



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

“ESTUDIO HISTOPATOLOGICO DE TEJIDOS DE CERDOS
PROVENIENTES DE GRANJAS DEL ESTADO DE MEXICO
E HIDALGO SOSPECHOSOS A CIRCOVIRUS PORCINO
TIPO 2”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
GUADALUPE UGALDE VARGAS

ASESORA: M. en C. PATRICIA BEATRIZ GARCIA REYNA
COASESOR: MVZ. VICTOR QUINTERO RAMIREZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO.

2005

M344903



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES-CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

" Estudio histopatológico de tejidos de cerdos provenientes de granjas del Estado de México e Hidalgo sospechosos a Circovirus Porcino tipo 2 "

que presenta la pasante: Guadalupe Ugalde Vargas
con número de cuenta: 09951584-5 para obtener el título de :
Medica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Méx. a 10 de noviembre de 2004

PRESIDENTE MVZ. José Alberto Chavez Enriquez

VOCAL Dr. Jorge Luis Tórtora Perez

SECRETARIO M C. Patricia Beatriz García Reyna

PRIMER SUPLENTE MVZ. Mario Alberto Velasco Jiménez

SEGUNDO SUPLENTE M C. Hugo Ramírez Alvarez

(B)
Juan Antonio Montaraz Crespo
[Firma]
[Firma]
[Firma]

DEDICATORIAS

A mis padres:

Por darme la oportunidad de realizar mis estudios, por impulsarme siempre a ser mejor persona. Agradezco que pueda contar incondicionalmente con ustedes y a ustedes debo la finalización de este trabajo. Esto es solo una pequeña muestra del infinito amor y orgullo que siento por ustedes.

A David:

El amor de mi vida. Eres una de las personas más importantes a quien dedico este esfuerzo, no tengo palabras para decir lo que significas para mi, pero si te agradezco todo el apoyo, la paciencia, comprensión, confianza y el amor que siempre me haz brindado. TE AMO.

A mis hermanos:

Claudia y Alejandro, a ustedes dedico este logro por que son una parte importante de mi vida, aunque no siempre nos llevamos bien se que cuento con ustedes, los quiero.

A todas mis inolvidables mascotas por darme tantas alegrías y dejarme aprender de ellos, a ustedes debo el amor a esta profesión. Gracias.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora:

A Patricia García R. Por toda la paciencia, apoyo, motivación, regaños, conocimientos y ayuda en la realización de este trabajo, pero sobre todo por ser una gran amiga con la que puedo contar en buenos y malos momentos, GRACIAS.

A mi co asesor:

Al MVZ. Víctor Quintero. Por ser parte de la realización y finalización de este trabajo, gracias por la ayuda y amistad brindada.

A mis sinodales:

Al MVZ. José Alberto Chávez., Dr. Jorge Tórtora., M C. Hugo Ramírez y al MVZ. Mario Alberto Velasco, por la revisión y valioso aporte en la finalización de esta tesis. Muchas gracias.

A mis amigos:

Ingrid y Perla: Agradezco haberlas conocido y el pasar momentos tan gratos junto a ustedes.

Valeria y Gustavo: Gracias por la ayuda que me brindaron, pero sobre todo por hacer más sencillo este trabajo.

Agradezco muy especialmente a la MVZ. Yolanda Romero. Por su valiosa ayuda y apoyo en la realización de esta tesis.

INDICE

PÁGINA

Indice de cuadros, figuras y gráficas

Resumen	1
1. Introducción	2
1.1 Definición.....	3
1.2 Etiología.....	3
1.3 Epidemiología.....	5
1.4 Patogenia.....	6
1.5 Signos clínicos.....	9
1.6 lesiones macroscópicas	9
1.7 Lesiones microscópicas	10
1.8 Diagnóstico	11
1.8.1 Diagnostico diferencial	12
1.9 Prevencion y control	13
2. Objetivo	14
2.1 Objetivos particulares	14
3. Diseño experimental	15
4. Material y métodos	15
5. Resultados	16
6. Análisis de resultados	24
6.1 Linfonodos	24
6.2 Bazo	24
6.3 Tonsila faringea	25
6.4 Placas de peyer	25
6.5 Pulmón	27
6.6 Hígado	28
6.7 Riñón	28
7. Discusión	29
8. Conclusiones	32
9. Bibliografía	33

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y GRÁFICAS

	PÁGINA
Figura 1. Microfotografía electrónica de circovirus porcino tipo 2	3
Figura 2. Genoma del circovirus porcino tipo 2	4
Figura 3. Distribución de los primeros brotes de circovirus porcino tipo 2 en el mundo	5
Figura 4. Patogenia	8
Figura 5. Bazo 10x	17
Figura 6. Bazo 40x	18
Cuadro 1. Descripción histopatológica de casos sospechosos al circovirus porcino tipo 2	19
Cuadro 2. Frecuencia de lesiones encontradas en órganos linfoides	22
Cuadro 2. (continuación). Frecuencia de lesiones encontradas en órganos no linfoides	23
Gráfica 1. Porcentaje de depleción en tejido linfoide	25
Grafica 2. Porcentaje de depleción histiocítica en tejido linfoide	26
Grafica 3. Porcentaje de células sincitiales en tejido linfoide	26
Cuadro 3. Resumen del porcentaje de lesiones asociadas al PCV-2 en tejido linfoide	27
Grafica 4. Porcentaje de lesiones halladas en pulmón	27
Grafica 5. Porcentaje de lesiones inflamatorias y fibrosis en el hígado	28
Figura 7. Tonsila 10x	31

RESUMEN.

En ésta revisión se presentan y discuten 30 casos de cerdos que se seleccionaron de acuerdo a los signos clínicos de retraso en el crecimiento, pérdida progresiva de peso, palidez en la piel, ictericia, y trastornos respiratorios leves a moderados y a las lesiones macroscópicas como: hipertrofia de ganglios linfáticos, los pulmones no colapsan, edema intersticial e hígado pálido y atrófico, halladas a la necropsia que se asocian con el PCV-2. Se recolectó tejido linfoide (linfonodos, bazo, tonsila y placas de Peyer), así como tejido pulmonar, hígado y riñón. Estas muestras se cortaron y tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina y posteriormente se evaluaron en un microscopio óptico. Se observaron las lesiones microscópicas características asociadas al PCV-2 como son depleción linfoide en grado variable, infiltrado de células histocíticas y la presencia de sincitios. En los pulmones la lesión principal detectada fue la neumonía intersticial, en el hígado se presentó en mayor proporción un infiltrado inflamatorio mononuclear y en el riñón nefritis intersticial. Estos hallazgos concuerdan con las lesiones microscópicas descritas por otros autores. En el caso específico de la depleción linfoide que se detectó en el tejido linfoide analizado, ésta se asoció no solamente a circovirus, sino probablemente a la existencia de otros agentes infecciosos en la que resaltan los virus, siendo el mas frecuente el de la Fiebre Porcina Clásica (Harding, 1996).

El estudio histopatológico es una excelente herramienta para diagnosticar la enfermedad pero no en todos los casos se pueden apreciar las lesiones microscópicas características ya que estas dependen del grado de infección viral, por lo que se recomienda hacer uso de otras pruebas diagnósticas como: PCR, hibridación in situ, ELISA y la inmunohistoquímica para corroborar la infección por circovirus tipo 2 en cerdos (Sorden, 2000)

1. INTRODUCCIÓN.

La carne de cerdo representa un aporte importante de proteína de origen animal a la dieta de los mexicanos; en nuestro país los valores máximos de producción de carne de cerdo se concentran en las explotaciones tecnificadas o intensivas las cuales disponen de calidad genética, espacios apropiados de acuerdo a la etapa de desarrollo, alimentación con productos balanceados para cada etapa y atención médica (Flores y Agraz, 1983).

El manejo productivo en condiciones intensivas ha provocado la expresión de diferentes patologías en el cerdo que no se ven en condiciones de traspatio. Esto ha obligado a los porcicultores a establecer programas preventivos de manejo, conforme a la problemática de la zona en donde se ubican las granjas. Las causas principales de deterioro o muerte en los cerdos en las explotaciones intensivas son las de origen infeccioso, a las cuales se les invierten una gran parte del presupuesto del manejo productivo y por otro lado, grandes pérdidas en la ganancia de peso de estos animales. (Flores y Agraz., 1983).

El establecimiento de enfermedades emergentes ó el cambio en el comportamiento de las patogenias que afectan a diferentes grupos de animales en la explotación (lactancia, destete, engorda, maternidad), ha obligado a los porcicultores a adaptarse implementando constantes modificaciones en los programas de manejo (Segalés y Domingo, 2003).

La etapa de destete es de gran relevancia en la expresión de diferentes enfermedades infecciosas (bacterianas y virales) las cuales se han asociado entre otras cosas al estrés en que se somete a los lechones al separarlos de la madre (Segalés y cols., 2003).

Una enfermedad viral emergente de reciente descripción en México, que afecta a los cerdos en la etapa de destete y engorda es el circovirus porcino tipo 2 (PCV-2) (Trujano y cols., 2001). Este virus se ha asociado como la causa del síndrome multisistémico de adelgazamiento post-destete (PMWS) (Clark, 1997; Luckert y Allan, 1999 y Rosell y cols., 1999). La descripción del PMWS se originó inicialmente en 1991 en Saskatchewan, Canadá (Harding y Clark, 1996), posteriormente se reportaron casos en muchas otras partes del mundo donde la producción porcina es una actividad económica importante (Allan y Ellis, 2000).

1.1 DEFINICIÓN

El PMWS asociado al circovirus porcino tipo 2 (PCV-2) es una nueva enfermedad propia de cerdos en la etapa de destete y engorda, caracterizada clínicamente por adelgazamiento, palidez de la piel y ocasionalmente ictericia. (Harding y Clark, 1997; Hamel y cols., 1998 y Rosell y cols., 1999).

Algunos autores han propuesto que el PMWS es una enfermedad multifactorial en donde el PCV-2 es necesario para producir la enfermedad, pero no es suficiente para desencadenarla (Allan y cols., 1999; Kennedy y cols., 2000; Krakowka y cols., 2000; 2001; Rovira y cols., 2001; Bolin y cols., 2001 y Harms y cols., 2001).

1.2 ETIOLOGÍA

Dentro de la familia *Circoviridae* se encuentran virus de mamíferos y aves (Murphy y cols., 1999). El genero *circovirus* es el agente etiológico de la Enfermedad del Pico y las Plumas de los Psitácidos (BFDV) y del Circovirus Porcino (PCV) (Fig.1) y en el genero *gyrovirus* se encuentra la Anemia Infecciosa del Pollo (CAV). (Pogranichniy y cols., 2002)

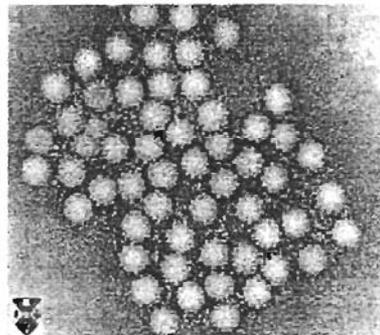


Fig. 1 Microfotografía electrónica mostrando al circovirus porcino tipo 2
Tomado de www.syva.es

El circovirus porcino tiene dos variantes las cuales se han denominado como PCV-1 y el PCV-2 . El PCV-1 fue descrito como un contaminante no citopático de la línea celular PK-15 derivada de riñón porcino, y es aparentemente apatógeno para el cerdo. Distintos estudios demuestran que el PCV-1 no produce ningún tipo de signos clínicos, ni lesiones en porcinos de diferentes edades. (Clark, 1997; Luckert y Allan, 1999 y Rosell y cols., 1999).

El PCV-2 es el agente etiológico del PMWS su diámetro promedio es de 17 nm, de morfología icosaédrica, no envuelto y con una cadena simple de ADN circular. (Tischer y cols., 1982; Pogranichniy y cols., 2002 y Murphy y cols., 1999). El genoma de este virus contiene 1767-68 nucleótidos de los cuales el 80% de estos son idénticos a los nucleótidos aislados del PCV-1 (Allan y cols., 1999; Meehan y cols., 1998 y Mankertz y cols., 2000). Se han identificado distintos marcos de lectura abierta (ORFs) en el genoma viral. Los ORF1 Y ORF2 son los más estudiados. En PCV2 se han descrito entre 6 y hasta 11 ORFs potenciales (Fig. 2).

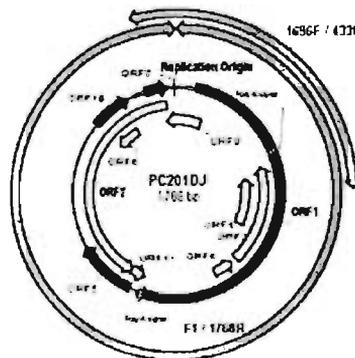


Fig. 2 Diagrama del genoma del PCV-2. Se aprecian los diferentes marcos de lectura (ORF) localizados dentro del genoma.

En base a los estudios realizados, el circovirus porcino es uno de los virus porcinos más resistentes al medio por sus características fisicoquímicas. Su densidad de flotación en CICs es de 1.33-1.34 y resiste la inactivación cuando es expuesto a un medio ácido (pH 3), a cloroformo o temperaturas elevadas (56 y 70 °C) por 15 minutos (Allan y cols., 1999). Así mismo el virus muestra relativa resistencia a desinfectantes como el fenol, formaldehído, cuaternarios de amonio, hidróxido de sodio y otros agentes oxidantes (Allan y cols., 1994; Murphy y cols., 1999 y Royer y cols., 2001).

1.3 EPIDEMIOLOGÍA

El PCV-2 se encuentra ampliamente distribuido, entre los países que han descrito su presencia destacan Canadá, EE.UU., Francia, Alemania, Gran Bretaña, España, Dinamarca, Irlanda del Norte, Suecia, Bélgica, Italia, Holanda, México, Taiwán, Corea del Sur y Japón entre otros. (Tischer y cols., 1982; Dulac y Afshar, 1989; Horner y cols., 1991; Edwards y cols., 1994; Allan y cols., 1994, 1995, 1998, 2000; Morozov y cols., 1998 y Segales y Domingo, 2002) (Fig.3).



Fig. 3 Distribución de los primeros brotes de circovirus porcino tipo 2 en el mundo.
Tomado de www.syva.es

Este virus afecta comúnmente a cerdos entre 2-3.5 meses de edad (Segáles, 2002) sin embargo la enfermedad se ha presentado en cerdos de 1-6 meses de edad. En Japón se han reportado casos en donde se muestran lechones de 3 días de edad infectados en forma natural (Hirai y cols., 2001).

La morbilidad comúnmente es baja, puede variar entre 4-30% (Harding y cols., 1996) y con una elevada mortalidad por arriba del 70-80% en cerdos destetados (Clark, 1997; Morozov y cols., 1998 y Rossell y cols., 1999).

Los hospedadores naturales son el cerdo doméstico y el jabalí. No se han detectado anticuerpos del PCV-2 en vacas, caballos, pequeños rumiantes, perros, gatos e incluso humanos. Experimentalmente se ha conseguido infectar ratones de laboratorio, mientras que el conejo parece ser refractario (Segáles y cols., 2003).

Se sabe que el virus se replica en tejidos linfoides como el timo, bazo, tonsila, placas de Peyer y linfonodos, así como en el hígado, riñón y pulmones (Harding y Clark, 1997).

El virus puede transmitirse por secreciones vía oro-nasal, heces y orina (Segalés, 2002) también puede adquirirse en el útero (Jestin y cols., 2001 y O'Connor y cols., 2001). Por otra parte, se ha aislado PCV-2 en el semen de verracos infectados, aunque no se ha podido demostrar su capacidad infectante, no obstante debe considerarse como una vía potencial de contagio (O'Connor y cols., 2001)

La vía de transmisión oro-nasal es considerada la más común. La transmisión vertical de la madre al feto aun de desconoce sin embargo, se han presentado trastornos reproductivos tales como abortos, aumento del número de nacidos muertos y momias que se a la infección por el virus del PCV-2 (Allan y Ellis, 2000).

1.4 PATOGENIA.

Hasta la fecha se desconoce la patogenia del PCV-2, sin embargo existen diferentes propuestas sobre el posible mecanismo de la infección, según diversos autores (Fig.4).

La inoculación del PCV-2 en cerdos seronegativos a este virus sin otras manipulaciones simultáneas, provoca un cuadro leve a moderado de lesiones linfoides características de PMWS y una forma leve de la enfermedad clínica (Allan y cols., 1999; Balasch y cols., 1999; Kennedy y cols., 2000; Krakowka y cols., 2000; Magar y cols., 2000; Resendes y cols., 2001 y Rovira y cols., 2002). Estos resultados sugieren que probablemente podrían ser necesarios otros factores para el desarrollo completo del PMWS. Por otro lado infecciones experimentales con el PCV-2 han sido capaces de generar un cuadro clínico típico de la enfermedad utilizando solamente el virus (Bolin y cols., 2001; Harms y cols., 2001 y Allan y cols., 2002). De todas formas, no se puede descartar que múltiples factores tales como la edad de los cerdos, condición de los cerdos (convencionales, privados de calostro y derivados de cesárea, gnotobióticos), genética de los animales, dosis de la inoculación viral, aislados del PCV-2 y el origen del virus inoculado (propagado en líneas celulares o procedente de un homogeneizado del tejido de un cerdo con la enfermedad), puedan jugar un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. El PCV-2 suele encontrarse en el citoplasma de las células y más raramente en el núcleo de macrófagos, células dendríticas y células gigantes

multinucleadas de los tejidos linfoides. También se detecta en macrófagos de otras localizaciones del organismo,

incluyendo las células de Kupffer del hígado, macrófagos intersticiales y macrófagos en infiltrados inflamatorios de múltiples órganos de cerdos afectados por PMWS (Clark, 1997, Rosell y cols., 1999; Kennedy y cols., 2000 y Krakowka y cols., 2000). Es sorprendente que un virus DNA tal como el PCV-2, del cual se sabe que se replica en el núcleo celular (Tischer y cols., 1987), se encuentre básicamente en el citoplasma y raramente en el núcleo. No se tiene una explicación para ello, pero sí se conoce que un bajo porcentaje de macrófagos, hepatocitos y células epiteliales/endoteliales presentan materiales vírales en el núcleo, sugiriendo que estos tipos celulares sí podrían jugar un papel importante en la replicación del PCV-2 (Kennedy y cols., 2000; Rosell y cols., 2000 y Rovira y cols., 2002). Sin embargo el mecanismo por el cual se genera una depleción linfocitaria tampoco se ha establecido. Se ha sugerido que esta depleción se podría generar por una vía indirecta en la cual la apoptosis, desequilibrios de citoquinas y/o la alteración en la migración de linfocitos podrían estar implicados. Esto se basa en el hecho de que un bajo número de linfocitos se encuentran infectados con el PCV-2, mientras que un número relativamente elevado de estas células se encuentran apoptóticas (Shibahara y cols., 2000). Estos datos indican que el PCV-2 interacciona con el sistema inmune y sus componentes celulares, no obstante, actualmente se desconoce cómo se establece esta interacción en la fase inicial de la infección y cómo esta interacción evoluciona hacia el PMWS o bien hacia una infección subclínica (Gilpin y cols., 2001).

Investigaciones recientes han demostrado que el sistema inmune se comporta como un arma de doble filo para la infección por el PCV-2. Por un lado, la inoculación de otros virus tales como el Parvovirus Porcino (PPV) o el virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV) conjuntamente con el PCV-2 provoca una aparente estimulación del sistema inmune incrementando la replicación de este último virus en cerdos co-infectados (Allan y cols., 1999, 2000; Krakowka y cols., 2000; Harms y cols., 2001 y Rovira y cols., 2002). Es más, la utilización del sistema inmune de cerdos infectados con PCV-2 utilizando agentes no-infecciosos también ha resultado en PMWS (Krakowka y cols., 2001). Por ello todos estos datos han sugerido que la inmunoestimulación es un evento primordial para el desarrollo de la enfermedad clínica (Krakowka y cols., 2001). Aún no se ha demostrado el efecto del PCV-2 sobre el sistema inmune de cerdos afectados con la enfermedad o en cerdos infectados subclínicamente con el virus. Por otro lado la existencia de lesiones microscópicas en órganos linfoides (Segalés y cols., 1997 y Rosell y cols., 1999), la infección por patógenos oportunistas en cerdos con PMWS (Clark, 1997 y Carrasco y cols., 2000) y cambios en las subpoblaciones de células del sistema inmune en sangre periférica y en tejidos linfoides (Segalés y cols., 2001; Chianini y cols., 2002 y Darwich y cols., 2002) son hallazgos habituales que sugieren la imposibilidad de montar una respuesta inmune normal en los cerdos afectados. Por lo tanto, los cerdos afectados con el PCV-2 probablemente se encuentren en un estado de inmunosupresión (Segalés y cols., 2001).

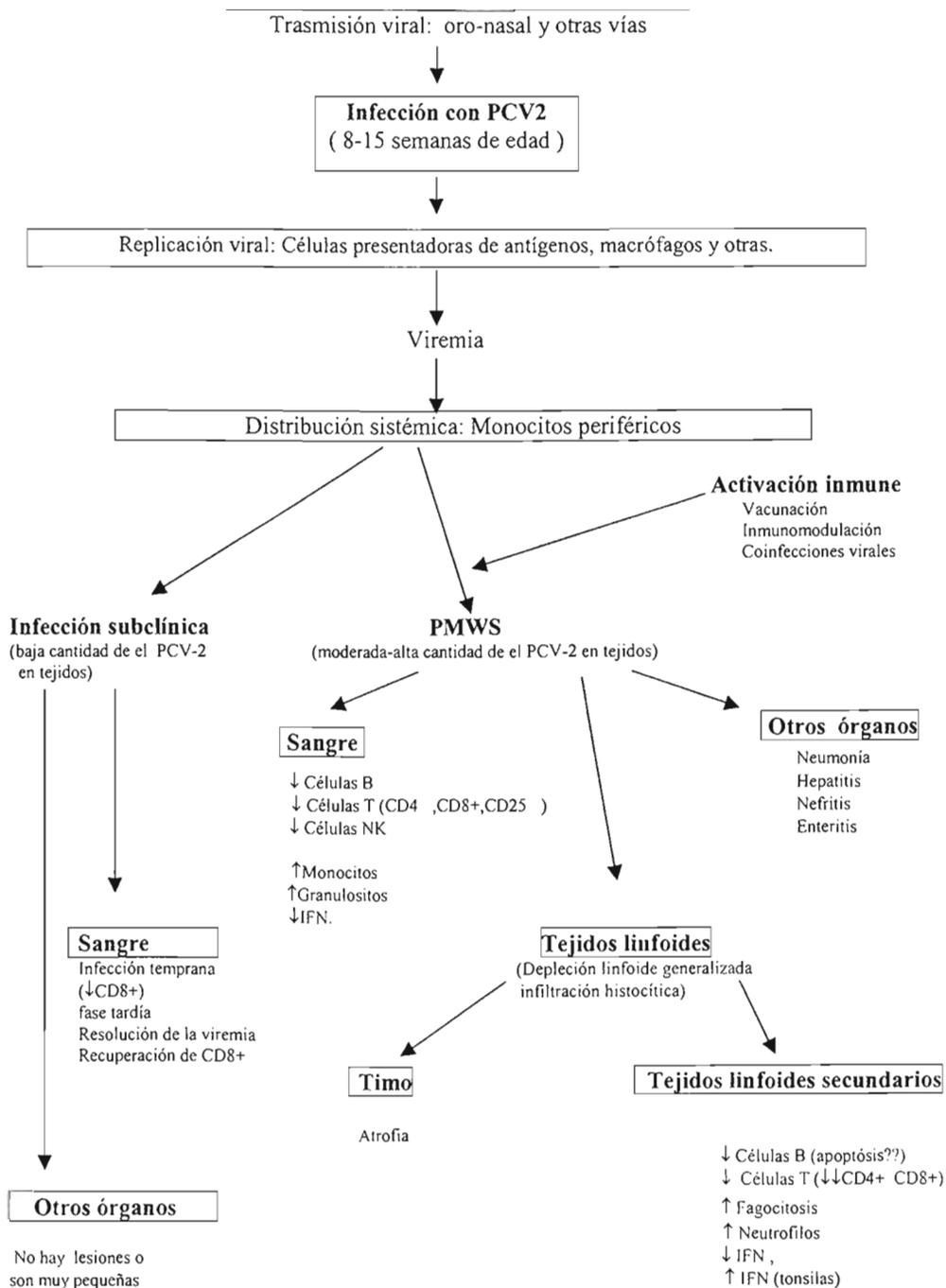


Fig. 4. Patogenia de la infección con el PC-2 (Darwich y cols., 2004)

1.5 SIGNOS CLÍNICOS

Esta enfermedad se caracteriza por retraso en el crecimiento, pérdida progresiva de peso, palidez en la piel, ocasionalmente presenta ictericia, hipertrofia de linfonodos y trastornos respiratorios leves a moderados (Clark., 1997; Hardingand Clark., 1997; Rossell y cols., 1999 y Segalés., 2002).

1.6 LESIONES MACROSCÓPICAS

Los cadáveres de cerdos con PCV-2 están en malas condiciones mostrando diferentes grados de emaciación muscular y la piel esta moderadamente pálida e ictérica. A la necropsia, las lesiones más importantes asociadas al PCV-2 son el aumento de tamaño de los linfonodos principalmente: inguinal superficial, mandibular, mesentéricos y mediastínicos (Rosell y cols., 1999); en los linfonodos pueden presentarse áreas de necrosis multifocal (Segalés y cols., 2000), la cual es probablemente la principal característica en cerdos afectados por el PCV-2. Los pulmones no colapsan se muestran pesados y firmes, también presentan edema intersticial marcado (Segalés., 2002), sin embargo estas lesiones no son consistentes. Un porcentaje de los animales afectados por PCV-2 muestran también el hígado pálido y atrófico; el riñón, en la corteza muestra palidez focal y/o multifocal (Segalés y cols., 2000). También pueden presentarse úlceras gástricas de origen multietiológico, sin embargo las lesiones del estómago causan hemorragias internas, por lo que llevan a la muerte a un gran número de cerdos con el PCV-2. Esto además es responsable de la palidez de la piel que se relaciona frecuentemente con esta enfermedad (Segalés y cols., 2000). En casos crónicos, los cerdos pueden desarrollar caquexia (Rosell y cols., 1999)

1.7 LESIONES MICROSCÓPICAS

Histopatológicamente las lesiones más importantes en cerdos con PMWS se presentan en tejidos linfoides, donde existe una depleción linfoide variable, usualmente se presenta combinada con una característica infiltración histiocítica escasa o abundante y presencia de células gigantes multinucleadas. Otro hallazgo es la presencia de células histiocíticas con cuerpos de inclusión basófilos intracitoplasmáticos pertenecientes al PCV-2 que son morfológicamente característicos (Oroveerkal y cols., 1993; Clark., 1997 y Rosell y cols., 1999). La neumonía intersticial es la lesión más importante en el pulmón, en algunos casos hay presencia de células gigantes multinucleadas e histocitos en la pared intra alveolar

y/o alveolar, en los casos crónicos puede presentarse bronquitis fibrinosa. En las lesiones hepáticas puede presentarse una infiltración linfocítica e histiocítica en la zona porta, hinchazón y vacuolización del citoplasma de los hepatocitos, necrosis de los hepatocitos que es la causa de la ictericia, siendo la lesión macroscópica principal en el hígado (Rosell y cols., 2000). Otras lesiones detectadas incluyen infiltración linfohistiocítica en el riñón, páncreas, intestinos y esporádicamente en el miocardio (Clark, 1997; Rosell y cols., 1999 y Kennedy y cols., 2000).

1.8 DIAGNÓSTICO.

En general el diagnóstico final del PMWS se establece en base a 3 criterios:

1. La presencia de signos clínicos compatibles con PMWS.
2. La presencia de lesiones histopatológicas características (Rossel y cols., 1999).
3. La detección de PCV-2 en los tejidos afectados (Sorden y cols., 2000).

En la mayoría de los casos el PCV-2 se encuentra en cantidades variables en los tejidos utilizando las técnicas moleculares de detección, sin embargo siempre se debe asociar a la presencia de lesiones microscópicas. El tejido linfoide es el más indicado para establecer este diagnóstico (Segalés y cols., 2002).

Se ha observado una fuerte relación entre la cantidad del virus y la severidad de lesiones microscópicas, sin embargo también es posible detectar PCV-2 en tejidos de cerdos clínicamente sanos, en estos casos la cantidad de virus y la intensidad de las lesiones histopatológicas son menores (Krakowka y cols., 2001; Quintana y cols., 2001 y Rovira y cols., 2002).

Por otra parte a nivel de investigación se ha detectado el virus PCV-2 mediante pruebas inmunológicas como ELISA, inmunofluorescencia sobre cortes congelados, inmunohistoquímica en cortes de parafina e inmunoperoxidasa en monocapas en cultivos de células PK-15, sin embargo éstas técnicas aun no están disponibles en el mercado (Luckert y Allan, 1999).

Se han utilizado otros métodos de diagnóstico moleculares para la detección de el PCV-2 también en tejidos y que se del mismo modo se deben relacionar con la presencia de lesiones. Entre ellas se encuentra, la hibridación *in situ*, que son de las más utilizadas (McNeilly y cols., 1999; Rosell y cols., 1999 y Segalés., 2002). Finalmente otra estrategia para detectar el PCV-2 es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Choi y cols., 2000; Fenaux y cols., 2000; Hamel y cols., 2000 y Larochelle y cols., 1999; Quintana y cols., 2001). Recientemente en un estudio se muestra que el PCR es la técnica más sensible para la detección de PCV-2. Esta prueba es muy valiosa ya que puede ayudar a diagnosticar la enfermedad *in vivo*, (Liu y cols., 2000; Rovira y cols., 2001 y Segalés, 2002).

1.8.1 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.

El diagnóstico diferencial del PCV-2 desde el punto de vista clínico, puede ser muy amplio y depende de los signos clínicos dominantes en cada granja en particular. Uno de los signos clínicos que con frecuencia se observa en los casos de PCV-2 es la disnea y a su vez histopatológicamente se caracteriza por presentar una neumonía de tipo intersticial. Originalmente la neumonía intersticial se ha asociado con el Síndrome Respiratorio y Reproductivo del Cerdo (PRRS). Debido a la alta prevalencia del PRRS a nivel mundial es necesaria la diferenciación entre ambas entidades utilizando la amplia variedad de pruebas diagnósticas que existen para ello. Incluso es importante considerar que estas enfermedades pueden coexistir conjuntamente en las granjas (Segalés, 2001). Por otro lado, otras patologías pueden ser consideradas en el cuadro respiratorio, entre ellas esta la influenza porcina, *Mycoplasma hyopneumoniae* y en el caso de México la Enfermedad del Ojo Azul (Clark, 1996; Ellis y cols., 1998; Rossow, 1998; Larochelle y cols., 1999; Harms y cols., 2001).

El adelgazamiento en el cerdo (desmedro) es otro signo que se presenta en los animales afectados por PMWS, sin embargo es muy inespecífico ya que se presenta en una gran variedad de enfermedades. Entre estas se pueden considerar desde los desórdenes nutricionales hasta una gran variedad de infecciones (bacterianas, virales, parasitarias). Por ello, su presentación se debe de tomar con mucha reserva durante la evaluación clínica de la enfermedad.

En cuanto a la afección del tejido linfoide son bien conocidos los cuadros de depleción asociados a infecciones virales (ej. Fiebre porcina clásica). Sin embargo, la presencia de infiltrado histiocítico y la formación de sincitios que identifican una lesión de tipo granulomatosa circunscrita al tejido linfoide, son una característica que solo se describe en el PCV-2 (Darwich y cols., 2004).

Así también, el PCV-2 se ha asociado a la falla reproductiva en las hembras en las que se presentan abortos, aparición de momias y aumento del número de nacidos muertos. Este tipo de afección a nivel de reproductor también puede encontrarse en granjas afectadas por PRRS ó Parvovirus Porcino (PPV) (West y cols., 1999). Sin embargo en el caso del PCV-2 a nivel histológico se ha descrito a la miocarditis necrotizante como una lesión característica que no se presenta en los fetos abortados en el caso de PRRS y PPV (Pensaert y col., 2004).

Por otra parte, a nivel hepático la lesión causada por el PCV-2 describe presentación inflamatoria con infiltrado mononuclear y cuadros de fibrosis variables. Sin embargo, estas lesiones pueden ser vistas en la afección por el Virus de la Hepatitis E (HEV) (Meng y cols., 1997), la Enfermedad de Aujeszky (Rodríguez y cols., 1999), PPV (Ellis y cols., 2000; Allan y cols., 2000 y Krakowka y cols., 2000) y PRRS (Harms y cols., 2001). Es posible, por otro lado que estas lesiones las acompañe un cuadro granulomatoso con infiltración histiocítica y presencia de sincitios, lo que hace de esta descripción una característica del PCV-2 (Segalés, 2001).

1.9 PREVENCIÓN Y CONTROL

El diagnosticar en forma rápida y correcta la enfermedad, así como la separación de animales enfermos en las granjas y el realizar buenas prácticas de manejo, podrían ser el único método actual de controlar las pérdidas atribuidas al PMWS (Kennedy y cols., 2002).

Se deben llevar a cabo estrictas medidas de manejo, utilizando el método de "todo dentro-todo fuera", separación de los animales por edades, disminuir la densidad de la población en una misma nave, mantener buenos niveles de anticuerpos calostrales, realizar un programa de vacunación efectivo, dirigido a las enfermedades presentes en la granja, mantener buenas condiciones de higiene, ventilación y temperatura, así como eliminar otros patógenos circulantes (Mateo., 2002).

Actualmente, el conocimiento acerca del control del PMWS es muy escaso. Los circovirus son altamente resistentes a la inactivación y es difícil realizar la desinfección de los locales infectados (Rover y cols., 2001). Hasta la fecha no existe una vacuna para el control del PCV-2, aunque, se ha propuesto el desarrollo de vacunas autógenas. Sin embargo, a este tipo de vacunas se recurre en muy pocas ocasiones debido a que el cultivo y desarrollo del virus a niveles suficientes, es difícil para producirlas.

La seroterapia es una estrategia que ha implementado en algunos países europeos en los que se ha observado una reducción notable en la mortalidad (Ferreira y cols., 2001 y Waddilove y cols., 2002). Sin embargo, su utilización es también un gran riesgo, ya que se corre el peligro de introducir otros patógenos a la granja (Segalés, 2002).

2. OBJETIVO.

Analizar histopatológicamente los tejidos de cerdos provenientes de granjas sospechosas al Circovirus Porcino tipo 2 del Estado de México e Hidalgo.

2.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Colectar un mínimo 30 cerdos sospechosos al PMWS.
- Realizar la necropsia de los cerdos e identificar las lesiones macroscópicas sugestivas de PMWS.
- Procesar muestras histológicas de los siguientes órganos: linfonodo mesentérico, mandibular, bronquial, bazo, tonsila faríngea, pulmón, hígado, riñón e intestino de cerdos.
- Evaluar por histopatología los cortes de tejidos de los cerdos seleccionados
- Analizar las lesiones encontradas en la histopatología de acuerdo a los criterios propuestos por Rosell y col., 1999 en tablas de frecuencia y distribución por porcentajes.

3. DISEÑO EXPERIMENTAL.

A partir de 40 cerdos detectados clínicamente como sospechosos de presentar PMWS, al realizar la necropsia se seleccionaron 30 casos de los cuales presentaban las lesiones macroscópicas descritas asociadas a PMWS, como son neumonía intersticial, hipertrofia de linfonodos, palidez corporal, y emaciación como referencia morfológica macroscópica. Posteriormente de los cerdos seleccionados se tomaron muestras para histopatología de cada animal, las cuales consistieron en: tejido linfoide (linfonodos: mesentérico, mandibular y bronquial, bazo, tonsila faríngea), así como del pulmón, hígado, riñón e intestino, según los criterios sugeridos por Rosell y cols., 1999. Las muestras se conservaron en formalina bufferada al 10% hasta su procesamiento histológico. Durante el procesamiento histológico se siguieron los lineamientos de inclusión en parafina y posteriormente la tinción con hematoxilina & eosina convencionales (Rosell y cols., 1999)

Para evaluar los resultados histopatológicos se utilizaron tablas de frecuencia distinguiendo los distintos tipos de lesiones comunes al circovirus porcino tipo 2 y las frecuencias a su vez se reportaron en porcentaje.

4. MATERIAL Y MÉTODOS.

Se seleccionaron clínicamente 40 cerdos provenientes de la etapa de destete y la engorda con características sugestivas al PMWS. Los cerdos se ubicaron de granjas localizadas en los siguientes municipios:

- Texcoco, Estado de México.
- Zumpango, Estado de México.
- Coacalco, Estado de México.
- Jilotepec, Estado de México.
- Tlaxcoapan, Hidalgo.

Las características de las granjas fueron:

1. Inventario de 300 o más vientres.
2. Salas de destete con jaulas de pisos de malla.
3. Alimentación con preiniciador comercial de la misma marca con medicación.
4. Temperatura controlada con calefacción de gas y extractor eléctrico.
5. Aplicando el siguiente calendario de vacunación:
 - Parvovirus porcino 3 veces al año.
 - Fiebre Porcina Clásica a los 60 días en lechones y 15 días post parto en hembras.
 - *Haemophilus parasuis* a los 21 días en lechones.
 - *Escherichia coli* 21 días antes del parto.
 - *Mycoplasma hyoneumoniae* 30 días antes del parto.
 - Aujezky 3 veces al año en hembras, en Tlaxcoapan se aplica a los lechones a las 10 semanas de edad.

3. DISEÑO EXPERIMENTAL.

A partir de 40 cerdos detectados clínicamente como sospechosos de presentar PMWS, al realizar la necropsia se seleccionaron 30 casos de los cuales presentaban las lesiones macroscópicas descritas asociadas a PMWS, como son neumonía intersticial, hipertrofia de linfonodos, palidez corporal, y emaciación como referencia morfológica macroscópica. Posteriormente de los cerdos seleccionados se tomaron muestras para histopatología de cada animal, las cuales consistieron en: tejido linfoide (linfonodos: mesentérico, mandibular y bronquial, bazo, tonsila faríngea), así como del pulmón, hígado, riñón e intestino, según los criterios sugeridos por Rosell y cols., 1999. Las muestras se conservaron en formalina bufferada al 10% hasta su procesamiento histológico. Durante el procesamiento histológico se siguieron los lineamientos de inclusión en parafina y posteriormente la tinción con hematoxilina & eosina convencionales (Rosell y cols., 1999)

Para evaluar los resultados histopatológicos se utilizaron tablas de frecuencia distinguiendo los distintos tipos de lesiones comunes al circovirus porcino tipo 2 y las frecuencias a su vez se reportaron en porcentaje.

4. MATERIAL Y MÉTODOS.

Se seleccionaron clínicamente 40 cerdos provenientes de la etapa de destete y la engorda con características sugestivas al PMWS. Los cerdos se ubicaron de granjas localizadas en los siguientes municipios:

- Texcoco, Estado de México.
- Zumpango, Estado de México.
- Coacalco, Estado de México.
- Jilotepec, Estado de México.
- Tlaxcoapan, Hidalgo.

Las características de las granjas fueron:

1. Inventario de 300 o más vientres.
2. Salas de destete con jaulas de pisos de malla.
3. Alimentación con preiniciador comercial de la misma marca con medicación.
4. Temperatura controlada con calefacción de gas y extractor eléctrico.
5. Aplicando el siguiente calendario de vacunación:
 - Parvovirus porcino 3 veces al año.
 - Fiebre Porcina Clásica a los 60 días en lechones y 15 días post parto en hembras.
 - *Haemophilus parasuis* a los 21 días en lechones.
 - *Escherichia coli* 21 días antes del parto.
 - *Mycoplasma hyoneumoniae* 30 días antes del parto.
 - Aujesky 3 veces al año en hembras, en Tlaxcoapan se aplica a los lechones a las 10 semanas de edad.

- Ojo azul, solo en Texcoco y Zumpango 30 días antes del parto en hembras y a los 30 días de edad en lechones.

Los cerdos seleccionados se encontraron en un rango de edad entre 16 y 70 días, manifestaron características clínicas compatibles con el PMWS (retraso en el crecimiento, pérdida progresiva de peso, palidez en la piel, ocasionalmente presenta ictericia, hipertrofia de linfonodos y trastornos respiratorios leves a moderados) y lesiones macroscópicas halladas a la necropsia (hipertrofia de ganglios linfáticos, los pulmones no colapsan, edema intersticial e hígado pálido y atrófico) determinando un total de 30 animales a los cuales se les tomaron las muestras correspondientes para el análisis histopatológico que constaron de: tejido linfoide (linfonodos: mesentérico, mandibular, bronquial, bazo, tonsila faríngea), así como del pulmón, hígado, riñón e intestino. Las muestras se fijaron por inmersión en formalina bufferada al 10% y posteriormente se procesaron para su deshidratación e inclusión en parafina. En seguida se realizaron cortes de 5-8µm de diámetro, los cortes utilizados se colocaron en baño de flotación a 37°C con grenetina previamente disuelta, para que se extendieran y se adhirieran al portaobjetos. Después, se dejaron secar durante 10 minutos sobre una parrilla a 37°C. Posteriormente, para teñir los cortes, se desparafinaron e hidrataron, haciéndolos pasar en tres cambios sucesivos de xilol durante 10 minutos cada uno. Posteriormente se hicieron pasar por alcohol de 100°, 96°, 70°, y 50° por 3 minutos en cada uno. Se tiñeron con la técnica de hematoxilina y eosina (H&E) (Rosell y cols., 1999). Los cortes se colocaron en la solución hematoxilina de Harris durante 10 minutos, el exceso de colorante se eliminó con agua corriente y se realizaron varios pases en agua destilada. Finalmente se introdujeron en eosina alcohólica durante 2 a 3 minutos. Los cortes se colocaron en alcoholes de 96° y alcohol absoluto durante 5 minutos cada uno. Para aclarar los cortes ya teñidos, se colocaron en xilol durante 5 minutos y después se cubrieron con resina para colocar sobre ellos el cubreobjetos. La evaluación de los cortes histológicos se realizó en un microscopio óptico y su descripción se recopiló en tablas elaboradas en el programa de Excel.

5. RESULTADOS.

Se realizaron aproximadamente 40 necropsias en granja de las cuales se seleccionaron 30 animales que correspondieron al cuadro clínico y a las lesiones macroscópicas características descritas en el PMWS.

Durante el análisis histopatológico para el tejido linfoide se tomaron en consideración las siguientes características: Depleción linfoide, infiltración histiocítica, células sincitiales (cuadro 1). Por otro lado en la evaluación de órganos como el pulmón, riñón e hígado se tomó en consideración las siguientes patologías: neumonía intersticial, nefritis intersticial infiltrado inflamatorio y fibrosis en el hígado (cuadro 1. continuación).

- Ojo azul, solo en Texcoco y Zumpango 30 días antes del parto en hembras y a los 30 días de edad en lechones.

Los cerdos seleccionados se encontraron en un rango de edad entre 16 y 70 días, manifestaron características clínicas compatibles con el PMWS (retraso en el crecimiento, pérdida progresiva de peso, palidez en la piel, ocasionalmente presenta ictericia, hipertrofia de linfonodos y trastornos respiratorios leves a moderados) y lesiones macroscópicas halladas a la necropsia (hipertrofia de ganglios linfáticos, los pulmones no colapsan, edema intersticial e hígado pálido y atrófico) determinando un total de 30 animales a los cuales se les tomaron las muestras correspondientes para el análisis histopatológico que constaron de: tejido linfoide (linfonodos: mesentérico, mandibular, bronquial, bazo, tonsila faríngea), así como del pulmón, hígado, riñón e intestino. Las muestras se fijaron por inmersión en formalina bufferada al 10% y posteriormente se procesaron para su deshidratación e inclusión en parafina. En seguida se realizaron cortes de 5-8µm de diámetro, los cortes utilizados se colocaron en baño de flotación a 37°C con grenetina previamente disuelta, para que se extendieran y se adhirieran al portaobjetos. Después, se dejaron secar durante 10 minutos sobre una parrilla a 37°C. Posteriormente, para teñir los cortes, se desparafinaron e hidrataron, haciéndolos pasar en tres cambios sucesivos de xilol durante 10 minutos cada uno. Posteriormente se hicieron pasar por alcohol de 100°, 96°, 70°, y 50° por 3 minutos en cada uno. Se tiñeron con la técnica de hematoxilina y eosina (H&E) (Rosell y cols., 1999). Los cortes se colocaron en la solución hematoxilina de Harris durante 10 minutos, el exceso de colorante se eliminó con agua corriente y se realizaron varios pases en agua destilada. Finalmente se introdujeron en eosina alcohólica durante 2 a 3 minutos. Los cortes se colocaron en alcoholes de 96° y alcohol absoluto durante 5 minutos cada uno. Para aclarar los cortes ya teñidos, se colocaron en xilol durante 5 minutos y después se cubrieron con resina para colocar sobre ellos el cubreobjetos. La evaluación de los cortes histológicos se realizó en un microscopio óptico y su descripción se recopiló en tablas elaboradas en el programa de Excel.

5. RESULTADOS.

Se realizaron aproximadamente 40 necropsias en granja de las cuales se seleccionaron 30 animales que correspondieron al cuadro clínico y a las lesiones macroscópicas características descritas en el PMWS.

Durante el análisis histopatológico para el tejido linfoide se tomaron en consideración las siguientes características: Depleción linfoide, infiltración histiocítica, células sincitiales (cuadro 1). Por otro lado en la evaluación de órganos como el pulmón, riñón e hígado se tomó en consideración las siguientes patologías: neumonía intersticial, nefritis intersticial infiltrado inflamatorio y fibrosis en el hígado (cuadro 1. continuación).

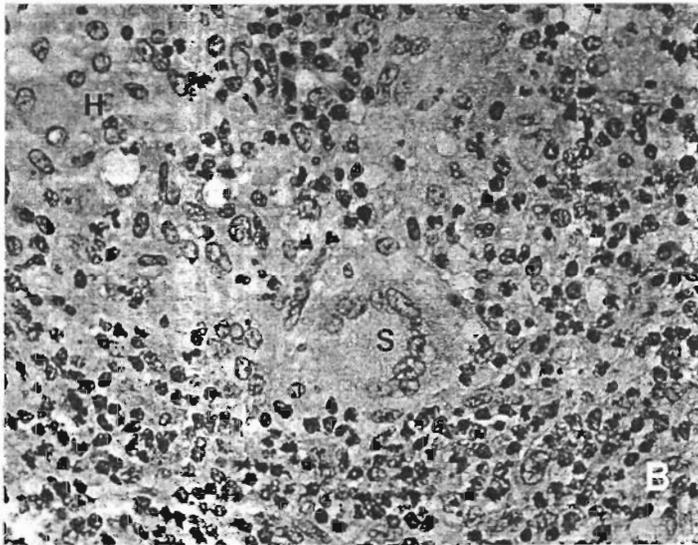


Fig. 5. A. Bazo 10 x. Se observa una depleción linfoide moderada (DL) con focos de infiltración histiocítica (H). B. Bazo 40 x. Se aprecian los acúmulos de histiocitos en los centros germinales (H) y sincitios característicos en PCV-2 (S).

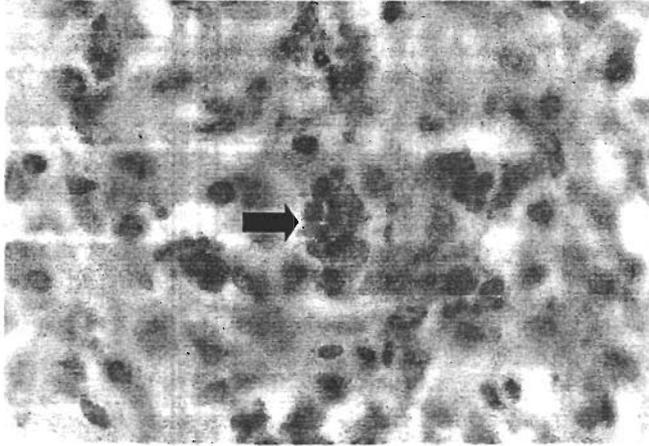


Fig. 6. Bazo 40x. Acercamiento histológico de los cuerpos de inclusión producidos por el circovirus porcino tipo 2. En esta imagen se observan cuerpos densos de diferentes tamaños, localizados en las células histiocíticas (flecha).

CUADRO 1.

DESCRIPCIÓN HISTOPATOLÓGICA DE CASOS SOSPECHOSOS AL CIRCUMVIRUS PORCINO TIPO 2.

HALLAZGOS MICROSCÓPICOS	NÚMERO DE CASO														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
LINFONODO															
DEPLECIÓN LINFOIDE	(++)	(++)	(++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+)	(+++)	(+++)	(-)	(++)	(+++)	(+)	(+++)	(+-
PROLIFERACIÓN HISTIOCÍTICA	(+)	(-)	(++)	(-)	(+)	(++)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
CÉLULAS SINCITIALES	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
CUERPOS DE INCLUSIÓN INTRACITOPLASMÁTICOS	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
NECROSIS/APOPTÓISIS	A	(-)	(-)	(-)	n/A	n/A	(-)	n/A	(-)	n	n	n	n	(-)	n
INFILTRACIÓN INFLAMATORIA	ELM	(-)	EN	EN	ENM	ENL	(-)	ML	EML	ML	NLE	NLE	EN	(-)	(-)
FIBROSIS	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	SI	(-)	(-)	(-)
BAZO															
DEPLECIÓN LINFOIDE	(++)	(+)	(++)	(++)	(+++)	(+++)	(+)	(++)	(++)	(++)	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+-
PROLIFERACIÓN HISTIOCÍTICA	(+)	(+)	(-)	(+)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
CÉLULAS SINCITIALES	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
CUERPOS DE INCLUSIÓN INTRACITOPLASMÁTICOS	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
NECROSIS/APOPTÓISIS	A	A	(-)	A	n/A	(-)	(-)	(-)	n	n/A	(-)	n	n	(-)	n/A
INFILTRACIÓN INFLAMATORIA	EN	EN	(-)	EN	EN	(-)	(-)	EML	EML	EN	(-)	NL	EN	(-)	EN
TONSILA FARINGEA															
DEPLECIÓN LINFOIDE	(-)	(++)	(-)	(++)	(++)	(+++)	(-)	(+++)	(+++)	(++)	(++)	(-)	(-)	(++)	(-)
PROLIFERACIÓN HISTIOCÍTICA	(-)	(++)	(-)	(-)	(-)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
CÉLULAS SINCITIALES	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
CUERPOS DE INCLUSIÓN INTRACITOPLASMÁTICOS	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
NECROSIS/APOPTÓISIS	(-)	n	(-)	n	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	n	A	(-)	(-)	n	(-)
INFILTRACIÓN INFLAMATORIA	(-)	(-)	(-)	N	N	N	(-)	NEL	(-)	N	N	(-)	(-)	MLN	
PLACAS de PEYER															
DEPLECIÓN LINFOIDE	(+++)	(+++)	(+++)	(++)	(+)	(+)	(+)	(++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+)	(+++)	(+++)	(+)
PROLIFERACIÓN HISTIOCÍTICA	(-)	(++)	(-)	(++)	(-)	(-)	(-)	(++)	(-)	(-)	(++)	(-)	(-)	(++)	(-)
CÉLULAS SINCITIALES	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
CUERPOS DE INCLUSIÓN INTRACITOPLASMÁTICOS	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
NECROSIS/APOPTÓISIS	(-)	n/A	(-)	(-)	(-)	n	(-)	n/A	N	(-)	n/A	N	n/A	N	A
INFILTRACIÓN INFLAMATORIA	(-)	MLN	(-)	(-)	(-)	ML	(-)	ML	(-)	(-)	NIE	N	MLN	N	N

(+) leve (++) moderado (+++) severo (M) monocitos (L) linfocitos (E) eosinófilos
(N) neutrófilos (A) apoptosis (n) Necrosis

Cuadro 1 (continuación).

DESCRIPCIÓN HISTOPATOLÓGICA DE CASOS SOSPECHOSOS AL CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2.

HALLAZGOS MICROSCÓPICOS

NÚMERO DE CASO

LINFONODO

	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
DEPLECIÓN LINFOIDE															
PROLIFERACIÓN HISTIOCÍTICA															
CÉLULAS SINCITIALES	(+++)	(++)	(+)	(++)	(+++)	(+)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	(+)	(++)	(+++)	(+++)	(+)
CUERPOS DE INCLUSIÓN INTRACITOPLASMATICOS	(+)	(-)	(-)	(-)	(++)	(-)	(+)	(++)	(-)	(-)	(+)	(++)	(+)	(+)	(-)
NECROSIS/APOPTÓISIS	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
INFILTRACIÓN INFLAMATORIA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
FIBROSIS	n	n	(-)	n/A	n/A	(-)	n	(-)	n	n/A	n	n/A	n	N	(-)
BAZO	EN	LM	(-)	EN	EN	(-)	EN	(-)	MLE	(-)	ML	EN	NLE	(-)	(-)
	SI	(-)	(-)	SI	SI	(-)	SI	(-)	SI	(-)	(-)	SI	SI	(-)	(-)

DEPLECIÓN LINFOIDE

PROLIFERACIÓN HISTIOCÍTICA

CÉLULAS SINCITIALES

CUERPOS DE INCLUSIÓN INTRACITOPLASMATICOS

NECROSIS/APOPTÓISIS

INFILTRACIÓN INFLAMATORIA

TONSILA FARINGEA

DEPLECIÓN LINFOIDE	(++)	(++)	(-)	(+++)	(-)	(-)	(++)	(+++)	(+++)	(-)	(++)	(+++)	(+++)	(-)	(-)
PROLIFERACIÓN HISTIOCÍTICA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(-)	(-)	(-)
CÉLULAS SINCITIALES	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
CUERPOS DE INCLUSIÓN INTRACITOPLASMATICOS	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
NECROSIS/APOPTÓISIS	(-)	(-)	(-)	n/A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)	(-)	(-)
INFILTRACIÓN INFLAMATORIA	N	N	(-)	N	(-)	(-)	N	MLE	ML	(-)	(-)	ML	MLN	(-)	(-)

PLACAS de PEYER

DEPLECIÓN LINFOIDE	(+)	(+)	(+++)	(++)	(++)	(+)	(++)	(+)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+++)	(+++)	(+)
PROLIFERACIÓN HISTIOCÍTICA	(-)	(-)	(++)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(-)	(-)	(++)	(++)	(-)	(-)
CÉLULAS SINCITIALES	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
CUERPOS DE INCLUSIÓN INTRACITOPLASMATICOS	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
NECROSIS/APOPTÓISIS	(-)	N	n/A	n	(-)	(-)	n	(-)	n/A	(-)	(-)	n/A	n/A	N	(-)
INFILTRACIÓN INFLAMATORIA	(-)	(-)	N/E	N/E	(-)	(-)	N	(-)	MLN	(-)	(-)	N	N	N	(-)

(+) leve (++) moderado (+++) severo (M) monocitos (L) linfocitos (E) eosinófilos
(N) neutrófilos (A) apoptosis (n) Necrosis

Cuadro 1 (continuación).

DESCRIPCIÓN HISTOPATOLÓGICA DE CASOS SOSPECHOSOS AL CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2.

HALLAZGOS MICROSCÓPICOS	NÚMERO DE CASO														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
PULMÓN															
CÉLULAS SINCITIALES	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
NEUMONIA INTERSTICIAL	(-)	(+)	(+)	(++)	(++)	(++)	(+++)	(-)	(+)	(++)	(++)	(+)	(+++)	(++)	(+)
BRONCONEUMONÍA PURULENTA	(-)	(+)	(+)	(-)	(+++)	(++)	(-)	(-)	(+)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
HÍGADO															
INFLAMACIÓN	LMN	ML	LMN	LM	(-)	M(+)	LM	LM	L+	L+	(-)	LM	(-)	LM	LM
FIBROSIS	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	leve	leve	mod	(-)	leve	(-)	(-)	(-)
RIÑÓN															
FIBROSIS	leve	leve	(-)	(-)	(-)	(-)	mod	mod	leve	leve	mod	mod	mod	(-)	leve
NEFRITIS INTERSTICIAL	(-)	(-)	L	L	(-)		LM	L	(-)	(-)	LM	(-)	(-)	LM	LM

HALLAZGOS MICROSCÓPICOS	NÚMERO DE CASO														
	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
PULMÓN															
CÉLULAS SINCITIALES	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
NEUMONIA INTERSTICIAL	(+)	(++)	(++)	(+++)	(+++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(++)	(+)	(++)	(++)	(+++)	(+++)
BRONCONEUMONÍA PURULENTA	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
HÍGADO															
INFLAMACIÓN	LM	LM	LMN	LMN	(-)	N/E	LM	LM	LM	(-)	N/E	LM	LMN	LM	N/E
FIBROSIS	leve	mod	mod	leve	(-)	(-)	(-)	(-)	mod	(-)	(-)	(-)	mod	(-)	(-)
RIÑÓN															
FIBROSIS	(-)	mod	leve	leve	leve	mod	mod	leve	mod	mod	mod	(-)	leve	leve	leve
NEFRITIS INTERSTICIAL	(-)	LM	LM	LM	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

(+) leve (++) moderado (+++) severo (L) linfocitos (M) monocitos (N) neutrofilos (E) eosinofilos

CUADRO 2.
Frecuencia de lesiones encontradas en órganos linfoides de 30 cerdos sospechosos al PCV-2.

Tejidos	Lesiones	Frecuencia	Porcentaje (%)
Linfonodo	Depleción linfoide	30/30	100
	Infiltración histiocítica	14/30	46.6
	Células sincitiales	6/30	20
	Cuerpos de inclusión	0/30	0
	Necrosis	20/30	66.6
	Apoptosis	8/30	26.6
	Infiltrado inflamatorio	21/30	70
	Fibrosis	8/30	26.6
Bazo	Depleción linfoide	30/30	100
	Proliferación histiocítica	8/30	26.6
	Células sincitiales	4/30	13.3
	Cuerpos de inclusión	0/30	0
	Necrosis	12/30	40
	Apoptosis	11/30	36.6
	Infiltrado inflamatorio	18/30	60
Tonsila faringea	Depleción linfoide	18/30	60
	Proliferación histiocítica	3/30	10
	Células sincitiales	0/30	0
	Cuerpos de inclusión	0/30	0
	Necrosis	5/30	16.6
	Apoptosis	3/30	10
	Infiltrado inflamatorio	15/30	50
Placas de Peyer	Depleción linfoide	30/30	100
	Proliferación histiocítica	9/30	30
	Células sincitiales	9/30	30
	Cuerpos de inclusión	0/30	0
	Necrosis	17/30	56.6
	Apoptosis	9/30	30
	Infiltrado inflamatorio	15/30	50

CUADRO 2 (continuación).

Frecuencia de lesiones en órganos no linfoides de 30 cerdos sospechosos al PCV-2.

Tejidos	Lesiones	Frecuencia	Porcentaje (%)
Pulmón	Células sincitiales	4/30	13.3
	Neumonía intersticial	28/30	93.7
	Bronconeumonía Purulenta	9/30	30
Hígado	Hepatitis	25/30	83.3
	Fibrosis	10/30	33.3
Riñón	Nefritis intersticial	10/30	33.3
	Fibrosis	23/30	76.6

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para la descripción de lesiones se utilizaron los criterios sugeridos por Rosell y cols, las cuales para su identificación, se clasificaron como se muestra en el cuadro 1. En la determinación de las frecuencias y porcentajes de las lesiones encontradas los resultados se muestran en el cuadro 2. El análisis de la presentación de las lesiones en cada uno de los órganos linfoides, así como en los tejidos no linfoides fue el siguiente:

6.1 LINFONODOS.

En la evaluación realizada a los linfonodos se observó que en el 100% de los casos tenían una depleción linfoide. La depleción se clasificó en diferentes grados, en base a porcentajes de acuerdo a los siguientes criterios: 50% severo, 26.6 % moderado y el 23.3 % leve. En relación a la infiltración histiocítica, solo 14 (46.6%) de los 30 casos mostraron la infiltración de células histiocíticas en donde 9 casos (30 %) presentaron un grado leve, mientras que en 5 casos (16.6%) se observó moderada. La presencia de sincitios se encontró en 6 de estos casos (20%). Con respecto a otras lesiones se encontró necrosis en 20 (66.6%) de los casos y focos de apoptosis en 8 casos (26.6%). La reacción inflamatoria en linfonodos se presentó en 21 (70 %) casos, observándose 39.5 % con inflamación aguda polimorfonuclear y el 60.4% con inflamación asociada a presencia de células mononucleares. La fibrosis en estos casos se observó en 8 (26.6%) de los casos (gráficas 1, 2 y 3).

6.2 BAZO.

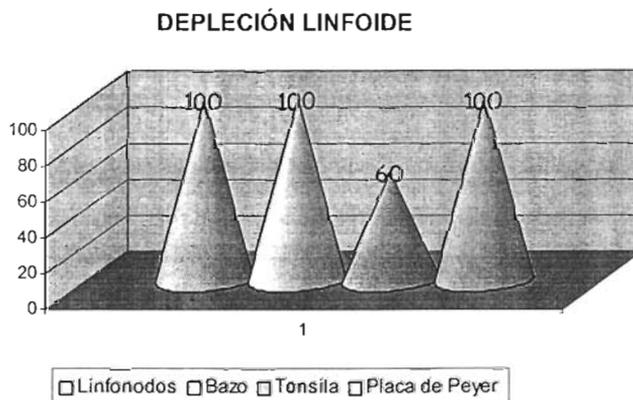
En el 100% de los bazos se presentó depleción linfoide, la cual se clasificó como leve en 9 (30%) casos, moderada en 11 (36.6%) casos y severa en 10 casos (33.3%). La infiltración histiocítica se observó en 8 de 30 casos (26.6%) y se definió como leve en 7 casos (20%) y moderada en solo un caso (3.3%). Aunado a este hallazgo se encontraron células sincitiales en 4 casos (13.3 %). Entre otras lesiones se detectó necrosis en 12 casos (40) y apoptosis en 11 casos (36.6), así como un infiltrado de células inflamatorias de grados variables el 60 % muestra infiltrado inflamatorio en grado variable de tipo mononuclear en un 69% y polimorfonuclear en el 30.9% de ellos (gráfica 1, 2 y 3).

6.3 TONSILA FARINGEA.

En este órgano se observó que 18 de los treinta casos (60 %) presentaron depleción linfoide, donde el 36.6% es de grado moderado y el 23.3 % el grado severo. La infiltración histiocítica se presentó en 3 casos (10%) (gráfica 1,2 y 3) y las células sincitiales y cuerpos de inclusión no se encontraron en ninguno de los casos. Con respecto a la necrosis en tonsila, ésta se encontró en 5 de los cortes (16.6 %) y la apoptósisis sólo en 3 de estos casos (10 %). La muerte de células se acompañó de reacción inflamatoria en 15 de los casos (50%) con diferencias en la intensidad y con infiltrado de células inflamatorias variable. El infiltrado mononuclear, se presentó en el 46.1% de los casos y el 53.8 % fue de tipo polimorfonuclear.

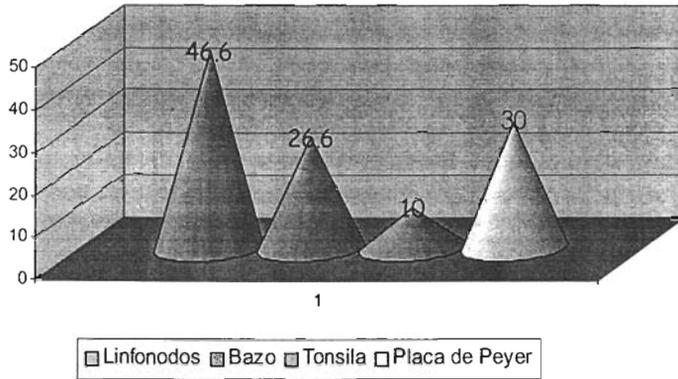
6.4 PLACAS DE PEYER.

En las placas de Peyer observamos que la lesión principal es la depleción linfoide, en el 100 % de los casos; con despoblación de centros germinales en grados variables (40% leve, 16.6% moderada, 43.3% severa). Esta depleción se acompañó de infiltración histiocítica en 9 casos (30 %), así como en los mismos 9 casos se encontró presencia de células sincitiales (30 %) (gráfica 1,2 y 3). El 56.5 % (17 casos) presentan necrosis y el 30 % (9 casos) se encuentran con apoptósisis. Por otro lado se observó un infiltrado de células inflamatorias donde el 34.7% son de tipo mononuclear y el 65.2% polimorfonuclear.



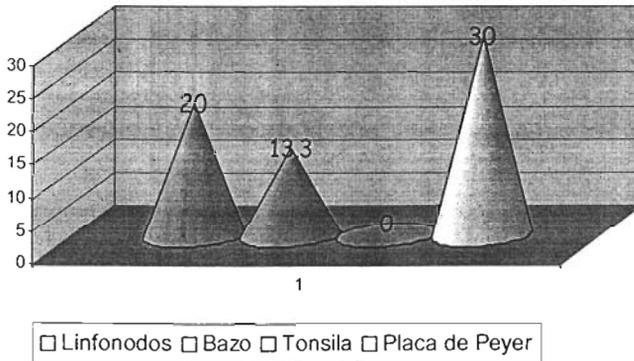
Gráfica 1. Porcentaje de depleción linfoide encontrada en tejidos linfoides en 30 casos de cerdos sospechosos a la afección del PCV-2.

PROLIFERACIÓN HISTIOCÍTICA



Gráfica 2. Porcentaje de tejidos linfoides que presentó infiltración histiocítica de 30 cerdos sospechosos a la afección del PCV-2.

CÉLULAS SINCITIALES



Gráfica 3. Porcentaje de tejidos linfoides que presentaron células sincitiales en 30 casos de cerdos sospechosos a la afección de el PCV-2.

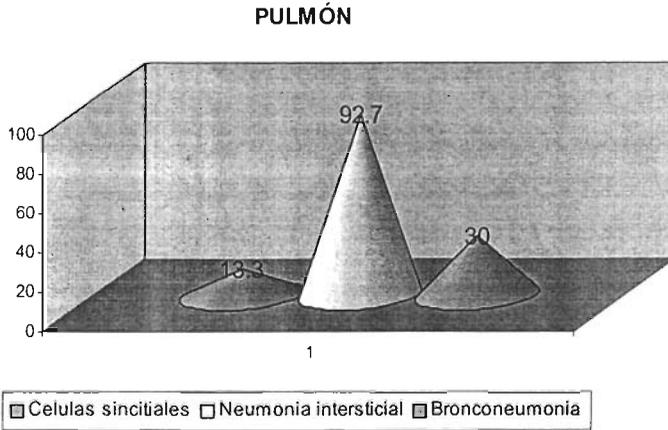
En resumen, en la valoración del tejido linfoide se puede observar que en prácticamente el 100% de los casos se observó una depleción linfoide. Sin embargo menos del 50% de estos casos se acompañó con infiltración histiocítica y en menos del 30% de los mismos con presencia de células sincitiales. En ninguno de los casos que se revisaron se encontró presencia de cuerpos de inclusión (Cuadro 3).

Cuadro 3. Resumen del porcentaje de lesiones encontradas en el tejido linfoide que se asocian a la presencia del PCV-2 en el PMWS

LESIÓN/ÓRGANO	LINFONODO	BAZO	TONSILA	PLACAS PEYER
Depleción linfoide	100%	100%	60%	100%
Infiltración histiocítica	46.6%	26.6%	10%	30%
Células sincitiales	20%	13.3%	0%	30%
Cuerpos de inclusión	----	----	----	----

6.5 PULMÓN.

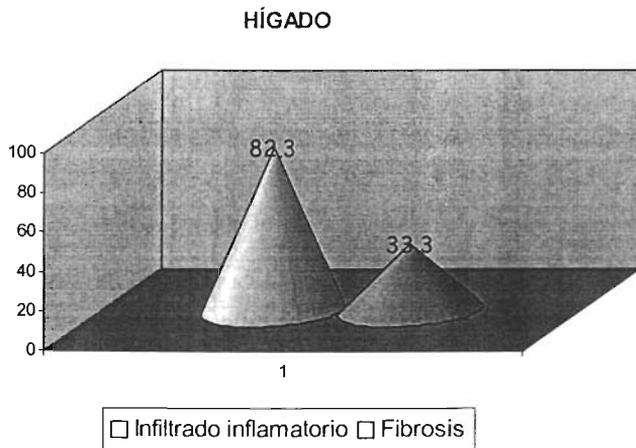
En el pulmón encontramos que el 93.7 % (28 casos) presentan neumonía intersticial de leve a moderada (focal ó difusa). La presencia de células sincitiales se evidenció en 4 casos (13.3%) y estas lesiones se encontraron acompañadas con bronconeumonía de tipo purulenta en 9 de los casos (30 %) (gráfica 4).



Gráfica 4. Porcentaje de lesiones encontradas en pulmón en 30 casos de cerdos sospechosos a la afección de el PVC-2.

6.6 HÍGADO.

En el hígado se observó en 25 de los casos (83.3%) un infiltrado inflamatorio del cual el 78.8% básicamente se constituyó por mononucleares y el 21.1% por polimorfonucleares. En 10 de los casos (33.3%) se observó una fibrosis en grados variables, en los cuales el 16.6% fue leve y el 16.6% moderada (gráfica 5).



GRÁFICA 5. Porcentaje de lesión inflamatoria y de fibrosis en hígados de 30 cerdos sospechosos a la afección de el PCV-2.

6.7 RIÑÓN.

En el riñón se presentó básicamente una lesión inflamatoria caracterizada por mononucleares en 10 de los 30 casos (33.3). Asociada a esta lesión se encontró fibrosis en 76.6% de los casos (23 casos) en donde el 40% fue en grado leve y el 36.6% en forma moderada.

7. DISCUSIÓN.

En el presente trabajo se describieron 30 casos de cerdos sospechosos al PCV-2. Estos se seleccionaron basándose en los signos clínicos y lesiones macroscópicas que se documentaron previamente (Daff y cols, 1996; Harding y Clark, 1997; Segalés y cols, 1997). A la revisión histológica de los órganos linfoides se observó una depleción (atrofia) en el 100% de los casos, exceptuando en la tonsila que se presentó en el 60% de los cortes. Sin embargo, esta depleción es sugestiva de circovirus siempre y cuando se encuentre en asociación con infiltración histiocítica y la presencia de sincitios, que son las lesiones que caracterizan al PCV-2. En este sentido la infiltración histiocítica se observó en aproximadamente 50% de los casos y la presencia de sincitios en aproximadamente un 30% de los tejidos linfoides analizados. En el trabajo realizado por Rosell y cols, 1999 y el de Segalés y Domingo en el 2002, se refieren lesiones similares en frecuencia y porcentaje a las reportadas en esta tesis.

Como una manera de evaluación de las muestras histológicas analizadas en este trabajo a la presencia del PCV-2, se seleccionaron al azar algunas de ellas y se les realizó la prueba de reacción en cadena de la polimerasa de muestras incluidas en parafina (Datos no mostrados). El resultado de esta evaluación fue positivo a la presencia del virus PCV, por lo que las lesiones encontradas se consideraron asociadas al virus en cuestión.

Durante el análisis de depleción encontrada en el tejido linfoides se observó que aproximadamente el 50% de los casos, ésta no se asoció a la infiltración histiocítica y presencia de sincitios que son característicos de circovirus. Esto pone de manifiesto una posible asociación a otros agentes infecciosos (Rosell y cols, 1999).

Durante el análisis de las zonas depletadas del tejido linfoides se evaluó tanto la presencia de necrosis en los centros germinativos o bien de formas histológicas que sugirieran cuerpos apoptóticos. Cabe resaltar que dada la dificultad de identificar histológicamente la presencia de apoptosis, de algunos de estos tejidos se realizó la técnica inmunohistoquímica de tunel para la identificación de ésta apoptosis (Fig. 7 A y B). El resultado obtenido en las muestras evaluadas fue que a pesar de no observar apoptosis por la vía histológica, en la mayoría de los casos la apoptosis se encontró en asociación con necrosis e infiltración histiocítica. Este evento también se ha

descrito en los casos de circovirus porcino tipo 2 reportados según Segalés y Domingo en el 2002.

Por otra parte, como se mencionó en los resultados, no se encontraron cuerpos de inclusión en ninguno de los casos. Con respecto a esto, se sabe que la presencia de cuerpos de inclusión están estrechamente relacionados con el grado de infección con el PCV-2. A este respecto, existen también reportes en donde menciona que la cantidad del virus involucrado en la infección, determina la intensidad en la presentación de las lesiones características (Segalés y Domingo, 2002). Según un estudio mostrado por Rosell y cols., en 1999, durante la evaluación histopatológica de 15 cerdos con desmedro, reportaron que un 6% de los casos presentaron cuerpos de inclusión. Cabe mencionar que algunos de los casos presentes en este trabajo se les realizó la prueba diagnóstica de PCR, dando como positivos a la presencia del PCV-2, demostrando así, que la evaluación histopatológica es un gran acercamiento al diagnóstico de la enfermedad.

En el pulmón observó que más del 90 % de los casos presentan neumonía intersticial, la cual es la lesión característica reportada en vías aéreas de cerdos con PCV-2, sin embargo estas lesiones pueden verse en otro tipo de patologías del cerdo (Ellis y cols., 2004).

En el hígado la lesión principal fue el infiltrado inflamatorio mononuclear en un 83.3 %, en el 33.3 % de los casos se observó fibrosis perilobulillar y pérdida de hepatocitos en grado variable, que es un hallazgo macroscópico frecuente en el hígado y se asocia a ictericia. En el estudio realizado por Rosell y cols, 1999, se reporta el infiltrado inflamatorio en el 85 % de los casos, la fibrosis y pérdida de hepatocitos en un 7%, sin embargo el grado y la intensidad de estas lesiones es dependiente también de la cantidad de virus presente, por lo que estos casos no siempre se relacionan con PCV-2 y se deben considerar otros agentes patógenos que potencializan el daño hepático.

La lesión más importante observada en el riñón es la nefritis intersticial en un 33.3%. En el estudio de Rosell y cols en 1999, se reporta el 50% de los casos, Segalés y cols en el 2002 reportan un 39.1% de los casos con esta lesión, lo que nos indica sugiere un hallazgo frecuente en asociación al PCV-2.

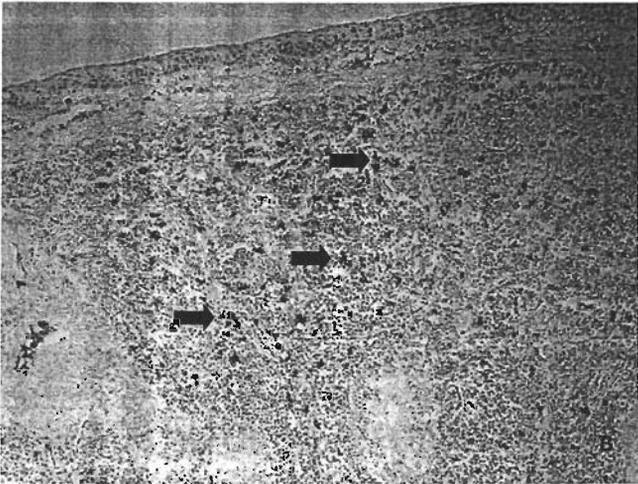
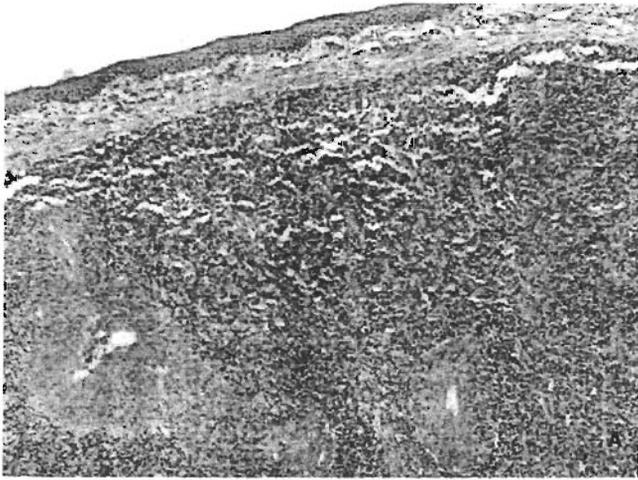


Fig. 7 Tonsila 10x. (A) Corte histológico de tonsila con H. E proveniente en el que se aprecia depleción linfoide. (B) Corte de Tonsila en el que se utilizó la técnica de tunel para la detección de apoptosis. Los focos apoptóticos localizados se encuentran distribuidos alrededor de los centros germinales (flechas).

8. CONCLUSIONES

En este trabajo se concluyó que el análisis histopatológico de muestras sospechosas al PCV-2 es una herramienta útil en el diagnóstico de esta enfermedad, debido a que la presencia de lesiones histopatológicas características en tejido linfoide (depleción linfocítica, proliferación histiocítica, células sincitiales) y la presencia de cuerpos de inclusión del PCV2), no se describen en otros padecimientos en el cerdo.

Del mismo modo, se mencionó que no todos los casos presentaron el mismo grado de lesión ya que estas, dependen de la cantidad de virus presente en el tejido. A este respecto es importante el uso de otras herramientas diagnosticas para confirmar la presencia del virus.

En los casos donde se observó depleción linfoide pero no se detectaron otras lesiones características del PCV-2 lo que sugiere la afección de otros agentes infecciosos, particularmente de tipo viral.

Finalmente los datos encontrados en este estudio demuestran que no todos los animales que presenten desmedro como signo clínico padecen PMWS.

9. BIBLIOGRAFÍA.

1. Allan, G., Phenix, K., Todd, D. and Adair, B. (1994) Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. *Journal Veterinary Medical*. 41: 17-26.
2. Allan, G., McNeilly, F., Cassidy, J., Reilly, G., Adair, B., Ellis, W. and MacNalty, M. (1995) Pathogenesis of porcine circovirus: Experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pigs foetal material, *Veterinary Microbiology*. 44:49-64.
3. Allan, G., McNeilly, F., Kennedy, S., Duff, B., Clark, G., Ellis, J., Haines, D., Meehan, B. and Dair B. (1998) Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with wasting disease in the USA and Europe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 10:3-10.
4. Allan, G., Kennedy, S., McNeilly, F., Foster, J., Ellis, J., Krakawka, S., Meehan, B. and Adair, B.(1999) Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *Jornal of comparative pathology*. 121:1-11.
5. Allan, G. and Ellis, J. (2000) Porcine circoviruses: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 12:3-14.
6. Allan, G.M., McNeilly, F., Meehan, B., Kennedy, S., Johnston, D., Ellis, J., Krakowka, S., Fossum, C., Watrang, E. and Wallgren, P. (2002). Reproduction of PMWS with a 1993 Swedish isolate of PCV-2. *Veterinary record*. 150: 255-256.
7. Balasch, M., Segalés, J., Rosell, C., Domingo, M., Mankertz, A., Urniza, A. and Plana-Durán, J. (1999). Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of comparative pathology*. 121, 139-148.
8. Bolin, S., Stroffregen, W., Nayar, G. and Hamel, A. (2001) Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrum-deprived piglets with type 2 porcine circovirus. *Journal of Veterinary Diagnostic investigation*. 13:185-194.
9. Chianini, F., Majó, N., Segalés, J. and Domingo, M. (2002). Characterisation of lymphoid, renal, lung and hepatic lesions of naturally postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. *Veterinary immunology and immunopathology*. 11 : 114-118
10. Clark, E. (1997) Postweaning multisystemic wasting syndrome. *In Proceedings of the American Association of Swine Practitioners*. Quebec City, Canada. p, 499-501.

11. Darwich, L., Segalés, J., Domingo, M. and Mateu, E. (2002). Changes in CD4(+), CD8(+), CD4(+) CD8 (+), and Immunoglobulin M-Positive Peripheral Blood Mononuclear Cells of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome-Affected Pigs and Age-Matched Uninfected Wasted and Healthy Pigs Correlate with Lesions and Porcine Circovirus Type 2 Load in Lymphoid Tissues. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*. 9: 236-242.
12. Darwich, L., Segalés, J., Domingo, M. and Mateu, E. (2004). Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine Circovirus 2 : an immune riddle. *Archives of Virology*. 149: 857-874.
13. Dulac, G. and Afshar, A. (1989) Porcine circovirus antigens in PK cell line (ATCC CCLL33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 53: 431-439.
14. Ewards, S. and Sands, J. (1994) Evidence of circovirus infection in British pigs. *Veterinary Record*. 134: 180-184.
15. Flores, M. and Agraz, G. (1983). Ganado Porcino. 3ª edición, editorial Limusa, México. p 46.
16. Ferreira, D., Sanset, B and Lavat, A. (2001). Attempt to use serotherapy to control mortality in PMWS. Proceedings of the ssDNA Viruses of plants, birds, pigs and primates: porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome. *European Society of Veterinary Virology*. p. 144.
17. Fenaux, M. Halbur, P. Gill, M. Toth, T. and Meng, X. (2000). Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2. *Journal of Clinical Microbiology*. 38:2494-2503.
18. García, R., García, C., Rodríguez, R., Mercado, M., Vatalla, C y Vargas, C.(2004). Estandarización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para la detección de circovirus porcino tipo 2 en tejido congelado. Memorias congreso AMVEC.
19. Gilpin, D.F., Stevenson, L.S., McCullough, K., Krakowka, S., Meehan, B.M., McNeilly, F., Foster, C., Adair, B., Welsh, M. and Allan, G.M. (2001). Studies on the in vitro and in vivo effect of porcine circovirus type 2 infection of porcine monocytic cells. Proceedings of the ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates: porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome *European Society of Veterinary Virology*. p. 97.
20. Hamel, A.L., Lin, L.L. and Nayar, G.P.S. (1998). Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Journal of virology*. 72: 5262-5267.
21. Harding, J.(1996) Post-weaning multisystemic wasting syndrome, Preliminary epidemiology and clinical findings. *Proceedings of the western Canadian Association of Swine Practitioners*. p.21.

22. Harding, J and Clark, E. (1997). Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic syndrome (PMWS). *Swine Health and Production*. 5:201-203.
23. Harms, P., Sorden, S., Halbur, P., Bolin, S., Lager, K., Morozov, I. and Paul, P. (2001) Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and PRRS. *Veterinary Pathology*. 38:528-539.
24. Harms, P., Halbur, P and Sorden, S. (2002). Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. *Journal of Swine Health Production*. 10:27-30.
25. Hirai, T., Nunoya, T., Ihara, T., Kusanagi, K. And Shibuya, K. (2001). Infection with PCV-2 and porcine epidemic diarrhoea in neonatal piglets. *Veterinary Record*. 148:482-484.
26. Horner, G. (1991) Circovirus antibodies presented in New Zeland pigs. *Surveillance Wellington*. 18:23.
27. Jestin, A., Mahe, P., Le Dimma, M., Cariolet, R., Truong, C., Keranflec'h, A., Madec, F. and Albina, E. (2001). Protection of swine from post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) conferred by porcine circovirus tipe 2 (PVC-2) ORF2 protein . Proceedings of the ssDNA Viruses of plants, birds, pigs and primates: porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome. *European Society of Veterinary Virology*. p. 139.
28. Kennedy, S., Moffett, D., McNeilly, F., Meehan, B., Ellis, J., Krakowka, S. and Allan, G. (2000) Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of convectional pigs with porcine circovirus tipo 2 alone or in combination with porcine parvovirus. *Journal of Comparative Pathology*. 122:9-24.
29. Krakowka, S., Ellis, J., Meehan, B., Kennedy, S., McNeilly, F. and Allan, G. (2000) Viral wasting syndrome of swine. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and parvovirus. *Veterinary Pathology*. 37: 254-263.
30. Krakowka, S., Ellis, J., McNeilly, F., Ringler, S., Rings, D. and Allan, G. (2001) Activation of the inmune system is the pivotal event in the production of wasting in pigs infected with porcine circovirus 2 (PCV-2). *Veterinary Pathology*. 38:31-41.
31. Luckert, P. and Allan, G. (1999) Porcine Circovirus. *Disease of Swine*. 8 th edition. Ed Mc Graw Hill. p.119-124.
32. Magar, R., Larochele, R., Thibault, S. And Lamontagne, L. (2000). Experimental transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2) in weaned pigs: a sequential study. *Journal of comparative pathology*. 123: 258-269.
33. Mankertz, A., Domingo, M., Folch, J., LeCann, P., Jestin, A., Segáles. J., Chmielewicz, B., Plana-Duran, J. And Soike, D. (2000). Characterization of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Researsh*. 66:65-67.

34. Mateo, P. (2002) A Clinicians Perspective on Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome. *Trens in Emerging Viral Infections of Swine*. Iowa State Press. p. 309-311.
35. McNeilly, F., Keenedy, S., Moffett, D., Meehan, B., Foster, J., Clarke, E., Ellis, J., Haines, D., Adair, B. and Allan, G. (1999) A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Journal of Virology Methods*. 80: 123-128.
36. Medec, F., Eveno, E., Morvan, P., Hamon, L., Blanchard, P., Cariolet, R., Amenna, N., Morvan, H., Truong, C., Mahé, D., Albina, E. and Jestin, A. (2000). Postweaning mutisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies affected. *Livestock Production Science*. 63: 223-233.
37. Morozov, I., Sirinarumitr, T., Sarden, S., Halbur, P., Morgan, M., Yoon, K. and Paul, P. (1998) Detection of anovel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning mutisystemic wasting syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 2535-2541.
38. Murphy, F. and Gibbs, P. (1999). Circoviridae. *Veterinary Virology*. 3th edition, Academic Press. p. 357-36.
39. O'connor, B., Gauvreau, H., West, K., Bogdan, J., Ayround, M., Clark, E., Konoby, C., allan, G and Ellis, J. (2001) Multiple porcine circovirus 2-associate abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. *Canadian Veterinary Journal*. 42:551-553.
40. Pogradichniy, R. and Yoon, K. (2002). Animal Circoviruses. *Trends in Emerging Viral Infections of Swine*. Iowa State Press. P. 283-289.
41. Quintana, J., Segalés, J., Rosell, C., Calsamiglia, M., Rodríguez-Arrijoja, G.M., Chianini, F., Folch, J.M., Maldonado, J., Canal, M., Plana-Duran, J. and Domingo, M. (2000). Clinical and pathological observations on pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Veterinary Record*. 149, 357-361.
42. Resendes, A.R., Balasch, M., Calsamiglia, M., Segalés, J., Sibila, M., Mankertz, A., Plana-Durán, J. and Domingo, M. (2001). Experimental co-inoculation of porcine circovirus type 2 (PCV2) and a vaccine adjuvant in conventional pigs. Proceedings of the ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates: porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome *European Society of Veterinary Virology*. p.134.
43. Rosell, C., Segalés, J., Plana, J., Balwch, M., Rodriguez, G., Kennedy, S., Allan, G., McNeilly, F., Latimer, K. and Domingo, M. (1999) Pathological immunohistochemical and in-situ hibridization studies of natural cases of postweaning multisystemic warting syndrome (PMWS) in pigs. *Journal of Comparative Pathology*. 120:59-78.

44. Rosell, C., Segalés, J. and Domingo, M. (2000). Hepatitis and staging of hepatic damage in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. *Veterinary Pathology*. 37: 687-692.
45. Rovira, A., Balasch, M., Segalés, J., Garcia, L., Plana-Duran, J., Rosell, C., Ellerbrock, H., Mankertz, A. and Domingo, M. (2002) Experimental inoculation of convectional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *Journal Virology*. 76:3232-3239.
46. Royer, A. Nawagitgul, P. Halburt, P and Paul, P. (2001). Susceptibility of circovirus type 2 to commercial and laboratory disinfectans. *Journal Swine Health and Production*. 9:281-284.
47. Segalés, J. and Domingo, M. (2002) Posweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)in pigs. A review. *Veterinary Quarterly*. 24(3): 109-124.
48. Segalés, J., Rosell, C., Rodríguez-Arroja, C. and Domingo, M. (2000). Patología de la circovirosis porcina. *Porci*. 56:41-54.
49. Segalés, J. (2002) Update on posweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome diagnostics. *Journal Swine Health and Production*. 10(6) p.1-5.
50. Segalés, J. Calsamiglia, M and Domingo, M. (2003) Epidemiology of porcine circovirus type 2 infection. *Mundo Ganadero*. 24: 103-110.
51. Shibahara, T., Sato, K., Ishikawa, Y. and Kadota, K. (2000). Porcine circovirus induces B lymphocyte depletion in pigs with wasting disease syndrome. *Journal of veterinary medical science*. 62: 1125-1131.
52. Sorden, S.D. (2000). Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine health and production*. 8: 133-136.
53. Tischer, I., Gelderblam, H., Vettermann, W. and Koch, M. (1982) Avery small porcine virus with circular single stranded DNA. *Nature* 293:64-66.
54. Tischer, I., Peters, D., Rasch, R. and Pocuili, S. (1987). Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Archives of virology*. 96: 39-57.
55. Trujano, M., Iglesias, G., Segalés, J., Palacios, J. (2001). PVC-2 from emaciated pigs in México. *Veterinary Record*. 23,148 (25):792.
56. Waddilove, A and Marco, E. (2002). Assessing serotherapeutic control of PMWS in the field. *Proceedings of the 17th International Pig Veterinary Society Congress*. Vol I, p.34.
57. West, H., Bystrom, J., Wojnarowicz, C., Shantz, n., Jacobson, M., Allan, G., Haine, D., Clark, E., Krakowka, S., McNeilly, F., Konoby, C., Martin, K y Ellis, J. (1999) Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows porcine circovirus 2. *Journal Diagnostic*