

# EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LA PESTE PORCINA CLÁSICA EN COLOMBIA

**Sabogal Z. Y.<sup>1</sup>, Rincón M.A<sup>2</sup>, Mogollón J.D<sup>2</sup>. Clavijo A<sup>3</sup>**

Instituto Colombiano Agropecuario Ica

Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario, Grupo de Medicina Porcina,  
National Center for Foreign Animal Disease, Manitoba-Canadá.

## RESUMEN.

El propósito de esta investigación fue realizar en Colombia un estudio de epidemiología molecular en Peste Porcina Clásica (PPC) para analizar aislados circulantes en el país relacionados con brotes de enfermedad entre 1997-2002. Este trabajo incluyó Aislamiento viral, Inmunoperoxidasa Directa, Inmunofluorescencia Directa, Transcriptasa Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidada (RT-PCRn), Secuenciación y Análisis de secuencias. Dos fragmentos del virus de la PPC fueron secuenciados; uno de 190 nucleótidos del gen de la glicoproteína E2 y otro de 150 nucleótidos de la región 5'UTR. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias de cepas de referencia y aislados de otros lugares del mundo.

Los resultados permitieron establecer que el brote que ocurrió en el año 2002 estuvo asociado con un solo tipo viral clasificado dentro del grupo 1, subgrupo 1.1 el cual estuvo muy relacionado con el aislado "Santander" aislado de un brote en los años 80; por lo que se propone que ha estado circulando en el campo desde entonces. También se detectó una relación filogenética de los aislados

---

<sup>1</sup> E-mail: zyubylls@yahoo.com.mx

<sup>2</sup> E-mail: porcicol@tutopía.com

<sup>3</sup> E. mail: aclavijo@inspection.gc.ca

colombianos de los años 90 con aislados del Brazil, lo cual hace suponer un origen diferente. En conclusión, se demostró que los aislados ocurridos en Colombia durante el 2002 tienen un mismo origen ya que mostraron una alta homología en sus secuencias.

**Palabras claves:** Virus de la Peste Porcina Clásica, epidemiología molecular, secuenciamiento, análisis de secuencias, Colombia, Pestivirus.

## **INTRODUCCIÓN**

La Peste Porcina Clásica (PPC) es una enfermedad viral altamente contagiosa que causa importantes pérdidas económicas en la industria porcina tanto a nivel nacional como mundial. El agente causal de la PPC es el Virus de la Peste Porcina Clásica (VPPC), perteneciente al Género Pestivirus, Familia Flaviviridae (Wengler, 1991). Este virus afecta cerdos domésticos, silvestres y jabalíes, causándoles un severo síndrome hemorrágico generalizado como una de las manifestaciones más importantes de la forma aguda de la enfermedad.

El genoma del VPPC está formado por ARN de cadena sencilla, polaridad positiva, de aproximadamente 12.3 Kb, el cual contiene un marco de lectura abierto (ORF) que está flanqueado por dos regiones no codificantes (UTR) en los extremos 5' y 3'. Este ORF codifica para una sola poliproteína que después de sufrir una serie de clivajes origina las proteínas virales maduras. Dentro de las proteínas estructurales, sobresale la glicoproteína E2 como la más importante, ya que estimula la producción de anticuerpos neutralizantes en el hospedero y es

considerada como la más inmunogénica, encontrando hacia su extremo 3' una de las regiones más variables entre los Pestivirus (Collet et al., 1989).

En los últimos años se ha demostrado la gran utilidad del análisis de secuencias en los estudios de Epidemiología Molecular realizados desde el año 1994 en diversos países afectados por la PPC (Lowings et al., 1994 y 1996; Diaz de Arce et al., 1999; Greiser-Wilke et al., 2000; Paton et al., 2000; Biagetti et al., 2001). En esos estudios se ha comprobado que el secuenciamiento tiene mayor poder discriminatorio para la tipificación y clasificación de los Pestivirus, que otros procedimientos como anticuerpos monoclonales, patrones de restricción del genoma (RFLP's), etc.

En Colombia, la enfermedad se reportó por primera vez en la década de los 40; desde entonces se han venido presentando brotes esporádicos de PPC que han afectado seriamente la producción porcícola nacional. El principal objetivo de este trabajo fue establecer el comportamiento de estos aislados Colombianos durante el tiempo y el espacio geográfico, para tratar de determinar si el causante de los brotes ha sido el mismo virus a través de los años o si se habían introducido nuevas cepas en el territorio nacional.

Este trabajo está enmarcado dentro del Plan Nacional de Erradicación de la PPC en Colombia y se constituye en el primero realizado entre los países del área

andina en el cual se utilizan las herramientas básicas de la Epidemiología Molecular para rastrear, clasificar y determinar el comportamiento de los aislados de VPPC circulantes en el país.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Muestras:** Se procesaron muestras de tonsila (amígdala), ganglio linfático, bazo o riñón de 38 casos positivos, por Inmunofluorescencia Directa y/o RT-PCRn para PPC, correspondientes al brote de la enfermedad ocurridos en Colombia durante el año 2002. Estos casos se seleccionaron de un total de 234 recibidos en el Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario del ICA para diagnóstico de PPC provenientes de diferentes departamentos del país. Además, se incluyeron muestras de tejidos de 12 casos positivos a PPC de los años 1997-2000 y muestras de tejidos (tonsila, bazo y ganglio linfático) de un animal inoculado experimentalmente con el aislado viral denominado “Santander”, el cual se presentó en los años 80 y que actualmente es utilizado como cepa de desafío en las pruebas de potencia para la evaluación de las vacunas contra PPC disponibles en el mercado.

**Células y Virus:** La línea celular PK-15 (ATCC CCL33) y el VPPC cepa Alfort fueron obtenidos gracias a la colaboración de la doctora Heidy Díaz de Arce del Laboratorio de Sanidad Animal–CENSA-República de Cuba. El título obtenido para el virus fue  $10^{7.3}$  DITC50 (Dosis Infecciosas Tejido Celular 50%). Las células

PK-15, certificadas libres del Virus de Diarrea Viral Bovina (VDVB), fueron cultivadas en medio de crecimiento MEM (Minimun Essential Médium) modificado por Dulbecco (DMEM) (GIBCO-USA), adicionado con 10% de suero fetal bovino (SFB) gamma irradiado (SIGMA-USA) certificado libre del VDVB y anticuerpos contra el VDVB.

**Inmunofluorescencia Directa (IFD):** El procedimiento se realizó de acuerdo a lo descrito por Terpstra (2000) y Bloemraad (2000), utilizando el conjugado policlonal de CEDITEST<sup>®</sup>ID-DLO (Holanda).

**Aislamiento Viral:** Se siguió el protocolo descrito por Wensvoort et al. (1986) y Terpstra (2000), el que en síntesis consiste en tomar 1-2 g de un pool de tejidos que son homogenizados por maceración en una suspensión al 10% peso/volumen. 50 µl de cada homogenizado en dilución 1:5 se inocularon por triplicado en placas de 96 pozos y se incubaron por tres días a 37°C en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub>.

**Inmunoperoxidasa Directa (IPD):** La técnica de inmunoperoxidasa se realizó siguiendo esencialmente el procedimiento reportado por Terpstra (2000). Se utilizó el anticuerpo monoclonal específico para VPPC 21.2 (CEDITEST<sup>®</sup> ID-DLO, Holanda) marcado con peroxidasa de rábano picante. Las placas inoculadas se lavaron y fijaron a 80°C por 2 horas y luego incubadas por 1 hora a 37°C en cámara húmeda en presencia del anticuerpo monoclonal. Después de varios

lavados, las células fueron coloreadas con la solución sustrato cromógeno 3-amino 9-etil carbazole por 20 minutos a temperatura ambiente y observadas al microscopio.

**Extracción de ARN:** El ARN fue extraído de acuerdo a las recomendaciones del productor utilizando el reactivo Trizol (Gibco BRL-USA). El ARN fue finalmente resuspendido en 50  $\mu$ l de agua con dietil-pirocarbonato (DEPC) (Sigma<sup>®</sup>-USA) antes de ser congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**RT-PCR anidada (RT-PCRn) para el gen E2 y región 5'UTR:** Para la transcripción reversa del ARN obtenido se utilizaron hexámeros al azar (random hexamers) 30 ng/ml (Promega<sup>®</sup>-USA) y la enzima transcriptasa reversa del virus de la leucosis murina de Moloney M-MLV (Promega<sup>®</sup>-USA). Todas las muestras fueron montadas por duplicado.

Para la aplicación de la técnica PCR anidada, se usaron dos pares de primers para las regiones E2 y 5'UTR, descritos previamente por Paton et al, 2000b.

Para la amplificación de la región E2 los primers utilizados fueron: externos Forward: 5' AGR CCA GAC TGG TGG CCN TAY GA 3' (2228-2250) y Reverse: 5' TTY ACC ACT TCT GTT CTC A 3' (2898-2880). Primers internos Forward: 5' TCR WCA ACC AAY GAG ATA GGG 3' (2477-2497) y Reverse: 5' CAC AGY CCR AAY CCR AAG TCA TC 3' (2748-2726). Para 5'UTR los primers externos

CSFV-UP1 (sense): 5' CTA GCC ATG CCC WYA GTA GG 3' (94-113) y CSFV-UP2 (antisense): 5' CAG CTT CAR YGT TGA TTG T 3' (514-496). Primers internos: CSFV/SQ-1 (sense): 5' AGC TCC CTG GGT GGT CTA 3' (146-163) y CSFV/SQ-2 (antisense): 5' TGT TTG CTT GTG TTG TAT A 3' (417-399). En paréntesis están indicadas las posiciones de los nucleótidos correspondientes a la cepa de referencia Alfort 187.

Para E2 las condiciones de reacción para la primera PCR (20 ciclos) fueron: denaturación inicial 94°C/5', denaturación 94°C/1', anillamiento 50°C/1', extensión 72°C/1' y una extensión final 72°C/10'. Para la segunda PCR (30 ciclos) fueron las mismas condiciones excepto el anillamiento, el cual se realizó a 60°C por 1 minuto.

La primera y segunda PCR para 5'UTR fueron realizadas con las mismas concentraciones de reactivos y condiciones que para E2, con la única diferencia en la temperatura de anillamiento; con los primers externos 62°C por 1 minuto y con los primers internos 54°C por 1 minuto.

Los productos obtenidos para las dos regiones del genoma viral fueron de 271 pb, los cuales fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2%, coloreados con bromuro de etidio (10 mg/ml Promega®-USA) y visualizados bajo luz ultravioleta.

**Secuenciamiento:** Se realizó la purificación y secuenciación automatizada de 19 productos de PCR obtenidos del gen E2 y 5 productos de la región 5'UTR del VPPC. La purificación se realizó usando el kit Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega®) y la secuencia de los productos de PCR fue determinada en el equipo ABI PRISM 310 de Applied Biosystems® con el Kit Big Dye Terminator de Applied Biosystems®, realizando dos reacciones para cada muestra (forward y reverse), y utilizando los primers internos mencionados anteriormente para cada región. El procedimiento se realizó en la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) gracias a la colaboración de la Dra. Pilar Martínez, y de los Drs. Manuel Elkin Patarroyo y Manuel Alfonso Patarroyo. Las secuencias (principalmente de cepas de referencia internacional, utilizadas en el análisis y construcción de árboles) fueron obtenidas del Genbank y las secuencias pertenecientes a virus aislados en Cuba y otros países incluyendo algunos de Latinoamérica fueron proporcionadas por la Dra. Heidy Díaz de Arce del Laboratorio CENSA-Cuba.

**Evaluación de los Datos:** La depuración y edición de las secuencias se realizó con los programas CHROMAS Versión 1.45 (McCarthy), CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) y BLAST (Altschul et al, 1990).

**Análisis de Secuencias:** Para la construcción de los dendrogramas se utilizaron 190 nucleótidos del gen E2 ubicados en las posiciones 2518-2707 (Lowings et al., 1996; Paton et al., 2000) y 150 nucleótidos de la región 5'UTR ubicados en la posición 190-339 (Greiser-Wilke et al., 1998; Paton et al., 2000). El alineamiento múltiple de las secuencias fue realizado usando el programa CLUSTAL W

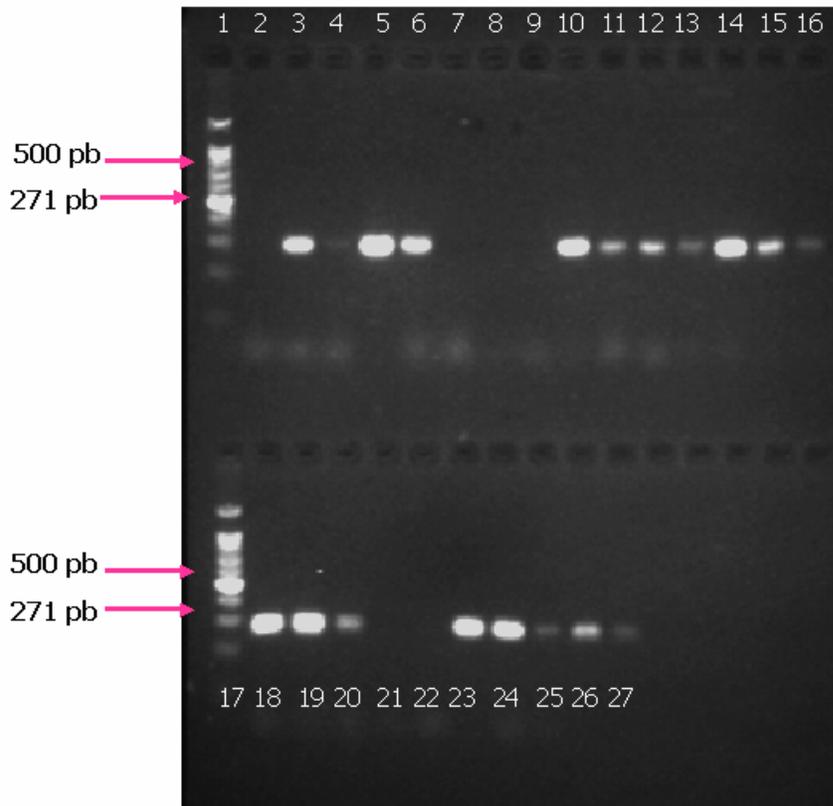
(Thompson et al., 1994). Los árboles fueron generados con el paquete MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 2.1 (Kumar et al., 2001). La estimación de distancias fue calculada de acuerdo a los modelos propuestos por Jukes y Cantor (1969); dos parámetros establecidos por Kimura (1980) y distancia-p en MEGA 2.1 y los árboles sin raíz fueron construidos usando el método de Neighbor-Joining (Saitou, 1987) y Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean-UPGMA (Sokal y Michener, 1958) en MEGA 2.1. El Bootstrapping fue realizado con 1000 réplicas para cada uno de los árboles y se utilizaron las cepas de Tremor Congénito y/o Kanagawa como grupos externos (outgroups). La nomenclatura de los grupos y subgrupos virales fue la sugerida previamente por Lowings et al, (1996).

## **RESULTADOS**

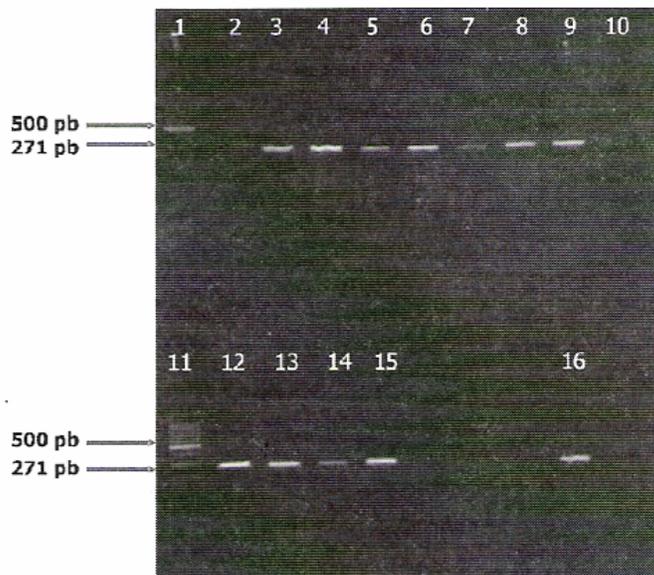
**Detección del VPPC por IFD e IPD:** De 38 casos (año 2002) analizados por IFD, 36 (94.7%) resultaron positivos (Tabla 1). En 14/19 (73.7%) muestras procesadas (1997-2002) se logró aislar el VPPC, y en todos los casos su presencia fue evidenciada por medio de la IPD al observar una coloración pardo-rojiza en el citoplasma de las células infectadas.

**RT-PCRn para el Gen E2 y región 5'UTR:** Se obtuvieron los fragmentos esperados del segmento de 271 pb tanto del gen E2 como de la región 5'UTR (Figuras 1 y 2). Los resultados de esta prueba se pueden observar en la Tabla 1. De los 38 casos pertenecientes al año 2002, para E2 se obtuvieron 36 casos

(94.7%) positivos y solo dos (5.3%) negativos. De los 12 casos de los años 1997-2000 tres casos fueron positivos y nueve negativos. Los dos tejidos procesados del animal experimentalmente infectado con el aislado Santander fueron igualmente positivos para esta prueba. Para 5'UTR las 16 muestras procesadas resultaron positivas.



**Figura 1.** Productos de RT-PCRn de un fragmento de 271 pb del gen E2 del VPPC, a partir de ARN extraído de muestras de tejidos de cerdos sospechosos de PPC. Línea 1 y 17: Marcador molecular de pb, a la izquierda está indicado el tamaño del fragmento amplificado. Líneas 3 y 18: Control Positivo. Líneas 2 y 22: control Negativo. Líneas 5 y 6; 10 y 11; 12 y 13; 19 y 20; 24 y 25; 26 y 27: Casos de campo del año 2002. Cada pareja corresponde a tonsila y riñón respectivamente.



**Figura 2.** Productos de RT-PCRn de un fragmento de 271 pb de la región 5'UTR del VPPC, a partir de ARN extraído de muestras de tejidos de cerdos sospechosos de PPC. Línea 1 y 11: Marcador molecular de pb, a la izquierda está indicado el tamaño del fragmento amplificado. Línea 16: Control Positivo. Línea 2 y 10: Control Negativo. Líneas 3 a 9: casos 3764, 4650, 5356, 5704, 5985, 6588, 7447; líneas 12 a 15: casos 7487, 7510, 7609, 8281. Todos correspondientes a casos de campo del año 2002.

**Secuenciamiento y Análisis de Secuencias:** Los resultados del alineamiento de las secuencias del gen E2 y de 5'UTR, utilizando el programa CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) se pueden observar en las figuras 3 y 4. Los dendrogramas obtenidos para E2 y 5'UTR se presentan en las figuras 5 y 6. Las distancias nucleotídicas entre los aislados Colombianos incluidos en este estudio fueron calculadas con el método de Kimura-2. La medición de las distancias con los modelos Jukes y Cantor y distancia-p proporcionaron resultados similares a los obtenidos con Kimura-2.

**Tabla 1.** Resultados obtenidos con las diferentes técnicas utilizadas según año de recolección y procedencia de las muestras.

Nº	IDENTIFIC.	PROCEDENCIA		PRUEBAS					
		Municipio	Departamento	IFD	A.V.	PCR		SECUENCIAMIENTO	
						E2	5'UTR	E2	5'UTR
1	3764-02	Zipaquirá	Cundinamarca	+	-	+	+	SI	SI
2	3812-02	Zipaquirá	Cundinamarca		+	+		SI	
3	3847-02	Tena	Cundinamarca	+	+	+	+	SI	
4	4191-02	San Antonio Teque.	Cundinamarca	+	+	+	+	SI	
5	4438-02	Zipaquirá	Cundinamarca	+	+	+	+	SI	
6	4650-02	Zipaquirá	Cundinamarca	+	+	+	+	SI	
7	4755-02	La Calera	Cundinamarca	+	-	+	+	SI	
8	4766-02	San Antonio Teque.	Cundinamarca	+		+	+		
9	5160-02	La Calera	Cundinamarca	-		+			
10	5356-02	La Calera	Cundinamarca	+		+	+		
11	5390-02	Soacha	Cundinamarca	+		+			
12	5403-02	Soacha	Cundinamarca	+		+			
13	5456-02	Sibaté	Cundinamarca	+		+			
14	5704-02	Puente Nacional	Santander	+	+	+	+	SI	
15	5755-02	La Calera	Cundinamarca	+		+			
16	5841-02	Fontibón	Cundinamarca	+		+			
17	5864-02	Zipaquirá	Cundinamarca	+		+			
18	5893-02	Choachí	Cundinamarca	+		+			
19	5948-02	La Dorada	Caldas	+		-			
20	5981-02	Zipaquirá	Cundinamarca	+		+			
21	5985-02	San Andrés	San Andrés	+	+	+	+	SI	
22	6143-02	Sibaté	Cundinamarca	+		+			
23	6279-02	Sibaté	Cundinamarca	+		+			
24	6554-02	Soacha	Cundinamarca	+		+			
25	6588-02	Ibagué	Tolima	+	+	+	+	SI	
26	6621-02	Cajicá	Cundinamarca	+		+			
27	6645-02	Soacha	Cundinamarca	+		+			
28	6760-02	Cáqueza	Cundinamarca	+		+			
29	6895-02	Soacha	Cundinamarca	+		-			

<b>30</b>	7447-02	San Antonio Tena	Cundinamarca	+		+	+		SI
<b>31</b>	7487-02	Vélez	Santander	+	+	+	+	SI	SI
<b>32</b>	7510-02	Ibagué	Tolima	+	+	+	+	SI	SI
<b>33</b>	7538-02	Fusagasuga	Cundinamarca	+		+			
<b>34</b>	7609-02	Moniquirá	Boyacá	+	+	+	+	SI	SI
<b>35</b>	8028-02	Guaduas	Cundinamarca	+		+			
<b>36</b>	8156-02	La Vega	Cundinamarca	+		+			
<b>37</b>	8226-02	Cota	Cundinamarca	+		+			
<b>38</b>	8281-02	Toca	Boyacá	+	+	+	+	SI	
<b>39</b>	3076-97	Manta	Cundinamarca			-			
<b>40</b>	2584-98	Madrid	Cundinamarca			-			
<b>41</b>	3223-98	Zipaquirá	Cundinamarca		-	+		SI	
<b>42</b>	1012-99	N.I.	Quindío			-			
<b>43</b>	1094-99	Trujillo	Valle			-			
<b>44</b>	1831-99	Mocoa	Putumayo		-	+		SI	
<b>45</b>	1884-99	Puerto Asis	Putumayo			-			
<b>46</b>	2032-99	Puerto Asis	Putumayo			-			
<b>47</b>	2094-99	Puerto Asis	Putumayo		-	+		SI	
<b>48</b>	2177-99	Puerto Caicedo	Putumayo			-			
<b>49</b>	2638-99	Dorada	Putumayo			-			
<b>50</b>	3299-99	Rionegro	Antioquia			-			
<b>51</b>	80-	Bazo	¿?	Santander		+	+		SI
	85	Ganglio				+	+		SI

+ indica resultado positivo para esta prueba. – indica resultado negativo. IFD: Inmunofluorescencia Directa. A.V.: Aislamiento Viral. Las casillas en blanco representan las pruebas no realizadas. Sombreadas de azul se indican las muestras pertenecientes al año 2002, en rosa las pertenecientes al banco de muestras y en amarillo el aislado Santander.



## DISCUSIÓN

En este trabajo se aplicaron los conceptos de la Epidemiología Molecular para comparar a nivel genómico algunos de los aislados del VPPC circulantes en Colombia, logrando establecer las relaciones de parentesco entre ellos y permitiendo la clasificación de los mismos en el **Grupo 1, Subgrupo 1.1** de acuerdo con la clasificación propuesta por Lowings et al, 1996. De esta manera, se describen por primera vez las características genómicas de los virus circulantes en el país.

Es importante destacar el haber logrado aislar el VPPC en células PK-15 el cual fue evidenciado por medio de la IPD. Ninguno de los aislamientos obtenidos presentó efecto citopático, lo cual es concordante con lo reportado anteriormente por otros autores, quienes señalan que la mayoría de aislados de VPPC no exhiben citopatogenicidad en cultivo celular, (Moennig y Plagemann, 1992; Meyers y Thiel, 1995) aunque excepcionalmente se ha evidenciado la existencia de algunas cepas citopáticas (Kosmidou et al., 1998; Meyers y Thiel, 1995).

```

                11       21       30       40       50
                |       |       |
3764_Zipaquiral_Col102 .....
7447_Iena_Col102 .....
7487_Velez_Col102 .....
7609_Moniquira_Col102 .....
7510_Ibague_Col102 .....
*****
Prim.cons.      TGAACAGAAAGCCCACTTCGAGATGCTATGTTGACGAGGGCATGCCCAAGA

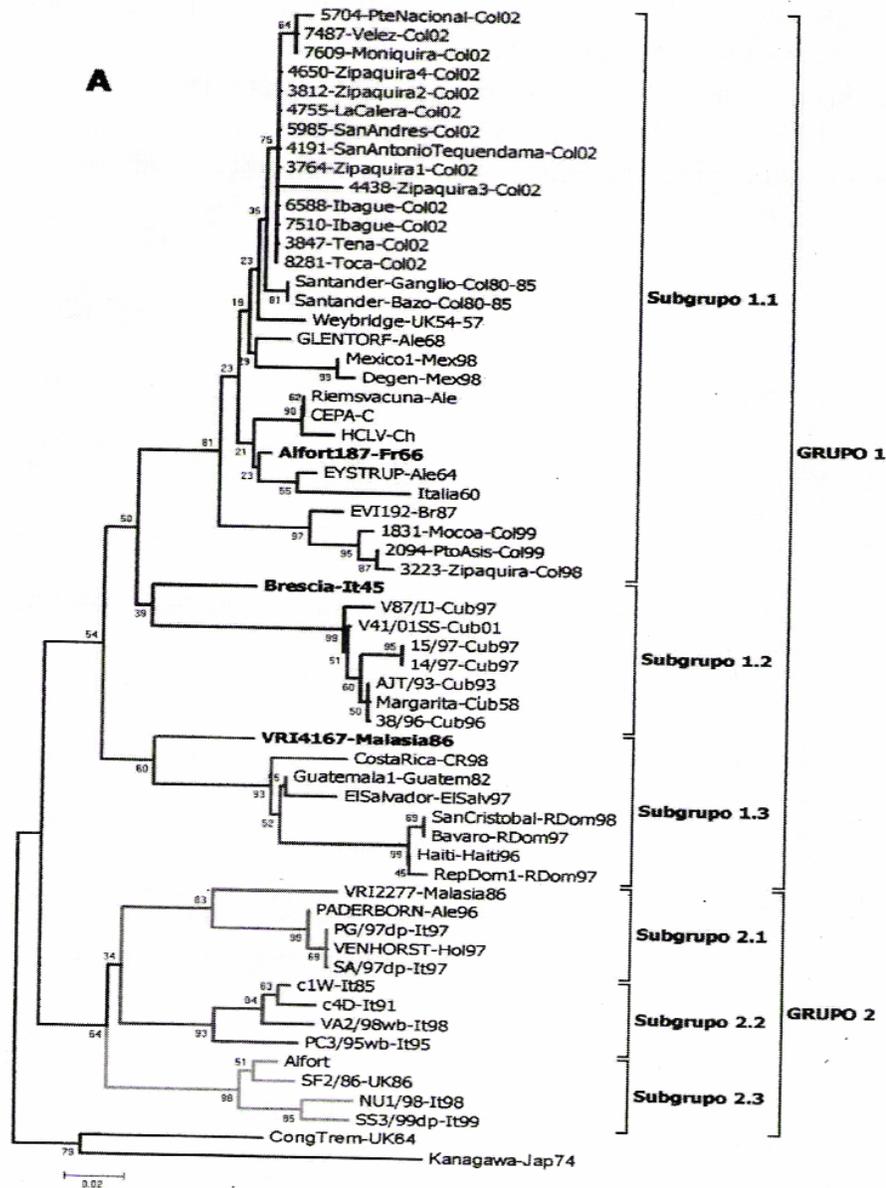
                60       71       80       90       100
                |       |       |
3764_Zipaquiral_Col102 .....
7447_Iena_Col102 .....
7487_Velez_Col102 .....
7609_Moniquira_Col102 .....
7510_Ibague_Col102 .....
*****
Prim.cons.      CACACCTTAACCCCTAGCCGGGCTCGGTAGGGTGAATCACACCACCTGAT

                111      121      130      140      150
                |       |       |
3764_Zipaquiral_Col102 .....
7447_Iena_Col102 .....
7487_Velez_Col102 .....
7609_Moniquira_Col102 .....
7510_Ibague_Col102 .....
*****
Prim.cons.      GGGAGTACGACCCGATAGGGTCTGCGAGGGCCCACTATTAGGCTAGTAC

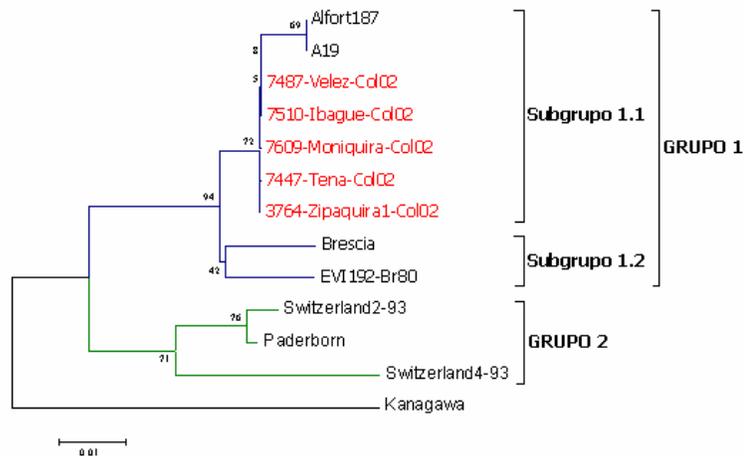
```

**Figura 4.** Secuencias de los fragmentos de 150 nt de la región 5'UTR correspondientes a los aislados del VPPC determinados en este estudio. Se observa la identidad completa en las cinco secuencias analizadas.

Con las dos regiones del genoma viral analizadas en este estudio, los VPPC Colombianos se segregaron en grupos similares cuando se utilizaron los diferentes modelos de construcción de árboles y de medición de distancias. Con las secuencias de las dos regiones trabajadas, los aislados Colombianos permanecieron ubicados en el Subgrupo 1.1. Esta concordancia entre los resultados obtenidos al utilizar diferentes modelos, permitió confirmar la información obtenida y deducir que estos resultados son independientes del modelo empleado para la construcción de los árboles.



**Figura 5.** Dendrograma construido por el método de Neighbour-Joining utilizando 190 nucleótidos de la región que codifica para la proteína E2. Incluye 19 VPPCs Colombianos secuenciados en este estudio. Se emplearon las secuencias Kanagawa y Congenital Tremor como grupos externos. La nomenclatura de Grupos y Subgrupos es la propuesta por Lowings et al., 1996. Los aislados Colombianos están señalados en colores rojo (2002), azul (Santander 80) y verde (1998-1999). Para cada nodo está indicado el valor correspondiente al Bootstrap.



**Figura 6.** Árbol sin raíz construido por el método de Neighbour-Joining utilizando 150 nucleótidos de la región 5' UTR que incluye 5 VPPCs Colombianos. Se empleó la secuencia Kanagawa como grupo externo. La nomenclatura de Grupos y Subgrupos es la propuesta por Lowings et al, 1996. Los aislados Colombianos están señalados en color rojo y todos pertenecen a los casos presentados durante el año 2002. Para cada nodo está indicado el valor correspondiente al Bootstrap.

La información así obtenida es consistente con estudios previos, en los cuales se han secuenciado aislados de VPPC del Continente Americano que han sido clasificados en el Grupo 1 (Lowings et al., 1996; Diaz de Arce et al., 1999; Paton et al., 2000). Es probable considerar que para los aislados Colombianos, la clasificación dentro del Grupo 1, signifique una relación cercana con las cepas vacunales secuenciadas en otros lugares del mundo. Sin embargo, se deberán continuar los estudios para lograr amplificar y secuenciar fragmentos de la cepa utilizada en la producción de las vacunas comerciales utilizadas en el país.

Para el presente estudio, se consideraron significativos únicamente los valores de bootstrap mayores a 70% (Clewley, 1999 citado por Paton et al., 2000). Observando el agrupamiento de los virus Colombianos y los valores de bootstrap

obtenidos, se puede inferir que los brotes que se presentaron durante el año 2002 en Colombia fueron causados por un mismo tipo viral que se encuentra muy relacionado con el VPPC denominado aislado “Santander”, el cual se presentó en los años 80 y que según estos resultados probablemente ha permanecido en el campo desde ese tiempo.

En un grupo separado del grupo de VPPC del año 2002 (Figura 5), pero dentro del Subgrupo 1.1 se encontraron los aislados correspondientes a los años 1998 y 1999, muy relacionados con una cepa del año 1987 encontrada en el Brasil (EVI-192). Por lo anterior, se cree que la presentación de los casos en los años 98-99 en el sur de Colombia tuvieron un origen diferente al del brote del año 2002. Es probable que esta relación esté dada por la movilización entre los dos países (Colombia-Brasil) ya que estas zonas se encuentran geográficamente cercanas y comunicadas por transporte fluvial principalmente.

Teniendo en cuenta la información epidemiológica, el primer caso de PPC en el año 2002 correspondió al reportado en el municipio de Zipaquirá (Cundinamarca) (3764-Zipaquirá1-Col02), para el cual se pudo establecer como origen probable de la enfermedad la entrada de animales infectados provenientes de una explotación extensiva sin vacunación a PPC, ubicada en la zona de Mondoñedo (Mosquera – Cundinamarca) donde los animales eran alimentados con residuos de la alimentación humana y desechos crudos recogidos en mataderos de la región. Se cree que desde este sitio la enfermedad se diseminó a otros departamentos como Boyacá, Tolima, Santander, etc. (Boletín Informe Epidemiológico semanal, ICA, 2002).

Situaciones epidemiológicas similares han sido descritas en la literatura, donde se ha demostrado que las formas más comunes de transmisión de la PPC son el contacto directo entre animales infectados y cerdos vivos susceptibles y la alimentación de los porcinos con carne de cerdo contaminada (Paton et al., 2000; Gomez-Tejedor y valenciano,1994). Según Edwards et al., (2000) la alimentación con desechos o basuras es la fuente de infección más frecuente para los brotes primarios en países donde esto es permitido, tal como ocurre en Colombia, principalmente en explotaciones de tipo extensivo. La opción tecnológica para el uso de las lavazas en la alimentación porcina es la cocción de estos desperdicios antes de ser suministrados a los animales (Edwards et al., 2000).

Con relación al caso presentado en San Andrés, se consideró según la información epidemiológica existente, que este fue originado por la alimentación de los cerdos con desperdicios de carnes crudas obtenidas en algunos hoteles de la Isla. Normalmente, dichos alimentos son llevados a la Isla desde el interior del país y se cree que probablemente el virus fue transportado por esta vía. Según el dendrograma obtenido en este estudio (Figura 5 ), se observa que no hay ningún tipo de relación del virus aislado de San Andrés con los encontrados en varios países de Centroamérica y del Caribe puesto que estos últimos se encuentran clasificados principalmente en los Subgrupos 1.2 y 1.3. En consecuencia, el brote que se presentó en San Andrés Islas, fue causado por el mismo tipo de VPPC circulante en el interior del país causante de los brotes durante el año 2002.

El alineamiento de las secuencias de 5'UTR, confirmó el hecho de estar trabajando con una región altamente conservada del VPPC, ya que los cinco aislados Colombianos procesados no presentaron diferencias en sus secuencias (Figura 6). Esto está de acuerdo con lo encontrado en otros estudios en los cuales varios virus clasificados en el grupo 2.1 fueron idénticos al 5'UTR mientras que con E2 los virus se agruparon en grupos diferentes (Paton et al., 2000). El árbol construido con 5'UTR también agrupó los virus Colombianos en el Grupo 1 Subgrupo 1.1. De esta manera se pudo observar que con las dos regiones secuenciadas, los VPPCs Colombianos se agruparon de igual forma. Esto también ha sido demostrado por otros autores, incluso trabajando con otro virus perteneciente a la Familia Flaviviridae, como es el virus de la Hepatitis C, con el cual se han logrado subdivisiones virales similares obtenidas por comparación de secuencias derivadas de diferentes regiones blanco del genoma (Simmonds et al., 1996 En: Paton et al., 2000). Las secuencias idénticas encontradas para los cinco aislados virales Colombianos coinciden con lo reportado por varios autores quienes afirmaron que la región 5'UTR es altamente conservada, debido a que es un sitio clave en la iniciación de la traducción y en la replicación del VPPC (Van Rijn et al., 1997; Paton et al., 2000).

En este estudio se analizaron las secuencias de aislados colombianos del VPPC, lo que permitió conocer por primera vez a nivel nucleotídico los virus circulantes en el país y valorar la utilidad de esta información de secuencia para los estudios de Epidemiología Molecular. A pesar de las diferencias en el número de aislados secuenciados para cada región viral estudiada, las dos regiones analizadas

agruparon los virus Colombianos en el Grupo 1 Subgrupo 1.1. Se encontraron relaciones importantes entre aislados causantes de brotes de PPC durante el año 2002 en Colombia y los aislados que se presentaron en los años 80 y 90. El aislamiento del VPPC a partir de tejidos se logró sobre monocapas de células PK-15, lo que permitió complementar y confirmar la identificación del agente.

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores expresan sus agradecimientos a los doctores Heidy Díaz de Arce y Manuel Elkin Patarroyo por el apoyo técnico para la realización de este estudio, a la Asociación Colombiana de Porcicultores – Fondo Nacional de la Porcicultura y al Instituto Colombiano Agropecuario por el soporte financiero.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J.. "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990
2. Biagetti M.; Greiser-Wilke, I. and Rutili. Molecular Epidemiology of Classical Swine Fever in Italy. *Vet. Microbiol.* 83:205-215, 2001
3. Bloemraad, M. Laboratory manual of diagnostic procedures for classical swine fever as performed at the national reference laboratory for classical swine fever of the Institute for Animal Science and Health Lelystad, The Netherlands, 2000.

4. Collet, M.S.; Moennig, V. and Horsinek, M.C. Recent advances in Pestivirus research. *J. Gen. Virol.* 70:253-266, 1989.
5. Diaz de Arce, H.; Núñez, J.I.; Ganges, L.; Barreras, M.; Frías, M.T.; Sobrino, F.. Molecular Epidemiology of Classical Swine Fever in Cuba. *Virus Res.* 64:61-67, 1999
6. Edwards, S.; Fukusho, A.; Lefevre, P.; Lipowski, A.; Pejsak, Z.; Roehe, P. and Westergaard, J. Classical swine fever: The global situation. *Vet. Microbiol.* 73:103-119, 2000
7. Gómez-Tejedor, C. y Valenciano, M. Epizootiología y patogenia de la peste porcina clásica. *Aula Veterinaria.* 22:11-17, 1994
8. Greiser-Wilke, I.; Depner, K.; Fritzemeier, J.; Haas, L.; Moennig, V. Application of a computer program for genetic typing of classical swine fever virus isolates from Germany. *J. Virol. Methods.* 75:141-150, 1998.
9. Greiser-Wilke, I.; Fritzemeier, J.; Koenen, F.; Vanderhallen, H.; Rutili, D.; De Mia, G.-M.; Romero, L.; Rosell, R.; Sánchez -Vizcaino, J.M. y San Gabriel, A. Molecular epidemiology of a large classical swine fever epidemic en the European Union in 1997-1998. *Vet. Microbiol.* 77:17-27, 2000
10. Kosmidou, A.; Büttner, M. and Meyers, G. Isolation and characterization of cytopathogenic classical swine fever virus (CSFV). *Arch. Virol.* 143:1295-1309, 1998
11. Kumar, S.; Tamura, K.; Jakobsen, I. and Nei, M. MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA, 2001

12. Lowings, P.; Paton, D.; Sands, J.; De Mia, G. and Rutili, D. Classical swine fever: genetic detection and analysis of differences between virus isolates. *J. Gen. Virol.* 75:3461-3468, 1994
13. Lowings, P.; Ibata, G.; Needham, J. and Paton, D. Classical swine fever virus diversity and evolution. *Journal of General Virology.* 77:1311-1321, 1996
14. McCarthy. Software Chromas Versión 1.45. Sin publicar
15. Meyers, G. and Thiel, H. Cytopathogenicity of classical swine fever virus caused by defective interfering particles. *J. Virol.* 69:3683-3689, 1995
16. Moennig, V. and Plagemann P.G.W. The Pestiviruses. *Advances on Virus Res.* 41:53-98, 1992
17. Paton, D.J.; McGoldrick, A.; Greisser-Wilke, I.; Parchariyanon, S.; Song, J.Y.; Liou, P.P.; Stadejek, T.; Lowings, P.J.; Björklund and Belak, S. Genetic typing of classical swine fever virus. *Vet. Microbiol.* 73:137-157, 2000
18. Saitou, N. and Nei, M. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mo. Biol. Evolut.* 4:406-425, 1987
19. Sokal, R.R. and Michener C.D. A statistical method for evaluating systematic relationships. University of Kansas. *Science Bulletin.* 38:1409-1438, 1958
20. Terpstra, C. Classical swine fever in manual of standards of diagnostic tests and vaccines, OIE, 2000
21. Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence

weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22:4673-4680, 1994

22. Van Rijn, PA; Van Gennip, H.G.P.; Lee Derse, C.H; Brusckke, C.J.M.; Paton, D.J.; Moormann, R.J.M and Van Oirschot, J.T. Subdivision of the pestivirus genus based on envelope glycoprotein E2 virol. 237: 337-348, 1997.
23. Wengler, G. Family Flaviviridae. In: Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.L., Brown, F. *Classification and Nomenclature of Viruses. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Springer, Berlin, pág. 223-233, 1991.
24. [www.Ica.gov.co/epidemianimal/index.asp](http://www.Ica.gov.co/epidemianimal/index.asp)