELISA-FL (Tabla 50).

CONTROLES		ANTISUEROS REFERENCIA		ANTISUEROS DE CONEJO (15dpi)				ANTISUERO DE CONEJO (33-34dpi)		
CONTROL +	BLANCO	PTV4	PSV	CC80(PTV2)	PTV8	PTV9	SUERO C-	CC78(PTV2)	PTV8	PTV8
0,051	0,046	0,504	0,703	0,625	0,496	0,535	0,844	0,925	1,025	0,857
CONTROL +	BLANCO	PTV4	PSV	CC80(PTV2)	PTV8	PTV9	SUERO C-	CC78(PTV2)	PTV8	PTV8
0,051	0,048	0,547	0,698	0,616	0,559	0,556	0,79	0,942	1	0,939
CONTROL +d	PTV1	PTV5	PEV-9	CC70(PTV2)	PTV11	CC13SW	SUERO C-	CC79(PTV2)	PTV9	SUERO C-
0,155	0,618	0,592	0,722	0,753	0,477	0,779	0,958	1,021	0,878	0,99
CONTROL +d	PTV1	PTV5	PEV-9	CC70(PTV2)	PTV11	CC13SW	SUERO C-	CC79(PTV2)	PTV9	SUERO C-
0,136	0,561	0,608	0,791	0,665	0,517	0,77	0,991	0,799	0,901	0,844
CONTROL -	PTV2	PTV6	PEV-10	CC78(PTV2)	PTV8	PTV8	CC80(PTV2)	PTV8	PTV9	SUERO C-
0,679	0,552	0,743	0,734	0,673	0,524	0,504	0,788	0,749	0,931	0,851
CONTROL -	PTV2	PTV6	PEV-10	CC78(PTV2)	PTV8	PTV8	CC80(PTV2)	PTV8	PTV9	SUERO C-
0,773	0,806	0,595	0,73	0,694	0,56	0,703	0,803	0,837	0,953	0,871
CONTROL AG	PTV3	PTV7	PAD	CC79(PTV2)	PTV9	SUERO C-	CC70(PTV2)	PTV11	CC13SW	SUERO C-
0,849	0,561	0,74	0,849	0,737	0,708	0,718	0,829	1,014	0,866	0,702
CONTROL AG	PTV3	PTV7	PAD	CC79(PTV2)	PTV9	SUERO C-	CC70(PTV2)	PTV11	CC13SW	SUERO C-
0,817	0,552	661	0,841	0,644	0,711	0,552	0,887	0,731	0,831	0,884
MEDIA	CONTROL +	0,051	CONTROL +d	0,146	CONTROL -	0,726	CONTROL AG	0,833	CUT OFF	0,417

Tabla 50. Resultados del ELISA *sándwich* de bloqueo en fase líquida para la detección de anticuerpos específicos de la enfermedad vesicular porcina (ELISA-FL). Control +: Control positivo; Control +d: Control positivo débil; Control -: Control negativo; Control AG: Control de antígeno; PTV: Teschovirus; PSV: Sapelovirus; PEV: Enterovirus-B; PAD: Adenovirus; Suero C-: Suero control negativo de conejo).

6. Neutralización de la interferencia de los virus entéricos porcinos no vesiculares en la técnica de aislamiento del VEVP en cultivo celular, mediante el uso de antisueros

Los virus entéricos porcinos no vesiculares (VEP-NV) se eliminan en las heces y se pueden propagar fácilmente en las mismas líneas celulares porcinas usadas para aislar el VEVP, pudiendo enmascarar la presencia del mismo en las muestras fecales analizadas por aislamiento vírico. Teniendo en cuenta la abundancia de estos VEP-NV en las heces porcinas analizadas en los planes de vigilancia del VEVP, con una prevalencia, estimada en este trabajo, de un aislamiento de VEP-NV en una de cada seis muestras fecales analizadas, se podría pensar que en un hipotético brote real del VEVP, el aislamiento en heces se vería dificultado por esta presencia de virus adventicios. Se planteó la siguiente hipótesis: *La inhibición del crecimiento de los virus no vesiculares mediante el empleo de antisueros específicos para éstos en el medio celular empleado en el aislamiento podría mejorar la eficacia del aislamiento del VEVP.*

Con el fin de comprobar si esta hipótesis era cierta, se realizaron experimentos específicos como se describe a continuación:

Muestras fecales procedentes de cerdos infectados experimentalmente con el aislado *POR04* del VEVP, y naturalmente con teschovirus y adenovirus, fueron ensayadas en la técnica de aislamiento vírico en cultivo celular descrita en el apartado de métodos virológicos 1.2 y 1.3, tanto en presencia como en ausencia de un cóctel de antisueros frente a teschovirus y adenovirus.

Previamente, los ácidos nucleicos extraídos de los macerados de las muestras fecales obtenidas de los animales (0 dpi, 5dpi, 7dpi y 9dpi) fueron examinados para confirmar o descartar la presencia de EVP, PTV, PSV y PAD (*Tabla 51*):

MUESTRAS	DPI	ANIMAL	RRT-PCR ^{1*}	RRT-PCR ²	RT-PCR ³		PCR ⁴
			(EVP)	(PTV)	PTV	PSV	(PAD)
Cerdo 1	0dpi	-	no ct	n.a	pos	neg	neg
Cerdo 3	0dpi	-	no ct	n.a	pos	neg	neg
Cerdo 6	0dpi	-	no ct	n.a	pos	neg	neg
Cerdo 1	7dpi	Inoculado	32,79	33,39	pos	neg	pos
Cerdo 1	9dpi	" "	34,65	28,07	pos	neg	neg
Cerdo 3	5dpi	Contacto	31,76	27,88	pos	neg	pos
Cerdo 6	7dpi	Inoculado	32,64	28,47	pos	neg	pos

Tabla 51. Detección del genoma de diferentes virus entéricos en las heces de los animales inoculados con VEVP (*aislado POR04*), por RRT-PCR, RT-PCR y PCR. RRT-PCR^{1*}: detección del virus de la EVP incluyendo un control interno (β -actina) en tiempo real (apartado 3.3.3 de métodos moleculares); RRT-PCR²: detección del teschovirus en tiempo real (apartado 3.3.1 de métodos moleculares); RT-PCR³: detección múltiple del teschovirus y sapelovirus (apartado 3.3.4 de métodos moleculares); PCR⁴: detección de adenovirus porcino (apartado 3.3.7 de métodos moleculares). n.a: no analizado.

Como puede observarse en la *Tabla 51*, las 4 heces de partida correspondientes a 2 cerdos inoculados con VEVP y un cerdo que permaneció en contacto y resultó infectado por VEVP, presentaban genoma de VEVP, PTV y PAD detectables. Las cuatro muestras fueron inoculadas en cultivo celular siguiendo los procedimientos de referencia para el aislamiento del VEVP. Se inocularon en paralelo 3 placas de células IBRS-2, una de ellas sin cóctel de antisueros (placa problema), otra en presencia del cóctel de antisueros, y una tercera con una cantidad equivalente de suero de conejo no inmune (placa control). El curso de crecimiento viral para las cuatro muestras fecales fue similar en las placas problema y control, observándose un ECP intenso en un 1^{er} pase en 3 de las 4 muestras y un ECP leve en la 4^a, que evolucionó a ECP máximo en el pase siguiente, sin necesidad de completar un 3^{er} pase. Sin embargo, en la placa tratada con el cóctel de antisueros específicos, el ECP fue, en conjunto, más tenue en un 1^{er} pase, con una única muestra mostrando un ECP intenso, otra un ECP leve y las dos muestras restantes permaneciendo sin ECP. En un 2^o

pase, 3 de las 4 muestras mostraron un ECP máximo. Una de las muestras permaneció negativa durante todo el proceso (*Tabla 52*). A la vista de los resultados, el cóctel de antisueros neutralizó aproximadamente en un 50 % el ECP del 1^{er} pase.

SIN ANTISUERO	C1(7dpi)	C1(9dpi)	C3(5dpi)	C6(7dpi)
ECP 1ºP	ECP ↑ (3ºd)	ECP ↑ (3ºd)	ECP ↑ (3ºd)	F (3ºd)
ECP 2ºP	-	-	-	ECP ↑ (1ºd)
ECP 3ºP				
CÓCTEL	C1(7dpi)	C1(9dpi)	C3(5dpi)	C6(7dpi)
ECP 1ºP	ECP ↑ (3ºd)	F (3ºd)	neg	neg
ECP 2ºP	ECP ↑ (1ºd)	ECP ↑ (3ºd)	ECP ↑ (1ºd)	neg
ECP 3ºP				neg
SUERO CONEJO	C1(7dpi)	C1(9dpi)	C3(5dpi)	C6(7dpi)
ECP 1ºP	F (3ºd)	ECP ↑ (3ºd)	ECP ↑ (3ºd)	ECP ↑ (3ºd)
ECP 2ºP	ECP ↑ (3ºd)	-	-	-
ECP 3ºP				

Tabla 52. Tabla descriptiva del ECP desarrollado a lo largo de los tres pases celulares por las muestras ensayadas en las distintas placas evaluadas en el experimento de interferencia en la técnica de aislamiento vírico. ECP: Efecto citopático máximo; F: Foco; neg: sin ECP visible.

Presuponiendo que el ECP no es por adenovirus, debido a que dicho virus no se propaga bien en células IBRS-2 y los positivos encontrados fueron muy débiles por PCR, dichos ECP sólo pueden pertenecer al virus de EVP ó PTV. Se efectuaron análisis de detección del genoma de ambos tipos de virus para comprobar esta afirmación (*Tabla 53*).

Los análisis moleculares para ambos virus confirmaron que en ausencia del cóctel de antisueros, PTV se propagaba mejor que el VEVP en los cultivos, logrando *ct* más bajos que VEVP, existiendo una competencia directa por los mecanismos implicados en la replicación de estos virus en las células. Sin embargo, el efecto contrario ocurrió en presencia de antisueros anti-PTV, donde EVP se multiplica mejor en las células, alcanzando *ct* más bajos que PTV, de lo que se puede concluir que la presencia de antisueros mejoró en este caso la eficacia del proceso del aislamiento del virus de la EVP (*Tabla 53*). Se obtuvieron resultados similares cuando se aplicó la RT-PCR múltiple cualitativa (epígrafe 3.3.8 de métodos moleculares).

RRT-PCR (EVP)					RRT-PCR (PTV)				
SIN ANTISUERO	C1(7dpi)	C1(9dpi)	C3(5dpi)	C6(7dpi)	SIN ANTISUERO	C1(7dpi)	C1(9dpi)	C3(5dpi)	C6(7dpi)
ARN 1ºP	13;96	30;38	33;88		ARN 1ºP	22;34	14;53	15;52	
ARN 2ºP	-	-	-	13;68	ARN 2ºP	-	-	-	17;79
ARN 3ºP					ARN 3ºP				
CÓCTEL					CÓCTEL				
SIN ANTISUERO	C1(7dpi)	C1(9dpi)	C3(5dpi)	C6(7dpi)	SIN ANTISUERO	C1(7dpi)	C1(9dpi)	C3(5dpi)	C6(7dpi)
ARN 1ºP	14,36			-	ARN 1ºP	33,67			-
ARN 2ºP	-	13;54	13;54	-	ARN 2ºP	-	27;71	32;71	-
ARN 3ºP					ARN 3ºP				
SUERO CONEJO					SUERO CONEJO				
SIN ANTISUERO	C1(7dpi)	C1(9dpi)	C3(5dpi)	C6(7dpi)	SIN ANTISUERO	C1(7dpi)	C1(9dpi)	C3(5dpi)	C6(7dpi)
ARN 1ºP		no:ct	20;67	13,3	ARN 1ºP		14;45	13,5	26;93
ARN 2ºP	30;96	-	-	-	ARN 2ºP	13;71	-	-	-
ARN 3ºP					ARN 3ºP				

Tabla 53. Detección del genoma viral de PTV y EVP por RT-PCR en tiempo real en el experimento de interferencia en la técnica de aislamiento vírico. Los valores se expresan en *ct*. En rojo se destacan los valores fuertemente positivos, en azul los positivos medios y en negro los positivos débiles.

Si se asume que, en base a la experiencia adquirida en este ensayo, los *ct* con valores comprendidos entre 10-20 son los responsables del ECP, que *ct* entre 20-30 contribuyen al efecto citopático y *ct* entre 30-40 no contribuyen al efecto citopático, podemos establecer una relación ECP-virus responsable como la que se muestra en la (Tabla 54):

ECP	C1(7dpi)	C1(9dpi)	C3(5dpi)	C6(7dpi)
SIN ANTISUERO	EVP / PTV	PTV	PTV	EVP / PTV
CÓCTEL	EVP	EVP / PTV	EVP	¿?
SUERO CONEJO	PTV	PTV	PTV / EVP	EVP / PTV

Tabla 54. Relación ECP con el virus causante del ECP en el experimento de interferencia en la técnica de aislamiento vírico. **EVP** ó **PTV**: virus responsable del ECP; **EVP** ó **PTV**: virus que contribuye en menor medida al ECP; ¿?: sin ECP.

En conclusión, partiendo de coinfecciones con PTV y EVP, se puede afirmar que en general el uso de un cóctel de antisueros con capacidad neutralizante del virus *Teschovirus* mejoró en este caso el aislamiento del virus de la enfermedad vesicular porcina, ya que al inhibir en parte, la carga viral de PTV, permitió la entrada y replicación en las células del virus de la EVP. Sin embargo, la ausencia de ECP en una muestra de la placa tratada con el cóctel muestra que en este caso ocurrió una inhibición tanto del PTV como del VEVP. Esta inhibición es desconocida, pero debe descartarse un efecto debido a neutralización cruzada entre estos virus, teniendo en cuenta los resultados mostrados en el apartado 5.

DISCUSIÓN

La familia *Picornaviridae* engloba virus comúnmente implicados en diversas enfermedades en humanos y animales cuya sintomatología puede comprender desde una leve infección respiratoria hasta cuadros neurológicos graves con presencia de parálisis flácida, meningitis y encefalitis, entre otros (Minor y Muir., 2004). Entre los picornavirus de interés veterinario, cabe destacar los virus de la fiebre aftosa, de la enfermedad vesicular porcina, de la encefalomiocarditis porcina y las cepas patógenas de teschovirus porcinos, cuya presencia pueden tener efectos devastadores en el ganado y el comercio internacional (Hicks y Duffy., 2011). Por su repercusión sanitaria, social y económica, el virus de la fiebre aftosa está incluido en la lista de la OIE de enfermedades de declaración obligatoria comunes a varias especies (OIE., 2012; Capítulo 2.1.5). Asimismo, y debido a la imposibilidad de distinguirla clínicamente del virus de la fiebre aftosa, el virus de la enfermedad vesicular porcina también está incluido en la lista de la OIE. Con el objetivo de conocer la situación sanitaria de la EVP en España, las autoridades sanitarias (MAGRAMA) llevan a cabo una vigilancia activa basada en un muestreo serológico anual de una muestra representativa del censo porcino nacional (RD 599/2011). España es un país libre de EVP desde 1993. Sin embargo, con cierta frecuencia, durante el proceso de vigilancia seroepidemiológica, se dan reacciones falsas positivas. Estos “falsos positivos” o “*singleton reactors*” aparecen con una frecuencia mayor de la esperada, es decir, de aquella que se puede atribuir únicamente a las limitaciones de especificidad de las técnicas diagnósticas utilizadas (ELISA y VN). El manual europeo para el diagnóstico de la EVP establece que una vez confirmado un positivo serológico por virus-neutralización, se debe confirmar la presencia del virus mediante técnicas de cultivo celular y detección por RT-PCR (Decisión de la Comisión 2000/428/CE). Esta confirmación virológica ha dado en todos los casos investigados hasta ahora resultados negativos; sin embargo, el largo proceso de análisis hasta llegar al diagnóstico final ocasiona importantes pérdidas económicas para los ganaderos. Con mucha frecuencia, en la técnica de aislamiento se aíslan virus entéricos distintos al VEVP, denominados en esta tesis como *virus entéricos porcinos no vesiculares* (VEP-NV). Parte de estos virus presentan una semejanza en su ECP que hace difícil distinguirlos del VEVP. Este curioso hallazgo revela la necesidad de conocer mejor la naturaleza de estos virus y sugiere que puedan tener algún papel en el diagnóstico de la EVP.

Teniendo en cuenta la situación epidemiológica y la importancia del VEVP en sanidad animal y en el comercio internacional, junto con los datos serológicos que evidencian la presencia de reacciones falsas positivas detectadas durante el plan de vigilancia sanitaria serológica del ganado porcino (RD 599/2011), esta tesis doctoral se ha dedicado al estudio

de estos VEP-NV aislados en cultivo celular, con la finalidad de clarificar su posible implicación en el diagnóstico del VEVP. Asimismo, se han desarrollado nuevos métodos de detección y caracterización de VEP-NV de interés veterinario. Ello ha conducido a la descripción de un nuevo serotipo de teschovirus, el cual ha sido caracterizado en profundidad, incluyendo estudios de patogenicidad *In-vivo*.

1. Estudios moleculares y epidemiológicos de los virus entéricos porcinos no vesiculares en España

Los virus entéricos porcinos están implicados en numerosas enfermedades infecciosas, que unido a procesos de etiología bacteriana, ocasionan grandes pérdidas económicas en las explotaciones porcinas. Todo ello hace que las enfermedades digestivas del cerdo estén teniendo una importancia creciente, acrecentada en parte a su posible carácter enzoótico y porque en muchos casos no disponemos de medidas de control suficientemente eficaces (Cubero y cols., 1993; Carvajal y cols., 1995; Segalés y cols., 2001; Halaihel y cols., 2010; Vico y cols., 2011; Cságola y cols., 2012; Grau-Roma y cols., 2012; Di Bartolo y cols., 2012). Asimismo, otros virus entéricos porcinos muy prevalentes en heces pueden originar infecciones asintomáticas en el ganado porcino y pueden ser detectados habitualmente en aguas contaminadas con material fecal (Jiménez-Clavero y cols., 2003; Maluquer de Motes y cols., 2004).

En esta tesis se examina un rango de virus entéricos porcinos circulantes en España, que producen ECP en el cultivo celular empleado en su aislamiento. El estudio pretende reconocer y caracterizar los diferentes tipos de virus citopáticos presentes en heces porcinas particularmente los pertenecientes a las familias *Picornaviridae* y *Adenoviridae*, que son los más frecuentemente encontrados en este tipo de muestras (Jiménez-Clavero y cols., 2003; Palmquist y cols., 2002; La Rosa y cols., 2006; Maluquer de Motes y cols., 2004). Entre los VEP-NV analizados (n: 216), los teschovirus fueron los más abundantes (49%), seguido de sapelovirus (9.3%) y adenovirus (3.2%), no detectándose en ningún caso enterovirus-B.

Se han publicado recientemente estudios que tratan de describir y caracterizar la variedad virológica en muestras de heces porcinas en diversos países. Si bien estos estudios podrían permitir comparar las distintas situaciones epidemiológicas prevalentes en las distintas zonas geográficas estudiadas con respecto a estos virus, hay que advertir que las comparaciones deben hacerse con precaución, pues existen diferencias en cuanto a las metodologías empleadas, así como distintos sesgos muestrales, que impiden la comparación directa de los datos sin tener en cuenta esas diferencias.

Los estudios más similares al nuestro fueron realizados en Italia con aislados víricos procedentes del programa de vigilancia del VEV, y son dos: el primero mostró una mayor prevalencia de enterovirus-B (45.5%), seguido de sapelovirus (42.4%) y teschovirus (12.1%) (La Rosa y cols., 2006), mientras que el segundo (con un enfoque y herramientas moleculares similares al anterior), mostró resultados distintos, más parecidos a nuestro estudio, identificando 55 ARN virales en 40 aislados víricos de los que un 61.82% eran PTV, un 25.45% PSV y un 12.73 % PEV-B (Sozzi y cols., 2010). En este último se detectaron frecuentes coinfecciones entre PTV-PSV principalmente (también entre PSV-PEV-B y PTV-PEV-B). En nuestro estudio, empleando la misma herramienta de detección (Palmquist y cols., 2002), no se detectó dicha coinfección. Asimismo, difiere de los estudios italianos citados en el número de muestras virológicas ensayadas: 216 frente a 33 y 40 de los estudios de La Rosa y cols (2006) y Sozzi y cols (2010) respectivamente.

Un estudio epidemiológico algo diferente, analizando muestras fecales directamente por RT-PCR sin mediar un paso de aislamiento, realizado entre los años 2005-2011 en la República Checa reveló un 46.9 % de PTV, 39.2% de PSV y 50% de PEV-B con respecto a un total de 166 muestras fecales porcinas, observándose una destacable prevalencia de coinfecciones (52.66%, n: 109) en todas las combinaciones posibles (Prodelalová., 2012). Teniendo en cuenta la diferente metodología (Krumbholz y cols., 2003) sin mediar aislamiento vírico, la prevalencia global observada para PTV fue muy superior a la observada en nuestros estudios (Buitrago y cols., 2010).

Por otro lado, un análisis llevado a cabo en Taiwán mostró una prevalencia global de PTV en heces porcinas del 11.04 % (58/525) similar al 17,2% (105/610) hallado en esta tesis (Lin y cols., 2011).

Cuantitativamente, los resultados de nuestro estudio pueden tener un valor indicativo sobre la frecuencia relativa en que se encuentran los virus entéricos en muestras fecales porcinas en España. Sin embargo, el estudio tiene importantes limitaciones: Por un lado hay un evidente sesgo muestral, pues se emplean muestras procedentes de la vigilancia de la EVP de la mayoría (pero no todas) las CC.AA.; por otro lado, solo se estudian virus que causan ECP en determinadas líneas celulares, lo que excluye del estudio a virus no citopáticos y/o incapaces de crecer en las líneas utilizadas, como son circovirus, astrovirus y calicivirus. De igual modo, la prevalencia de adenovirus porcino en nuestro estudio podría estar subestimada, teniendo en cuenta estudios españoles que muestran una alta prevalencia en *pooles* de heces porcinas (70%) usando herramientas moleculares PCR convencional (Maluquer de Motes y cols., 2004), y valores comprendidos entre el 76.4-100%

en *pooles* de heces porcinas utilizando q-PCR en tiempo real (Hundesda y cols., 2009). La baja presencia de adenovirus porcinos detectada en nuestro estudio realizado a partir de aislados víricos podría deberse en parte a la dificultad que ofrece el aislamiento de estos virus en cultivo celular. Estudios ambientales de muestras residuales de mataderos (lodos, sedimentos y aguas residuales sin tratar) y aguas de ríos en diferentes áreas de Cataluña mostraron un alto porcentaje de muestras contaminadas con adenovirus porcinos y bovinos, lo que indica una contaminación de origen fecal y/o de orina, datos que apoyan su alta prevalencia en el ganado porcino (Hundesda y cols., 2006).

De los 216 aislados víricos estudiados, 85 (38.9%) quedaron sin identificar en una primera etapa que detectaba específicamente a PTV, PSV y PEV-B. De ellos sólo se conservaron 34 para ulteriores estudios, que no llegaron a identificar a ninguno de ellos. Los virus que podrían integrar este grupo deben cumplir al menos dos condiciones: 1) que causen infecciones asintomáticas en el cerdo, y 2) que se puedan aislar de heces empleando cultivos de líneas celulares de origen renal porcino (IBRS-2 o PK-15). Entre los candidatos cabe citar en primer lugar a los *Rotavirus* y *Coronavirus*, causantes de procesos diarreicos de moderados a severos en la especie porcina. Además, es muy probable encontrarlos en heces de poblaciones sanas, y son capaces de producir ECP en líneas celulares de riñón de cerdo. Otro posible candidato, el virus de la hepatitis E, es endémico en cerdos en muchas regiones del mundo (Lu y cols., 2006; Okamoto., 2007) y la seroprevalencia frente al VHE en el cerdo varía según países, granjas y edades, pudiendo llegar a ser muy elevada (>90%) (Choi y Chae., 2003; Cooper y cols., 2005; Hsieh y cols., 1999). Además, ciertos aislados porcinos son capaces de crecer en IBRS-2 y A549 (línea celular humana) (Zhang y cols., 2011), lo que podría explicar su presencia en nuestros aislados no identificados.

Por otro lado, numerosos autores han descrito la presencia de kobuvirus porcinos en heces de animales tanto sanos como con procesos entéricos. Aunque la especie prototipo humana *Aichi virus A* perteneciente al G⁰ *Kobuvirus* es capaz de crecer en BS-C1 y Vero, hasta la fecha no se ha logrado propagar los aislados porcinos a pesar de su carácter endémico (Reuter y cols., 2010; Reuter y cols., 2011). También el virus del síndrome respiratorio y reproductor porcino (PRRS) puede ser propagado en un número limitado de tipos celulares, entre ellos macrófagos alveolares porcinos y el clon celular MA-104 observándose ECP (Kim y cols., 1993; OIE, 2010; capítulo 2.8.7) mientras que el parvovirus porcino es más sensible a pases tempranos de células (células renales porcinas fetales) que a líneas establecidas (ST y PK15) (Oraveerakul y cols., 1992).

La dificultad de aislamiento en cultivo celular y por su predilección por tipos celulares distintos a líneas celulares renales porcinas establecidas posiblemente nos indica que estos virus no son los causantes del ECP encontrado.

La enfermedad de Aujeszky puede ser asintomática en animales adultos y el herpesvirus responsable es capaz de replicar en BHK-1, Hep-1, Vero y PK-15 mostrando dos tipos de ECP: células gigantes multinucleadas y células redondeadas refringentes (Iglesias., 1987), sin embargo la lucha en su erradicación llevada a cabo en nuestro país hace poco probable su presencia en este estudio por su baja prevalencia.

Asimismo, los torque teno virus porcinos (TTSuVs) están ampliamente distribuidos en las poblaciones porcinas aunque sus prevalencias son variables. Sin embargo, estos virus se han encontrado en vacunas comerciales y numerosas líneas celulares están contaminadas por uno o ambos genogrupos, entre ellas, la línea celular PK-15 (Teixeira y cols., 2011), complicando el estudio de su presencia en las poblaciones porcinas.

Por otro lado, el estudio llevado a cabo con heces de jabalíes en esta tesis reveló una alta prevalencia de teschovirus en la población estudiada y a su vez la coinfección de PTV y PSV en una misma muestra. Sin embargo, el éxito en el aislamiento de tales positivos no fue el esperado, según lo observado en cerdos domésticos (Cano-Gómez y cols., 2012). Teniendo en cuenta que la separación entre ambos biotipos (*Sus scrofa*) ocurrió hace unos 12.000 años (Larson y cols., 2005) es posible que virus ancestrales hayan evolucionado independientemente, adaptándose unos genotipos al hospedador doméstico, permaneciendo otros adaptados al silvestre. Ello podría determinar que aquéllos más adaptados a jabalíes tuvieran una cierta dependencia por células de jabalíes para su aislamiento. Por el mismo motivo, las herramientas moleculares diseñadas contando con las secuencias de aislados porcinos podrían no ser adecuadas para la caracterización molecular de los posibles genotipos de jabalíes.

Recientemente, aplicando técnicas de pirosecuenciación y RT-PCR, un nuevo genotipo de PTV (PTV-13) ha sido descrito en jabalíes, mostrando grandes diferencias, especialmente en la identidad aminoacídica de la proteína VP1 (66-74 %) y la poliproteína P1 (74-76%), con respecto a las secuencias de PTV disponibles (Boros y cols., 2012b). Este hallazgo podría apoyar la existencia de genotipos de PTV propios de jabalíes (Figura 53).

Por el contrario, el hallazgo de 3 aislados de PTV muy cercanos filogenéticamente a recientes aislados españoles de serotipo 5 en porcino doméstico, podría indicar que ciertas variantes de teschovirus están siendo compartidas entre el porcino doméstico y el silvestre. Teniendo en cuenta que los jabalíes son considerados reservorios de numerosos virus transmisibles, principalmente, patógenos porcinos, y que estudios serológicos confirman que

tiene un notable papel como hospedador reservorio de importantes enfermedades (Meng y cols., 2009), es factible que pueda existir en algún momento una interacción epizootológica entre ambos biotipos, aunque serán necesarios más estudios para poder entender la naturaleza de dicha interacción. Además, los sapelovirus secuenciados de las heces de jabalíes mostraron una elevada relación filogenética con aislados porcinos españoles, lo que refuerza la probabilidad de transmisión de los sapelovirus entre ambos biotipos. No obstante, sería recomendable extender los análisis filogenéticos a regiones más amplias del genoma, con la finalidad de sustentar tal afirmación (Cano-Gómez y cols., 2012).

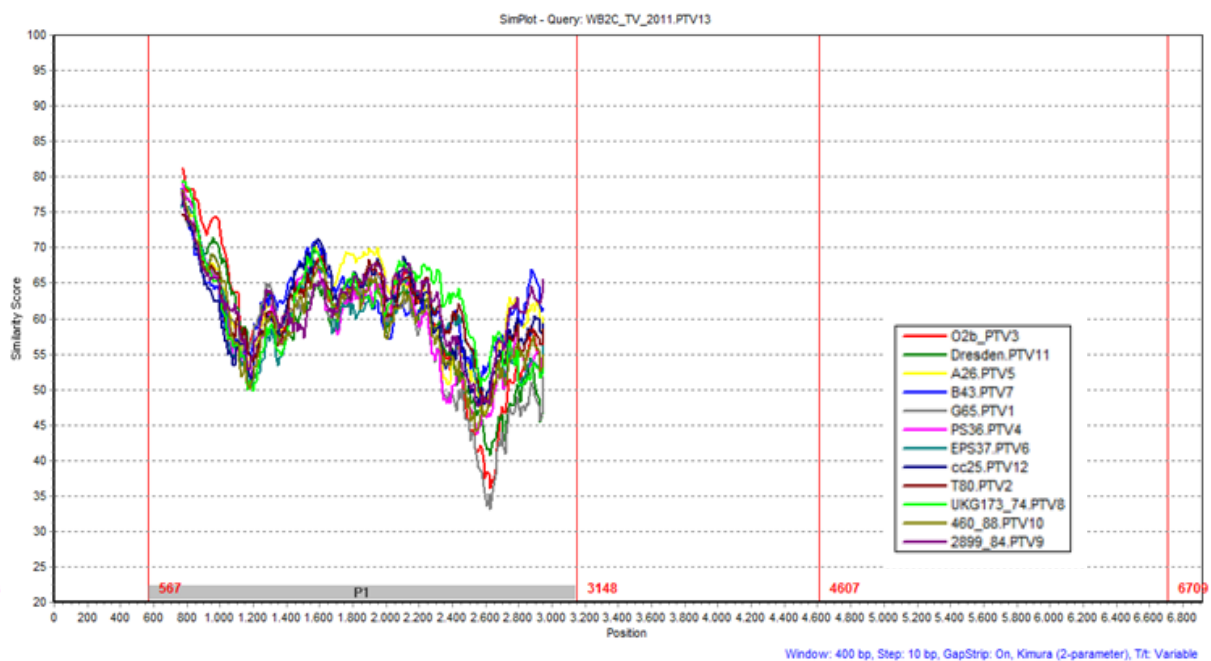


Figura 53. Representación gráfica de la similitud nucleotídica de la poliproteína P1 del genotipo PTV13, WB2C-TV/2011/ HUN (JQ429405), respecto a representantes de todos los genotipos descritos de PTV mediante el programa *Simplot* (Lole y cols., 1999).

Recientemente, la aplicación de las nuevas tecnologías de secuenciación de nueva generación al conocimiento de las comunidades de virus de ambientes naturales (metagenómica de virus) ha surgido como una potente herramienta complementaria al cultivo celular y a la secuenciación tradicional, por su rapidez, eficacia y sensibilidad para la identificación de virus, con gran repercusión en biotecnología, genética humana y diagnóstico de enfermedades en salud animal (Mokili y cols., 2012). En esta tesis presentamos un estudio metagenómico de la comunidad de virus de ADN y ARN presentes en una mezcla de heces de 10 cerdos de cebo. Un porcentaje importante de las secuencias obtenidas fueron taxonómicamente asignadas al dominio *Bacteria*, principalmente en el viroma de ADN, pese al prácticamente despreciable número de secuencias con similitudes por bases de datos específicas de ARN ribosómico bacteriano. La presencia de estas secuencias bacterianas puede deberse a una contaminación real durante el proceso de

purificación de partículas virales. Sin embargo, la filtración secuencial por filtros 0.45 μm y 0.22 μm y el bajo porcentaje de secuencias de ARN ribosómico encontradas en nuestros viomas apuntan en contra de esta hipótesis. Como alternativa, estudios similares han señalado una posible asignación taxonómica errónea debida a la enorme cantidad de profagos anotados como genomas de bacterias en las bases de datos, o a la frecuente adquisición de genes de origen bacteriano por parte de los bacteriófagos, como resultado de la transferencia horizontal de genes.

El metagenoma de virus ADN de las muestras examinadas estaba dominado principalmente por bacteriófagos de ADN de doble cadena (familias *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae*). Estos virus se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y constituyen las familias dominantes en la mayoría de los viomas estudiados. La enorme abundancia de bacterias en el tracto intestinal justifica la dominancia de familias de bacteriófagos en este metagenoma. También se detectó la presencia de representantes de las familias *Mimiviridae* y *Phycodnaviridae*, constituidas por virus de protozoos y algas, respectivamente, que han sido hallados también en metagenomas de muestras completamente distintas como son lagos antárticos, corales y alimentos fermentados (Vega Thurber y cols., 2008; López-Bueno y cols., 2009; Park y cols., 2011). La única familia de virus que infectan a mamíferos en este viroma de ADN es la familia *Adenoviridae*. Estos virus han sido también detectados en viomas de ADN de heces de murciélagos (Li y cols., 2010), y su presencia en el viroma fecal porcino de ADN es normal, dada su alta prevalencia en este tipo de muestras (Maluquer de Motes y cols., 2004; Hundesa y cols., 2006; Hundesa y cols., 2009).

Hasta la fecha existen dos estudios publicados describiendo la diversidad de virus en heces de cerdo (Shan y cols., 2011; Lager y cols., 2012). Al compararlos con nuestro estudio, se observa igualmente en ellos una dominancia de bacteriófagos en las comunidades de virus de ADN. Sin embargo, en ambos estudios se obtuvieron secuencias de virus con ADN de cadena sencilla (*Circoviridae* y *Parvoviridae*), como únicos representantes del grupo de virus eucarióticos. El uso de diferentes protocolos de purificación de los genomas virales y de técnicas de amplificación al azar podría tener un impacto importante en la composición de las comunidades de virus detectadas. Los controles previos realizados a la muestra mostraron la presencia de representantes de la familia *Circoviridae* lo que indicaba que en el proceso de secuenciación masiva se pierde la representación de esta familia. Es probable que la distribución de virus de ADN, claramente dominada por bacteriófagos obstaculice la secuenciación de genomas menos representados, necesitando para ello alcanzar una mayor profundidad de lecturas.

Asimismo, la amplificación por medio de la ADN polimerasa de $\phi 29$, puede favorecer la detección de virus con genoma de ADN circular de cadena sencilla, como circovirus o torque teno virus (Salas y cols., 2004).

Por otro lado, el metagenoma de virus ARN estaba dominado por secuencias de la familia *Reoviridae*. Miembros de esta familia como los rotavirus son considerados agentes patógenos importantes del ganado (Victoria y cols., 2008). Los rotavirus de cerdo pertenecientes a los grupos A y C están ampliamente distribuidos en todo el mundo, con seroprevalencias próximas al 100%, y han sido frecuentemente identificados como agentes causales de enfermedad gastrointestinal en cerdos. En concreto, en nuestro estudio hasta un 10 % de los *contigs* presentaban similitudes por el genoma de rotavirus porcino del tipo A y otro 10 % del tipo C. La coexistencia de al menos dos tipos de rotavirus relacionados con los tipos A y C pudo ser demostrada por el alineamiento de varios *contigs* muy diferentes en la misma región del genoma de referencia de estos rotavirus.

Queda por determinar si estos rotavirus estaban presentes en uno o más animales cuyas heces formaron el pool examinado, y que no fueron analizadas individualmente. Una infección aguda por rotavirus en un único animal podría dar cuenta de la enorme abundancia de secuencias de este virus en el pool de heces de 10 animales. Significativamente, y pese a su abundancia, esta familia no fue detectada en los viomas fecales porcinos descritos por Shan y cols (2011) ni Lager y cols (2012).

La mayoría de los estudios metagenómicos de virus de ARN tanto de muestras ambientales como de muestras asociadas a mamíferos están dominados por virus ARN de cadena sencilla y polaridad positiva, principalmente del orden *Picornavirales* (Rosario y Breitbart., 2011; Shan y cols., 2011), debido a su gran diversidad y su amplia distribución. En nuestro estudio encontramos un número bajo pero significativo de secuencias pertenecientes a la familia *Picornaviridae* (géneros *Teschovirus*, *Sapelovirus* y *Enterovirus-B*) y una mayor abundancia de secuencias *picorna-like*. Estas secuencias no fueron clasificadas inicialmente debido a que las bases de datos utilizadas en *MG-RAST* no estaban actualizadas. Sin embargo, se logró encontrar una similitud nucleotídica aproximada del 90% con un virus *picorna-like* descrito recientemente en un estudio metagenómico en los EE.UU. (Shan y cols, 2011), cuando se compararon los 14 *contigs* ensamblados con la base de datos de *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Este nuevo virus has sido denominado *posavirus* y descrito como un virus que posiblemente infecta a nematodos o a protozoos que habitan en el tracto gastrointestinal de los cerdos (Shan y cols, 2011). Además, el genoma casi completo del virus del G⁰ *Posavirus* pudo ser reconstruido con 3 de los 14 *contigs*, abarcando una longitud de unos 8000 nt de un total de unos 9800.

Los análisis realizados en esta tesis sobre VEP-NVC crecidos en cultivo celular confirmaron la abundancia de virus del G^o *Teschovirus* y *Sapelovirus*, pero no pudieron confirmar la presencia del G^o *Enterovirus*, frecuente en otros estudios (La Rosa y cols., 2006; Buitrago y cols., 2010; Sozzi y cols., 2010). Sin embargo, el ensamblaje de las secuencias obtenidas del G^o *Enterovirus*, y su estudio de homología, confirmaron la presencia de enterovirus-B en las muestras fecales examinadas.

Un grupo de virus detectado en nuestro estudio y no siempre en estudios metagenómicos de virus de ARN de heces de cerdo, es el de los picobirnavirus. La familia *Picobirnaviridae* integra virus entéricos que también pueden ser encontrados en el tracto respiratorio de los cerdos (Smits y cols., 2011) y que son pobladores habituales de las heces porcinas (Lager y cols., 2010; Ganesh y cols., 2012).

Existen diferencias destacables en estudios previos respecto a los metagenomas de animales sanos y animales con patología digestiva. Así, en el trabajo publicado por *Tongling Shan y cols* (2011) destacan por su abundancia, el género *Kobuvirus* (familia *Picornaviridae*) en animales sanos, sin embargo, los coronavirus son más prevalentes en animales con diarrea. *Lager y cols* (2012) señalan la alta frecuencia del género *Sapovirus* (familia *Caliciviridae*) en animales sanos, sin embargo, los enterovirus son más frecuentes en animales con diarrea crónica. *Tongling Shan y cols* (2011) también describen la abundancia de astrovirus en todos sus grupos de estudios, a diferencia de *Lager y cols* (2012) que sólo lo refieren a animales enfermos.

Existen múltiples factores que podrían explicar la distinta composición de nuestro viroma de ARN de heces de cerdos con respecto a estudios previos (*Shan y cols*, 2011; *Lager y cols.*, 2012): 1) que realmente circulen virus distintos en las diferentes áreas geográficas examinadas; 2) diferente metodología aplicada en los distintos estudios a la purificación de partículas virales y a la amplificación de ARN; 3) empleo de pools de muestras frente a muestras individuales; y 4) diferencias en la edad de los animales en estudio.

Por otro lado, detectamos una leve contaminación de secuencias de virus ADN (*Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* y *Microviridae*) en el viroma de ARN, que pudo ser debida a un deficiente tratamiento con DNasas.

Finalmente, es muy revelador el alto porcentaje de secuencias y *contigs* desconocidos que no muestran similitud significativa con ninguna secuencia depositada en las bases de datos. Este aspecto pone de manifiesto la importancia de la metagenómica como herramienta para ampliar nuestro conocimiento del mundo microbiano conocido y desconocido.

2. Nuevas aportaciones al diagnóstico virológico y caracterización del virus de la enfermedad de Teschen-Talfan

En esta tesis se describe la validación de un método molecular en tiempo real (RRT-PCR), eficaz para la detección de todos los genotipos conocidos del G^o *Teschovirus* (PTV1-PTV11), de utilidad para el diagnóstico de enfermedad de Teschen-Talfan y para observaciones medioambientales.

El empleo de un sistema de extracción de ARN viral robotizado junto con la amplificación y detección del genoma viral mediante RRT-PCR, ofrece una técnica de diagnóstico automatizada que permite la aplicación a gran escala, que se traduce en una mayor simplicidad, reproducibilidad, rapidez y capacidad de análisis, pudiendo llevarse a cabo en menos de tres horas desde la recepción de las muestras hasta la obtención del resultado.

Originariamente, el diseño de oligonucleótidos y de una sonda *TaqMan* en la región 5'RNC, altamente conservada entre los teschovirus, y la optimización de las condiciones de la RT-PCR, demostró su utilidad en muestras ambientales (Jiménez-Clavero y cols., 2003). En este trabajo se llevaron a cabo estudios de especificidad, sensibilidad y eficiencia de este método, mediante el análisis de todos los genotipos conocidos de teschovirus y otros patógenos relacionados. Los resultados mostraron que esta técnica es altamente específica y capaz de detectar todos los genotipos (incluido el genotipo 12) con una sensibilidad superior a la de los únicos métodos de RT-PCR descritos en el manual de diagnóstico de la OIE 2008 (Zöll y cols., 2000; Palmquist y cols., 2002; OIE., 2008. Capítulo 2.8.10).

Las herramientas moleculares de diagnóstico recomendadas en el manual son de detección convencional. El formato de RT-PCR en tiempo real con sondas *TaqMan* es ventajoso frente a los formatos convencionales, más laboriosos, lentos y que requieren una etapa de visualización por electroforesis en gel. Además, los métodos anidados son altamente susceptibles a contaminación cruzada debido a la manipulación de productos previamente amplificados. Por otro lado es frecuente la visualización de múltiples bandas en el caso de la RT-PCR diseñada por Palmquist y cols (2002) cuando se ensaya ARN procedente de macerados fecales, lo que sugiere que dicha técnica sería más adecuada para muestras purificadas o aisladas en cultivo celular que para muestras fecales (observación también descrita por Chiu y cols (2012).

Krumbholz y cols (2003) han descrito una PCR en tiempo real basado en el método de transferencia de energía (FRET) optimizado para la plataforma *Lightcycler*. Sin embargo, el ensayo de FRET necesita dos reacciones separadas, lo que justifica el uso de sondas

basadas en la hidrólisis (*TaqMan*) que proporcionan una plataforma conveniente para análisis de grandes cantidades de muestras.

Wang y cols (2011) describieron un método de detección de PTV mediante la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (RT-LAMP). Características como su rapidez (1h), su bajo costo, alta sensibilidad y especificidad y la facilidad de aplicación en condiciones de campo, hacen de este método una herramienta atractiva para un rápido diagnóstico, ya que el resultado puede visualizarse por turbidez, fluorescencia y sin necesidad de termocicladores. Sin embargo, su aplicación puede ser limitada debido a la dificultad en el diseño de los *primers*, así como a la necesidad de encontrar zonas altamente conservadas y con suficiente longitud para ubicar esos *primers*, a veces difícil por la alta variabilidad de los virus, sobre todo los virus ARN. Además, la detección visual de la reacción es subjetiva y puede conllevar un error en el diagnóstico.

El uso de RT-PCR múltiple para la detección simultánea de distintos agentes infecciosos es de aplicación habitual tanto en el diagnóstico molecular como en estudios epidemiológicos. *Liu y cols* (2011) describieron una RT-PCR convencional que identifica y diferencia en una sola reacción, PTV, PRRS y PPC. Sin embargo, el método múltiple muestra una sensibilidad 100 veces menor en comparación con el método simple en el ensayo de teschovirus.

La RRT-PCR para teschovirus evaluada en esta tesis, además, tiene la ventaja de compartir el mismo programa de incubación que la RRT-PCR para el VEV (Reid y cols., 2004a), lo que permite hacer un diagnóstico diferencial virológico en paralelo, de muestras procedentes del programa de vigilancia del VEV. Este diagnóstico diferencial se podría mejorar, integrando ambas sondas y primers en una misma reacción incluyendo un control interno, por ejemplo β -actina o GAPDH (Toussaint y cols., 2007; Tsai y cols., 2010), y optimizando las condiciones para obtener una RRT-PCR múltiple.

Cabe destacar la mayor sensibilidad y la especificidad de la RRT-PCR sobre el aislamiento del virus. Este hecho es debido a que la RRT-PCR detecta el genoma del virus (no necesariamente vinculado a partículas viables del virus), y el aislamiento del virus detecta partículas víricas infecciosas. Sin embargo, el aislamiento de virus es una técnica con ventajas específicas en el diagnóstico de las enfermedades virales, que no puede ser sustituido por los métodos de detección molecular.

Este método molecular nos permite una detección rápida y específica de los PTV, pero debido al grado de conservación de la región 5'RNC, no facilita su diferenciación a nivel de serotipo.

En la caracterización molecular de los teschovirus hay que tener en cuenta sus proteínas estructurales, ya que los epítomos responsables de la diferenciación serotípica están localizados, en su mayoría, en áreas expuestas de la cápsida proteica (VP1-3). Los epítomos neutralizantes ha sido localizados en las proteínas VP1 y VP2, lo que ha permitido desarrollar métodos de tipificación molecular basados en secuencias parciales de estas subunidades (La Rosa y cols., 2006; Kaku y cols., 2007). Asimismo, la VP1 de los picornavirus suele concentrar la mayor variabilidad genética debido a la presencia de epítomos inmunodominantes, que hacen de ella una región diana óptima para la correlación serotípica (Usherwood y Nash., 1995) (*Figura 54*).

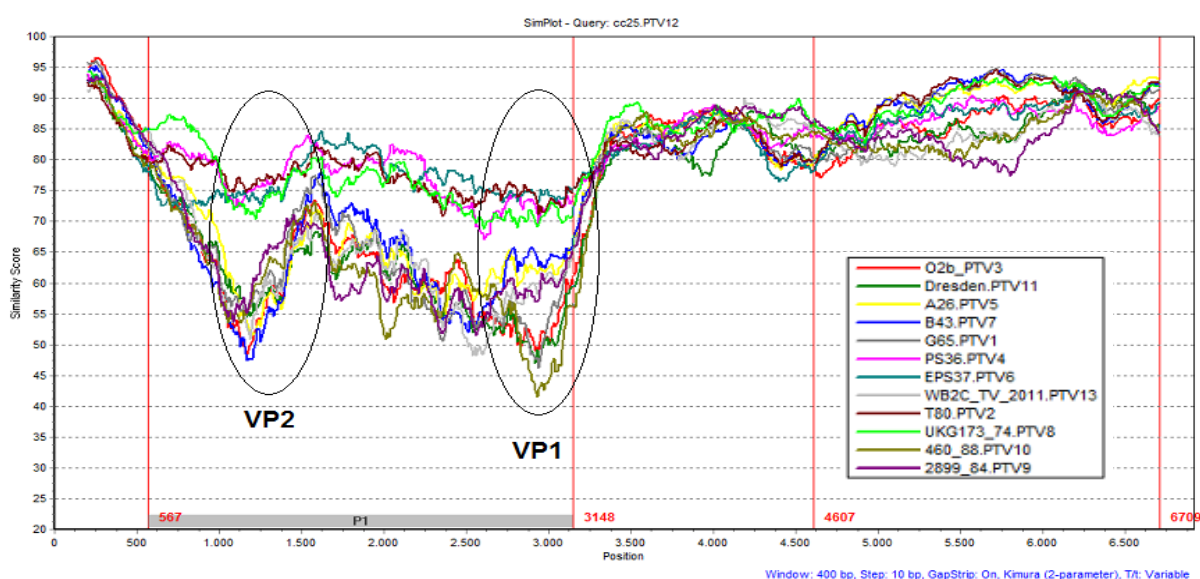


Figura 54. Representación gráfica de la similitud nucleotídica del genoma completo de CC25 respecto a representantes de todos los genotipos descritos de PTV mediante el programa *Simplot* (Lole y cols., 1999). Los círculos negros representan las regiones más variables en el genoma entre los genotipos de PTV.

En esta tesis se describe una nueva técnica de caracterización genotípica de PTVs basada en el análisis de la secuencia completa de la proteína VP1 (Cano Gómez y cols, 2011b), que ha servido para realizar estudios de caracterización molecular de los teschovirus en España. Éstos revelaron una alta diversidad genotípica, señalando que el análisis molecular de la proteína VP1 completa es un método adecuado y válido para la identificación de genotipos del género *Teschovirus*. Además, debido a la información genética específica que contiene, puede ser útil para evaluar los cambios en las prevalencias de los diferentes genotipos, determinar las relaciones epidemiológicas entre PTVs aislados en diferentes lugares, y realizar estudios evolutivos.

Si comparamos nuestro estudio con otros trabajos similares realizados en Italia y Taiwán, que emplean distintas herramientas moleculares sobre aislados fecales porcinos locales, podemos concluir (*Figura 55*):

- El genotipo 2 es marcadamente más prevalente tanto en Italia como en España mientras que en Taiwán el genotipo 6 presenta una abundancia ligeramente mayor que los demás. El genotipo 6 es el segundo más prevalente en España.
- En todos los estudios se pone de manifiesto una alta diversidad genotípica, detectándose entre 9 y 11 genotipos distintos, dependiendo del estudio. En España no se detectaron los genotipos 3, 9 y 10, mientras que en Italia si se detectó el genotipo 10, y en Taiwán se detectaron todos excepto el genotipo 5. Estas diferencias podrían indicar situaciones epidemiológicas distintas entre estos países.

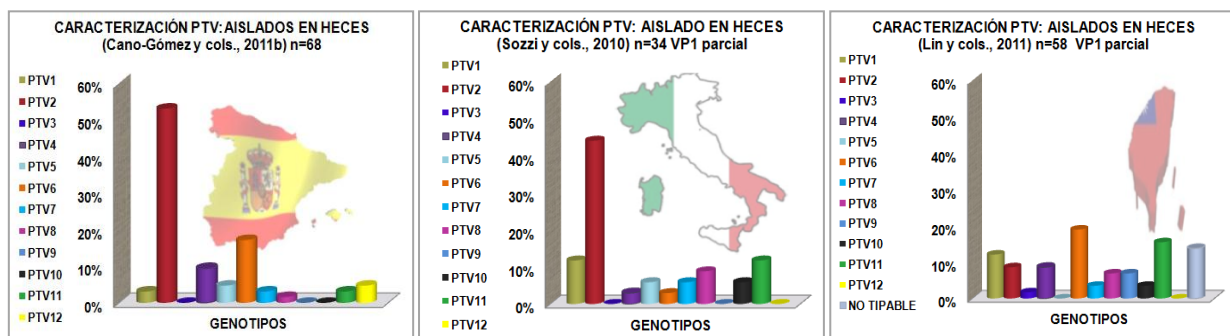


Figura 55. Representación gráfica de los distintos genotipos de PTV detectados en los estudios realizados en España, Italia y Taiwán en aislados fecales. No tipable: PTV no clasificado

La técnica de tipificación genética basada en la secuencia completa de la VP1 (VP1c), descrita en esta tesis fue comparada con otra técnica previamente descrita para el mismo fin, basada en la secuenciación parcial de la VP1 (VP1p) (La Rosa y cols, 2006), empleando muestras analizadas con esa técnica por Sozzi y cols (Sozzi y cols., 2010), lo que permitió su comparación directa. Los resultados obtenidos con ambas técnicas fueron homogéneos en la mayor parte de las muestras analizadas, excepto en aquellas muestras que presentaban coinfección por dos genotipos distintos de PTV (22.22%; 6/27), en las cuales cada técnica parece amplificar preferentemente a uno de los dos genotipos presentes en la muestra, lo que explicaría los resultados discordantes. Además, el uso de la VP1 completa unido a una mejora de los análisis filogenéticos permitió la reclasificación de ciertos aislados en un nuevo genotipo (PTV-12) y la detección de un nuevo clúster que formaría otro nuevo genotipo (PTV-14) (*Figura 56*).

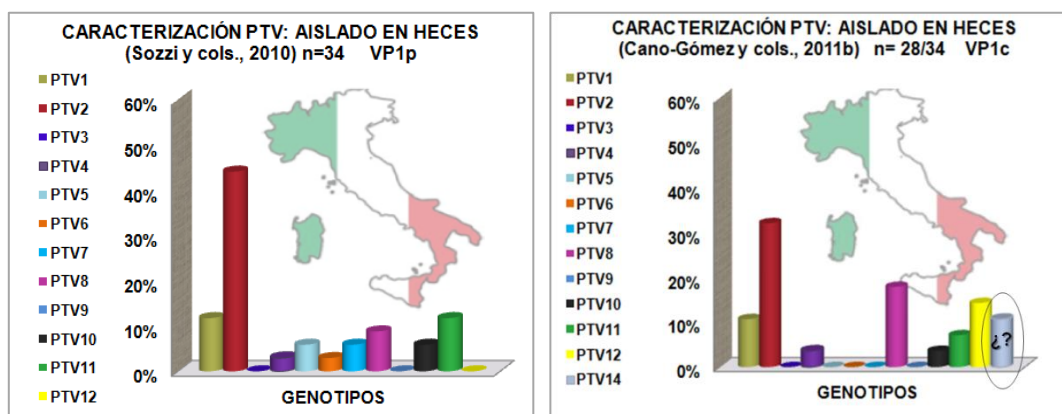


Figura 56. Representación gráfica del estudio comparativo de caracterización de aislados italianos del G^o *Teschovirus* por amplificación y secuenciación de la proteína VP1 parcial y VP1 completa.

La estrategia de caracterización descrita por *Kaku y cols* (2007) asegura que una única pareja de primers degenerados es capaz de detectar y caracterizar todos los serotipos de teschovirus, amplificando tan sólo 320 pb de la región que codifica la proteína VP2 (VP2p), considerándola una herramienta rápida de tipificación molecular (*Kaku y cols.*, 2007). Sin embargo, análisis efectuados por varios autores han comprobado la falta de sensibilidad de esta técnica, debido al amplio rango y variabilidad de los PTV. Sus resultados, empleando tanto aislados virales como muestras fecales, no superan el 50 % de éxito en la asignación de genotipos (*La Rosa y cols.*, 2006; *Prodelalová.*, 2012). El estudio comparativo llevado a cabo con los aislados españoles (n=68), confirma una mayor sensibilidad de la técnica basada en VP1c (58/68, 85.29%) con respecto a la que se basa en VP2p (45/68, 66.18%). Además, como ocurre en el caso anterior, los resultados discordantes entre ambos métodos se debieron a la presencia de coinfecciones de 2 genotipos distintos en una misma muestra (29.55%; 13/44) (*Figura 57*).

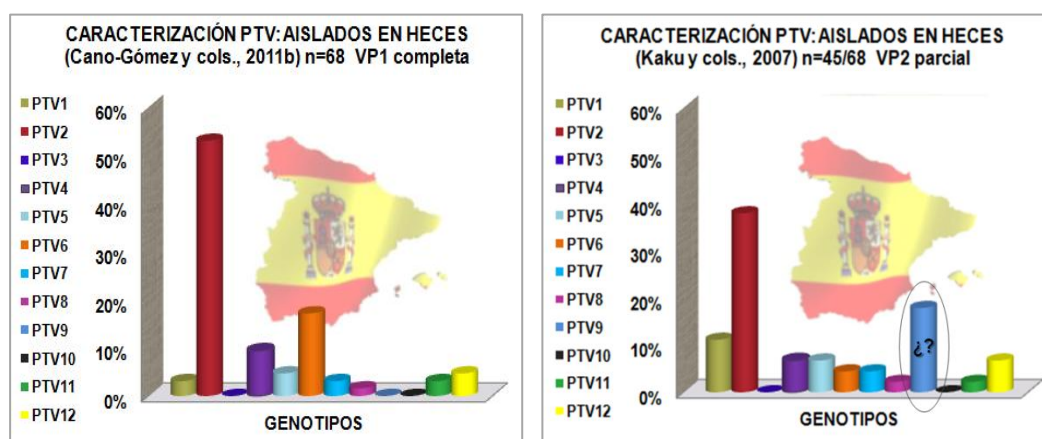


Figura 57. Representación gráfica del estudio comparativo de caracterización de aislados españoles del G^o *Teschovirus* por amplificación de la proteína VP1 completa y VP2 parcialmente. Círculo gris: representa el % de aislados con homología con el genotipo 9, pero indicando su posible reclasificación como nuevo genotipo (¿?).

Las coinfecciones con dos o más genotipos del mismo género dificultan el proceso de tipificación, impidiendo la obtención de secuencias consenso adecuadas. La detección de un coinfectante u otro depende principalmente de la especificidad genotípica de cada técnica empleada, siendo necesaria para su correcta tipificación la separación de ambos genotipos². Todo ello, sumado a la falta de sensibilidad de todas las técnicas de caracterización empleadas, dificulta el proceso de caracterización molecular de los teschovirus.

Por otro lado, es frecuente la cocirculación en una misma región de diferentes genotipos de teschovirus (*Figura 58*). En nuestro estudio, la distribución geográfica de los teschovirus en España no reflejó una asociación de determinados genotipos a territorios concretos. Sin embargo, serían necesarios más estudios para apoyar la estructura geográfica de los teschovirus en España.

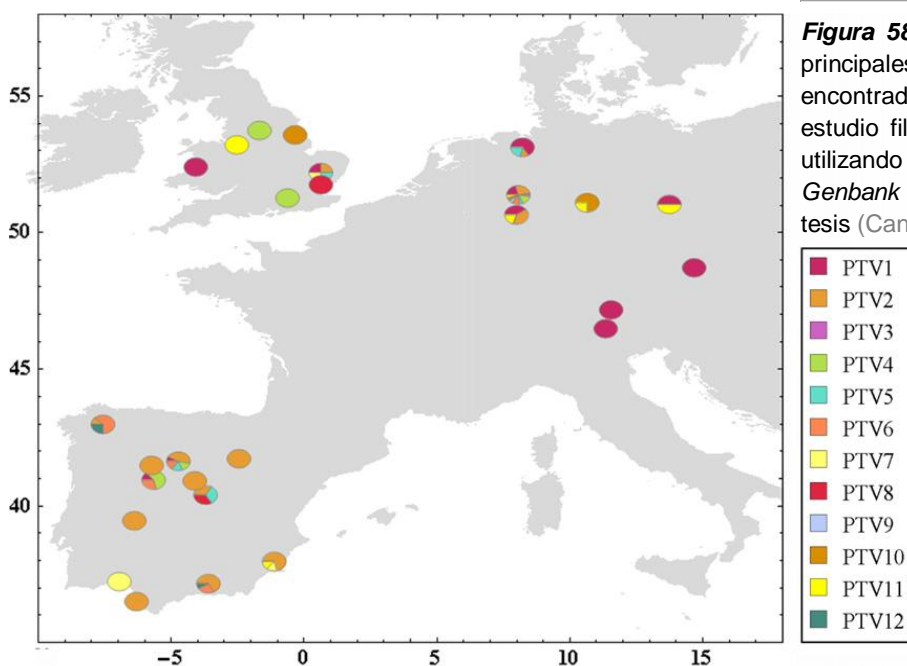


Figura 58. Distribución espacial de los principales genotipos de PTV encontrados en Europa, derivado del estudio filogenético de la proteína VP1 utilizando secuencias publicadas en *Genbank* y de las obtenidas en esta tesis (Cano-Gómez y cols., 2011b).

El estudio filogenético de las secuencias de VP1 generadas en esta tesis distinguió los 11 clúster genéticos que correlacionan con los 11 serotipos conocidos de teschovirus y mostró una topología en el árbol filogenético coherente con las relaciones filogenéticas descritas al analizar la totalidad de la región estructural (P1) (Zöll et al., 2001; Lin y cols., 2012; Zhang y cols., 2010). Además, un grupo de secuencias formó un clado monofilético y diferenciado de los 11 PTV conocidos, apoyado por un *bootstrap* y una probabilidad posterior consistentes, que fue denominado en esta tesis tentativamente PTV-12.

² Mediante separación clonal aplicada al aislado CC30 se pudo demostrar que éste estaba constituido por dos genotipos distintos, PTV-2 y PTV-8 (datos no mostrados).

Por su repercusión sanitaria y económica, la importancia de la identificación a nivel de genotipo radica en la determinación de cepas responsables de la encefalomiелitis en cerdos. Es por ello fundamental poder determinar el genotipo responsable de cada brote y reconocer variantes, recombinantes y nuevos genotipos emergentes (Sozzi y cols., 2010).

Los virus ARN presentan generalmente tasas de mutación en su replicación muy altas, del orden de 10^{-5} a 10^{-3} errores por nucleótido copiado, debido a que las replicasas de ARN carecen actividad correctora de errores. Es un valor muy superior a los 10^{-8} a 10^{-11} errores por nucleótido copiado estimados para los procesos normales de replicación de ADN celular (Drake., 1993). Se han publicado diversas estimaciones de la tasa de sustitución nucleotídica para la familia *Picornaviridae*, especialmente para el gen VP1 (Jenkins y cols., 2002; Moratorio y cols., 2007; Faria y cols., 2009; Gullberg y cols., 2010; McWilliam Leitch y cols., 2010) debido a su relevancia antigénica, encontrando diferencias entre enterovirus y no-enterovirus. Recientemente se ha descrito que las secuencias de VP1 de virus no-entéricos evolucionan con una tasa 4 veces menor que los virus entéricos (9.76×10^{-4} a 2.79×10^{-3} ns/s/y vs. 3.4 a 1.19×10^{-3} ns/s/y, respectivamente) (Hicks y Duffy., 2011). Los resultados obtenidos en esta tesis, usando la VP1 completa y un gran número de secuencias, confirman estos datos para un virus entérico como es el teschovirus (Tabla 55).

Cabe señalar que las estimaciones del ancestro común descritas en esta tesis (tMRCA) corresponden a la región del gen VP1 únicamente y que sería deseable extender los análisis a regiones más grandes, como por ejemplo, la región P1.

Gen	Especie viral	Nºde secuencias	Nº de nt	Rango de datos	Modelo de sustitución	Modelo de Reloj	tMRCA	Media de ratio de sustitución ($\times 10^{-3}$)	Referencia
VP1	Human enterovirus B (CVB2)	51	231	1946-2008	GTR+I+Г	Relajado	72(60-100)	5.27 (3.57–7.06)	Hicks y Duffy., 2011
	Human enterovirus B (CVB4)	110	300	1959-2007	TrN+I+Г	Relajado	75 (60–95)	5.73 (4.18–7.29)	" "
	Encephalomyocarditis virus	27	210	1986-2008	K80+I	Estricto	247 (98–824)	1.61 (0.56–2.78)	" "
	Porcine teschovirus	46	702	1957-2007	GTR+I+Г	Estricto	507 (205–832)	1.62 (0.63–2.75)	" "
Porcine teschovirus	125	762	1957-2009	GTR+I+Г	Relajado	500 (385-659)	2.46 (2.03-2.95)	Cano-Gómez y cols.,2011	

Tabla 55. Análisis comparativo de la tasa de sustitución nucleotídica de diferentes picornavirus respecto al gen que codifica la proteína VP1.

El estudio molecular mediante secuenciación convencional del genoma completo del aislado CC25, unido al análisis filogenético y de homologías tanto nucleotídica como aminoacídica de la región P1, confirmaron los resultados obtenidos empleando la secuencia de la proteína VP1: CC25 pertenece a un nuevo genotipo y posible serotipo de teschovirus porcino (PTV12). Este nuevo genotipo puede ser considerado como un integrante más dentro del subgrupo III. Además, los estudios moleculares comparativos indicaron que el nuevo genotipo PTV12 estaba circulando también en Italia.

La recombinación es una de las principales fuerzas impulsoras de la evolución en la mayoría de los picornavirus, jugando un importante papel en la creación de variantes virales con nuevas propiedades, entre ellas la virulencia viral (Worobey y cols., 1999). Wang y cols (2010) describieron por primera vez la recombinación natural de PTV en un aislado procedente de animales enfermos. La variante aislada exhibía una alta similitud con cepas de serotipo 2 en la región de la P1 (poliproteína estructural) y con cepas de serotipo 5 en la región 3D (polimerasa viral). Sin embargo, la diversidad genética en la región VP1 parece ser debida principalmente al efecto de la mutación (Cano-Gómez y cols., 2011b). Teniendo en cuenta lo anterior, el papel de los eventos de recombinación en la evolución del aislado CC25 es aún incierto, siendo necesarios estudios específicos en más regiones del genoma del virus, que permitan esclarecer este punto.

Como se indicó en la introducción de esta tesis, se han notificado numerosos brotes de enfermedad de Teschen-Talfan desde su primera descripción en 1929, causados por diferentes serotipos, principalmente cepas del serotipo 1 y cursando con sintomatologías clínicas variables. Sin embargo, lo habitual (como queda bien reflejado en esta tesis) es encontrar circulando PTV no patógenos con gran diversidad viral, que están de manera endémica o enzoótica en las poblaciones porcinas, coexistiendo con una gran variedad de patógenos comunes en cerdos como son PCV-2 y PRRS, principalmente (Huang y cols.-2009; Zhang y cols., 2010).

El aislado CC25 (PTV12) procede de una muestra de heces porcinas de animales presuntamente sanos. Los estudios experimentales realizados en esta tesis mostraron que los cerdos inoculados con CC25 no desarrollaban ningún tipo de sintomatología clínica compatible con la enfermedad de Teschen-Talfan, en las condiciones ensayadas, basadas en la vía natural de infección (fecal-oral). A consecuencia de la infección, los animales inoculados desarrollaron una respuesta inmune basada en anticuerpos neutralizantes específicos frente al aislado CC25, reproduciendo la cinética de anticuerpos descrita en otros estudios tanto con cepas patógenas como con cepas atenuadas avirulentas (Hájek y cols., 1971a; Hájek y Mandel., 1971b). La inmediata respuesta de formación de anticuerpos específicos es posiblemente debida a la estimulación antigénica local de los tejidos linfoides asociados al tracto gastrointestinal (GALT).

Aunque, como se ha discutido anteriormente, las pruebas moleculares resultan útiles en la tipificación de los diferentes PTVs, la técnica “*gold standard*” para la serotipificación de estos virus es la seroneutralización con paneles de antisueros policlonales mono-específicos (OIE; 2008; capítulo 2.8.10). Existe cierta reactividad cruzada entre serotipos de PTV, hecho que dificulta su serotipificación (Zöll y cols., 2001; Sereika y cols., 2006). Siguiendo la

metodología descrita en el manual de la OIE, el ensayo de serotipado del aislado CC25 usando un panel de antisueros monoespecíficos disponibles para los serotipos conocidos del G^o *Teschovirus*, así como el suero homotípico obtenido de los animales inoculados con CC25, demostró que los datos moleculares correlacionaban con los serológicos, y que por tanto el nuevo genotipo podía ser igualmente considerado un nuevo serotipo.

Los animales utilizados en la inoculación experimental de CC25 presentaron, en el momento de la inoculación, inmunidad neutralizante frente a algunos serotipos de teschovirus, indicativa de infecciones previas con alguna(s) variante(s) de este género, aunque en ensayos previos estos mismos animales fueron seronegativos. Probablemente estos animales podrían portar una infección persistente, que circunstancias ambientales, como el estrés derivado del transporte, el alojamiento y/o la manipulación en los boxes NCB3, pudieron haber desencadenado una infección activa, con la correspondiente seroconversión. Sin embargo, esta inmunidad pre-existente no impidió la infección por CC25.

El estudio macroscópico y microscópico de las lesiones confirmó una reactividad del sistema linfoide en respuesta al estímulo antigénico, mostrando un aumento de tamaño de los ganglios linfáticos de manera generalizada y una hiperplasia folicular linfoide en linfonodos y placas de Peyer. Asimismo, se encontraron cuerpos de inclusión citoplasmáticos compatibles con centros activos de replicación del virus, como ya se había descrito anteriormente (Scheurer., 1937; Takahashi y cols., 2008).

Dado su enterotropismo (Mayr., 1962) las proteínas virales pudieron ser detectadas en enterocitos y células con morfología macrofágica del íleon (Yamada y cols., 2009), a diferencia de otros estudios, que las detectaban en el plexo mioentérico (Yamada y cols., 2008).

Los análisis histopatológicos del SNC revelaron la ausencia de polioencefalomielitis no supurativa, típico proceso inflamatorio del estadio neurotrópico del virus de la enfermedad de Teschen (Manuelidis y cols., 1957; Yamada y cols., 2004; Bangari y cols., 2010; Salles y cols., 2011; Deng y cols., 2012). No se observaron cambios patológicos en la materia gris del diencefalo, cerebelo, bulbo raquídeo ni en la médula espinal cervical de los animales inoculados. Del mismo modo, la ausencia de manguitos perivasculares con infiltración de linfocitos y células plasmáticas, meningitis, gliosis, satelitosis, necrosis neuronal y neurofagia, unido a la ausencia de genoma vírico en los órganos del SNC analizados por RRT-PCR, confirman que el virus no atravesó la barrera hematoencefálica, asegurando, en las condiciones experimentales empleadas, que el aislado CC25 (PTV12) es

una cepa no patógena. Por otro lado, la detección de genoma viral en el sistema linfóide y en el sistema digestivo demostró que el aislado CC25 posee un tropismo por estos órganos.

Se han llevado a cabo muy pocos estudios no enfocados en cepas patógenas y neurotrópicas. *Chiu y cols* (2012) han estudiado los PTV basándose en un modelo de patogénesis fecal-oral. Sus resultados confirmaron el estado endémico a PTV en los animales muestreados en Taiwán, detectando la infección principalmente en intestinos y órganos linfoides, lo cual coincide con los resultados obtenidos para CC25. Sin embargo, y a diferencia de los resultados obtenidos en esta tesis, diferentes órganos (hígado, riñón y bazo) y regiones del sistema nervioso central (cerebro y médula espinal cervical) fueron también positivos en algunos individuos examinados. Esta diferencia podría ser atribuida a las distintas metodologías y/o el origen de las muestras de este estudio.

Los ensayos *in-vivo* para comprobar la patogenicidad de las cepas de PTV presentan ciertas dificultades a la hora de reproducir el cuadro clínico. Mientras que distintos ensayos de patogenicidad con cepas virulentas de serotipos 8 (*Jilin/2003*) y 1 (*Talfan*), confirmaron la sintomatología clínica esperada, usando la ruta oral y dosis infectivas similares a las utilizadas en esta tesis (Edington y cols., 1972; Zhang y col., 2010), sin embargo, cuando este mismo ensayo fue llevado a cabo con la cepa *Teschen-Konratice* (también patógena) no se observaron signos clínicos (Edington y cols., 1972). La vía de inoculación puede tener importancia, como demuestra otro estudio experimental llevado a cabo con cepas causantes de encefalomiелitis. En este estudio, cuando la inoculación se llevó a cabo por vía oral o intranasal no se observó ni sintomatología ni lesiones en el SNC. Sin embargo, tras la inoculación por vía intravenosa se desarrolló una encefalomiелitis no supurativa con signos neurológicos (Yamada y cols., 2009).

La baja incidencia de infecciones sintomáticas en las poblaciones porcinas podría explicarse por la circulación frecuentemente endémica de cepas no patógenas, que podrían conferir una inmunidad protectora frente a cepas de alta patogenicidad. En nuestros estudios, la infección experimental previa con la cepa CC25 (PTV12), aparentemente no patogénica, indujo una respuesta inmunitaria que fue incapaz de conferir protección cruzada frente al desafío con la cepa heteróloga (*Teschen-Tirol*, PTV1). Además, es probable que la ausencia de una sintomatología clínica de tipo nervioso tras la inoculación de la cepa *Teschen-Tirol* se deba a que ésta pudo atenuarse o perder su patogenicidad por los pases en cultivo celular necesarios para la obtención del inóculo. Tal como muestra este experimento, la protección cruzada es improbable entre cepas heterólogas. Sin embargo es probable que la experimentación con aislados más relacionados filogenéticamente y/o serológicamente, induzca una respuesta protectora.

3. Análisis dirigidos a demostrar o descartar la hipótesis de la reacción cruzada entre el VEVP y los VEP-NVC. Estudios de interferencia en la técnica del cultivo celular

El fenómeno de los “*singleton reactors*” es muy complejo, y en él podrían jugar un papel importante distintos agentes biológicos. Estudios para esclarecer la causa de estos sueros “SR” no han identificado un único factor responsable de los mismos.

Jiménez-Clavero y cols (2000) demostraron que al menos una parte de estos falsos positivos muestran una reacción cruzada con antígenos de especies del género *Mycoplasma*, sugiriendo que debe haber epítomos similares estructuralmente en ambos patógenos. Sin embargo, no todos los sueros “*singleton reactors*” a VEVP presentaron reactividad frente a *Mycoplasma*, lo que implica que debe existir otra(s) causa(s) subyacente que expliquen el total de los SR. Por otro lado, existe una alta seroprevalencia de anticuerpos frente a *M. hyopneumoniae* en las poblaciones porcinas, que no se corresponde con la baja frecuencia de aparición de los SR.

Asimismo, el VEVP es considerado una variante de los coxsackievirus B5 humanos (CV-B5) por adaptación del virus a la especie porcina (*Brown y cols.*, 1973; *Graves.*, 1973). Los SR podrían ser resultado de la existencia de epítomos comunes entre VEVP y CV-B5, o de otros virus que hayan infectado a los cerdos. *Moonen y cols* (2000) estudiaron el posible papel de los CVB5, sin embargo todos los SR estudiados reaccionaron mejor a VEVP que a CV-B5, excluyéndolos como causa del fenómeno SR.

Por otro lado, *Marquardt y Ohlinger* (1995) llevaron a cabo un estudio ensayando un panel de AcM caracterizados frente al VEVP mediante la técnica de ELISA, utilizando aislados pertenecientes a 11 serotipos de enterovirus porcinos (según la antigua clasificación), 2 enterovirus bovinos, 5 serotipos de echovirus, CV-A16 y CV-B (1-6), encontrando sólo reactividad frente a CV-A16 y CV-B5 para tres AcM.

Durante el proceso de confirmación virológica del VEVP mediante la técnica de aislamiento vírico se observó la presencia de VEP que mostraban un ECP similar al VEVP. La confirmación virológica por técnicas de RT-PCR descartó el VEVP en todos los casos. En esta tesis hemos querido demostrar o descartar la posible implicación de los VEP-NVC, aislados y caracterizados en este estudio, en las reacciones falsas positivas observadas durante el diagnóstico serológico del VEVP. La seroneutralización frente a aislados de VEVP (*POR04* y *UKG/27/72*), utilizando un panel de antisueros policlonales específicos para cepas de referencia de los G^{os} *Teschovirus*, *Sapelovirus*, *Enterovirus-B* y *Adenovirus*, así como para aislados españoles de campo pertenecientes a los G^{os} *Teschovirus* y

Sapelovirus, confirmó la ausencia de reacción cruzada por parte de los AcN específicos de los VEP-NV estudiados. Igualmente, el mismo panel de antisueros fue ensayado en el ELISA-FL descartándose que los anticuerpos frente a los VEP-NV tuvieran reactividad alguna frente a los antígenos del VEPV empleados en el ELISA-FL. Ambas pruebas concluyen que los aislados estudiados de los G^{os} *Teschovirus*, *Sapelovirus*, *Enterovirus-B* y *Adenovirus* no son los responsables de los falsos positivos serológicos al VEPV observados, siendo improbable que otros aislados de los mismos géneros lo fueran.

Debido a que los SR son generalmente de isotipo IgM y no IgG, la causa de estos SR es más probable que se encuentre ligada a anticuerpos IgM aunque la fuente de estos Ac no haya sido aún identificada (Dekker y cols., 2000). En este sentido, se ensayaron sueros tempranos (IgM) y tardíos (IgG) sintetizados en respuesta a la infección experimental por los serotipos 1 y 12 de teschovirus, comprobándose que en ningún caso se producía neutralización cruzada, por lo que es improbable que los SR puedan atribuirse a la respuesta temprana o tardía por una infección por teschovirus.

De hecho, la propia naturaleza de estos SR (0.05%), y en particular, la ausencia de seroconversión, parece sugerir que son más un fenómeno asociado a la propia variabilidad intrínseca de los anticuerpos naturales presentes en las poblaciones animales que el producto de una respuesta inmune específica concreta.

Aunque determinados serotipos de PTV han causado históricamente enfermedades graves en cerdos, los PTV que circulan actualmente en España aparentemente no producen síntomas manifiestos de la enfermedad. Esto puede ser debido a una falta de patogenicidad intrínseca de los virus circulantes o, alternativamente, a la inmunidad adquirida en las poblaciones de cerdos. Diversos estudios apuntan a una situación endémica con altas seroprevalencias para teschovirus en las poblaciones de cerdos de diferentes partes del mundo. Un estudio llevado a cabo en China en sueros porcinos mediante inmunofluorescencia indirecta mostró un 60,17% de seroprevalencia frente a PTV, indicando un alta tasa de infección en las poblaciones de cerdos examinadas (Wang y cols., 2011). Asimismo, las investigaciones seroepidemiológicas llevadas a cabo en Lituania usando VN revelaron una alta seroprevalencia ($\geq 1:8 = 97,7\%$) frente a una cepa antigénicamente análoga a la cepa *Talfan* (PTV1), en cerdos de todas las edades (Sereika y cols., 2007). El estudio de seroprevalencia por VN llevado a cabo en esta tesis, basado en un serotipo ampliamente distribuido en nuestro país (PTV2), reveló un alto porcentaje de positivos serológicos ($\geq 1:80 = 47,2\%$; $\geq 1:40 = 71,4\%$), sugiriendo un estado endémico en la población porcina española. Asimismo, la alta frecuencia con que se aislan virus del G^o *Teschovirus* a partir de heces porcinas en España apoyaría este estatus serológico.

En cuanto a la distribución geográfica de la frecuencia de sueros positivos frente a PTV-2, se encontraron diferencias sustanciales, principalmente en Baleares, que mostró valores muy superiores ($\geq 1:40 = 90.8\%$) a otros territorios estudiados. Sin embargo, a la hora de interpretar los resultados debemos tener en cuenta los diversos sesgos de muestreo introducidos, como son que los sueros proceden del programa de vigilancia sanitaria de la EVP, que el muestreo no es representativo de toda España, y que no han sido seleccionados al azar para este estudio. Aun así, este es el primer estudio sobre la abundancia de sueros positivos del G⁰ *Teschovirus* en nuestro país, y puede ser indicativo, junto con los datos de epidemiología molecular, del estatus serológico de la cabaña porcina respecto a teschovirus en nuestro país.

Estadísticamente se ha podido concluir que no existía asociación entre tener Ac a EVP y tener Ac a PTV en general, sugiriendo que los Ac de PTV no eran los responsables de los falsos positivos a EVP estudiados en esta tesis, lo cual corrobora los estudios presentados igualmente en esta tesis que señalan la ausencia de reactividad cruzada entre ambos tipos de virus.

Finalmente, se ha examinado experimentalmente si el uso de antisueros específicos con alta capacidad neutralizante para los VEP-NV más prevalentes hallados en este estudio, los cuáles crecen fácilmente en cultivo celular, podría ser útil en la técnica confirmatoria de aislamiento del VEVP. Los VEP-NV podrían enmascarar el crecimiento del VEVP en el método de aislamiento vírico; esto es de gran importancia porque este método es comúnmente utilizado para la confirmación del diagnóstico del virus de EVP. Los antisueros anti-VEP-NV neutralizarían específicamente la infectividad de estos virus, descartando su competencia directa con el VEVP por los mecanismos de replicación de estos virus en las células, y mejorando el aislamiento del VEVP. Los resultados obtenidos en esta tesis son prometedores, aunque serán necesarios más estudios para optimizar las condiciones de aplicación de estos antisueros, así como para ajustar su composición en función de los VEP-NVC más prevalentes en cada zona, antes de aplicar esta técnica en las investigaciones virológicas del VEVP. Por otro lado, se ha comprobado cómo la presencia de AcN frente a teschovirus y adenovirus en animales inoculados experimentalmente con VEVP no impidió el desarrollo de una infección normal con este virus, lo que demuestra que la respuesta inmune derivada de una infección previa con PTV y PADV no confiere protección cruzada por el VEVP afianzando la hipótesis que descarta la reacción cruzada entre VEP-NV y VEVP.

CONCLUSIONES

1. Las muestras procedentes del programa de serovigilancia epidemiológica de la enfermedad vesicular porcina, analizadas mediante técnicas moleculares en esta tesis, han permitido identificar la mayoría de los aislados entéricos porcinos y clasificarlos en tres géneros: *Teschovirus*, *Sapelovirus* y *Adenovirus*.
2. Los estudios moleculares confirmaron la abundancia de teschovirus, y en menor medida, de sapelovirus en heces de jabalíes. Las relaciones filogenéticas entre aislados de ambos tipos de virus, procedentes de cerdo y de jabalí, puestas de manifiesto en esta tesis, podrían ser explicadas por la posible interacción epizootológica entre cerdo doméstico y jabalí ibérico. Sin embargo, no se puede descartar la evolución independiente de virus ancestrales en ambas subespecies, como sugiere la dificultad en el aislamiento y secuenciación molecular observadas en los PTV estudiados.
3. Se ha realizado por primera vez en España un estudio metagenómico de heces porcinas que ha proporcionado información genética sobre la diversidad de las comunidades de virus ADN y ARN. El estudio reveló la predominancia de bacteriófagos de doble cadena y de rotavirus porcinos de los serogrupos A y C, y permitió la reconstrucción casi completa del genoma de posavirus 1.
4. Se ha validado un método de RT-PCR en tiempo real para la detección específica de todos los genotipos de teschovirus. La sensibilidad del método evaluado es superior a los métodos convencionales descritos en el manual de la OIE para la encefalomiелitis por teschovirus, pudiendo ser una técnica de gran utilidad en los programas de vigilancia, control y erradicación en el caso de brotes de la enfermedad de Teschen-Talfan en nuestro país.
5. Se ha desarrollado una herramienta de caracterización molecular para todos los genotipos de teschovirus basada en la proteína estructural VP1. La diversidad genética y el fenómeno de coinfección observados en los estudios comparativos de diferentes RT-PCR de caracterización de PTV, tanto en aislados españoles como italianos, ha permitido reclasificar e identificar posibles nuevos genotipos.

6. Se ha identificado un nuevo genotipo y serotipo perteneciente al G⁰ *Teschovirus* denominado en esta tesis PTV-12. El estudio de su patogenicidad mostró que en las condiciones ensayadas, el aislado CC25 (PTV-12) es un virus no patógeno, con tropismo tisular por el sistema linfático y digestivo e incapaz de promover una protección cruzada frente a una cepa heteróloga (PTV-1).
7. El estudio sobre la frecuencia de anticuerpos neutralizantes para el G⁰ *Teschovirus* en nuestro país, apoyado con los datos de epidemiología molecular, indica que la infección por teschovirus en la cabaña porcina de nuestro país es endémica. Además la ausencia de correlación entre la serología positiva observada frente al VEVP y la observada frente a un aislado español de serotipo 2, sugiere que estos anticuerpos neutralizantes no son los responsables de los falsos positivos a EVP.
8. La ausencia de reactividad cruzada de un panel de antisueros policlonales monoespecíficos frente a teschovirus, sapelovirus, enterovirus-B y adenovirus en las pruebas serodiagnósticas para VEVP (VN y ELISA-FL), demostró que la infección por estos virus no es responsable de los falsos positivos serológicos observados.
9. El uso de antisueros específicos con alta capacidad neutralizante para los VEP-NVC más prevalentes mostró una inhibición parcial de los mismos, que podría ser de utilidad en la técnica de aislamiento del VEVP, evitando la competencia directa por los mecanismos implicados en la replicación de estos virus en las células. No obstante, será necesaria la optimización de esta técnica para conseguir una mejora efectiva en el diagnóstico confirmatorio de la EVP.

BIBLIOGRAFÍA

- ✓ **Decisión de la Comisión de 4 de julio (2000/428/CE)**, por la que se establecen procedimientos de diagnóstico, métodos de muestreo y criterios para la evaluación de los resultados de las pruebas de laboratorio con fines de confirmación y diagnóstico diferencial de la enfermedad vesicular porcina.
- ✓ **Decisión de la Comisión de 30 de julio de 2008 (2008/650/CE)**, que modifica la Directiva 82/894/CEE del Consejo relativa a la notificación de las enfermedades de los animales en la Comunidad para incluir determinadas enfermedades en la lista de enfermedades de declaración obligatoria y suprimir de dicha lista la encefalomielitis enterovírica porcina.
- ✓ **Ley 32/2007**, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.
- ✓ **Manual práctico de operaciones en la lucha contra la enfermedad vesicular porcina (2008)**. Dirección General de Recursos Agrícolas y Ganaderos. Subdirección General de Sanidad de la Producción Primaria.
- ✓ **Real Decreto 650/1994**, de 15 de abril, por el que se establece medidas generales de lucha contra determinadas enfermedades de los animales y medidas específicas contra la enfermedad vesicular porcina. Aplicación nacional de la Directiva 92/119/CEE, de 17 de diciembre.
- ✓ **Real Decreto 1201/2005**, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.
- ✓ **Real Decreto 617/2007**, de 16 de mayo, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación.
- ✓ **Real Decreto 1314/2007**, de 5 de octubre, por el que se modifica el Real Decreto 650/1994, de 15 de abril, por el que se establece medidas generales de lucha contra determinadas enfermedades de los animales y medidas específicas contra la enfermedad vesicular porcina.
- ✓ **Real Decreto 599/2011**, de 29 de Abril, por el que se establecen las bases del plan de vigilancia sanitaria serológica del ganado porcino.

- Abascal F, Zardoya R, Posada D (2005). "ProtTest: Selection of best-fit models of protein evolution". *Bioinformatics*; 21(9): 2104-2105.
- Abe M, Ito N, Sakai K, Kaku Y, Oba M, Nishimura M, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Sugiyama M, Mizutani T (2011). "A novel sapelovirus-like virus isolation from wild boar". *Virus Genes*; 43: 243-248.
- Adair BM and McFerran JB (1976). "Comparative serological studies with mammalian adenoviruses". *Arch Virol.*; 51(4): 319-25.
- Adair BM, McKillop ER, McFerran JB, Todd D (1983). "Studies on the antigenic relationship between bovine subgroup 2 and conventional mammalian adenoviruses using immunofluorescence". *Vet Microbiol.*; 8(2): 121-8.
- Agüero M, Arias M y Sánchez-Vizcaíno JM (2000a). "Desarrollo de nuevas metodologías para el diagnóstico molecular de las enfermedades porcinas". *Prod. Animal*, 160: 4-23.
- Agüero M, Arias M and Sánchez-Vizcaíno JM (2000b). "Development of a novel Multiplex PCR for porcine Circoviruses detection and preliminary field testing". *Proceedings of the 5th International Congress of Veterinary Virology*. Brescia, Italy, 27-30.
- Agüero M, Fernández J, Romero L, Sánchez Mascaraque C, Arias M, Sánchez-Vizcaíno JM (2003). "Highly sensitive PCR assay for routine diagnosis of African swine fever virus in clinical samples". *J Clin Microbiol.*; 41(9): 4431-4.
- Alonso A, Zamora MJ, Arias M, Sánchez C, Gómez-Tejedor C (1995). "The use of swine and mice sera in Elisa for SVD diagnosis". *Report of the first annual Meeting of National Reference Laboratories for Swine Vesicular Disease*. CEC. NIDO, Belgium.
- Allan GM and Ellis JA (2000). "Porcine circoviruses: a review". *J Vet Diagn Invest.*; 12(1): 314.
- Armstrong RN and Barnett ITR (1989). "An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection and quantification of antibodies against swine vesicular disease virus (SVDV)". *Journal of Virological Methods*; 25: 71-79.
- Andersen AA (1977). "Occurrence of cross reactions to foot-and-mouth disease virus in normal swine sera". *Am J Vet Res.*; 38(11): 1757-9.
- Auerbach J, Prager D, Neuhaus S, Loss U, Witte KH (1994). "Grouping of porcine enteroviruses by indirect immunofluorescence and description of new serotypes". *Zbl Vet Med B* 41: 277-282.
- Bachrach HL (1968). "Foot-and-mouth disease". *Annu. Rev. Microbiol.*; 22: 201-244.
- Bachtarzi H, Stevenson M, Fisher K (2008). "Cancer gene therapy with targeted adenoviruses". *Expert Opin Drug Deliv.*; 5(11): 1231-40.

- Bahnemann HG (1990). "Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine". *Vaccine*; 8(4): 299-303. Review.
- Banér J, Gyarmati P, Yacoub A, Hakhverdyan M, Stenberg J, Ericsson O, Nilsson M, Landegren U, Belák S (2007). "Microarray-based molecular detection of foot-and-mouth disease, vesicular stomatitis and swine vesicular disease viruses, using padlock probes". *J Virol Methods*; 143(2): 200-6.
- Bangari DS, Pogranichniy RM, Gillespie T, Stevenson GW (2010). "Genotyping of Porcine teschovirus from nervous tissue of pigs with and without polioencephalomyelitis in Indiana". *J Vet Diagn Invest.*; 22(4): 594-7.
- Bautista E, Jordan DM, Neubauer A, Patterson AR, Vaughn JG (2011). "Multivalent vaccine against teschovirus porcine and other disease causing organisms in swine". U.S Solicitud de patente 2011/ 0150770 A1.
- Bellini S, Alborali L, Zanardi G, Bonazza V, Brocchi E (2010). "Swine vesicular disease in northern Italy: diffusion through densely populated pig areas". *Rev Sci Tech.*; 29(3): 639-48.
- Bellini S, Santucci U, Zanardi G, Brocchi E, Marabelli R (2007). "Swine vesicular disease surveillance and eradication activities in Italy". *Rev Sci Tech.*; 26(3): 585-93.
- Ben Salem AN, Chupin Sergei A, Bjadovskaya Olga P, Andreeva Olga G, Mahjoub A, Prokhvatilova Larissa B (2010). "Multiplex nested RT-PCR for the detection of porcine enteric viruses". *J Virol Methods*; 165(2): 283-93.
- Betts AO (1960). "Studies on enteroviruses of the pig. VI. The relationship of the T 80 strain of a swine polioencephalomyelitis virus to some other viruses as shown by neutralization tests in tissue cultures". *Res. Vet. Sci.*; 1, 296–300.
- Blomström AL, Hakhverdyan M, Reid SM, Dukes JP, King DP, Belák S, Berg M (2008). "A one-step reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification assay for simple and rapid detection of swine vesicular disease virus". *J Virol Methods*; 147(1): 188-93.
- Blomström AL, Belák S, Fossum C, McKillen J, Allan G, Wallgren P, Berg M (2009). "Detection of a novel porcine boca-like virus in the background of porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome". *Virus Res.*; 146 (1-2): 125-9.
- Blomström AL, Widén F, Hammer AS, Belák S, Berg M (2010). "Studies of porcine circovirus type 2, porcine boca-like virus and torque teno virus indicate the presence of multiple viral infections in postweaning multisystemic wasting syndrome pigs". *J Clin Microbiol.*; 48(12): 4392-6.

- Blomström AL (2011). "Viral metagenomics as an emerging and powerful tool in veterinary medicine". *Vet Q.*; 31(3): 107-14.
- Borrego B, Carra E, García-Ranea JA, Brocchi E (2002). "Characterization of neutralization sites on the circulating variant of swine vesicular disease virus (SVDV): a new site is shared by SVDV and the related coxsackie B5 virus". *J Gen Virol.*; 83: 35–44.
- Boros A, Pankovics P, Reuter G (2011). "Characterization of a novel porcine enterovirus in domestic pig in Hungary". *Infect. Genet. Evol.*; 11: 1096-1102.
- Boros A, Pankovics P, Reuter G (2012a). "Characterization of a novel porcine enterovirus in wild boars in Hungary". *Arch Virol.*; 157: 981–986.
- Boros A, Nemes C, Pankovics P, Kapusinszky B, Delwart E, Reuter G (2012b). "Porcine teschovirus in wild boars in Hungary". *Arch Virol.*; 157(8): 1573-8.
- Boros A, Pankovics P, Knowles NJ, Reuter G (2012c). "Natural interspecies recombinant bovine/porcine enterovirus in sheep". *J Gen Virol.*; 93: 1941-1951.
- Boshoff CI, Bastos AD, Gerber LJ, Vosloo W (2007). "Genetic characterisation of African swine fever viruses from outbreaks in southern Africa (1973–1999)". *Vet Microbiol.*; 121: 45–55.
- Brocchi E, Berlinzani A, Gamba D, De Simone F (1995). "Development of two novel monoclonal antibody-based ELISAs for the detection of antibodies and the identification of swine isotypes against swine vesicular disease virus". *J. Virol. Methods.*, 52: 155–167.
- Brocchi E, Zhang G, Knowles NJ, Wilsden G, McCauley JW, Marquardt O, Ohlinger VF, De Simone F (1997). "Molecular epidemiology of recent outbreaks of swine vesicular disease: two genetically and antigenically distinct variants in Europe, 1987-94." *Epidemiol Infect.*; 118(1): 51-61.
- Brown F, Talbot P, Burrows R (1973). "Antigenic differences between isolates of swine vesicular disease virus and their relationship to Coxsackie B5 virus". *Nature*, 245: 315-316.
- Buitrago D, Cano-Gomez C, Agüero M, Fernández-Pacheco P, Gómez-Tejedor C, Jiménez-Clavero MA (2010). "A survey of porcine picornaviruses and adenoviruses in fecal samples in Spain". *J. Vet. Diagn. Invest.*; 22: 763-766.
- Burmeister WP, Guilligay D, Cusack S, Wadell G, Arnberg N (2004). "Crystal structure of species D adenovirus fiber knobs and their sialic acid binding sites". *J. Virol.*; 78: 7727–7736.
- Burrows R, Mann JA, Goodridge D, Chapman WG (1974). "Swine vesicular disease: attempts to transmit infection to cattle and sheep". *J Hyg. (Lond)*; 73(1): 101-7.

- Cano-Gómez C, Buitrago D, Fernández-Pinero J, Fernández-Pacheco P, Mansilla C, Agüero M, Jiménez-Clavero MA (2011a). "Evaluation of a fluorogenic real-time reverse transcription-polymerase chain reaction method for the specific detection of all known serotypes of porcine teschoviruses". *J Virol Methods*; 176(1-2): 131-4.
- Cano-Gómez C, Palero F, Buitrago MD, García-Casado MA, Fernández-Pinero J, Fernández-Pacheco P, Agüero M, Gómez-Tejedor C, Jiménez-Clavero MA (2011b). "Analyzing the genetic diversity of teschoviruses in Spanish pig populations using complete VP1 sequences". *Infect Genet Evol.*; 11(8): 2144-50.
- Cano-Gómez C, García-Casado MA, Soriguer R, Palero F, Jiménez-Clavero MA (2012). "Teschoviruses and sapeloviruses in faecal samples from wild boar in Spain". *Vet. Microbiol.* DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.11.022.
- Callens M and De Clercq K (1999). "Highly sensitive detection of swine vesicular disease virus based on a single tube RT-PCR system and DIG-ELISA detection". *J. Virol. Methods*; 77 (1): 87-99.
- Caracappa S, Vesco G, Iannizzotto G, Guercio V, Knowles NJ (1985). "Isolamento ed identificazione di enterovirus suini in Sicilia". *Arch. Vet. Ital.*; 36: 167-170.
- Carvajal A, Lanza I, Diego R, Rubio P, Cármenes P (1995). "Seroprevalence of porcine epidemic diarrhea virus infection among different types of breeding swine farms in Spain". *Preventive Veterinary Medicine*, 23: 33-40.
- Castresana J (2000). "Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis". *Mol Biol Evol.*; 17(4): 540-52.
- CFSPH (2009). "Teschovirus Encephalomyelitis and Porcine Teschovirus Infection". <http://www.cfsph.iastate.edu>.
- Chandler RL (1965). "Demonstration of a porcine adenovirus by electron microscopy". *Virology*; 25: 143-5.
- Chenard G, Bloemraad M, Kramps JA, Terpstra C, Dekker A (1998). "Validation of a monoclonal antibody-based ELISA to detect antibodies directed against swine vesicular disease virus". *J. Virol. Methods*; 75 (1): 105-12.
- Chiu S, Hu S, Chang C, Chang C, Huang C, Pang V, Wang F (2012). "The role of porcine teschovirus in causing diseases in endemically infected pigs". *Vet Microbiol.*; 161 (1-2): 88-95.
- Choi C and Chae C (2003). "Localization of swine hepatitis E virus in liver and extrahepatic tissues from naturally infected pigs by in situ hybridization". *J Hepatol.*; 38(6): 827-32.
- Chu RM, Moore DM, Conroy JD (1979). "Experimental swine vesicular disease, pathology and immunofluorescence studies". *Can J Comp Med.*; 43(1): 29-38.

- Clarke MC, Sharpe HB, Derbyshire JB (1967). "Some characteristics of three porcine adenoviruses". *Arch Ges Virusforsch*; 21: 91-97.
- Clemente-Casares P, Pina S, Buti M, Jardi R, Martin M, Bofill-Mas S, Girones R (2003). "Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries". *Emerg Infect Dis.*; 9: 448-454.
- Cooper K, Huang FF, Batista L, Rayo CD, Bezanilla JC, Toth TE, Meng XJ (2005). "Identification of genotype 3 hepatitis E virus (HEV) in serum and fecal samples from pigs in Thailand and Mexico, where genotype 1 and 2 HEV strains are prevalent in the respective human populations". *J Clin Microbiol.*; 43(4): 1684-8.
- Cortey M, Macera L, Segalés J, Kekarainen T (2011). "Genetic variability and phylogeny of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) based on complete genomes". *Vet. Microbiol.*; 148: 125–131.
- Cox-Foster DLCS, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan PL, Briese T, Hornig M, Geiser DM, Martinson V, vanEngelsdorp D, Kalkstein AL, Drysdale A, Hui J, Zhai J, Cui L, Hutchison SK, Simons JF, Egholm M, Pettis JS, Lipkin WI (2007). "A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder". *Science*, 318: 283-287.
- Csárgola A, Lőrincz M, Cadar D, Tombácz K, Biksi I, Tuboly T (2012). "Detection, prevalence and analysis of emerging porcine parvovirus infections". *Arch Virol.*; 157(6):1003-10.
- Cubero MJ, León L, Contreras A, Astorga R, Lanza I, García A (1993). "Transmissible gastroenteritis in pigs in South East Spain: prevalence and factors associated with the infection". *Veterinary Record*, 132: 238-241.
- Dawe PS, Forman AJ, Smale CJ (1973). "A preliminary investigation of the swine vesicular disease epidemic in Britain". *Nature*, 241(5391): 540-2.
- De Clercq K (1998). "Reduction of singleton reactors against swine vesicular disease virus by a combination of virus neutralisation test, monoclonal antibody based competitive ELISA and isotype specific ELISA". *Journal of Virological Methods*; 70: 7–18.
- Dea S, Elazhary MA (1984a). "Cultivation of a porcine adenovirus in porcine thyroid cell cultures". *Cornell Vet.*; 74(3): 208-17.
- Dea S, El Azhary MA (1984b). "Prevalence of antibodies to porcine adenovirus in swine by indirect fluorescent antibody test". *Am J Vet Res.*; 45(10): 2109-12.
- Dekker A, Moonen P, de Boer-Luijtz EA, Terpstra C (1995). "Pathogenesis of swine vesicular disease after exposure of pigs to an infected environment". *Vet Microbiol.*; 45(2-3): 243-50.

- Dekker A (2000). "Swine vesicular disease, studies on pathogenesis, diagnosis, and epizootiology: a review." *Vet Q*; 22(4): 189-92.
- Dekker A, Van Hemert-Kluitenberg F, Baars C, Terpstra C (2002). "Isotype specific ELISAs to detect antibodies against swine vesicular disease virus and their use in epidemiology". *Epidemiol Infect.*; 128(2): 277-84.
- Delwart EL (2007). "Viral metagenomics". *Rev Med Virol.* ; 17(2): 115-31. Review.
- Deng MY, Millien M, Jacques-Simon R, Flanagan JK, Bracht AJ, Carrillo C, Barrette RW, Fabian A, Mohamed F, Moran K, Rowland J, Swenson SL, Jenkins-Moore M, Koster L, Thomsen BV, Mayr G, Pyburn D, Morales P, Shaw J, Burrage T, White W, McIntosh MT, Metwally S (2012). "Diagnosis of Porcine teschovirus encephalomyelitis in the Republic of Haiti". *J Vet Diagn Invest.*; 24(4): 671-8.
- Derbyshire JB (1981). "Porcine adenovirus infection". In: Leman AD, Glock RD, Mengeling WL, Penny RHC, Scholl E, Straw B, eds. *Diseases of Swine*. 4th Ed. Ames, Iowa: The Iowa State University Press: 261-265.
- Di Bartolo I, Diez-Valcarce M, Vasickova P, Kralik P, Hernandez M, Angeloni G, Ostanello F, Bouwknegt M, Rodríguez-Lázaro D, Pavlik I, Ruggeri FM (2012). "Hepatitis e virus in pork production chain in czech republic, Italy, and Spain, 2010". *Emerg Infect Dis.*; 18(8): 1282-9.
- Donaldson AI, Ferris NP, Knowles NJ, Barnett IT (1983). "Comparative studies of United Kingdom isolates of swine vesicular disease virus". *Res Vet Sci.*; 35(3): 295-300.
- Doherty M, Todd D, McFerran N, Hoey EM (1999). "Sequence analysis of a porcine enterovirus serotype 1 isolate: relationships with other picornaviruses". *J Gen Virol.*; 80: 1929-1941.
- Drake JW (1993). "Rates of spontaneous mutation among RNA viruses". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; 90: 4171–4175.
- Drummond AJ and Rambaut A (2007). "BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees". *BMC Evol Biol.*; 7: 214.
- Ducatelle R, Coussement W, Hoorens J (1982). "Sequential Pathological Study of Experimental Porcine Adenovirus Enteritis". *Vet. Pathol.*; 19: 179-189.
- Dunne HW, Gobble JL, Hokanson JF, Kradel DC, Bubash GR (1965). "Porcine reproductive failure associated with a newly identified 'SMEDI' group of picornavirus". *Am J Vet Res.*; 26: 1284–1297.
- Edington N, Christofinis GJ, Betts AO (1972). "Pathogenicity of Talfan and Konratice strains of Teschen virus in gnotobiotic pigs". *J Comp Path.*; 82: 393–399.

- Escribano-Romero E, Jiménez-Clavero MA, Ley V (2000). "Swine vesicular disease virus. Pathology of the disease and molecular characteristics of the virion". *Anim Health Res Rev.*; 1(2): 119-26.
- Fallacara F, Pacciarini M, Bugnetti M, Berlinzani A, Brocchi E (2000). "Detection of swine vesicular disease virus in faeces samples by immune-PCR assay". In: *Veterinary Virology in the New Millennium. Proceedings of the 5th International Congress of the European Society for Veterinary Virology, Brescia, Italy, 27–30 August 2000*, pp 173–174.
- Faria NR, de Vries M, van Hemert FJ, Benschop K, van der Hoek L (2009). "Rooting human parechovirus evolution in time". *BMC Evol. Biol.*; 9: 164.
- Fernández J, Agüero M, Romero L, Sánchez C, Belák S, Arias M, Sánchez-Vizcaíno JM (2008). "Rapid and differential diagnosis of foot-and-mouth disease, swine vesicular disease, and vesicular stomatitis by a new multiplex RT-PCR assay". *J Virol Methods*; 147(2): 301-11.
- Fernández-Pacheco P, Fernández-Pinero J, Fernández R, Cano-Gómez C, Sánchez MA, Del Pozo M, Arias M, Jiménez-Clavero MA (2012). "Experimental inoculation of a recent pathogenic isolate of swine vesicular disease virus (POR1/04) in pigs". 6th Annual Meeting EPIZONE: Viruses on the move"12-14 June 2012.
- Ferris NP and Dawson M (1988). "Routine application of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation for the diagnosis of foot-and-mouth and swine vesicular diseases". *Vet. Microbiol.*; 16 (3): 201-9.
- Fry EE, Knowles NJ, Newman JW, Wilsden G, Rao Z, King AM, Stuart DI (2003). "Crystal structure of Swine vesicular disease virus and implications for host adaptation". *J Virol.*; 77(9): 5475-86.
- Gaggar A, Shayakhmetov DM, Lieber A (2003). "CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses". *Nat. Med.*; 9: 1408–1412.
- Ganesh B, Bányai K, Martella V, Jakab F, Masachessi G, Kobayashi N (2012). "Picobirnavirus infections: viral persistence and zoonotic potential". *Rev Med Virol.*; 22(4): 245-56.
- Garland AJM and Mann JA (1974). "Attempts to infect pigs with Coxsackievirus type B5". *Journal of Hygiene, Cambridge* 73: 85–96.
- Garwes DJ and Xuan H (1989). "Genome typing of three serotypes of porcine adenovirus". *Intervirology*; 30(4): 234-6.

- Grau-Roma L, Stockmarr A, Kristensen CS, Enøe C, López-Soria S, Nofrarias M, Bille-Hansen V, Hjulsager CK, Sibila M, Jorsal SE, Fraile L, Baekbo P, Vigre H, Segalés J, Larsen LE (2012). "Infectious risk factors for individual postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) development in pigs from affected farms in Spain and Denmark". *Res Vet Sci.*; 93(3): 1231-40.
- Graves JH (1973). "Serological relationship of swine vesicular disease virus and Coxsackie B5 virus". *Nature* 245 (5424): 314-5.
- Golding SM, Hedger RS, Talbot P, Watson J (1976). "Radial immunodiffusion and serum-neutralization techniques for the assay of antibodies to swine vesicular disease". *Res. Vet. Sci.*, 20: 142-147.
- Gourreau JM, Dhennin L, Labie J (1975). "Preparation of an inactivated virus vaccine against swine vesicular disease". *Recueil Med Vet.*; 151: 85-9.
- Guindon S and Gascuel O (2003). "A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood". *Syst Biol.*; 52(5): 696-704.
- Gullberg M, Tolf C, Jonsson N, Mulders MN, Savolainen-Kopra C, Hovi T, Van Ranst M, Lemey P, Hafenstein S, Lindberg AM (2010). "Characterization of a putative ancestor of coxsackievirus B5". *J. Virol.*; 84: 9695–9708.
- Haig DA, Clarke MC, Pereira MS (1964). "Isolation of an adenovirus from a pig". *J Comp Pathol.*; 74: 81-84.
- Hájek P, Mandel L, Smolová M (1971). "Neutralizing antibody formation in newborn colostrum-deprived germfree piglets infected per os with Teschen disease virus". *Acta Virol.*; 15(5): 430.
- Hájek P and Mandel L (1971). "The antibody response in newborn precolostral germfree piglets following the peroral monocontamination with attenuated Teschen disease virus (TDV)". *Folia Microbiol (Praha)*; 16(1): 58-61.
- Halaihel N, Masía RM, Fernández-Jiménez M, Ribes JM, Montava R, De Blas I, Gironés O, Alonso JL, Buesa J (2010). "Enteric calicivirus and rotavirus infections in domestic pigs". *Epidemiol Infect.*; 138(4): 542-8.
- Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM (1998). "Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products". *Chem Biol.*; 5(10): R245-9.
- Harding JDJ, Done JT, Kershaw GF (1957). "A transmissible polio-encephalomyelitis of pigs (Talfan Disease)". *Veterinary Record*; 69: 824–832.
- Harrach B and Benko M (2007). "Phylogenetic analysis of adenovirus sequences". *Methods Mol Med.*; 131: 299-334.

- Herniman KA, Medhurst PM, Wilson JN, Sellers RF (1973). "The action of heat, chemicals and disinfectants on swine vesicular disease virus". *Vet Rec.*; 93(24): 620-4.
- Hicks AL and Duffy S (2011). "Genus-specific substitution rate variability among picornaviruses". *J Virol.*; 85(15): 7942-7.
- Hoffmann B, Scheuch M, Höper D, Jungblut R, Holsteg M, Schirrmeier H, Eschbaumer M, Goller KV, Wernike K, Fischer M, Breithaupt A, Mettenleiter TC, Beer M (2012). "Novel orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011". *Emerg Infect Dis.*; 18(3): 469-72
- Honda E, Kimata A, Hattori I, Kumagai T, Tsuda T, Tokui T (1990). "A serological comparison of 4 Japanese isolates of porcine enteroviruses with the international reference strains". *Nippon Juigaku Zasshi*; 52: 49–54.
- Hsieh SY, Meng XJ, Wu YH, Liu ST, Tam AW, Lin DY, Liaw YF (1999). "Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus". *J Clin Microbiol.*; 37(12): 3828-34.
- Huang TS, Wang C, Deng MC, Jeng JJ, Lee SH, Pan CS, Lee MC, Jong MH (2009). "The results of virus isolation in swine tissue samples submitted by LDCC and tested by viral isolation and PCR and/or RT-PCR in 2008". In *Exp. Rep. AHRI (Animal Health Research Institute)* 44: 35-46.
- Hubschle OJB, Rajoanarison J, Koko M, Rakotondramary E, Rasolfomanana P (1983). "ELISA for detection of Teschen virus antibodies in swine serum samples". *Dtsch Tierarztl. Wochenschr*; 90: 86–88.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001). "MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees". *Bioinformatics*; 17: 754-755.
- Hundesda A, Maluquer de Motes C, Bofill-Mas S, Albinana-Gimenez N, Girones R (2006). "Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment". *Appl. Environ. Microbiol.*; 72: 7886–7893.
- Hundesda A, Maluquer de Motes C, Albinana-Gimenez N, Rodriguez-Manzano J, Bofill-Mas S, Suñen E, Rosina Girones R (2009). "Development of a qPCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment". *J Virol Methods*; 158(1-2): 130-5.
- Iglesias G (1987). "Infección del virus de la enfermedad de aujeszky en cerdos". *Ciencia Veterinaria*, 4-1987.
- Inoue T, Suzuki T, Sekiguchi K (1989). "The complete nucleotide sequence of swine vesicular disease virus". *J Gen Virol.*; 70 (Pt 4): 919-34.

- Inoue T, Yamaguchi S, Kanno T, Sugita S, Saeki T (1993). "The complete nucleotide sequence of a pathogenic swine vesicular disease virus isolated in Japan (J1'73) and phylogenetic analysis". *Nucleic Acids Res.*; 21(16): 3896.
- Izawa H, Bankowski RA, Howarth JA (1962). "Porcine enteroviruses. I. Properties of three isolates from swine with diarrhea and one from apparently normal swine". *Am J Vet Res.*; 23: 1131–1141.
- Jack PJ, Amos-Ritchie RN, Reverter A, Palacios G, Quan PL, Jabado O, Briese T, Lipkin WI, Boyle DB (2009). "Microarray-based detection of viruses causing vesicular or vesicular-like lesions in livestock animals". *Vet Microbiol.*; 133(1-2): 145-53.
- Jenkins GM, Rambaut A, Pybus OG, Holmes EC (2002). "Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis". *J Mol Evol.*; 54(2): 156-65.
- Jeong C, Park SI, Park SH, Kim HH, Park SJ, Jeong JH, Choy HE, Saif LJ, Kim SK, Kang MI, Hyun BH, Cho KO (2007). "Genetic diversity of porcine sapoviruses". *Vet Microbiol.*; 21; 122 (3-4): 246-57.
- Jiménez-Clavero MA, Escribano-Romero E, Sánchez-Vizcaíno JM, Ley V (1998). "Molecular cloning, expression and immunological analysis of the capsid precursor polypeptide (P1) from swine vesicular disease virus". *Virus Res.*; 57: 163–170.
- Jiménez-Clavero MA, Douglas A, Lavery T, Garcia-Ranea JA, Ley V (2000a). "Immune recognition of swine vesicular disease virus structural proteins: novel antigenic regions that are not exposed in the capsid". *Virology*; 270(1): 76-83.
- Jiménez-Clavero MA y Ley V (2000b). "Falsos positivos en pruebas serológicas de virus de la enfermedad vesicular del cerdo: reacción cruzada con *Mycoplasma*". *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim.*; Vol. 15 (3).
- Jiménez-Clavero MA, Escribano-Romero E, Douglas AJ, Ley V (2001). "The N-terminal region of the VP1 protein of swine vesicular disease virus contains a neutralization site that arises upon cell attachment and is involved in viral entry". *J Virol.*; 75(2): 1044-7.
- Jiménez-Clavero, MA, Fernández C, Ortiz JA, Pro J, Carbonell G, Tarazona JV, Roblas N, Ley V (2003). "Teschoviruses as indicators of porcine fecal contamination of surface water". *Appl. Environ. Microbiol.*; 69: 6311–6315.
- Jiménez-Clavero MA, Escribano-Romero E, Ley V, Spiller OB (2005). "More recent swine vesicular disease virus isolates retain binding to coxsackie-adenovirus receptor, but have lost the ability to bind human decay-accelerating factor (CD55)". *J Gen Virol.*; 86 (Pt 5): 1369-77

- Kadoi K (1983). "The propagation of a strain of swine vesicular disease virus in one-day-old mice". *Nihon Juigaku Zasshi*; 45(6): 821-3.
- Kadoi K (1997a). "Beneficial use of inactivated porcine adenovirus vaccine and antibody response of young pigs". *New Microbiology*; 20: 89–91.
- Kadoi K, Iwabuchi M, Satoh T, Katase T, Kawaji T, Morichi T (1997b). "Adenovirus isolation from spleen lymphocytes of apparently healthy pigs". *New Microbiology*; 20: 215–220.
- Kaku Y, Sarai A, Murakami Y (2001). "Genetic reclassification of porcine enteroviruses". *J. Gen. Virol.*; 82: 417-424.
- Kaku Y, Murakami Y, Sarai A, Wang Y, Ohashi S, Sakamoto K (2007). "Antigenic properties of porcine teschovirus 1 (PTV-1) Talfan strain and molecular strategy for serotyping of PTVs". *Arch Virol.*; 152(5): 929-40.
- Kanno T, Inoue T, Wang Y, Sarai A, Yamaguchi S (1995). "Identification of the location of antigenic sites of swine vesicular disease virus with neutralization-resistant mutants". *J Gen Virol.*; 76 (Pt 12): 3099-106.
- Kanno T, Mackay D, Inoue T, Wilsden G, Yamakawa M, Yamazoe R, Yamaguchi S, Shirai J, Kitching P, Murakami Y (1999). "Mapping the genetic determinants of pathogenicity and plaque phenotype in swine vesicular disease virus". *J Virol.*; 73(4): 2710-6.
- Kasza, L (1966). "Isolation of an adenovirus from the brain of a pig". *American Journal of Veterinary Research*; 27: 751–758.
- Kesy A., Niedbalski W, Fitzner A, Paprocka G (1997). "Use of polymerase chain reaction (PCR) for detection of SVDV-RNA in clinical samples". *Medycyna Weterynaryjna*; 53: 270-72.
- Kim HS, Kwang J, Yoon IJ, Joo HS, Frey ML (1993). "Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line". *Arch. Virol.*; 133: 477–483.
- Kleiboeker SB (1994). "Sequence analysis of putative E3, pVIII, and fiber genomic regions of a porcine adenovirus". *Virus Res.*; 31(1):17-25.
- Klobouk A (1931). "Encephalomyelitis enzootica suum (Teschen disease)". Preliminary report. *Zvěrolékařské rozpravy*, V, pag 95.
- Klobouk A (1935). "Active immunization against Teschen disease". *Zvěrolékařské rozpravy*, IX, 14: 217-218
- Klobouk A (1936). "Encephalomyelitis enzootica suum (Teschen disease) spread outside of Teschen district". *Zvěrolékařské rozpravy*, X: 146-149.

- Knowles NJ, Buckley LS, Pereira HG (1979) "Classification of porcine enteroviruses by antigenic analysis and cytopathic effects in tissue culture: description of three new serotypes". *Archives of Virology*; 62: 201-208.
- Knowles NJ (1988). "The association of group III porcine enteroviruses with epithelial tissue". *Vet. Rec.*; 122: 441-442.
- Knowles, NJ and McCauley JW (1997). "Coxsackievirus B5 and the relationship to swine vesicular disease virus." *Curr Top Microbiol Immunol.*; 223: 153-67.
- Knowles NJ (2006). "Porcine enteric picornaviruses". In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ (eds) *Diseases of Swine*, 9th edn. Blackwell, Oxford, pp 337–354.
- Knowles NJ, Wilsden G, Reid SM, Ferris NP, King DP, Paton DJ, Fevereiro M, Brocchi E (2007). "Reappearance of swine vesicular disease virus in Portugal". *Vet Rec.*; 161(2): 71.
- Knowles NJ, Hovi T, Hyypiä T, King AMQ, Lindberg AM, Pallansch MA, Palmenberg AC, Simmonds P, Skern T, Stanway G, Yamashita T, Zell R (2012). "Picornaviridae". In: *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses: 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Ed: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. San Diego: Elsevier, pp 855-880.
- Kouba V (2009). "Teschen disease (Teschovirus encephalomyelitis) eradication in Czechoslovakia: a historical report". *Vet Med Czech.*; 54: 550–560.
- Kremer EJ, Boutin S, Chillon M, Danos O (2000). "Canine adenovirus vectors: an alternative for adenovirus-mediated gene transfer". *J Virol.*; 74(1): 505-12.
- Krumbholz A, Dauber M, Henke A, Birch-Hirschfeld E, Knowles NJ, Stelzner A, Zell R (2002). "Sequencing of porcine enterovirus groups II and III reveals unique features of both virus groups". *J Virol.*; 76: 5813-5821.
- Krumbholz A, Wurm R, Scheck O, Birch-Hirschfeld E, Egerer R, Henke A, Wutzler P, Zell R (2003). "Detection of porcine teschoviruses and enteroviruses by LightCycler real-time PCR". *Journal of Virological Methods*; 113: 51–63.
- La Rosa G, Muscillo M, Di Grazia A, Fontana S, Laconelli M, Tollis M (2006). "Validation of rt-PCR assays for molecular characterization of porcine teschoviruses and enteroviruses". *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*; 53: 257-265.
- Lahellec M, Gourreau JM (1975). "Swine vesicular disease: pathological study". (author's transl). *Ann Rech Vet.*; 6(2): 179-86.
- Lai SS, McKercher PD, Moore DM, Gillespie JH (1979). "Pathogenesis of swine vesicular disease in pigs". *Am J Vet Res.*; 40(4): 463-8.

- Lager KM, Ng TF, Bayles DO, Alt DP, Delwart EL, Cheung AK (2012). "Diversity of viruses detected by deep sequencing in pigs from a common background". *J Vet Diagn Invest.*; 24(6): 1177-9.
- Lan D, Ji W, Yang S, Cui L, Yang Z, Yuan C, Hua X (2011). "Isolation and characterization of the first Chinese porcine sapelovirus strain". *Arch Virol.*; 156: 1567-1574.
- Lane, DJ (1991). "16S/23S rRNA sequencing". In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 115-17.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0". *Bioinformatics*, 23: 2947-2948.
- Larson G, Dobney K, Albarella U, Fang M, Matisoo-Smith E, Robins J, Lowden S, Finlayson, H, Brand T, Willerslev E, Rowley-Conwy P, Andersson L, Cooper A (2005). "Worldwide pylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication". *Science* 307: 1618-1621.
- Laurin MA, Dastor M, L'homme Y (2011). "Detection and genetic characterization of a novel pig astrovirus: relationship to other astroviruses". *Arch Virol.*; 156(11): 2095-9.
- Lenghaus C, Mann JA, Done JT, Bradley R (1976). "Neuropathology of experimental swine vesicular disease in pigs". *Res Vet Sci.*; 21(1): 19-27.
- Lépine P and Atanasiu P (1950). "Existence a madagascar de l'encéphalomyélite enzootique des porcs immunité croisée avec le virus de la maladie de Teschen transmission au sanglier". *Annales de l'Institut Pasteur*, t.79, n° 2.
- Li L, Victoria JG, Wang C, Jones M, Fellers GM, Kunz TH, Delwart E (2010). "Bat guano virome: predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses". *J Virol.*; 84: 6955-6965.
- Li L, Shan T, Wang C, Côté C, Kolman J, Onions D, Gulland FM, Delwart E (2011). "The fecal viral flora of California sea lions". *J. Virol.*; 85: 9909-9917.
- Liebke H and Schlenstedt D (1971). "Eine Enterovirus (ECSO)-Infektion bei Schweinen mit nervösen Störungen und einer gleichzeitig vorhandenen Rhinitis". *Tierärztl Umschau*; 26(287-291): 324-330.
- Lin F, Mackay DK, Knowles NJ (1997). "Detection of swine vesicular disease virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction". *J Virol Methods*; 65 (1): 111-121.
- Lin F, Mackay DK, Knowles NJ (1998). "The persistence of swine vesicular disease virus infection in pigs". *Epidemiol Infect.*; 121(2): 459-72.

- Lin F and Kitching RP (2000). "Swine vesicular disease: an overview". *Vet J.*; 160(3): 192-201. Review.
- Lin F, Mackay DK, Knowles NJ, Kitching RP (2001). "Persistent infection is a rare sequel following infection of pigs with swine vesicular disease virus". *Epidemiol Infect.*; 127(1): 135-45.
- Lin W, Cui S, Zell R (2012). "Phylogeny and evolution of porcine teschovirus 8 isolated from pigs in China with reproductive failure". *Arch Virol.*; 157: 1387-1391.
- Lin YL, Huang YW, Lin SYF, Huang TS, Jong MH, Chang WM, Huang CC (2011). "The distribution and genotyping of porcine teschovirus in Taiwan". *Proceedings of the 5th Asian Pig Veterinary Society Congress, Pattaya, Thailand.*
- Liu S, Zhao Y, Hu Q, Lv C, Zhang C, Zhao R, Hu F, Lin W, Cui S (2011). "A multiplex RT-PCR for rapid and simultaneous detection of porcine teschovirus, classical swine fever virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in clinical specimens". *J Virol Methods.*; 172(1-2): 88-92.
- Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, Ingersoll R, Sheppard HW, Ray SC (1999). "Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination". *J Virol.*; 73(1): 152-60.
- Lomakina NF, Fallacara F, Pacciarini M, Amadori M, Lomakin AI, Timina AM, Shcherbakova LO, Drygin VV (2004). "Application of universal primers for identification of Foot-and-mouth disease virus and Swine vesicular disease virus by PCR and PCR-ELISA". *Arch Virol.*; 149(6): 1155-70.
- Long JF, Koestner A, Kasza L (1966). "Infectivity of three porcine polioencephalomyelitis viruses for germfree and pathogen-free pigs". *Am J Vet Res.*; 27: 274-279.
- Long JF (1985). "Pathogenesis of porcine polioencephalomyelitis". In RA Olsen, S. Krakowka, JR. Blakeslee, eds *Comparative Pathology of Viral Diseases. Vol I.* Boca Raton, FL: CRC Press, p. 179-197.
- López-Bueno A, Tamames J, Velázquez D, Moya A, Quesada A, Alcamí A (2009). "High diversity of the viral community from an Antarctic lake". *Science* 6; 326(5954): 858-61.
- Lu L, Li C, Hagedorn CH (2006). "Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis". *Rev Med Virol.*; 16(1): 5-36.
- Lung O, Fisher M, Beeston A, Hughes KB, Clavijo A, Goolia M, Pasick J, Mauro W, Deregt D (2011). "Multiplex RT-PCR detection and microarray typing of vesicular disease viruses". *J Virol Methods*; 175(2): 236-45.

- Lugovskaia NN, Kharitonova NE, Zhiltsova MV, Egorova AI, Kremenchugskaia SR, Borisov VV (2010). "Development of an indirect ELISA for the detection of antibodies to swine vesicular disease virus during monitoring studies". *Vopr Virusol.*; 55(4): 41-4.
- Madr V (1959). "Propagation of the Teschen disease virus in cell cultures". *Veterinarstvi*, IX, 298–301.
- Mahnel H and Bibrack B (1966). "Isolation of adenovirus from kidney cell cultures of normal slaughter swine". *Zentralbl Bakteriol Orig.*; 199(3): 329-38.
- Mahnel H, Ottis K y Herlyn M (1977). "Stability in drinking and surface water on nine virus species from different genera". *Zbl. Bakt. Hyg, Abt. Orig. B*; 164: 64-84.
- Mann JA and Hutchings GH (1980). "Swine vesicular disease: pathways of infection". *J Hyg. (Lond)*; 84(3): 355-63.
- Maluquer de Motes C, Clemente-Casares P, Hundesa A, Martín M, and Girones R (2004) "Detection of bovine and porcine adenoviruses for tracing the source of fecal contamination". *Appl Environ Microbiol.*; 70:1448–1454.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982). "Molecular cloning: a laboratory manual". Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 545p, ISBN: 0879691360.
- Manuelidis EE, Sprinz H, Horstmann DM (1954). "Pathology of Teschen disease (virus encephalomyelitis of swine)". *American Journal of Pathology*; 30: 567-597.
- Marquardt O and Ohlinger VF (1995). "Differential diagnosis and genetic analysis of the antigenically related swine vesicular disease virus and coxsackie viruses". *J Virol Methods*; 53 (2-3): 189-199.
- Martínez-Martínez M, Díez-Valcarce M, Hernández M, Rodríguez-Lázaro D (2011). "Design and Application of Nucleic Acid Standards for Quantitative Detection of Enteric Viruses by Real-Time PCR". *Food Environ Virol.*; 3(2): 92-98.
- Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Bányai K, Brister JR, Buesa J, Esona MD, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M, Johne R, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Parreño V, Rahman M, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Patton JT, Desselberger U, Van Ranst M (2011). "Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG)". *Arch Virol.*; 156(8): 1397-413.
- Mayr A and Schwoebel W (1957). "Propagation of the Teschen disease virus in porcine kidney cell cultures and properties of the cultured virus". 1.2.3. part. *Zentralbl. Bakteriol. [I. Orig.]*; 168: 329–359.
- Mayr A (1962). "The virus of Teschen disease". *Ann N Y Acad Sci.*; 30; 101: 423-7.

- Mayr A, Bibrack B, Bachmann, PA (1967). "Propagation of porcine adenoviruses in calf kidney cell cultures". *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde Infektionskrankheiten und Hygiene Erste Abteilung*; 203: 59–68.
- McKercher PD and Graves JH (1976). "A mixed vaccine for swine: an aid for control of foot-and-mouth and swine vesicular diseases". *Bol Centro Panameric Fiebre Aftosa*; 23/24: 37-49.
- McMenamy MJ, McKillen J, Reid SM, Hjertner B, King DP, Adair B, Allan G (2011) "Development of a minor groove binder assay for real-time one-step RT-PCR detection of swine vesicular disease virus". *J Virol Methods.*; 171(1): 219-24.
- McWilliam Leitch EC, Cabrerizo M, Cardoso J, Harvala H, Ivanova OE, Kroes AC, Lukashev A, Muir P, Odoom J, Roivainen M, Susi P, Trallero G, Evans DJ, Simmonds P. (2010). "Evolutionary dynamics and temporal/geographical correlates of recombination in the human enterovirus echovirus types 9, 11, and 30". *J Virol.*; 84: 9292–9300.
- Meng XJ, Lindsay DS, Sriranganathan N (2009). "Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans". *Phil Trans R Soc B*; 364: 2697–2707.
- Mettenleiter TC (2000). "Aujeszky's disease (Pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis". *Vet. Res.*; 31: 99-115.
- Meyer RC, Woods GT, Simon J (1966). "Pneumonitis in an enterovirus infection in swine". *Journal of Comparative Pathology*; 76: 397-405.
- Minor PD, Brown F, Domingo E., Hoey E, King A, Knowles N, Lemon S, Palmenberg A, Rueckert RR, Stanway G, Wimmer E, Yin-Murphy SH (1995). "Family Picornaviridae". In: *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses*, Murphey FA, Fauquet CM, Bishop HDL, Ghabrial SH, Jarvis AW, Martelli GP, Mayo MA & Summers MD, eds. 6th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.*, (Suppl.) 10: 329–336.
- Minor PD and Muir P (2004). "Enterovirus". *Principles and Practice of Clinical Virology*, 5th Edition. Edited by A.J Zuckerman, J.E Banatvala, J.R Pattison, P.D Griffiths and B.d Schoub. John Wiley & Sons Ltd. ISBN 0 470 84338 1.
- Mitev G, Tekerlekov P, Dilovsky M, Ognianov D, and Nikolova E (1978). "Experiments on the preparation and testing of associated vaccine against foot and mouth disease and vesicular disease in swine". *Arch Exp Veterinarmed*; 32: 29-33.
- Mokili JL, Rohwer F, Dutilh BE (2012). "Metagenomics and future perspectives in virus discovery". *Curr Opin Virol.*; 2(1): 63-77.

- Moon HJ, Song D, Seon BH, Kim HK, Park SJ, An DJ, Kim JM, Kang BK, Park BK (2012). "Complete genome analysis of porcine enterovirus B isolated in Korea". *J Virol.*; 86(18): 10250.
- Moonen P, Poelwijk F van, Moormann R, and Dekker A (2000). "Singleton reactors in the diagnosis of swine vesicular disease; The role of coxsackieB5". *Vet Microl.*; 76(3): 291-7.
- Moratorio G, Costa-Mattioli M, Piovani R, Romero H, Musto H, Cristina J (2007). "Bayesian coalescent inference of hepatitis A virus populations: evolutionary rates and patterns". *J Gen Virol.*; 88: 3039–3042.
- Morimoto T, Tukudo G, Omori T, Fukusho K, Watanabe M (1962). "Cytopathogenic agents isolated from the faeces and the intestinal content of pigs. I. Their isolation and serological classification. II. Properties of the isolates". *Nat Inst Anim Health Tokyo Quart*; 2: 59–75.
- Morimoto, T., Dunne, H. W. & Wang, J. T. (1968). "Serologic comparison of North American and Japanese porcine picornaviruses". *American Journal of Veterinary Research*; 29: 2275-2280.
- Mowat GN, Darbyshire JH, Huntley JF (1972). "Differentiation of a vesicular disease of pigs in Hong Kong from foot-and-mouth disease". *Vet Rec.*; 90(22): 618-21.
- Mowat GN, Prince MJ, Spier RE, Staple RF (1974). "Preliminary studies on the development of a swine vesicular disease vaccine". *Archiv fur die Gesamte Virusforschung*; 44: 350-60.
- Mulder WA, van Poelwijk F, Moormann RJ, Reus B, Kok GL, Pol JM, Dekker A (1997). "Detection of early infection of swine vesicular disease virus in porcine cells and skin sections. A comparison of immunohistochemistry and in-situ hybridization". *J Virol Methods*; 68(2): 169-75.
- Muscillo M, Carducci A, La Rosa G, Cantiani L, Marianelli C (1997). "Enteric virus detection in adriatic seawater by cell culture, polymerase chain reaction and polyacrylamide gel electrophoresis". *Water Research*; 31(8): 1980-1984.
- Nagy M, Nagy E, Tuboly T (2001). "The complete nucleotide sequence of porcine adenovirus serotype 5". *J Gen Virol.*; 82(Pt 3): 525-9.
- Nagy M, Nagy E, Tuboly T (2002). "Sequence analysis of porcine adenovirus serotype 5 fibre gene: evidence for recombination". *Virus Genes*; 24(2): 181-5.
- Nardelli L, Lodetti E, Gualandi GL, Burrows R, Goodridge D, Brown F, Cartwright B (1968). "A foot and mouth disease syndrome in pigs caused by an enterovirus". *Nature* 219(5160): 1275-6.

- Neill JD, Meyer RF, Seal BS(1995). "Genetic relatedness of the caliciviruses: San Miguel sea lion and vesicular exanthema of swine viruses constitute a single genotype within the Caliciviridae". *J Virol.*; 69(7): 4484-8.
- Niedbalski W, Keszy A, Paprocka G, Fitzner A (1995). "Detection of SVDV RNA amplified by the polymerase chain reaction (PCR)". *Bulletin- Veterinary Institute in Pulawy*; 39: 85-90.
- Niedbalski W (2009). "Application of real-time reverse transcription polymerase chain reaction for the detection of SVDV". *Pol J Vet Sci.*; 12(1): 119-21.
- Nijharl, SK (1997). "Antigenic characterisation of swine vesicular disease virus". [PhD thesis], University of Hertfordshire, 191 pp.
- Nijhar SK, Mackay DK, Brocchi E, Ferris NP, Kitching RP, Knowles NJ (1999). "Identification of neutralizing epitopes on a European strain of swine vesicular disease virus". *J Gen Virol.*; 80: 277-282.
- Núñez JI, Blanco E, Hernández T, Gómez-Tejedor C, Martín MJ, Dopazo J, Sobrino F (1998) "A RT-PCR assay for the differential diagnosis of vesicular viral diseases of swine". *J Virol Methods*; 72 (2): 227-235.
- Nylander JA, Ronquist F, Huelsenbeck JP, Nieves-Aldrey JL (2004). "Bayesian phylogenetic analysis of combined data". *Syst. Biol*; 53: 47–67.
- OIE(2008). Chapter 2.8.9. "Swine vesicular disease". In: *Manual of Diagnostic Tests & Vaccines for Terrestrial Animals*. World Organisation for Animal Health, Paris, pp. 1139-1145.
- OIE(2008). Chapter 2.8.10. "Teschovirus encephalomyelitis (previously enterovirus encephalomyelitis or Teschen/Talfan disease)". In: *Manual of Diagnostic Tests & Vaccines for Terrestrial Animals*. World Organisation for Animal Health, Paris, pp. 1146-1152.
- OIE(2008). Chapter 2.8.11. "Transmissible gastroenteritis". In: *Manual of Diagnostic Tests & Vaccines for Terrestrial Animals*. World Organisation for Animal Health, Paris, pp. 1153-1163.
- OIE(2010). Chapter 2.8.7. "Porcine Reproductive Respiratory Syndrome". In: *Manual of Diagnostic Tests & Vaccines for Terrestrial Animals*. World Organisation for Animal Health, Paris, pp. 1-13.
- OIE(2012). Chapter 2.1.5. "Foot and mouth disease". In: *Manual of Diagnostic Tests & Vaccines for Terrestrial Animals*. World Organisation for Animal Health, Paris, pp. 1-29.

- Okamoto H (2007). "Genetic variability and evolution of hepatitis E virus". *Virus Res.*; 127(2): 216-28.
- Oraveerakul K, Choi CS, Molitor TW (1992). "Restriction of porcine parvovirus replication in nonpermissive cells". *J Virol.*; 66(2): 715-22.
- Palmquist JM, Munir S, Taku A, Kapur V, Goyal SM (2002). "Detection of porcine teschovirus and enterovirus type II by reverse transcription-polymerase chain reaction". *J Vet Diagn Invest.*; 14(6): 476-80.
- Pasma T, Davidson S, Shaw SL (2008). "Idiopathic vesicular disease in swine in Manitoba". *Can Vet J.*; 49(1): 84-5.
- Park EJ, Kim KH, Abell GC, Kim MS, Roh SW, Bae JW (2011). "Metagenomic analysis of the viral communities in fermented foods". *Appl Environ Microbiol.*; 77: 1284-1291.
- Phan TG, Kapusinszky B, Wang C, Rose RK, Lipton HL, Delwart EL (2011). "The fecal viral flora of wild rodents". *PLoS Pathog.*; 7(9): e1002218.
- Pignatelli J, Jimenez M, Luque J, Rejas MT, Lavazza A, Rodriguez D (2009). "Molecular characterization of a new PToV strain. Evolutionary implications". *Virus Res.*; 143(1): 33-43.
- Pina S, Buti M, Cotrina M, Piella J, Girones R. (2000). "HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain". *J Hepatol*, 33: 826-833.
- Pogranichniy RM, Janke BH, Gillespie TG, Yoon KJ (2003). "A prolonged outbreak of poliomyelitis due to infection with a group I porcine enterovirus". *J Vet Diagn Invest.*; 15(2): 191-4.
- Posada D (2006). "ModelTest Server: a web-based tool for the statistical selection of models of nucleotide substitution online". *Nucleic Acids Res.*; 34(Web Server issue): W700-3.
- Posada D (2008). "jModelTest: phylogenetic model averaging". *Mol Biol Evol.*; 25(7): 1253-6.
- Postel A, Schmeiser S, Perera CL, Rodríguez LJ, Frias-Lepoureau MT, Becher P (2012). "Classical swine fever virus isolates from Cuba form a new subgenotype 1.4". *Vet Microbiol.*; 2012 Aug 3. [Epub ahead of print].
- Prodelalova J (2012). "The survey of porcine teschoviruses, sapeloviruses and enteroviruses B infecting domestic pigs and wild boars in the Czech Republic between 2005 and 2011". *Infect Genet Evol.*; 12: 1447-1451.
- Puig M, Jofre J, Lucena F, Allard A, Wadell G, Girones R (1994). "Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested-PCR amplification". *Appl. Environ. Microbiol.*; 60: 2963–2970.
- Rasmussen PG (1969). "Porcine adenoviruses. Isolation and cytopathogenic examination of four serological types". *Acta Vet Scand.*; 10(1):10-7.

- Rasmussen TB, Uttenthal A, Agüero M (2006). "Detection of three porcine vesicular viruses using multiplex real-time primer-probe energy transfer". *J Virol Methods*; 134(1-2): 176-82.
- Reddy PS, Idamakanti N, Hyun BH, Tikoo SK, Babiuk LA (1999). "Development of porcine adenovirus-3 as an expression vector". *J Gen Virol.*; 80 (Pt 3): 563-70.
- Reed LJ and Muench H (1938). "A Simple Method of Estimating Fifty Percent Endpoints". *American Journal of Hygiene*; 27: 493-497.
- Reid SM, Ferris NP, Hutchings GH, King DP, Alexandersen S (2004a). "Evaluation of real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays for the detection of swine vesicular disease virus". *J Virol Methods*; 116 (2): 169-176.
- Reid SM, Paton DJ, Wilsden G, Hutchings GH, King DP, Ferris NP, Alexandersen S (2004b). "Use of automated real-time RT-PCR to monitor experimental swine vesicular disease virus infection in pigs". *J Comp Pathol.*; 131: 308–317.
- Reuter G, Boldizsár Á, Pankovics P (2009). "Complete nucleotide and amino acid sequences and genetic organization of porcine kobuvirus, a member of a new species in genus Kobuvirus, family Picornaviridae". *Arch Virol.*; 154: 101–8.
- Reuter G, Kecskémeti S, Pankovics P (2010). "Evolution of porcine kobuvirus infection, Hungary". *Emerg Infect Dis.*; 16(4): 696-8.
- Reuter G, Boros A, Pankovics P (2011). "Kobuviruses - a comprehensive review". *Rev Med Virol.*; 21(1): 32-41.
- Reyes GR and Kim JP(1991). "Sequence-independent, single-primer amplification (SISPA) of complex DNA populations". *Mol Cell Probes*; 5(6): 473-81.
- Roelvink PW, Lizonova A, Lee JG, Li Y, Bergelson JM, Finberg RW, Brough DE, Kovesdi I, Wickham TJ (1998). "The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F". *J Virol.*; 72: 7909–7915.
- Romanenko VF, Pruss OG, Belyi YUA, Kupnovskaya LV (1982). "Immunofluorescent diagnosis of porcine encephalomyelitis". *Veterinariia*; 4: 69–72.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012). "MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space". *Syst Biol.*; 61(3): 539-42.
- Rosario K and Breitbart M (2011). "Exploring the viral world through metagenomics". *Curr Opin Virol.*; 1(4): 289-97.

- Rueckert RR (1996). "*Picornaviridae*: the viruses and their replication". In: Fields B N, Knipe D M, Howley P M, Chanock R M, Melnick J L, Monath T P, Roizman B, Straus S E, editors. *Virology*. 3rd ed. Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven; 1996. pp. 609–654.
- Salas M, De Vega M, Lázaro JM, Blanco L (2004). "ø29 DNA polymerase, a potent amplification enzyme". In *DNA amplification. Current technologies and applications*. Demidov, V.V. a. B., N.E. (ed.), pp. 21-34. Horizon Bioscience, UK.
- Salles MW, Scholes SF, Dauber M, Strebelow G, Wojnarowicz C, Hassard L, Acton AC, Bollinger TK (2011). "Porcine teschovirus polioencephalomyelitis in western Canada". *J Vet Diagn Invest.*; 23(2): 367-73.
- Sanford SE, Hoover DM (1983). "Enteric adenovirus infection in pigs". *Can J Comp Med.*; 47(4): 396-400.
- Santos F, Yarza P, Parro V, Briones C, Anton J (2010). "The metavirome of a hypersaline environment". *Environ Microbiol.*; 12: 2965-2976.
- SAS Institute, Inc (2000). "*SAS/STAT Software: User's Guide*". Cary, NC: SAS Institute, Inc.
- Sauvage V, Ar Gouilh M, Cheval J, Muth E, Pariente K, Burguiere A, Caro V, Manuguerra JC, Eloit M. (2012). "A member of a new *Picornaviridae* genus is shed in pig feces". *J Virol.*; 86(18): 10036-46.
- Scheuer F (1937). "Alterations inflammatoires du systeme nerveux central dans la paralysie infectieuse du porc". *Bull Inst Pasteur*; 35, 629.
- Seechurn P, Knowles NJ, McCauley JW (1990). "The complete nucleotide sequence of a pathogenic swine vesicular disease virus". *Virus Res.*; 16(3): 255-74.
- Segalés J, Fernández-Salguero JM, Fructuoso G, Quintana J, Rosell C, Pozo J, De Arriba ML, Rubio P, Domingo M (2001). "Granulomatous enteritis and lymphadenitis in Iberian pigs naturally infected with *Lawsonia intracellularis*". *Vet Pathol.*; 38(3):343-6.
- Sereika V, Lelesius R, Zienius D (2007). "Seroprevalence of Antibodies against Porcine Teschovirus 1 in Lithuania". *Acta Vet. Brno.*; 76: 231–236.
- Shaddock JA, Koestner A, Kasza L (1967). "The lesions of porcine adenoviral infection in germfree and pathogen-free pigs". *Pathol Vet.*; 4: 537-552.
- Shan T, Li L, Simmonds P, Wang C, Moeser A, Delwart E (2011). "The fecal virome of pigs on a high-density farm". *J Virol.*; 85(22): 11697-708.
- Shen Q, Zhang W, Yang S, Cui L, Hua X (2012). "Complete genome sequence of a new-genotype porcine norovirus isolated from piglets with diarrhea". *J Virol.*; 86(12): 7015-6.

- Smits SL, Poon LL, van Leeuwen M, Lau PN, Perera HK, Peiris JS, Simon JH, Osterhaus AD (2011). "Genogroup I and II picobirnaviruses in respiratory tracts of pigs". *Emerg Infect Dis.*; 17(12): 2328-30.
- Song D and Park B (2012). "Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines". *Virus Genes*; 44(2):167-75.
- Sozzi E, Barbieri I, Lavazza A, Lelli D, Moreno A, Canelli E, Bugnetti M, Cordioli P (2010). "Molecular characterization and phylogenetic analysis of VP1 of porcine enteric picornaviruses isolates in Italy". *Transbound. Emerg. Dis.*; 57: 434-442.
- Stadejek T, Stankevicius A, Storgaard T, Oleksiewicz MB, Belák S, Drew TW, Pejsak Z (2002). "Identification of radically different variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Eastern Europe: towards a common ancestor for European and American viruses". *J Gen Virol.*; 83(Pt 8): 1861-73.
- Sun SQ, Liu XT, Guo HC, Yin SH, Shang YJ, Feng X, Liu ZX, Xie QG (2007). "Protective immune responses in guinea pigs and swine induced by a suicidal DNA vaccine of the capsid gene of swine vesicular disease virus". *J Gen Virol.*; 88(Pt 3): 842-8.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011). "MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods". *Mol Biol Evol.*; 28(10): 2731-9.
- Takahashi M, Seimiya YM, Seki Y, Yamada M (2008). "A piglet with concurrent polioencephalomyelitis due to porcine teschovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome". *Journal of Veterinary Medical Science*; 70: 497-500.
- Terpstra, C (1992). "Vesicular swine disease in The Netherlands". *Tijdschr Diergeneeskd*; 117(21): 623-6.
- Teixeira TF, Dezen D, Cibulski SP, Varela AP, Holz CL, Franco AC, Roehe PM (2011). "Torque teno sus virus (TTSuV) in cell cultures and trypsin". *PLoS One.* 2; 6(3): e17501.
- Toussaint JF, Sailleau C, Breard E, Zientara S, De Clercq K (2007). "Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments". *J Virol Methods.*; 140(1-2): 115-23.
- Thacker EE, Timares L, Matthews QL (2009). "Strategies to overcome host immunity to adenovirus vectors in vaccine development". *Expert Rev Vaccines*; 8(6): 761-77. Review.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997). "The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools". *Nucleic Acids Research*; 25: 4876-488.

- Thurber RV, Haynes M, Breitbart M, Wegley L, Rohwer F (2009). "Laboratory procedures to generate viral metagenomes". *Nat Protoc.*; 4(4): 470-83.
- Traub E (1942). "Active immunization against Teschen disease using vaccines adsorbed on aluminium hydroxide". *Arch. Tierheilkd*; 77: 52–66.
- Trefny L (1930). "Massive illness of swine in Teschen area". *Zveroleki Obzori*; 23: 235-236.
- Tsai YC, Jeng CR, Hsiao SH, Chang HW, Liu JJ, Chang CC, Lin CM, Chia MY, Pang VF (2010). "Porcine circovirus type 2 (PCV2) induces cell proliferation, fusion, and chemokine expression in swine monocytic cells in vitro". *Vet Res.*; 41: 60-71.
- Tseng CH and Tsai HJ (2007). "Sequence analysis of a duck picornavirus isolate indicates that it together with porcine enterovirus type 8 and simian picornavirus type 2 should be assigned to a new picornavirus genus". *Virus Res.*; 129: 104-114.
- Tsuda T, Tokui T, Onodera T (1987). "Induction of neutralizing antibodies by structural proteins VP1 and VP2 of swine vesicular disease virus". *Nihon Juigaku Zasshi*; 49(1): 129-32.
- Tuboly T, Nagy E, Derbyshire JB (1993). "Potential viral vectors for the stimulation of mucosal antibody responses against enteric viral antigens in pigs". *Res Vet Sci.*; 54(3): 345-50.
- Turner C and Williams SM (1999). "Laboratory-scale inactivation of African swine fever virus and swine vesicular disease virus in pig slurry". *J Appl Microbiol.*; 87(1):148-57.
- Usherwood EJ and Nash AA (1995). "Lymphocyte recognition of picornaviruses". *J Gen Virol.*; 76 (Pt 3): 499-508.
- Vega Thurber RL, Barott KL, Hall D, Liu H, Rodriguez-Mueller B, Desnues C, Edwards RA, Haynes M, Angly FE, Wegley L, Rohwer FL (2008). "Metagenomic analysis indicates that stressors induce production of herpes-like viruses in the coral *Porites compressa*". *Proc Nat Acad Sci USA*; 105: 18413-18418.
- Verdaguer N, Jimenez-Clavero MA, Fita I, Ley V. (2003). "Structure of swine vesicular disease virus: mapping of changes occurring during adaptation of human coxsackie B5 virus to infect swine". *J Virol.*; 77: 9780–9789.
- Viancelli A, Garcia LA, Kunz A, Steinmetz R, Esteves PA, Barardi CR (2012). "Detection of circoviruses and porcine adenoviruses in water samples collected from swine manure treatment systems". *Res Vet Sci.*; 93(1): 538-43.
- Vico JP, Rol I, Garrido V, San Román B, Grilló MJ, Mainar-Jaime RC (2011). "Salmonellosis in finishing pigs in Spain: prevalence, antimicrobial agent susceptibilities, and risk factor analysis". *J Food Prot.*; 74(7): 1070-8.

- Victoria JG, Kapoor A, Dupuis K, Schnurr DP, Delwart EL (2008). "Rapid identification of known and new RNA viruses from animal tissues". *PLoS Pathog.*; 4:e1000163.
- Villena C, El-Senousy WM, Abad FX, Pinto RM, Bosch A (2003). "Group A rotavirus in sewage samples from Barcelona and Cairo: emergence of unusual genotypes". *Appl Environ Microbiol.*; 69: 3919-3923.
- Wang B, Tian ZJ, Gong DQ, Li DY, Wang Y, Chen JZ, An TQ, Peng JM, Tong GZ (2010). "Isolation of serotype 2 porcine teschovirus in China: evidence of natural recombination". *Vet Microbiol.*; 146: 138-143.
- Wang B, Wang Y, Tian ZJ, An TQ, Peng JM, Tong GZ (2011). "Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for detection of Porcine teschovirus". *J Vet Diagn Invest.*; 23(3): 516-8.
- Wang Y, Tian ZJ, Wang B, Gong DQ, Peng JM, An TQ, Ni HB, Fu SX (2011). "Isolation and identification of porcine teschovirus and preliminary serological survey". D.O.I: CNKI:SUN:HLJX.0.2011-03-006.
- Watson WA (1981). "Swine vesicular disease in Great Britain". *Can Vet J*; 22(6): 195-200.
- Wilder FW, Dardiri AH, Gay JG, Beasley HC, Heflin AA, Acree JA (1974). "Susceptibility of one-toed pigs to certain diseases exotic to the United States". *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc.*; (78): 195-9.
- Wolf S, Hewitt J, Greening GE (2010). "Viral multiplex quantitative PCR assays for tracking sources of fecal contamination". *Appl Environ Microbiol.*; 76(5): 1388-94.
- Worobey M and Holmes EC (1999). "Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses". *J Gen Virol.*; 80 (Pt 10): 2535-43.
- Wyn-Jones AP, Sellwood J (2001). "Enteric viruses in the aquatic environment". *J Appl Microbiol.*; 91(6): 945-62. Review.
- Yamada M, Nakamura K, Kaku Y, Yoshii M, Haritani M, Kozakura R, Ikegami R (2004). "Enterovirus encephalomyelitis in pigs in Japan caused by porcine teschovirus". *Veterinary Record.*; 155: 304-306.
- Yamada M, Kaku Y, Nakamura K, Yoshii M, Yamamoto Y, Miyazaki A, Tsunemitsu H, Narita M (2007). "Immunohistochemical detection of porcine teschovirus antigen in the formalin-fixed paraffin-embedded specimens from pigs experimentally infected with porcine teschovirus". *Journal of Veterinary Medicine A*; 54: 571-574.
- Yamada M, Kozakura R, Kaku Y, Nakamura K, Yamamoto Y, Yoshii M, Miyazaki A, Tsunemitsu H, Narita M (2008). "Immunohistochemical distribution of viral antigens in pigs naturally infected with porcine teschovirus". *Journal of Veterinary Medical Science*; 70: 305-308.

- Yamada M, Kozakura R, Nakamura K, Yamamoto Y, Yoshii M, Kaku Y, Miyazaki A, Tsunemitsu H, Narita M (2009). "Pathological changes in pigs experimentally infected with porcine teschovirus". *J Comp Pathol.*; 141(4): 223-8.
- Zamora-Escribano E (1997). "La enfermedad vesicular del cerdo en España: Caracterización viral y desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico". Facultad de Veterinaria de la Universidad de Madrid, 1997. Tesis doctoral.
- Zöll R, Krumbholz A, Henke A, Birch-Hirschfeld E, Stelzner A, Doherty M, Hoey E, Dauber M, Prager D, Wurm R (2000). "Detection of porcine enteroviruses by nRT-PCR: differentiation of CPE groups I-III with specific primer sets". *J Virol Methods.*; 88(2): 205-18.
- Zöll R, Dauber M, Krumbholz A, Henke A, Birch-Hirschfeld E, Stelzner A, Prager D, Wurm R (2001). "Porcine teschoviruses comprise at least eleven distinct serotypes: molecular and evolutionary aspects". *J Virol.*; 75: 1620–1631.
- Zhang CF, Cui SJ, Hu S, Zhang Z, Guo Q, Zell R (2010). "Isolation and characterization of the first Chinese strain of porcine Teschovirus-8". *J Virol Methods*; 167(2): 208-13.
- Zhang C, Wang Z, Hu F, Liu Y, Qiu Z, Zhou S, Cui S, Wang M (2012). "The survey of porcine teschoviruses in field samples in China with a universal rapid probe real-time RT-PCR assay". *Trop Anim Health Prod.*
- Zhang G, Wilsden G, Knowles NJ, McCauley JW (1993). "Complete nucleotide sequence of a coxsackie B5 virus and its relationship to swine vesicular disease virus". *J Gen Virol.*; 74: 845–853.
- Zhang G, Haydon DT, Knowles NJ, McCauley JW (1999). "Molecular evolution of swine vesicular disease virus". *J Gen Virol.*; 80 (Pt 3): 639-51.
- Zhang HY, Chen DS, Wu YQ, He QG, Chen HC, Liu ZF (2011). "Both swine and human cells are capable to support the replication of swine hepatitis E virus type 4 in vitro". *Virus Res.*; 158(1-2): 289-93.
- Zhang W, Yang S, Shen Q, Ren L, Shan T, Wei J, Cui L, Hua X (2012). "Complete genome sequence of a novel porcine enterovirus strain in china". *J Virol.*; 86: 7008-7009.
- Zimmerman JJ, Karriker L, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GR (2012). "Diseases of swine". 10th ed., John Wiley & Sons.

ANEXO I

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
%	Porcentaje
A549	Línea celular de epitelio alveolar humana
aa	Aminoácidos
Ac	Anticuerpo
AcM	Anticuerpo monoclonal
AcN	Anticuerpo neutralizante
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Desoxirribonucleasa
ADNc	ADN complementario
ADNcd	ADN complementario de cadena doble
ADNcs	ADN complementario de cadena sencilla
ADV	Virus de la enfermedad de aujeszky
AIC	<i>Akaike's Information Criteria</i>
AICc	<i>Corrected Akaike's Information Criteria</i>
Aprox.	Aproximadamente
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
AS	Antisuero
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATPasas	Enzima encargada de la defosfoliración del adenosin trifosfato.
BEA	2-bromoetilamina hidrobromuro
BEI	Etilenimina binaria
BHK	Línea celular de riñón de hámster
BHQ	<i>Black hole quencher</i>
BIC	<i>Bayesian Information Criteria</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BrEt	Bromuro de etidio
BSA	Albúmina bovina sérica
BSC1	Línea celular de riñón de mono verde africano
CaCl₂	Cloruro cálcico

CAR	Receptor constitutivo de androstano
CC.AA	Comunidades Autónomas
CFSPH	<i>Center for Food Security and Public Health</i>
CISA	Centro de Investigación en Sanidad Animal
cm²	Centrím metro cuadrado
CO₂	Dióxido de carbono
Ct	Ciclo umbral
CTT	Centro de transferencia tecnológica
CV-B5	Coxsackievirus B5
CV-A16	Coxsackievirus A16
DICT₅₀/ml	Dosis infectiva en cultivo tisular 50 por mililitro
DEP	Diarrea vírica porcina
DMEM	Medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
DNasa	Desoxirribonucleasa
DNASTAR	<i>Sequence Analysis Software</i>
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
dpi	Días post-inoculación
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
DVAT-UJ	<i>Department of Virology and Antiviral Therapy-University of Jena (Germany)</i>
EBD	Estación Biológica de Doñana
ECP	Efecto citopático
EDO	Enfermedad de declaración obligatoria
EDTA	Ácido-etilen-diamino-tetra-acético
EE.UU	Estados Unidos
EGTA	Acido-etilenglicol-bis-(β-aminoetil éter)- N, N, N', tetra-acético.
ELISA	Enzimoimmunoensayo
ELISA-FL	ELISA <i>sándwich</i> de bloqueo en fase líquida
ELISA-SI	ELISA tipo <i>sándwich</i> indirecto
EV	Estomatitis vesicular
EVI	Enfermedad vesicular idiopática
EVP	Enfermedad vesicular porcina
ExVC	Exantema vesicular del cerdo
F	Foco
FA	Fiebre aftosa
FAM	6-carboxifluoresceína

FVL	Facultad Veterinaria de León
g	Gramo
G°	Género
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GALT	Tejidos linfoides asociados al tracto gastrointestinal
GC	Genoma completo
GLM	Modelos lineales generalizados
GTR+G+I	<i>General Time-Reversible + Gamma + Proportion Invariant</i>
h	Hora
HCl	Cloruro de hidrógeno
H₂O₂	Agua oxigenada
HE	Hematoxilina-Eosina
HeLa	Línea celular humana
Hep-1	Línea celular humana
HEV	Virus de la hepatitis E
HIPRA	Laboratorios HIPRA
HPD	<i>Highest Posterior Density</i>
HVP-I	Herpesvirus porcino
Hz	<i>Hertzio</i>
IAHPL	<i>Institute for Animal Health</i>
IBRS-2	Línea celular de riñón de cerdo
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IFV	<i>Institute of Virology, Hannover (Germany)</i>
IHC	Inmunohistoquímica
Ig	Inmunoglobulina
IMIDRA	Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario
INIA	Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria
IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma
IZSLER	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna</i>
JTT+I	<i>Protein Model JTT + proportion invariant</i>
Kb	Kilobases
KCl	Cloruro de potasio
KDa	Kilodalton
Kg	Kilogramos
LCV	Laboratorio Central Veterinaria (Algete)

M	Molar
MA-104	Línea celular de riñón de mono <i>Rhesus</i>
MAC-ELISA	ELISA de competición con AcM
MAGRAMA	Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
MCMC	<i>Markov chain Monte Carlo</i>
mg	Miligramo
MG-RAST	<i>Metagenomics analysis server</i>
MEGA 5.05	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis 5.05</i>
MGB:	<i>Minor Groove Binder</i>
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
N	Normal (equivalentes/litro)
na	No analizado
NaCl	Cloruro sódico
NCB-3	Nivel de contención biológica - 3
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NEAA	Aminoácidos no esenciales
(NH₄)₂SO₄	Sulfato de amonio
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
nt	Nucleótido
NTR	<i>Non translated region</i>
NoV	Norovirus
NVSL	<i>National Veterinary Services Laboratories (USA)</i>
OEV	Enterovirus ovino
OIE	Oficina Mundial de la Sanidad Animal (Oficina Internacional de Epizootias)
OMS	Organización Mundial de la Salud
p	Nivel de significación
P1-3	Poliproteína P1, P2 y P3
p/v	Masa (g)/volumen (ml)
Panaftosa	Centro Pan-Americano de Fiebre Aftosa
PAD-PADV	Adenovirus porcino
PAstV	Astrovirus porcino

PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCV	Circovirus porcino
PEDV	Adenovirus porcino
PEG	Polietilenglicol
PE-SK	Línea celular de riñón equino
PEV	Virus entéricos porcinos
PEV-B	Enterovirus B porcinos
PEV-B1	Enterovirus B porcino serotipo 9
PEV-B2	Enterovirus B porcino serotipo 10
pH	Peso de hidrógeno
PK-15	Línea celular de riñón de cerdo
PKV	Kobuvirus porcino
PMWS	Síndrome multisistémico de desmedro post-destete
PoTV	Torovirus porcino
PPV	Parvovirus porcino
PRRSV	Virus del síndrome respiratorio y reproductor porcino
PSV	Sapelovirus porcino
PTV	Teschovirus porcino
PTV1-12	Teschovirus porcinos genotipos 1-12
RD	Real Decreto
RdRp	ARN Polimerasa - dependiente de ARN
Ref.	Referencia
RNasa	Ribonucleasa
RNC	Región no codificante
ROX	Carboxi-X-rodamina
rpm	Revoluciones por minuto
R	Coeficiente de correlación
RT	Transcripción reversa
RT+	Control de reacción de PCR positivo
RT-	Control de reacción de PCR negativo
RRT-PCR	Transcripción reversa - Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RT-LAMP	Transcripción reversa - Amplificación isotérmica mediada por bucle
RT-PCR	Transcripción reversa - Reacción en cadena de la polimerasa
s	Segundos

SECAL	Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio
SD	Sistema digestivo
SDS	Detergente aniónico dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SFB	Suero fetal bovino
SISPA	<i>Sequence-independent, Single-Primer Amplification</i>
SK6	Línea celular de riñón de cerdo
SL	Sistema linfoide
SMEDI	S-nacidos muertos, M-momificación, ED- muerte embrionaria e I-infertilidad
SNC	Sistema nervioso central
SPaV	Pasivirus porcino
ST	Línea celular de testículo porcino
SR	Reacciones positivas falsas o <i>singleton reactors</i>
SuHV	Herpesvirus porcino
SV	Sapovirus
T^a	Temperatura
TAMRA	Carboxi-tetra-metil-rodamina
TBS	Tampón Tris-Salino
TGEV	Virus de la gastroenteritis transmisible porcina
T_m	Temperatura de fusión
TMB	Tetra-metil-benzidina
tMRCA	<i>Estimated time most recent common ancestor</i>
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
Tris-Cl	Tris Clorhídrico
TTV	Torque teno virus
V	Volumen
VDEP	Virus de la diarrea epidémica porcina
Vero	Línea celular de riñón de mono verde africano
VEP-NV	Virus entéricos porcinos no vesiculares
VEP-NVC	Virus entéricos porcinos no vesiculares citopáticos
VEV	Virus de la estomatitis vesicular
VEVP	Virus de la enfermedad vesicular porcina
VFA	Virus de la fiebre aftosa
VN	Virusneutralización
V.O	Vía oral

VP1-4	Proteínas estructurales
VP1c	Proteína VP1 completa
VP1p	Proteína VP1 parcial
VP2p	Proteína VP2 parcial
VPg	Proteína viral
VPPA	Virus de la peste porcina africana
VPPC	Virus de la peste porcina clásica
WAHID	<i>World Animal Health Information System</i>
U	Unidad internacional
UAB	Universidad Autónoma de Barcelona
x g	Fuerza centrífuga relativa
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrómetro
®	Marca registrada

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de distribución de la EVP en el mundo y localización del último brote declarado en la región de Campania (Italia).	3
Figura 2. Estructura cristalográfica y su cápsida icosaédrica externa del VEVP. La organización de su genoma, de sus poliproteínas (P1, P2 y P3) y de los productos del procesamiento de la poliproteína viral.	5
Figura 3. Estructura de VEVP.	7
Figura 4. Árboles filogenéticos derivados del análisis de la proteína VP1 de aislados del VEVP.	8
Figura 5. Diagrama representativo de los posibles resultados en el diagnóstico serológico (VN).	17
Figura 6. Representación filogenética de géneros que constituyen la familia <i>Picornaviridae</i>	23
Figura 7. Microscopía electrónica de la cepa <i>PTV-1/Haití/2009</i> (PTV-1).	23
Figura 8. Brote de encefalomiелitis por teschovirus en Haití (2011).	25
Figura 9. Análisis inmunohistopatológico del SNC de cerdos con infección por PTV.	27
Figura 10. Inmunohistoquímica de un cerdo infectado con PTV.	27
Figura 11. Microscopía electrónica de la cepa <i>csH /China /2009</i> (PSV).	29
Figura 12. Cápsida icosaédrica externa del G ⁰ <i>Adenovirus</i> , cuerpos de inclusión intranuclear en las vellosidades yeyunales y adenovirus infectando un enterocito en el íleon.	32
Figura 13. Localización de los cebadores y de la sonda según la cepa <i>Talfan</i>	52
Figura 14. Localización de los cebadores y de la sonda según la cepa <i>UKG/27/72</i>	53
Figura 15. Amplificación de los 11 serotipos de referencia de PTV y el único serotipo conocido de PSV.	55
Figura 16. Control positivo de la 1ª reacción (clon) junto con 3 aislados positivos.	57
Figura 17. Diluciones del control positivo utilizado (CV777).	58
Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5% con BrEt de 5 reacciones procedentes de la amplificación del ADNc de doble cadena (1-5).	71
Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con BrEt de 1 µl de las muestra “viroma ADN” y “viroma ARN”.	72
Figura 20. Esquema de flujo de trabajo en metagenómica.	75
Figura 21. Alojamiento en las instalaciones del animalario de alta seguridad biológica NSB-3 del CISA.	76

Figura 22. Imágenes de cultivos celulares (IBRS-2) que presentan efecto citopático.	82
Figura 23. Distribución geográfica de los 3 géneros de virus entéricos porcinos detectados en el estudio.	83
Figura 24. Gráficas representativas de los porcentajes de virus entéricos porcinos conocidos y desconocidos.	84
Figura 25. Comparación de sensibilidad de la RRT-PCR y RT-PCR convencionales descritas por la OIE para la detección del aislado O3b (PTV-2).	87
Figura 26. Curvas estándares obtenidas para los 11 serotipos de referencia de teschovirus.	88
Figura 27. Representación geográfica por comunidades de los genotipos encontrados en el ensayo de caracterización molecular de los aislados del G ^o <i>Teschovirus</i>	90
Figura 28. Representación de los genotipos encontrados en el ensayo de caracterización molecular de los aislados del G ^o <i>Teschovirus</i>	90
Figura 29. Representación geográfica de las CC.AA estudiadas en la caracterización molecular de los aislados del G ^o <i>Teschovirus</i>	91
Figura 30. Relación evolutiva entre los aislados españoles de teschovirus porcino derivadas del análisis filogenético llevado a cabo mediante análisis bayesiano.	95
Figura 31. Relación filogenética inferida usando métodos bayesianos bajo un modelo de reloj molecular relajado (<i>uncorrelated lognormal</i>) usando datos espacio-temporales de la región VP1 completa.	96
Figura 32. Filogenia comparativa de caracterización molecular de teschovirus mediante secuenciación de la región VP1 completa y parcial de 28 aislados italianos.	102
Figura 33. Geles al 3% de agarosa como resultado de la amplificación por RT-PCR descrita por <i>Palmquist y cols</i> (2002) para las 28 y 35 muestras fecales de jabalíes recogidas en 2007 y 2011, respectivamente.	103
Figura 34. Reconstrucción filogenética usando análisis bayesiano a partir del alineamiento de la proteína VP1 de teschovirus incluyendo 140 secuencias de nucleótidos publicadas en la base de datos <i>Genbank</i> (Jabalíes).	106
Figura 35. Árbol filogenético construido con el método de máxima verosimilitud a partir del alineamiento de la proteína VP4 para el G ^o <i>Sapelovirus</i> (Jabalíes).	107
Figuras 36. Análisis filogenético de la poliproteína P1 de teschovirus.	110
Figura 37. Diagrama representativo de la inoculación y del muestreo en el estudio del aislado CC25 (PTV12).	111
Figura 38. Gráfica detallada de las temperaturas tomadas durante la duración del experimento de inoculación del aislado CC25.	111

Figura 39. Respuesta inmune de base humoral, representada como media del logaritmo inverso del título de anticuerpos neutralizantes, desarrollada por los animales inoculados con el aislado CC25 (PTV12)(línea azul) y del grupo control del experimento (línea roja).	112
Figura 40. Lesiones macroscópicas.	116
Figura 41. Estudio histopatológico del sistema nervioso central (SNC) de los cerdos inoculados con el aislado CC25 (Nº3 Y 4, PTV-12) y del control del experimento (Nº9).	118
Figura 42. Estudio histopatológico del sistema linfoide (SL) de los cerdos inoculados con el aislado CC25 (Nº3 Y 4, PTV-12) y del control del experimento (Nº9).	119
Figura 43. Estudio histopatológico del sistema digestivo (SD) de los cerdos inoculados con el aislado CC25 (Nº3 Y 4, PTV-12) y del control del experimento (Nº9).	120
Figura 44. Inmunohistoquímica de la válvula ileocecal del cerdo Nº4 y del control del experimento (Nº9)..	120
Figura 45. Diagrama representativo del desafío con la cepa <i>Teschen-Tirol</i> y del muestreo en el estudio de protección cruzada del aislado CC25 (PTV12).	122
Figura 46. Gráfica detallada de las temperaturas tomadas durante la duración del experimento de protección cruzada.	122
Figura 47. Representación de la respuesta inmune de base humoral (AcN) desarrollada por los animales inoculados con la cepa <i>Teschen-Tirol</i> (PTV1) frente a la cepa <i>Teschen-Tirol</i> y frente al virus heterólogo CC25 (PTV12).	124
Figura 48. Representación de la respuesta inmune de base humoral (AcN) desarrollada a lo largo de todo el ensayo frente a la cepa <i>Teschen-Tirol</i> (PTV1) y frente a la cepa CC25 (PTV12).	124
Figura 49. Distribución taxonómica por dominios derivada del análisis en <i>MG-RAST</i> de los dos grupos de secuencias de estudio.	125
Figura 50. Distribución taxonómica por familias virales derivada del análisis en <i>MG-RAST</i>	126
Figura 51. Resumen de los resultados de VN frente a VEV2 y PTV2, agrupados según el título de AcN.	131
Figura 52. Análisis en gel SDS-PAGE al 12.5% y posterior tinción con <i>Coomassie</i> de las siguientes preparaciones: PSV (C2: 13CCSW) y PTV (C3: PTV8; C4: PTV9) inactivados y semipurificados.	134
Figura 53. Representación gráfica de la similitud nucleotídica de la poliproteína P1 del genotipo PTV13, WB2C-TV/2011/ HUN (JQ429405), respecto a representantes de todos los genotipos descritos de PTV mediante el programa <i>Simplot</i>	144

Figura 54. Representación gráfica de la similitud nucleotídica del genoma completo de CC25 respecto a representantes de todos los genotipos descritos de PTV mediante el programa <i>Simplot</i>	155
Figura 55. Representación gráfica de los distintos genotipos de PTV detectados en los estudios realizados en España, Italia y Taiwán en aislados fecales.	156
Figura 56. Representación gráfica del estudio comparativo de caracterización de aislados italianos del G ⁰ <i>Teschovirus</i> por amplificación y secuenciación de la proteína VP1 parcial y VP1 completa.	157
Figura 57. Representación gráfica del estudio comparativo de caracterización de aislados españoles del G ⁰ <i>Teschovirus</i> por amplificación de la proteína VP2 parcialmente y VP1 completa.	157
Figura 58. Distribución espacial de los principales genotipos de PTV encontrados en Europa, derivado del estudio filogenético de la proteína VP1 utilizando secuencias publicadas en <i>Genbank</i> y de las obtenidas en esta tesis.	158

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Países europeos y asiáticos y los años correspondientes a los brotes declarados de la EVP.	4
Tabla 2. Principales sitios antigénicos identificados en la cápsida del VEMP.	8
Tabla 3. Relación de las familias y géneros virales que pueden estar presentes en las heces de los cerdos.	22
Tabla 4. Clasificación de las cepas prototipo del G ^o <i>Enterovirus B</i>	30
Tabla 5. Líneas celulares empleadas en cultivos celulares y técnicas serológicas.	40
Tabla 6. Cepas de referencia y aislados víricos usados en la realización de esta tesis.	41
Tabla 7. Cronograma con los pasos llevados a cabo en la producción de anticuerpos mono-específicos policlonales frente a distintos virus del G ^{os} <i>Teschovirus</i> y <i>Sapelovirus</i>	48
Tabla 8. Descripción de los cebadores y la sonda específicos para la amplificación de virus del G ^o <i>Teschovirus</i>	52
Tabla 9. Descripción de los cebadores y la sonda específicos para la amplificación de virus de la enfermedad vesicular porcina.	54
Tabla 10. Cebadores y sonda empleados para la detección del control interno (β -actina) incluidos en la RRT-PCR de VEMP.	55
Tabla 11. Descripción de los cebadores específicos para la amplificación de virus del G ^{os} <i>Teschovirus</i> y <i>Sapelovirus</i>	55
Tabla 12. Cebadores específicos para la amplificación de las regiones 5'NTR y VP1 para el G ^o <i>Enterovirus-B</i>	56
Tabla 13. Descripción de los cebadores descritos para la amplificación de distintos virus de la familia <i>Picornaviridae</i>	56
Tabla 14. Descripción de los cebadores específicos descritos para la amplificación parcial de la región de la hexona de adenovirus porcino.	57
Tabla 15. Descripción de los cebadores específicos para la amplificación de virus de los G ^{os} <i>Teschovirus</i> , <i>Sapelovirus</i> y <i>Enterovirus</i> (EVP).	58
Tabla 16. Descripción de los cebadores específicos para la amplificación de virus de diarrea epidémica porcina (VPED).	58
Tabla 17. Descripción de los cebadores específicamente diseñados para la secuenciación de la proteína VP1 de los aislados españoles de PTV en jabalíes.	59
Tabla 18. Descripción de los cebadores adicionales específicamente diseñados para la secuenciación de la proteína VP1 de los aislados españoles de teschovirus en jabalíes.	60

Tabla 19. Descripción de los cebadores empleados para la secuenciación parcial de la proteína VP2 de los aislados españoles de teschovirus porcino.	60
Tabla 20. Descripción de los cebadores diseñados para la secuenciación de la región que codifica para la proteína VP4 completa de los aislados españoles de sapelovirus.	61
Tabla 21. Descripción de los cebadores específicamente diseñados para la secuenciación del genoma completo del aislado del PTV (CC25).	62
Tabla 22. Resumen del almacenamiento y concentraciones del tampón requerido en el tratamiento con nucleasas.	67
Tabla 23. Resumen de la reconstitución, almacenamiento y concentraciones de las nucleasas requeridas.	68
Tabla 24. Cebadores para SISPA.	70
Tabla 25. Técnicas moleculares empleadas en el proceso de control viral de las muestras en metagenómica.	72
Tabla 26. Características de los animales utilizados en las inoculaciones experimentales...	76
Tabla 27. Resumen de la especificidad de las distintas RT-PCR y PCR empleadas en el estudio.	82
Tabla 28. Ensayos de especificidad analítica de la RRT-PCR del G ⁰ <i>Teschovirus</i>	85
Tabla 29. Ensayos de sensibilidad analítica de la RRT-PCR del G ⁰ <i>Teschovirus</i>	86
Tabla 30. Resultados obtenidos por la aplicación de las RT-PCR desarrolladas para la caracterización molecular de los aislados pertenecientes al G ⁰ <i>Teschovirus</i>	91
Tabla 31. Aislados españoles de PTV: distribución geográfica, caracterización serotípica, tamaño de la región que codifica para la proteína VP1 y comparación de su homología.	92
Tabla 32. Resultados del estudio comparativo de caracterización molecular de teschovirus mediante secuenciación de la región VP1 y VP2 parcial de 10 aislados españoles.	97
Tabla 33. Resultados del estudio comparativo de caracterización molecular de teschovirus mediante secuenciación de la región VP1 y VP2 parcial de 58 aislados españoles.	98
Tabla 34. Resultados del estudio comparativo de caracterización molecular de teschovirus mediante secuenciación de la región VP1 completa y parcial de 28 aislados italianos.	101
Tabla 35. Resultados obtenidos en el estudio de teschovirus y sapelovirus en jabalíes salvajes.	104
Tabla 36. Análisis comparativo de homología del genoma del aislado CC25 (PTV12).	109
Tabla 37. Resultados de la VN de los antisueros de referencia y de campo específicos para PTV, PSV y PEV-B frente al aislado CC25 (PTV12) y su cepa homóloga.	113

Tabla 38. Resultados de la VN de sueros porcinos procedentes del experimento de inoculación del aislado CC25 (PTV12) frente a cepas víricas de referencia del G ^o <i>Teschovirus</i>	114
Tabla 39. Resumen de los datos obtenidos (Ct) por RRT-PCR frente a PTV en sangre, saliva y heces tras su inoculación con el aislado CC25.	115
Tabla 40. Resumen de los datos obtenidos al analizar por RRT-PCR para detección de genoma de PTV una selección de tejidos de animales sacrificados a distintos días post-inoculación (dpi) del aislado CC25.	121
Tabla 41. Parámetros de las secuencias generadas en los metagenomas de virus de ARN y ADN.	125
Tabla 42. Análisis de los <i>contigs</i> derivados del viroma ARN.	128
Tabla 43. Análisis de similitud derivado del alineamiento de contigs (aa) identificados como rotavirus para las proteínas VP1 y VP2 y de cepas de referencia depositadas en la base de datos <i>Genbank</i>	129
Tabla 44. Resultados de los análisis de VN frente a VEVp y a PTV2.	131
Tabla 45. Resultados y distribución específica por CC.AA de los sueros objeto de estudio frente al virus de la enfermedad vesicular porcina (cepa UKG/27/'72).	132
Tabla 46. Resultados y distribución específica por CC.AA de los sueros objeto de estudio frente al PTV2 (aislado CC77).	132
Tabla 47. Títulos de anticuerpos neutralizantes frente a las cepas homólogas de teschovirus 1-7, sapelovirus y enterovirus-B y títulos de anticuerpos neutralizantes de los antisueros producidos para esta tesis.	135
Tabla 48. Seroneutralización del aislado UKG/27/'72 por los sueros porcinos procedentes de las inoculaciones experimentales de los aislados CC25 (PTV12) y <i>Tirol-Teschen</i> (PTV1).	136
Tabla 49. Resultado de las pruebas de seroneutralización frente a distintas cepas y aislados de PTV, PSV y PEV-B (referencia y campo) empleando los sueros de referencia experimentales porcinos.	137
Tabla 50. Resultados del ELISA de sándwich de bloqueo en fase líquida para la detección de anticuerpos específicos de la enfermedad vesicular porcina (ELISA-FL).	138
Tabla 51. Detección del genoma de diferentes virus entéricos en las heces de los animales inoculados con VEVp (aislado POR04), por RRT-PCR, RT-PCR y PCR.	139
Tabla 52. Tabla descriptiva del ECP desarrollado a lo largo de los tres pases celulares, por las muestras ensayadas en las distintas placas evaluadas durante el experimento de interferencia en la técnica de aislamiento vírico.	140

Tabla 53. Detección del genoma viral de PTV y EVP por RT-PCR en tiempo real durante el experimento de interferencia en la técnica de aislamiento vírico.	141
Tabla 54. Relación ECP con el virus causante del ECP durante el experimento de interferencia en la técnica de aislamiento vírico.	141
Tabla 55. Análisis comparativo de la tasa de sustitución nucleotídica de diferentes picornavirus respecto al gen VP1.	159

Anexo I: Tabla descriptiva G^o Teschovirus

CEPA DE TESCHOVIRUS	GENOTIPO	LOCALIDAD	FECHA	PAIS	AÑO	IDENTIFICADOR	IDENTIFICADOR GENBANK	IDENTIFICADOR FASTA
1008/88_PTV11_AY392550.1	PTV11	Bad Langensalza	1988	Alemania	1988	1008/88	AY392550.1	1008_88
1042/97_PTV1_AY392555.1	PTV1	Oldenburg	1997	Alemania	1997	1042/97	AY392555.1	1042_97
12/15Ge_PTV10_AY392547.1.REF	PTV10	Bad Langensalza	1980	Alemania	1980	12/15Ge	AY392547.1.REF	12_15Ge
149/79_PTV4_GQ293231.1	PTV4	Pirbright	Nov-1979	Inglaterra	1979	149/79	GQ293231.1	149_79
1520/93_PTV1_AY392532.1	PTV1	Neumünster	1993	Alemania	1993	1520/93	AY392532.1	1520_93
1626/89_PTV1_AF296103.1	PTV1	Amsberg	1989	Alemania	1989	1626/89	AF296103.1	1626_89
163/79_PTV4_GQ293232.1	PTV4	West Yorkshire	Nov-1979	Inglaterra	1979	163/79	GQ293232.1	163_79
1696/91_PTV11_AF296121.1	PTV11	Neumünster	1991	Alemania	1991	1696/91	AF296121.1	1696_91
1806/89_PTV5_AF296114.1	PTV5	Amsberg	1989	Alemania	1989	1806/89	AF296114.1	1806_89
183/93_PTV2_AY392533.1	PTV2	Neumünster	1993	Alemania	1993	183/93	AY392533.1	183_93
1925/02_PTV3_GQ293230.1	PTV3	Amsberg	2002	Alemania	2002	1925/02	GQ293230.1	1925_02
2018/87_PTV2_GQ293229.1	PTV2	Amsberg	1987	Alemania	1987	2018/87	GQ293229.1	2018_87
2236/99_PTV1_AF296102.1	PTV1	Amsberg	1999	Alemania	1999	2236/99	AF296102.1	2236_99
2374/01_PTV11_GQ293238.1	PTV11	Amsberg	2001	Alemania	2001	2374/01	GQ293238.1	2374_01
2481/02_PTV1_GQ293228.1	PTV1	Amsberg	2002	Alemania	2002	2481/02	GQ293228.1	2481_02
2498/96_PTV1_AY392551.1	PTV1	Oldenburg	1996	Alemania	1996	2498/96	AY392551.1	2498_96
2500/99_PTV4_AF296113.1	PTV4	Amsberg	1999	Alemania	1999	2500/99	AF296113.1	2500_99
289/89_PTV6_AF296116.1	PTV6	Oldenburg	Feb-1997	Alemania	1997	289/89	AF296116.1	289_89
289/84_PTV9_AF296094.1.REF	PTV9	Amsberg	1984	Alemania	1984	289/84	AF296094.1.REF	2899_84
3634/85_PTV6_AF296115.1	PTV6	Amsberg	1985	Alemania	1985	3634/85	AF296115.1	3634_85
3764/86_PTV4_AF296112.1	PTV4	Amsberg	1986	Alemania	1986	3764/86	AF296112.1	3764_86
461/88_PTV10_AF296119.1	PTV10	Amsberg	1988	Alemania	1988	461/88	AF296119.1	461_88
480/87_PTV2_AF296109.1	PTV2	Amsberg	1987	Alemania	1987	480/87	AF296109.1	480_87
49/99_PTV2_AF296110.1	PTV2	Oldenburg	1999	Alemania	1999	49/99	AF296110.1	49_99
53/81_PTV11_AF296120.1	PTV11	Cheshire	Jun-1981	Inglaterra	1981	53/81	AF296120.1	53_81
549/98_PTV1_AF296101.1	PTV1	Oldenburg	1998	Alemania	1998	549/98	AF296101.1	549_98
562/91_PTV1_AF296100.1	PTV1	Neumünster	1991	Alemania	1991	562/91	AF296100.1	562_91
61/96_PTV1_AY392535.1	PTV1	Dresden	1996	Alemania	1996	61/96	AY392535.1	61_96
65/97_PTV1_AY392552.1	PTV1	Oldenburg	1997	Alemania	1997	65/97	AY392552.1	65_97
655/97_PTV1_AY392553.1	PTV1	Oldenburg	1997	Alemania	1997	655/97	AY392553.1	655_97
6711-12/83_PTV2_AF296107.1	PTV2	Amsberg	1983	Alemania	1983	6711-12/83	AF296107.1	6711_12_83
6793/83_PTV2_AF296108.1	PTV2	Amsberg	1983	Alemania	1983	6793/83	AF296108.1	6793_83
736/97_PTV1_AY392554.17	PTV1	Oldenburg	1997	Alemania	1997	736/97	AY392554.17	736_97
756/93_PTV2_AY392534.1	PTV2	Neumünster	1993	Alemania	1993	756/93	AY392534.1	756_93
918-19/85_PTV4_AF296111.1	PTV4	Amsberg	1985	Alemania	1985	918-19/85	AF296111.1	918_19_85
CC01	PTV-2	Granada	30/04/2004	España	2004	CC01	JF723984	CC1
CC02	PTV-2	Granada	30/04/2004	España	2004	CC02	JF723985	CC2
CC03	PTV-2	Zamora	08/03/2005	España	2005	CC03	JF723986	CC3
CC04	PTV-2	Zamora	08/03/2005	España	2005	CC04	JF723987	CC4
CC05	PTV-2	Zamora	08/03/2005	España	2005	CC05	JF723988	CC5
CC06	PTV-6	Granada	29/06/2004	España	2004	CC06	JF723989	CC6
CC09	PTV-6	Granada	29/06/2004	España	2004	CC09	JF723990	CC9

CEPA DE TESCHOVIRUS	GENOTIPO	LOCALIDAD	FECHA	PAIS	AÑO	IDENTIFICADOR	IDENTIFICADOR GENBANK	IDENTIFICADOR FASTA
CC11	PTV-4	Salamanca	11/04/2005	España	2005	CC11	JF723991	CC11
CC12	PTV-4	Salamanca	11/04/2005	España	2005	CC12	JF723992	CC12
CC14	PTV-4	Salamanca	11/04/2005	España	2005	CC14	JF723993	CC14
CC16	PTV-6	Granada	12/04/2005	España	2005	CC16	JF723994	CC16
CC18	PTV-2	Caceres	05/10/2005	España	2005	CC18	JF723995	CC18
CC19	PTV-2	Valladolid	14/01/2005	España	2005	CC19	JF723996	CC19
CC20	PTV-4	Valladolid	14/01/2005	España	2005	CC20	JF723997	CC20
CC21	PTV-2	Valladolid	14/01/2005	España	2005	CC21	JF723998	CC21
CC22	PTV-2	Valladolid	14/01/2005	España	2005	CC22	JF723999	CC22
CC23	PTV-1	Salamanca	28/09/2005	España	2005	CC23	JF724000	CC23
CC25	PTV12	Granada	16/06/2006	España	2006	CC25	JF724001	CC25
CC26	PTV-2	Granada	16/06/2006	España	2006	CC26	JF724002	CC26
CC27	PTV-7	Huelva	12/05/2004	España	2004	CC27	JF724003	CC27
CC28	PTV-2	Cadiz	12/05/2004	España	2004	CC28	JF724004	CC28
CC29	PTV-2	Cadiz	12/05/2004	España	2004	CC29	JF724005	CC29
CC30	PTV-8	Madrid	26/04/2004	España	2004	CC30	JF724006	CC30
CC35	PTV-1	Valladolid	29/09/2004	España	2004	CC35	JF724007	CC35
CC36	PTV-6	Valladolid	29/09/2004	España	2004	CC36	JF724008	CC36
CC37	PTV-2	Valladolid	29/09/2004	España	2004	CC37	JF724009	CC37
CC38	PTV-6	Valladolid	29/09/2004	España	2004	CC38	JF724010	CC38
CC40	PTV-5	Valladolid	08/11/2004	España	2004	CC40	JF724011	CC40
CC41	PTV-5	Valladolid	08/11/2004	España	2004	CC41	JF724012	CC41
CC42	PTV-5	Madrid	07/06/2004	España	2004	CC42	JF724013	CC42
CC43	PTV-2	Madrid	14/07/2004	España	2004	CC43	JF724014	CC43
CC44	PTV-2	Soria	02/02/2005	España	2005	CC44	JF724015	CC44
CC45	PTV-2	Segovia	11/02/2005	España	2005	CC45	JF724016	CC45
CC47	PTV12	Lugo	17/06/2004	España	2004	CC47	JF724017	CC47
CC48	PTV-6	Lugo	17/06/2004	España	2004	CC48	JF724018	CC48
CC49	PTV-2	Lugo	17/06/2004	España	2004	CC49	JF724019	CC49
CC50	PTV-6	Lugo	17/06/2004	España	2004	CC50	JF724020	CC50
CC51	PTV-6	Lugo	17/06/2004	España	2004	CC51	JF724021	CC51
CC59	PTV-2	Granada	04/11/2005	España	2005	CC59	JF724022	CC59
CC60	PTV-2	Granada	04/11/2005	España	2005	CC60	JF724023	CC60
CC63	PTV-4	Salamanca	24/06/2005	España	2005	CC63	JF724024	CC63
CC65	PTV-4	Valladolid	01/07/2005	España	2005	CC65	JF724025	CC65
CC67	PTV-2	Valladolid	01/07/2005	España	2005	CC67	JF724026	CC67
CC68	PTV-6	Salamanca	19/01/2005	España	2005	CC68	JF724027	CC68
CC70	PTV-2	Segovia	2006	España	2006	CC70	JF724028	CC70
CC71	PTV-2	Granada	07/06/2004	España	2004	CC71	JF724029	CC71
CC72	PTV-6	Lugo	17/06/2004	España	2004	CC72	JF724030	CC72
CC73	PTV-6	Salamanca	19/01/2005	España	2005	CC73	JF724031	CC73
CC74	PTV-2	Zamora	08/03/2005	España	2005	CC74	JF724032	CC74
CC75	PTV-2	Zamora	08/03/2005	España	2005	CC75	JF724033	CC75

CEPA DE TESCHOVIRUS	GENOTIPO	LOCALIDAD	FECHA	PAIS	AÑO	IDENTIFICADOR	IDENTIFICADOR GENBANK	IDENTIFICADOR FASTA
CC76	PTV-2	Zamora	10/03/2005	España	2005	CC76	JF724034	CC76
CC77	PTV-2	Valladolid	01/07/2005	España	2005	CC77	JF724035	CC77
CC78	PTV-2	Zamora	10/03/2005	España	2005	CC78	JF724036	CC78
CC79	PTV-6	Lugo	17/06/2004	España	2004	CC79	JF724037	CC79
CC80	PTV-2	Granada	07/06/2004	España	2004	CC80	JF724038	CC80
CC81	PTV-12	Lugo	17/06/2004	España	2004	CC81	JF724039	CC81
CC82	PTV-11	Murcia	29/04/2009	España	2009	CC82	JF724040	CC82
CC83	PTV-7	Murcia	29/04/2009	España	2009	CC83	JF724041	CC83
CC85	PTV-2	Murcia	29/04/2009	España	2009	CC85	JF724042	CC85
CC86	PTV-2	Murcia	29/04/2009	España	2009	CC86	JF724043	CC86
CC87	PTV-2	Granada	07/06/2004	España	2004	CC87	JF724044	CC87
CC88	PTV-2	Murcia	29/04/2009	España	2007	CC88	JF724045	CC88
CC89	PTV-2	Murcia	29/04/2009	España	2009	CC89	JF724046	CC89
CC90	PTV-2	Murcia	29/04/2009	España	2009	CC90	JF724047	CC90
Dresden_PTV11_AF296096.1.REF	PTV11	Dresden	Jul-1963	Alemania	1963	Dresden	AF296096.1.REF	Dresden
F26_PTV5_AF296090.1.REF	PTV5	East Anglia	1958	Inglaterra	1958	F26	AF296090.1.REF	F26
F43_PTV7_AF296092.1	PTV7	East Anglia	1958	Alemania	1958	F43	AF296092.1	F43
F65_PTV1_AJ011380.1	PTV1	East Anglia	1958	Inglaterra	1958	F65	AJ011380.1	F65
JF613_PTV2_GU44660	PTV2	Heilongjiang	Jul-2009	China	2009	JF613	GU44660	JF613
Jilin/2003_PTV8_GQ293092.2	PTV8	Jilin (Provincia Heilongjiang)	2003	China	2003	Jilin/2003	GQ293092.2	Jilin2003
O2b_PTV3_AF296088.1.REF	PTV3	Ohio	1964	EE.UU	1964	O2b	AF296088.1.REF	O2b
O3B_PTV2_REF	PTV2	Ohio	1964	EE.UU	1964	O3B	No publicada.REF	O3B
PS34_PTV1_AF296105.1.REF	PTV1	Pennsylvania	1965	EE.UU	publicado 1965	PS34	AF296105.1.REF	PS34
PS36_PTV4_AF296089.1.REF	PTV4	Pennsylvania	1965	EE.UU	publicado 1965	PS36	AF296089.1.REF	PS36
PS37_PTV6_AF296091.1.REF	PTV6	Pennsylvania	1967	EE.UU	publicado 1967	PS37	AF296091.1.REF	PS37
S776/83_PTV10_AY392548.1	PTV10	Bad Langensalza	1983	Alemania	1983	S776/83	AY392548.1	S776_83
T80_PTV2_AF296087.1	PTV2	East Anglia	1958	Inglaterra	1958	T80	AF296087.1	T80
Talfan_PTV1_AB038528.1	PTV1	Aberystwyth	Jun-1956	Gales	publicado 1957	Talfan	AB038528.1	Talfan
TeschenBozen654_PTV1_AF231767	PTV1	Bozen	1961	Italia	publicado 1961	TeschenBozen654	AF231767	TeschenBozen654
TeschenKonratice_PTV1_AF23176	PTV1	Konratice	1959	República Checa	publicado 1959	TeschenKonratice	AF23176	TeschenKonratice
Teschen-Tirol_PTV1_AF296097.1	PTV1	Tirol	1961	Austria	publicado 1961	Teschen-Tirol	AF296097.1	TeschenTirol
UKG/170/80_PTV10_AY392539.1	PTV10	Humberside	Oct-1980	Inglaterra	1980	UKG/170/80	AY392539.1	UKG170_80
UKG173/74_PTV8_AF296093.1.REF	PTV8	Essex	Abril-1974	Inglaterra	1974	UKG173/74	AF296093.1.REF	UKG173_74
VS7/92_PTV10_AY392549.1	PTV10	Bad Langensalza	1992	Alemania	1992	VS7/92	AY392549.1	VS7_92
WR-2_PTV7_GQ293237.1.REF	PTV7	Washington, D.C.	1957	EE.UU	1957	WR-2	GQ293237.1.REF	WR2
Fuyu_2009	PTV8	Fuyu (Provincia	Sept-2009	China	2009	Fuyu/2009	HQ020378	Fuyu_2009
Vir3189_91	PTV1	Arnsberg	1991	Alemania	1991	Vir3189/91	HQ020379	Vir3189_91
Vir1063_01	PTV2	Arnsberg	2001	Alemania	2001	Vir1063/01	HQ020380	Vir1063_01
Sek2160_97	PTV5	Oldenburg	1997	Alemania	1997	Sek2160/97	HQ020381	Sek2160_97

ANEXO II

PUBLICACIONES

J Vet Diagn Invest 22:763–766 (2010)

A survey of porcine picornaviruses and adenoviruses in fecal samples in Spain

Dolores Buitrago, Cristina Cano-Gómez, Montserrat Agüero, Paloma Fernandez-Pacheco, Concepción Gómez-Tejedor, Miguel Ángel Jiménez-Clavero¹

Abstract. In the course of an epidemiologic surveillance program for swine diseases carried out in Spain, 206 cytopathic viruses were isolated from 600 porcine fecal samples between 2004 and 2005. The virus isolates were examined using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) methods specific for different types of porcine picornaviruses, including members of the *Teschovirus*, *Enterovirus*, and *Sapelovirus* genera, and PCR for porcine adenoviruses. Of the 206 isolates, 97 (47%) were identified as teschoviruses, 18 (9%) as sapeloviruses, and 7 (3%) as porcine adenoviruses. Neither *Porcine enterovirus B* nor Swine vesicular disease virus was found among the isolates. The present study confirms that teschoviruses are highly prevalent in porcine fecal samples, at least in Spain. It also reveals that these viruses commonly circulate among apparently healthy pigs.

Key words: *Enterovirus*; fecal samples; porcine enteric viruses; reverse transcription–polymerase chain reaction; *Sapelovirus*; *Teschovirus*.

Enteric viruses are pathogens infecting the gastrointestinal tract of vertebrates. They replicate in the gastrointestinal epithelia, are shed in feces in large amounts, and often persist in the environment for long periods, making the fecal–oral route (through fecally contaminated food, water, or fomites) their main route of transmission. The presence of enteric viruses in water and environmental samples is considered a good correlate of fecal contamination.^{3,6}

In swine, important enteric viruses belong to the *Picornaviridae* family, particularly the *Enterovirus*, *Teschovirus*, and *Sapelovirus* (formerly Porcine enterovirus A or Porcine enterovirus serotype 8)¹² genera. Porcine adenoviruses (family *Adenoviridae*) have also been frequently found in pig fecal and environmental samples.⁸ Among the *Picornaviridae* family, Swine vesicular disease virus (SVDV), a subtype of *Human enterovirus B* and belonging to the coxsackievirus B group, causes a disease of high relevance for trade and is included in the World Organization for Animal Health (OIE) list of notifiable animal

diseases.¹³ In Spain, a specific program for surveillance of swine diseases is being implemented. This surveillance program, which includes SVDV, involves feces collection at farms where serologic data raise suspicion of the disease, according to the Manual for Diagnosis of SVD in force in the European Union.¹ In 2004 and 2005, a total of 600 porcine fecal samples were examined under this surveillance program. The samples were collected from asymptomatic, healthy pigs from 10 autonomous communities within Spain, representing 79% of Spanish territory and 68% of Spain's total porcine census in 2005.

All specimens were subjected to virus isolation by inoculation of fecal homogenates in pig kidney cell lines (IB-RS₂^a or PK-15^b) following standard methods for SVDV diagnosis. The isolation was considered negative when no cytopathic effect could be observed after 3 blind cell-culture passages. Using this method, 206 cytopathic viral isolates (34% of the samples) were obtained. All of them were negative for SVDV using SVDV-specific real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)^{1,11}; therefore, it was concluded that all cytopathic viruses isolated were different from SVDV. These isolates were generically designated as “nonvesicular porcine enteric viruses” (NV-PEVs). Their identity was thus investigated in order to recognize and characterize the different types of cytopathic enteric viruses, particularly those belonging to

From the Laboratorio Central de Veterinaria, Algete, Spain (Buitrago, Agüero, Gómez-Tejedor); and the Centro de Investigación en Sanidad Animal, Valdeolmos, Spain (Cano-Gómez, Fernandez-Pacheco, Jiménez-Clavero).

¹ Corresponding Author: Miguel Ángel Jiménez-Clavero, Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA)-INIA, Carretera Algete-El Casar s/n, 28130 Valdeolmos, Spain. majimenez@inia.es



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Virological Methods

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

Short communication

Evaluation of a fluorogenic real-time reverse transcription-polymerase chain reaction method for the specific detection of all known serotypes of porcine teschoviruses

Cristina Cano-Gómez^a, Dolores Buitrago^b, Jovita Fernández-Pinero^a, Paloma Fernández-Pacheco^a, Carmen Mansilla^c, Montserrat Agüero^b, Miguel Angel Jiménez-Clavero^{a,*}^a Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA)-INIA, Ctra. Algete-El Casar s/n, 28130 Valdeolmos, Spain^b Laboratorio Central de Veterinaria, Ctra Algete, km 8, 28110 Algete, Spain^c Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP) UPM-INIA, Autopista M40 km 38, 28223 Pozuelo de Alarcón, Spain

A B S T R A C T

Article history:

Received 21 January 2011

Received in revised form 12 May 2011

Accepted 25 May 2011

Available online 1 June 2011

Keywords:

Teschovirus

Picornavirus

Diagnosis

Real-time

RT-PCR

Environment

Performance of a real-time reverse-transcription polymerase chain reaction method for the rapid, simple and reliable detection of porcine teschovirus (PTV) was assessed. The method was based on the use of a set of oligonucleotides consisting of two specific primers and a fluorogenic TaqMan-MGB probe. Reverse transcription and PCR reactions were performed sequentially in one step. As a result the whole procedure was simple and rapid, taking less than 3 h for completion. The method reacted in a dose-dependent manner with prototype strains for the eleven known PTV serotypes (PTV1–11), with higher analytical sensitivity than other gel-based RT-PCR methods described, which were performed in parallel to allow for a comparison. The assay did not cross-react with other related viruses or porcine viruses tested. The diagnostic performance of the method was analyzed using a panel of field samples consisting of pig fecal and pig slurry samples. As a conclusion, this technique is adequate and convenient for porcine teschovirus detection, both for diagnosis as well as in environmental investigations.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

Teschoviruses (*Teschovirus* genus, *Picornaviridae* family) are non-enveloped, round-shaped viruses with a single-stranded positive-sense RNA genome of approximately 7400 nucleotides, which infect specifically swine. There are eleven known porcine teschovirus (PTV) serotypes (PTV-1 to -11). Teschoviruses had been misclassified in the genus *Enterovirus*, until genome analysis revealed that they constitute a different genus within the *Picornaviridae* (Kaku et al., 2001; Zell et al., 2001).

Swine is the only known host for PTVs. Infected swine can develop a variety of clinical conditions, including severe and mild neurological disorders (Teschovirus encephalomyelitis), as well as heart and reproductive failures, although the vast majority of infections are asymptomatic (OIE, 2008). Pathogenic PTV strains often belong to PTV-1 serotype. Teschen (highly pathogenic) and Talfan (moderately pathogenic) PTV-1 strains were isolated during outbreaks of polioencephalomyelitis in 1929 and 1957, respectively (Harding et al., 1957; Trefny, 1930). PTV serotypes other than PTV-1 have also been associated to clinical disease (Auerbach et al., 1994). Teschovirus encephalomyelitis has been considered of socioeconomic importance, as it was categorized in the OIE

(World Organization for Animal Health) diseases list B until it was removed in 2004, as the disease became infrequent. Nevertheless, PTV outbreaks occur occasionally in Europe (Belarus, Latvia, Moldavia, Romania, Russia and Ukraine), Africa (Madagascar and Uganda), Asia (China and Japan), America (EE.UU, Canada and Haiti) and Oceania (Australia) (Bangari et al., 2010; OIE, 2008; Pinto et al., 2010; Salles et al., 2011; Wang et al., 2010; Yamada et al., 2004; Zhang et al., 2010). In some instances, PTV infection may appear concurrently with other infectious agents (Takahashi et al., 2008).

Molecular methods for the specific detection of PTVs have been designed, based in conventional (gel-based) RT-PCR (Palmquist et al., 2002), nested RT-PCR (Zell et al., 2000) or real-time RT-PCR methods (Jimenez-Clavero et al., 2003; Krumbholz et al., 2003). While conventional RT-PCR methods are laborious, cumbersome and, particularly nested methods, prone to cross-contamination, real-time RT-PCR methods offer several advantages: they are rapid, more sensitive in general, and can be easily automated, without the need for gel electrophoresis, providing a convenient platform for high-throughput analysis of large amounts of samples (Aguero et al., 2007; Jimenez-Clavero et al., 2006; Shi et al., 2001). In the course of a study aiming at evaluating the possible utility of the detection of PTVs as environmental indicator for swine fecal contamination, a real-time fluorogenic quantitative RT-PCR was developed, which enabled the detection of PTV genome in

* Corresponding author. Tel.: +34 91 6202300; fax: +34 91 6202247.

E-mail address: majimenez@inia.es (M.A. Jiménez-Clavero).



Analyzing the genetic diversity of teschoviruses in Spanish pig populations using complete VP1 sequences

Cristina Cano-Gómez^a, Ferran Palero^b, María Dolores Buitrago^c, María Ana García-Casado^a, Jovita Fernández-Pinero^a, Paloma Fernández-Pacheco^a, Montserrat Agüero^c, Concepción Gómez-Tejedor^c, Miguel Ángel Jiménez-Clavero^{a,*}

^a Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA)-INIA, Ctra Algete-El Casar, s/n 28130, Valdeolmos (Madrid), Spain

^b Centro Superior de Investigación en Salud Pública (CSISP), Av Cataluña 21, 46020 Valencia, Spain

^c Laboratorio Central de Veterinaria, Ctra Algete km 8, 28110 Algete, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 29 September 2011

Keywords:

Porcine teschovirus
Picornaviridae
Swine
Phylogeny
VP1
Spain

ABSTRACT

Porcine teschoviruses (PTVs) have been previously shown to be the most abundant cytopathic viruses found in swine feces. In the present study, the diversity of PTVs was studied, using PTV isolates collected between 2004 and 2009 in a wide territory in Spain. In order to characterize genetically the isolates, phylogeny reconstructions were made using maximum likelihood and Bayesian inference methods, based on the 1D (VP1) gene, and including sequences available in public databases. The phylogenetic trees obtained indicated that PTVs present 12 main lineages, 11 corresponding to the PTV serotypes described to date, and one lineage distinct from the rest.

The geographic distribution of the different lineages does not seem to be strongly associated to particular territories, and co-circulation of multiple lineages was found in the same geographic areas. Nevertheless, some spatial structuring of the viral populations studied is indicated by the differences found between Spanish samples with respect to other European countries. A coalescent-based approach indicated that mutation may have been the main factor in originating the genetic diversity observed in the VP1 gene region. This study revealed a high diversity of teschoviruses circulating in the pig populations studied, and showed that molecular analysis of the complete VP1 protein is a suitable method for the identification of members of the porcine teschovirus group. However, further analyses are needed to clarify the geographical structuring of the different PTV populations.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Porcine teschoviruses (PTV, genus *Teschovirus*, family *Picornaviridae*) are non-enveloped RNA viruses that infect swine populations. PTVs were originally misclassified as “porcine enteroviruses”, but modern molecular analytical tools revealed that they differ significantly from the enterovirus group (Kaku et al., 2001). Complete genome sequence studies defined 11 distinct porcine teschovirus serotypes (PTV1–PTV11) (Zell et al., 2001). Similarly to other members of the family *Picornaviridae*, the teschovirus genome consists of a single-stranded RNA of positive polarity approximately 7.0–7.2 kb long which is translated into a unique polyprotein. This polyprotein is processed to yield eight viral polypeptides: four

structural polypeptides (1A or VP4, 1B or VP2, 1C or VP3 and 1D or VP1) and four non-structural polypeptides (2A, 2B, 2C and 2D). While VP1–3 are exposed to the surface of the virion, VP4 is internal, and interacts with the RNA molecule that is protected by the capsid shell.

Teschoviruses are transmitted by the fecal-oral route, and different studies indicate that PTVs are abundant and ubiquitous in healthy pig populations (La Rosa et al., 2006). In fact, PTVs are generally non-pathogenic, and infected swine most often remain asymptomatic (Knowles, 2006; OIE, 2008). However, some virulent variants can cause a variety of clinical conditions, the most severe of which is a non-suppurative viral encephalomyelitis known as Teschen disease. The first epizootic of this disease was recorded in the Czech city of Teschen in 1929 (Trefny, 1930), and during the 1940s and 1950s the disease spread throughout Europe and other continents and caused enormous losses to the pig production industry. Subsequently, milder forms of the disease were reported in Talfan, Wales and Denmark (Harding et al., 1957). In recent years, several outbreaks have occurred again in Asia (Wang et al., 2010; Yamada et al., 2004; Zhang et al., 2010), America (Bangari

* Corresponding author. Tel.: +34 91 6202300; fax: +34 91 6202247.

E-mail addresses: cristina.cano@inia.es (C. Cano-Gómez), ferran.palero@uv.es (F. Palero), md.buitrago@hotmail.com (M.D. Buitrago), maria.garcia@inia.es (M.A. García-Casado), fpinero@inia.es (J. Fernández-Pinero), pacheco@inia.es (P. Fernández-Pacheco), magerog@mapa.es (M. Agüero), cgomezte@mapa.es (C. Gómez-Tejedor), majimenez@inia.es (M.Á Jiménez-Clavero).



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Veterinary Microbiology

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



Teschoviruses and sapeloviruses in faecal samples from wild boar in Spain

Cristina Cano-Gómez^a, María Ana García-Casado^a, Ramón Soriguer^b, Ferran Palero^c, Miguel Angel Jiménez-Clavero^{a,*}

^aCentro de Investigación en Sanidad Animal (CISA)-INIA, Ctra. Algete-El Casar s/n, 28130 Valdeolmos, Spain

^bEstación Biológica de Doñana-CSIC, Seville, Spain

^cUnitat Mixta Genòmica i Salut CSISP-UV, Institut Cavanilles Universitat de Valencia, C/Catedrático Jose Beltran 2, 46980 Paterna, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 October 2012

Received in revised form 17 November 2012

Accepted 19 November 2012

Keywords:

Teschovirus

Sapelovirus

Picornavirus

Characterization

Phylogeny

RT-PCR

Wild boar

ABSTRACT

Teschovirus and Sapelovirus are two genera of the *Picornaviridae* family, comprising highly variable and heterogeneous enteric viruses, commonly found in faecal samples from domestic pigs. Although both of them are also known to infect wild boar, studies on their presence in these wild suids are scarce. The present study aimed at determining the presence of porcine teschovirus (PTV) and sapelovirus (PSV) in free-living wild boar populations, as well as to study their relationships with similar viruses present in pigs. Fresh faecal samples ($n = 63$) from wild boar were collected in Doñana Biological Reserve (SW Spain) during 2007 and 2011, and analysed using multiplex RT-PCR for the simultaneous detection and differentiation of PTV and PSV. A total of 32 samples (50.8%) presented positive PTV bands, while PSV amplicons were detected in 4 samples (6.4%). All PSV-positive samples were also positive for PTV, which indicated co-infection with both viruses. Virus isolation was successful from 6 samples, 4 of which were identified as PTV by RT-PCR, and three of these were further characterized by sequencing of the VP1 capsid protein. The remaining two isolates were negative for PTV or PSV. Genetic characterization of PSV-positive faecal samples, using the VP4 protein coding gene, was successful in 4 stool samples. Close phylogenetic relationship was found among wild boar and domestic pig strains in both PTV and PSV. More studies are needed to ascertain the epizootiological significance of these findings.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Wild boar (*Sus scrofa scrofa* Linnaeus, 1758) is known to be the closest relative of the domestic pig, and it has been recently found that domestication of pigs probably occurred multiple times from different wild boar populations (Larson et al., 2005, 2007; Cucchi et al., 2009; Fang et al., 2009; Rowley-Conwy et al., 2012). Wild boar is considered to act as reservoir for numerous transmissible viruses, mainly pathogens of domestic pigs, but some also affect other domestic animals and even humans. For

instance, serological studies support a role for wild boar as reservoir host for Aujeszky disease virus (ADV), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), porcine parvovirus (PPV), classical swine fever virus (CSFV), African swine fever virus (ASFV), swine influenza virus (SIV), swine vesicular disease virus (SVDV), porcine circovirus type 2 (PCV2), hepatitis E virus (HEV), torque teno virus (TTV), and others (Meng et al., 2009).

Among the viral pathogens of relevance for suids and other vertebrates, enteric viruses deserve particular attention as infectious agents causing a variety of signs, including diarrhoea, respiratory signs, encephalitis, skin lesions and fertility disorders. They primarily infect the gastrointestinal tract, replicating in its epithelia and being shed in faeces, often remaining in the environment for long

* Corresponding author. Tel.: +34 91 6202300; fax: +34 91 6202247.
E-mail address: majimenez@inia.es (M.A. Jiménez-Clavero).