



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**"ESTANDARIZACION DE UNA TECNICA DE HIBRIDACION
IN SITU DE CIRCOVIRUS PORCINO".**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
GUSTAVO ADOLFO HUERTA JUAREZ**

**ASESOR: DRA. LUCIA ANGELICA GARCIA CAMACHO
COASESORA: DRA. PATRICIA BEATRIZ GARCIA REYNA**

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO,

2005.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

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

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

Estandarización de una Técnica de Hibridación in situ de

Circovirus Porcino.

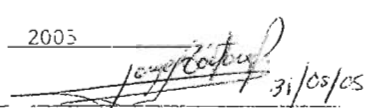
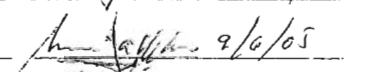
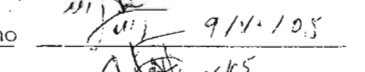
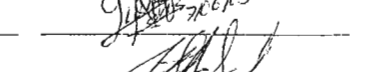
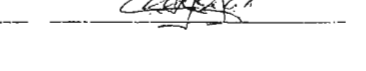
que presenta el pasante: Gustavo Adolfo Buerta Juárez
con número de cuenta: 09955442-4 para obtener el título de:

Médico Veterinario Zootecnista

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

ATENYAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 31 de Mayo de 2005

- | | | |
|------------------|------------------------------------|--|
| PRESIDENTE | Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez |  |
| VOCAI | MVZ. Mario Alberto Velasco Jiménez |  |
| SECRETARIO | Dra. Lucía Angélica García Camacho |  |
| PRIMER SUPLENTE | MVZ. Olivia Adams Vázquez |  |
| SEGUNDO SUPLENTE | MVZ. Ma. de Lourdes Jara Ramírez |  |

DEDICATORIAS.

A mis PADRES MARGARITO Y GUADALUPE, primero por traerme a la vida y posteriormente por apoyarme y dejarme vivir. Que gracias a su apoyo hemos logrado un objetivo que los tres anhelamos, que es el de titularme. Gracias por aguantarme en mis momentos buenos y malos, el de estar conmigo en esos momentos y el de mantenerse al margen en mis cosas, sabiendo que tarde o temprano yo les iba a entregar resultados.

A mis HERMANOS GUILLERMO Y MÓNICA, gracias por su apoyo, y el ejemplo que ambos me han dado de lucha, trabajo y perseverancia.

A mi ABUELITA DELFINA, TÍO MIGUE, CRISTINA, MERCEDES, FELIPE Y PRIMOS MÓNICA, CARLOS, BETO, gracias por estar siempre pendiente de mí, de mi carrera, y de su apoyo que me han dado desde físico como moralmente.

A VALERIA, mi mejor amiga, la persona de la Universidad que es la que más me ha aguantado dentro y fuera de ella, gracias por los momentos compartidos con mi persona, el impulsarme y el no dejarme caer en aquellos momentos de incertidumbre. Por las peleas, por las alegrías vividas. Gracias.

A mis amigos DAVID, KARINA, FERNANDO, LAURA, JEHIELI, LUPITA, por hacer de cualquier momento con ustedes algo especial, por su apoyo, por su interés, por hacerme saber que significa la palabra amistad.

A mi asesora la DRA. LUCIA, por compartir sus conocimientos, su tiempo, y también parte de su vida, por ofrecerme la tesis y ayudarme a redactarla. Y el saber que también puedo contar con usted en cuestión profesional como personal.

A mi coasesora la DRA. PATRICIA, que más que doctora para mí es mi amiga PATY, gracias por tus palabras, aquellos consejos, por guiarme por el camino profesional y por brindarme tu amistad.

Y por último a la Universidad Nacional Autónoma de México, y en especial a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por ser mi alma mater, y formarme como persona y profesionista.

A TODOS GRACIAS

Gustavo Adolfo Huerta Juárez

I. ÍNDICE

I.	Índice	1
II.	Resumen	2
III.	Introducción	3
	3.1. Etiología	3
	3.2. Epidemiología	4
	3.3. Transmisión	4
	3.4. Patogenia	5
	3.5. Síndromes Asociados a Circovirus Porcina	6
	3.5.1. Síndrome Multisistémico de Adelgazamiento Post-destete	6
	3.5.2. Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina	7
	3.5.3. Falla Reproductiva	7
	3.6. Control y Prevención	8
	3.7. Diagnóstico	9
	3.8. Marco Teórico	10
IV.	Material y Métodos	13
	4.1. Diseño Experimental	13
	4.2. Producción y Marcaje de la sonda	14
	4.3. Preparación del gel de agarosa y visualización de la sonda	16
	4.4. Purificación de la sonda DIG-marcada	16
	4.5. Protocolo de Hibridación <i>in situ</i>	17
V.	Resultados	23
VI.	Discusión	30
VII.	Bibliografía	34

II. RESUMEN

La circovirus porcina es una condición infecciosa que afecta principalmente a los cerdos, se describen dos tipos distintos de virus, uno apatógeno y otro patógeno, siendo este último el circovirus tipo 2 el cual ha sido asociado al Síndrome Multisistémico y de Adelgazamiento Post-destete, al Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina y a casos de Falla Reproductiva en Cerdas. Siendo de distribución mundial, esta enfermedad es importante debido a las pérdidas económicas que representa por lo que el diagnóstico específico es prioritario para la implementación de programas de control y prevención de la enfermedad. Los métodos de diagnóstico de PCV2 más utilizados son la detección de antígenos virales por inmunohistoquímica, la detección de ácido nucleico viral mediante la reacción en cadena de la polimerasa e Hibridación *in situ* y la detección de anticuerpos frente a PCV2 por pruebas de ELISA e inmunoperoxidasa en monocapa. Por tal motivo el propósito de este trabajo fue la estandarización de una técnica de Hibridación *in situ* como medio de diagnóstico del PCV2 con el objetivo de proporcionar una opción de diagnóstico confiable y accesible que reducirá la proporción de resultados falsos negativos que contribuya al control de la enfermedad dentro de las granjas. Para la estandarización de la técnica se emplearon muestras conservadas en formalina y embebidas en parafina, de tejidos linfoides de casos positivos al PCV-2 provenientes de los Estados de Jalisco e Hidalgo. Para tal efecto se obtuvo una sonda de cADN por PCR empleando un marcaje directo con digoxigenina y purificación del producto de la PCR mediante el uso de kits comerciales. Las reacciones de hibridación *in situ* se realizaron en secciones de tejido utilizando laminillas electrocargadas y se manejaron en una estación de trabajo siguiendo metodología rutinaria. Para la estandarización de la hibridación *in situ* se utilizaron tres diferentes concentraciones de la sonda de cADN-DIG marcada, derivada por PCR con el fin de determinar la concentración óptima que proporcionará una adecuada señal de hibridación. Dichas concentraciones fueron 534 ng, 200 ng y 134 ng en 200 μ l de solución de hibridación apreciándose señal positiva en todas las concentraciones, siendo la concentración de 200ng/200 μ l la óptima para la detección del PCV2. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre la concentración óptima y la concentración mínima utilizada por lo que se recomienda está para el diagnóstico rutinario de PCV2 lo cual reduciría significativamente los costos de la prueba y la operatividad en el laboratorio. Alternativamente, los resultados obtenidos sugieren que la concentración de 534 ng/ 200 μ l podrían ser utilizados para el diagnóstico de circovirus fetal y neonatal.

III. INTRODUCCIÓN

El Circovirus porcino (PCV) se describe por primera vez hace 25 años como un contaminante común de los cultivos de células de riñón de cerdo PK-15 de muy fácil difusión que infectan de forma natural a la especie porcina (Tischer, *et al.* 1974; Allan, *et al.* 2000; Segalés, *et al.* 2002). Hasta el momento se han caracterizado dos tipos distintos de circovirus en el cerdo, el tipo 1 (PCV1), apatógeno para el cerdo, y circovirus tipo 2 (PCV2), aislado por primera vez en 1998 en cerdos con Síndrome Multisistémico y de Adelgazamiento Post-destete (PMWS, por sus siglas en inglés Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome), descrito en 1991 en Canadá (Allan, *et al.* 2000; Segalés, *et al.* 2002).

Inicialmente, la participación del PCV2 en el PMWS se describió principalmente como una infección de tipo subclínico (Allan, *et al.* 2000; Segalés, *et al.* 2002). Posteriormente, se ha descrito una participación primaria del PCV2 en el PMWS por ser asociado consistentemente a cuadros patológicos de la enfermedad (Choi, *et al.* 1999; Choi, *et al.* 2000; Rosell *et al.* 1999; Saoulidis, *et al.* 2002; Segalés, *et al.* 2002). Otra patología asociada a la infección por PCV2 es el síndrome de dermatitis y nefropatía porcino (PDNS) en donde el virus ha sido detectado en lesiones de tejido linfoide por hibridación *in situ* (Rosell, *et al.* 2000; Saoulidis, *et al.* 2002; Segalés, *et al.* 2002).

3.1 ETIOLOGÍA

El PCV debe su nombre al hecho de que su genoma es circular y está unido de forma covalente en sus extremos. Pertenece a la Familia Circoviridae, Género Circovirus. A este género también pertenecen el virus de la enfermedad del pico y de las plumas de las psitácidas (beak and feather disease virus, BFDV) (Bassami *et al.*, 1998); el circovirus de la paloma (pigeon circovirus, PiCV o columbid circovirus, CoCV) (Woods *et al.*, 1993; Mankertz *et al.*, 2000); el circovirus del ganso (goose circovirus GCV) (Todd *et al.*, 2001); el circovirus del canario (canary circovirus CaCV) (Phenix *et al.*, 2001) y el circovirus de la gaviota (gull circovirus GuCV) (Jestin *et al.*, 2001).

Es un virus sin envoltura, esférico, de simetría icosaédrica, y de pequeño tamaño 17 nm. Posee una molécula de ADN (Ácido Desoxirribonucleico) circular simple, en forma de anillo de ahí su nombre, de 1.7 kpb. El genoma del PCV1 y PCV2 es estructuralmente muy similar con una longitud de 1759 nucleótidos y 1767 nucleótidos, respectivamente (Allan, *et al.* 2000).

3.2 EPIDEMIOLOGÍA

Entre los países que han descrito la presencia de PCV2 destacan Canadá, Estados Unidos de América, Francia, Alemania, Gran Bretaña, España, Dinamarca, Irlanda del Norte, Suecia, Bélgica, Italia y Holanda, y distintos países productores asiáticos, como Taiwán, Corea del Sur y Japón entre otros (Segalés, *et al.* 2002). Recientemente, se ha reportado la presencia de PCV2 en México en animales con PMWS (Trujano, *et al.*, 2000). Algunos de estos países han realizado estudios epidemiológicos que muestran una incidencia seropositiva estimada entre un 20 a un 80% en la mayoría de las explotaciones estudiadas, sin que en general se observen manifestaciones clínicas. Entre los animales seropositivos a PCV2 se encuentran tanto cerdos sanos como cerdos enfermos con diversas patologías no relacionadas. También la presencia y participación del PCV2 se ha demostrado mediante protocolos de Hibridación *in situ* (HIS) en tejidos afectados con lesiones características de circovirus (Segalés, *et al.* 2002).

3.3 TRANSMISIÓN

Los hospedadores naturales conocidos del PCV2 son el cerdo doméstico y el jabalí. No se han detectado anticuerpos frente a PCV2 mediante la técnica de inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA) en ovejas, vacas, cabras, caballos y humanos. Experimentalmente, algunos investigadores han conseguido infectar ratones de laboratorio, mientras que el conejo parece ser refractario.

El movimiento de animales entre explotaciones es seguramente la causa más importante de entrada del virus. El virus es muy estable en el ambiente, y puede ser vehiculizado de forma mecánica a través de camiones, ropa, calzado, material y equipamiento, e incluso también probablemente roedores y pájaros. Una vez presente en una explotación, la transmisión más probable es por contacto directo entre cerdos enfermos y sanos. Afectando la condición corporal principalmente en animales después del destete y durante la engorda (Segalés, *et al.* 2002). Recientemente, se ha descrito la transmisión vertical en lechones de casos de campo (Pensaert, *et al.* 2004) y experimentales (Sánchez, *et al.* 2003; Kyoung-Jin, *et al.* 2004; Nielsen, *et al.* 2004). En dichos reportes se describe que las hembras infectadas con PCV2 transmiten el virus a los fetos a partir del día 57 (+/-) generando una alta proporción de pérdidas reproductivas.

3.4 PATOGENIA

No se conoce en su totalidad la patogenia de la infección. En condiciones naturales la entrada del virus se produce probablemente por vía oronasal. Experimentalmente, se ha logrado infectar cerdos por la vía oronasal y parenteral (Segalés, *et al.* 2000b). En infecciones naturales de cerdos, el PCV2 infecta principalmente células de la línea monocito/macrófago y células gigantes multinucleadas, como los macrófagos alveolares, células Kupffer y células dendríticas de los órganos linfoides. Pero también es posible detectar el virus de manera esporádica en el citoplasma de células tubulares renales, células alveolares, células endoteliales, linfocitos, células ductulares y acinares pancreáticas, células de músculo liso, hepatocitos y enterocitos. Actualmente no existen datos concluyentes acerca de que PCV2 pueda infectar linfocitos (Segalés, *et al.* 2000; Sánchez *et al.* 2003, Darwich *et al.* 2004).

El virus ha sido aislado o detectado en tonsilas, timo, bazo, hígado, riñón, nódulos linfáticos, mucosa nasal, pulmón, intestino delgado, médula ósea, encéfalo y testículo. Pueden observarse múltiples inclusiones víricas esféricas de diámetro variable en el citoplasma de células infectadas (Segalés, *et al.* 2002). La diseminación inicial de PCV2 está probablemente ligada a la movilidad de las células infectadas, generalizándose la infección al sistema linfóide y a numerosos órganos. La presencia subsiguiente de virus en sangre, que puede durar meses, contribuye a la diseminación de PCV2. En cerdos con PMWS se aprecia una disminución significativa del número de linfocitos particularmente de células B y linfocitos CD8⁺ e incrementos de monocitos y neutrófilos. (Darwich *et al.* 2004). En las infecciones subclínicas por PCV2 se sugiere que el virus se encuentra en sangre y en los órganos linfoides en cantidades bastante menores que en casos patológicos por lo menos durante unas 10 semanas (Segalés, *et al.* 2002). La detección de PCV2 en tejidos y la presencia de anticuerpos frente a PCV2 previos a la ingestión de calostro en mortinatos y recién nacidos, confirman la existencia de infección intrauterina (Nielsen, *et al.* 2004).

Desde las fases iniciales de la infección por PCV2, los cerdos eliminan el virus fundamentalmente a través de heces, orina y secreciones nasales, durante meses. También se ha detectado en semen de verracos aparentemente sanos y, aunque hasta el momento no se han realizado estudios que confirmen su transmisión por esta vía, este dato debe ser considerado teniendo en cuenta las prácticas habituales de inseminación artificial. La presencia de PCV2 en cavidad nasal es un hecho muy frecuente en cerdos sanos con o sin viremia, a juzgar por los

resultados de técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sobre hisopos nasales (Segalés, *et al.* 2002).

3.5 SINDROMES ASOCIADOS A CIRCOVIROSIS PORCINA

Debido a las características particulares de este virus, no se puede descartar que la aparición de los síntomas clínicos y lesiones esté relacionada con otros factores como el estrés, y las propias características y condiciones inmunológicas del animal. En este sentido, también se ha confirmado que la presencia de otros microorganismos concomitantes con PCV2, favorece la aparición de formas clínicas y lesiones más severas asociadas a PCV2. Se ha demostrado que PCV1 no induce signos clínicos de enfermedad ni lesiones macroscópicas ni microscópicas. Sin embargo en los animales infectados es posible detectar la presencia de PCV1 en numerosos tejidos a distintos días post infección (Segalés, *et. al.* 2002).

3.5.1 Síndrome Multisistémico de Adelgazamiento Post-destete (PMWS)

Se caracteriza por presentar un incremento muy marcado de la mortalidad de cerdos entre las 7 y las 14 semanas de vida, junto con un número elevado de animales con un marcado adelgazamiento.

La infección por PCV2 origina signos clínicos bastante inespecíficos y no siempre evidentes, caracterizados por adelgazamiento rápido, palidez de la piel, hipertermia, letargo, depresión y emaciación, en algunos casos ictericia, hipertrofia de ganglios linfáticos (inguinales, submandibulares, mesentéricos y mediastínicos principalmente), aparición de trastornos respiratorios leves o moderados, y una mayor susceptibilidad a infecciones bacterianas (Allan, *et. al.* 2000; Kim, *et. al.* 2001; Segalés, *et. al.* 2002).

Microscópicamente se observa depleción linfocitaria variable en órganos linfoides, necrosis celular de hepatocitos y procesos inflamatorios mononucleares de intensidad leve a moderada con formación de sincitios, que pueden afectar a distintos tejidos principalmente nódulos linfáticos, pulmón, intestino, hígado, riñón y corazón. También se observa infiltración de macrófagos que ocasionalmente contienen cuerpos de inclusión intracitoplasmáticas de tipo basofílico en tejido linfoide y otros tejidos (Allan, *et. al.* 2000; Segalés, *et. al.* 2002).

El PCV2 parece ser un factor necesario, aunque probablemente no suficiente para la expresión de enfermedad como se observa en PMWS. Trabajos experimentales recientes confirman que la co-infección de PCV2 con otros virus, como PRRSV o parvovirus porcino, aumenta de forma

significativa la severidad de las lesiones, originando los cuadros típicos que se atribuyen a PMWS (Segalés, *et. al.* 2002).

3.5.2 Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina (PDNS)

Fue descrita por primera vez en el Reino Unido en 1993 (Smith, *et. al.* 1993). Han sido reportados casos en Canadá, España, Italia, Chile, Holanda, Sudáfrica, Estados Unidos de América y Francia (Helie, *et. al.* 1995, Van Halderen, *et. al.* 1995, Ramos-Vara, *et. al.*, Sierra, *et. al.* 1997, Solignac, 1997, Segalés *et. al.* 1998).

Los animales afectados se caracterizan por tener un curso afebril o un curso febril, depresión y edema subcutáneo en la región ventrocaudal. El curso de la enfermedad es corto y la mayoría de los cerdos infectados mueren dentro de los tres primeros días.

En animales muy infectados, se encuentran lesiones necrotizantes de la piel en los miembros posteriores y en el área perianal. Encontrando al ñón aumentado de tamaño y pálido, así como hemorragias petequiales en la zona cortical. (Higgins, 1993). Microscópicamente hay una vasculitis sistémica necrotizante, una glomerulitis exudativa y necrotizante y una nefritis intersticial (Higgins, 1993, Helie, *et. al.* 1995, Segalés, *et. al.* 1998, Thibault, *et. al.* 1998).

La patogenia de este síndrome es desconocida, pero las lesiones microscópicas y la presencia de depósitos de inmunoglobulina y de factores de complemento en el bazo y glomérulo sugieren que puede ser clasificado como una reacción sistémica de hipersensibilidad tipo III (Higgins, 1993, Helie, *et. al.* 1995, Sierra, *et. al.* 1997). La etiología aún no está bien definida, pero hay una fuerte asociación del PCV2 como posible causante de la enfermedad, aunado a las fuertes similitudes entre las lesiones de PMWS y PDNS como son la depleción linfóide, la presencia de células sincitios, infiltración inflamatoria granulomatosa en tejido linfóide y neumonía intersticial (Allan, *et. al.* 1998).

3.5.3 Falla Reproductiva

Recientemente, el PCV2 ha sido adicionado a la lista de virus que causa una infección transplacentaria. El primer reporte fue descrito en Canadá (West *et al.* 1999), donde fue aislado el PCV2 de cerdos abortados (Pensaert *et al.* 2004). Se menciona que la falla reproductiva en cerdas asociada a PCV2 se observa principalmente en co-infección con otros agentes etiológicos tales como parvovirus porcino y virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) por lo que el consenso general es que el PCV2 por sí solo no causa falla reproductiva y necesita la participación de otro agente infeccioso (Segalés, 2004). Sin embargo, se han descrito casos en los

que el PCV2 fue directamente asociado como único agente involucrado en donde se observaron incrementos de momias y nacidos muertos siendo la lesión más notoria una miocarditis no supurativa (West *et. al.* 1999; O'Connor *et. al.* 2001; Ellis *et. al.* 2004), aunque también fueron comunes la presencia de congestión hepática crónica y la detección del PCV2 en hígado, pulmón y riñón (O'Connor *et al.* 2001) En la falla reproductiva asociada a PCV2, la severidad de las lesiones dependerá de la edad del feto en el momento que ocurre la infección ya que entre más temprana sea la edad de la infección, mas grave será la lesión, puesto que el virus necesita que en las células del hospedero haya una gran cantidad de actividad mitótica (Sánchez, *et. al.* 2003; Pensaert, *et al.* 2004). Por eso los macrófagos se encuentran infectados tanto en los fetos como en los lechones recién nacidos (Sánchez, *et. al.* 2003).

3.6 CONTROL Y PREVENCIÓN

Hasta el momento se conoce muy poco sobre el control de enfermedades relacionadas con circovirus porcina. Los circovirus son muy resistentes a la inactivación por detergentes y desinfectantes usuales. Igualmente, la presencia de casos con enfermedad severa en explotaciones donde se mantiene una buena bioseguridad, pone de manifiesto que una buena bioseguridad no asegura ni evita la enfermedad. Un rápido diagnóstico, la eliminación de los animales enfermos, junto con un control estricto para evitar la presencia de otros patógenos circulantes (mediante planes de vacunación eficaces o de erradicación), combinado con buenos procedimientos de manejo, es actualmente la única vía para controlar la aparición de enfermedades asociadas a PCV2 (Segalés, *et. al.* 2002, Segalés 2004).

También se ha manejado el estado infeccioso serológico de la cerda frente a PCV2 al parto sugiriendo el incremento de los títulos de anticuerpos y el de disminuir la viremia alrededor del parto con el uso de vacunas (Segalés 2004).

El uso de ácidos grasos en especial el del ácido linolénico en la dieta ha demostrado en animales infectados con PCV2 que hay una disminución en las lesiones microscópicas que se observan en la circovirus porcina (Segalés 2004).

En la actualidad se han estado preparando estrategias de vacunación para hacer frente al PCV2, pero éstas solo se han desarrollado desde el punto de vista experimental, en las cuales se usan prototipos vacunales que contienen proteínas recombinantes correspondientes al ORF 1 y/o

ORF2 de PCV2, además del uso de vacunas inactivadas, pero esperan probar su eficiencia a nivel de campo (Segalés 2004)

3.7 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de laboratorio de la circovirus porcina se lleva a cabo principalmente por aislamiento vírico en células susceptibles, la detección del virus empleando técnicas de detección de antígenos virales (principalmente Inmunohistoquímica) o del ácido nucleico viral (HIS y PCR) y por la detección de anticuerpos específicos (principalmente IPMA y ELISA) (Allan, et. al. 2000; Segalés, et. al. 2002).

La Inmunohistoquímica (IHQ) permite la detección de antígenos virales sobre improntas de tejido fijadas en acetona, cortes de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, o cultivos celulares inoculados. Es una técnica rápida, emplea de 5 a 6 horas hasta la obtención de resultados y es de sensibilidad muy elevada. La técnica emplea un anticuerpo policlonal o monoclonal específico frente a cada circovirus en cuestión, que reacciona con los antígenos virales de la muestra. La detección se realiza mediante un anticuerpo secundario conjugado con una enzima o complejo enzimático. Algunos estudios con determinados protocolos específicos la evalúan con una sensibilidad comparable a la HIS.

Los protocolos de HIS empleados para la detección de PCV2 utilizan oligosondas y sondas de cDNA (Ácido Desoxirribonucleico Complementario) derivadas por la PCR (Rosell et. al. 1999; Choi et. al. 2000; Segalés et al. 2002) es uno de los métodos más populares y contundentes de la participación del PCV2 en los síndromes descritos debido a que se puede detectar la presencia del virus asociado a las lesiones características. Pero una amplificación positiva no es prueba de la participación de PCV2 como causante de enfermedad (Segalés, et. al. 2002).

Con respecto a las pruebas serológicas, la IPMA ha detectado anticuerpos de origen colostrario en lechones de 5-8 semanas de edad y se ha determinado seroconversión contra PCV2 entre las 8 y 12 semanas de edad. A esa edad incluso, en granjas sin sintomatología clínica compatible con PMWS es probable encontrar mediante PCR en suero, cerdos víremicos. Al final del periodo de engorde, la mayoría de cerdos presentan títulos altos frente a PCV2, pero la detección de viremia se convierte en un hecho infrecuente (Rosell et. al. 1999; Choi et. al. 2000; Segalés et al. 2002).

Adicionalmente, distintos laboratorios han desarrollado técnicas de ELISA indirecta, de captura y de competición. La sensibilidad de estos métodos es algo inferior a las técnicas de IHQ o

HIS, y significativamente menor a la obtenida empleando distintos métodos de PCR descritos, ya que el ELISA requiere de la presencia de grandes cantidades de antígenos virales en la muestra a analizar. A pesar de esta desventaja, la ELISA tiene capacidad para detectar todos los animales experimentalmente inoculados con PCV2 que manifiestan signos clínicos de enfermedad o lesiones histológicas, donde existen grandes cantidades de virus en tejidos, datos que se corroboran cuando se analizan muestras de tejido de animales enfermos con PMWS (Rosell *et. al.* 1999; Choi *et. al.* 2000).

Debido a que el diagnóstico específico de las enfermedades infecciosas de los animales domésticos es prioritario para la implementación adecuada de programas de control y prevención, y establecer la prevalencia de enfermedades, el desarrollo de herramientas de diagnóstico que puedan detectar simultáneamente lesiones características y la presencia del agente etiológico serán de gran importancia en la vigilancia epidemiológica para determinar la participación del PCV2 en las presentaciones de PMWS y PDNS en las granjas porcinas de nuestro país. En este sentido aunque en otros países se han desarrollado e implementado las pruebas de laboratorio referidas, es fundamental estandarizarlas e implementarlas en México para analizar la distribución del PCV2 y las pérdidas económicas reales generadas por la circovirus porcina. Por tal motivo, la estandarización de la técnica de Hibridación *in situ*, como medio de diagnóstico del PCV2 abre una opción de diagnóstico más confiable que reducirá la proporción de resultados falsos negativos y ayudará a un mayor manejo de control de la enfermedad dentro de las granjas.

3.8 MARCO TEÓRICO

La HIS detecta específicamente la presencia de ácidos nucleicos en secciones de tejidos y combina a la perfección los conocimientos básicos de histopatología con las modernas técnicas de biología molecular. La HIS es particularmente útil en el diagnóstico de enfermedades virales debido a su alta especificidad y sensibilidad. Su aplicación como técnica diagnóstica se encuentra en auge a partir del desarrollo de métodos de detección no radiactivos que utilizan a la Digoxigenina (DIG), cuya única fuente natural es a partir de *Digitalis purpurea* y *Digitalis lanata*. Esto permite que las sondas hibridadas puedan ser detectadas con alta afinidad por los anticuerpos anti-DIG conjugados con fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim 1996; Brown, C. 1998; Herrington, *et. al.* 1992; Mullink, *et. al.* 1989; Speel, *et. al.* 1994).

En las reacciones de hibridación la estabilidad de la unión entre la sonda y el ácido nucleico blanco tiene un papel muy importante. La fuerza de los híbridos disminuye en el siguiente orden: ARN-ARN, ADN-ARN, ADN-ADN (Brown, C. 1998). La sensibilidad de la HIS depende del tipo de sonda de ácido nucleico empleada para la detección.

Las sondas ARN (ribosondas) son generadas utilizando técnicas de clonación y recombinación molecular mediante la transcripción *in vitro* de una plantilla linearizada incorporando nucleótidos marcados durante dicho proceso. Para dicho efecto un promotor para las ARN polimerasas (SP6, T6, o T7) debe estar disponible en el vector de ADN que contiene la plantilla. Al igual que los oligonucleótidos incrementan su eficiencia cuando existe abundancia de ARNm. Las mayores ventajas de estas sondas son que, los híbridos de ARN-ARN y de ARN-ADN son más estables y tienen una mayor eficiencia de marcaje lo cual incrementa la sensibilidad en la detección (Boehringer Mannheim. 1996; Brown, 1998; Herrington, *et. al.*1992).

Las sondas de ADN (oligosondas) son utilizados para la detección de ARNm y su eficiencia se incrementa cuando los mensajes se encuentran en abundancia. Tienen la ventaja de que su producción es automatizada, los métodos de marcaje son sencillos y económicos y penetran en los tejidos con facilidad debido a su reducido tamaño. Sin embargo, esto último a su vez le proporciona una mejor eficiencia de marcaje disminuyendo la sensibilidad de la detección pero esta puede mejorar si se usan mezclas de diferentes oligonucleótidos en cada reacción de hibridación. Estudios recientes muestran que la excelente penetración de las oligosondas compensan grandemente la escasa cobertura del ácido nucleico. Además el hecho de que sean de cadena sencilla excluye la posibilidad de renaturalización. (Brown, 1998; Herrington, *et. al.*1992).

Las sondas de cADN generado mediante el PCR tiene la ventaja de que su producción es relativamente fácil y automatizada, permitiendo un eficiente marcaje simultáneo y la optimización del tamaño de las sondas de hibridación.

La incorporación de nucleótidos marcados durante el PCR puede producir grandes cantidades de sondas a partir de cantidades mínimas de ADN genómico o de plásmidos linearizados. En PCR, los dos iniciadores hibridizan en secuencias específicas a partir de los extremos opuestos de las cadenas de ADN. Posteriormente, una polimerasa termoestable (Taq polimerasa) amplifica los dos iniciadores en una serie repetitiva de ciclos lo cual resulta en una acumulación exponencial de copias. La incorporación de nucleótidos marcados durante el PCR puede producir grandes cantidades de sondas a partir de cantidades mínimas de ADN genómico o de plásmidos

linearizados. Además, el tamaño de la sonda amplificada puede ser definido en las terminaciones 5' de los iniciadores permitiendo una producción sencilla de sondas de un tamaño requerido. (Boehringer Mannheim. 1996).

La detección de ácido nucleico viral durante el período de latencia puede ser efectuado por HIS utilizando sondas de ácido nucleico, dirigidas a genes que son abundantes durante la replicación viral y que son transcritos con alta frecuencia debida a que la sensibilidad de la HIS depende considerablemente de tener un número adecuado de copias de ácido nucleico viral (arriba de 20-50) en las células infectadas. Lo anterior es una gran ventaja de la HIS pues detecta una célula infectada con un alto número de copias de ácido nucleico o unas cuantas células (3-4) con la cantidad adecuada de ácido nucleico viral. Otros métodos de biología molecular como el southern y northern blot fallan la detección en dichas condiciones y en los casos donde se obtiene una sensibilidad similar, la HIS proporciona la ventaja adicional de localizar con precisión el ácido nucleico viral en los tejidos, correlacionando los cambios morfológicos con la infección viral (Brown, C. 1998).

Las reacciones de precipitación de enzimas han sido utilizadas eficientemente en experimentos de HIS utilizando productos de precipitación de enzimas que soportan la digestión proteolítica y los pasos de desnaturalización realizados durante la HIS. Entre los productos se encuentran varios precipitados formados por la fosfatasa alcalina (Rojo rápido, nueva fuchsina y el BCIP/NBT), el precipitado de la diaminobencidina formado por la peroxidasa y el X-Gal formado por la β -galactosidasa. En estos casos, la digestión y la desnaturalización de la HIS remueve las capas del anticuerpo y de la enzima de detección pero el precipitado permanece firmemente en el sitio (Speel *et. al.* 1994)

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Diseño Experimental

Para la estandarización de la técnica de HIS se obtuvieron muestras de tejidos linfoides (bazo, y linfonodos mandibulares e inguinales) fijadas en formalina al 10%, amortiguada durante 24-48 horas y embebidas en parafina para obtener secciones de 3 μm , con tinción rutinaria de hematoxilina y eosina y su evaluación microscópica. Posteriormente de las muestras seleccionadas se realizaron secciones de 3 μm en blanco utilizando laminillas Probe On plus (Fisher Scientific, Pittsburg, USA) para ser utilizados en los protocolos de HIS. Como controles positivos se emplearon secciones de tejidos linfoides de casos de PMWS con lesiones y cuerpos de inclusión característicos (Fig. 1 y 2, respectivamente), provenientes del estado de Jalisco y de casos del estado de Hidalgo con lesiones de PDNS y probadas por HIS en España (Fig. 3). Los controles negativos consistieron en muestras de tejido linfoide procedentes de animales sanos. En ambos controles se utilizaron mezclas de hibridación con la sonda marcada con DIG específica para PCV2. Adicionalmente, en cada experimento de HIS se emplearon controles internos para cada tejido positivo a PCV2, en los cuales la mezcla de hibridación no contenía la sonda marcada. Para la estandarización de la hibridación in situ se utilizó una sonda de cADN-DIG marcada derivada por PCR a tres diferentes concentraciones de la sonda con el fin de determinar la concentración óptima para la obtención de una adecuada señal de hibridación. Dichas concentraciones fueron 534 ng, 200 ng y 134 ng en 200 μl de solución de hibridación.



Fig. 1. PMWS. Infiltrados histiocíticos y presencia de sincitios celulares, Bazo. H.E. 400x

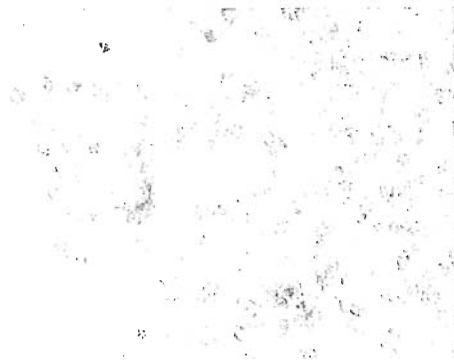


Fig. 2. PMWS. Múltiples cuerpos de inclusión basofílicos intracitoplasmáticos en macrófagos, Bazo. H.E. 400x

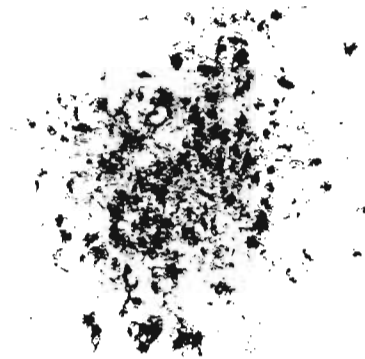


Fig. 3. PDNS. Señal de hibridación positiva (Cortesía de J. Segalés), Linfonodo. H.E. 400x

4.2 Producción y Marcaje de la Sonda

La producción de la sonda de cADN se obtuvo mediante el PCR en un volumen total de 50 μ l utilizando los iniciadores PCV7 y PCV10 publicados por Rosell, et al¹⁰ con condiciones de amplificación pre-establecidos en el laboratorio y utilizando un marcaje directo utilizando un kit comercial (PCR DIG Probe synthesis Kit, Roche Biochemical, Diagnostic, Mannheim, Germany) a una proporción 2:1 de dTTP:dUTP-DIG (Dinucleotido Trifosfato de Timina:Dinucleotido Trifosfato de Uracilo) para obtener una sonda de hibridación altamente marcada. Durante el marcaje de la sonda se emplearon dos controles, uno no marcado en los que se utilizó el mismo templado de PCV2 empleado en la sonda marcada y otro marcado (Control de marcaje) en el que se utilizó el templado

de Activador de Plasminógeno Tisular (tPA) proporcionado en el kit comercial. Los tubos fueron identificados y se realizaron las mezclas como se describe a continuación:

REACTIVO	1 Sonda marcada	2 Sonda no marcada	3 Control de Marcaje
Amortiguador de PCR 10X con MgCl ₂ (15 mM)	5 μl	5 μl	5 μl
Mezcla de marcaje* (2mM de dGTP, dATP, y dCTP, 1.3 mM dTTP y 0.7Mm dUTP-DIG)	5 μl	---	5 μl
Solución dNTP (2mM dGTP, dATP, dCTP y dTTP de cada uno)	---	5 μl	---
Iniciador sentido (+) PCV2 (7.67 ng/μl)	0.5 μl	0.5 μl	---
Iniciador antisentido (-) PCV2 (7.2 ng/μl)	0.5 μl	0.5 μl	---
Templado PCV2(Concentración)	4.5 μl	4.5 μl	---
Iniciador sentido (+) tPA	---	---	5 μl
Iniciador antisentido (-) tPA	---	---	5 μl
Templado tPA	---	---	5 μl
Mezcla de Enzima (3.5U/ μl)	0.75 μl	0.75 μl	0.75 μl
dd H ₂ O estéril	33.75 μl	33.75 μl	29.25 μl

* dGTP (Dinucleotido Trifosfato de Guanina), dATP (Dinucleotido Trifosfato de Adenina), dCTP (Dinucleotido Trifosfato de Citosina), dNTP (Dinucleotido Trifosfato de Nucleótidos)

Posteriormente, se procedió a realizar la PCR utilizando un termociclador MasterCycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) (Fig. 4), empleando las siguientes condiciones de amplificación:

TEMPERATURAS	TIEMPO	CICLOS	PROCESO
98°C	3 min.	1	Pre-PCR
95°C	30 seg.	35	Desnaturalización
58°C	1 min.	35	Alineación
72°C	90 seg.	35	Extensión
72°C	5 min.	1	Extensión Final
4°C	Variable	1	Conservación

4.3 Preparación del gel de agarosa y visualización de la sonda

La visualización de la sonda se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio. Brevemente, el gel se preparó con 1.5g de agarosa (Promega Corp., Madison WI., USA) en 100ml de agua desmineralizada y se disolvieron en horno de microondas en potencia alta en ciclos de 30 segundos hasta que se disuelva. Una vez disuelta la agarosa se agregaron 10 μ g de Bromuro de etidio (Promega Corp., Madison WI., USA). Se depositaron 30 ml de la agarosa en la cámara de transferencia y se colocó el peine de 10 pozos de 1.5mm y se dejó solidificar. Posteriormente, en la carga del gel se utilizó un volumen de 8 μ l compuesto por 4 μ l de las mezclas con las sondas diluidas con 4 μ l de Amortiguador de Carga (Promega Corp., Madison WI., USA) y se procedió al llenado de los pozos seleccionados. Como marcador de peso molecular se utilizó una mezcla de marcadores de PCR (PCR markers, Promega Corp., Madison WI., USA) el cual se diluyó de la manera descrita. El corrimiento de la cámara se realizó a 100 volts durante 1 hora.

4.4 Purificación de la sonda DIG-marcada

La purificación se realizó en membranas de purificación utilizando el kit High Pure PCR Product purification (Roche Biochemical Diagnostic, Mannheim, Germany) Brevemente, los productos de cada amplificación se ajustaron a un volumen de 100 μ l con agua grado molecular y se agregaron individualmente en un tubo de filtro acoplado a un tubo colector. Posteriormente, se adicionaron 500 μ l de Amortiguador de Ligadura y se procedió a centrifugar a 13000rpm por 30 segundos. El fluido del tubo colector se decantó y se reempló con el filtro y se adicionaron 500 μ l de Amortiguador de Lavado centrifugando a las condiciones descritas. Se decantó el fluido del tubo colector y se adicionaron 200 μ l de Amortiguador de Lavado a los tubos ya acoplados para volver a centrifugar y decantar de manera similar. Finalmente, se adicionaron 50 μ l de Amortiguador de Elusión de ADN a los tubos acoplados, se centrifuga a las mismas constantes y conservando el fluido del tubo colector se vuelve a repetir este mismo paso. El fluido del tubo colector corresponde a la sonda marcada purificada la cual se secó mediante centrifugación al vacío (Eppendorf, Hamburg, Germany), para posteriormente reconstituirse en 25 μ l de amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0)

4.5 Protocolo de HIS

Las secciones de tejido se procesaron en laminillas Probe On plus (Fisher Scientific, Pittsburg, USA) y se manejaron en una estación de trabajo (Fisher Scientific Microprobe Manual Staining System, Pittsburg, USA) (Fig. 5). Las reacciones de HIS se realizaron mediante un protocolo estándar (Roche Biochemical Diagnostic, Mannheim, Germany) modificado como se describe a continuación:

1. Las laminillas se calentaron en una platina térmica a 60°C durante 20-30 minutos.
2. Las laminillas se colocaron en canastillas para desparafinizar los cortes, en Xilol siguiendo 3 pases de 5 minutos seguido de una rehidratación en gradientes de alcohol etílico (EtOH) siguiendo dos pases de 5 minutos en EtOH100%, un pase de 2 minutos en EtOH95% y un pase de 2 minutos en EtOH70%.
3. Se realizó un pase en amortiguador de automatización (Biomedica Corp., Foster City, CA., USA) durante un minuto y las laminillas se acoplaron por pares quedando en contacto por la cara que contiene el tejido (Fig. 6a) colocando las parejas de laminillas en el soporte de la estación de trabajo para que por capilaridad se realicen los lavados y reacciones de la HIS (Figura 6b) y así lograr la optimización de los reactivos.
4. Una vez en el soporte, las laminillas se manejaron en la estación de trabajo (Figura 7), se sumergieron en amortiguador de automatización y se realizó un secado en almohadillas de absorción (Figura 8).
5. Posteriormente, se colocaron 250µl de solución de pepsina al 0.25% en amortiguador de automatización pH 2.0 (titulado con HCl) en forma individual y se aplicaron a las laminillas para la digestión de los tejidos seguido de un secado, para nuevamente adicionar pepsina a las laminillas para su incubación a 37°C durante 10 minutos y después durante 8 minutos a 105°C (Fisher Scientific Microprobe. Pittsburg, USA) (Fig. 9). Al finalizar, se realizó un secado y la digestión se detuvo mediante y cuatro lavados en amortiguador de automatización.
6. Después de la digestión, se aplicó formamida al 100% (Fisher, Scientific, Pittsburg, USA) las laminillas se incubaron a 105°C durante 5 minutos y se hace un secado para proceder a reacción de hibridación con la sonda de cDNA-DIG marcada derivado por PCR a las concentraciones de 534 ng, 200 ng y 134 ng lo que corresponde a 4 µl, 1.5 µl y 1.0 µl en 200 µl de solución de hibridación por cada par de laminillas y se incuba durante 5 minutos a 105 °C, y posteriormente 60 minutos a 37°C.

7. Posteriormente, se realizó una serie de lavados de alta astringencia con soluciones salina de citrato de sodio (SSC) (Promega Corp., Madison WI., USA), 3 veces en SSC 0.5% y 3 lavados en SSC 0.2% seguido de una incubación a 37°C durante 5 minutos en SSC 0.2% finalizando con un secado.
8. Previo a la aplicación del anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (Roche,Biochemical Diagnostic, Mannheim, Germany), se bloquearon las laminillas con amortiguador 1 (NaCl 0.15M, Tris HCl 0.1M, pH 7.5) suplementando con 0.3% de Triton X-100 (Fisher Scientific, Pittsburg, PA) y 1% de suero de borrego. Y se adicionaron se agregaron 250µl del conjugado a una dilución 1:500 en amortiguador 1, 0.3% Triton X-100 y 1% suero de borrego por cada par de laminillas para su incubación durante 45 minutos a 37 °C.
9. Se enjuagaron 6 veces en amortiguador 1 y se procedió al secado.
10. Se removieron las laminillas del soporte, se pusieron en la canastilla y se agitaron en amortiguador de automatización durante 2 min.
11. Se colocaron nuevamente las laminillas en el soporte.
12. Se lavo en amortiguador 2 (MgCl₂ 0.06M, NaCl 0.12M, Tris 0.1M pH 9.5) suplementado en el momento de ser utilizado con Tween 20 (Hycl de México SA. De CV) al 0.4%, y Brij 35 (Fisher Scientific, Pittsburg, USA) al 0.25%.
13. Se revela con cromógeno que contiene NBT (azul-nitro tetrazolio, Roche,Biochemical Diagnostic, Mannheim, Germany) al 0.45% y BCIP (5-bromocresil-3-indolilfosfato, Roche,Biochemical Diagnostic, Mannheim, Germany) al 0.35% disuelto en amortiguador 2 suplementado durante 30 a 60 minutos.
14. Se bloqueo la reacción con agua destilada, y se remueven las laminillas del soporte.
15. Se tiñeron las laminillas con hematoxilina de Harris o verde rápido y se montan con resina sintética (Entellan, Merck,) para su evaluación microscópica.

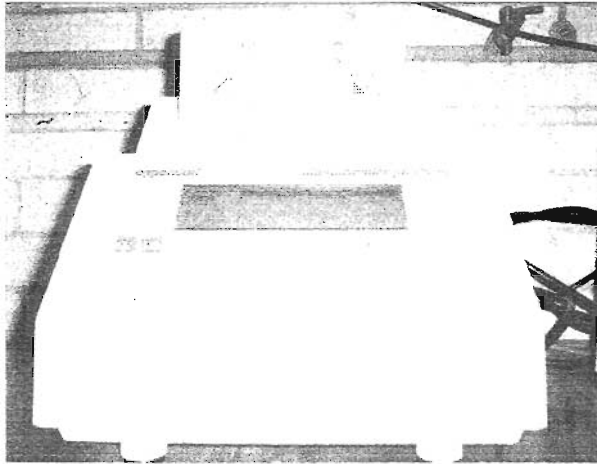


Fig. 4. Termociclador MasterCycler (Eppendorf, Hamburg, Germany).

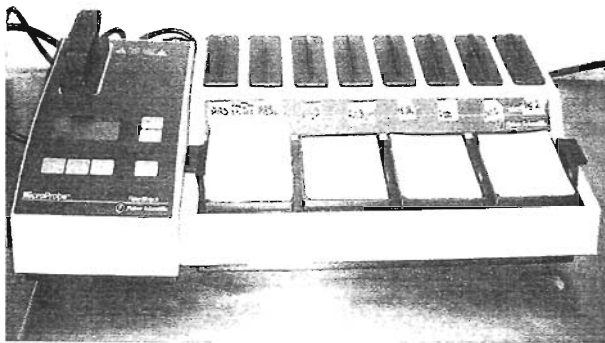


Fig. 5. Estación de trabajo (Fisher Scientific Microprobe Pittsburg, USA).

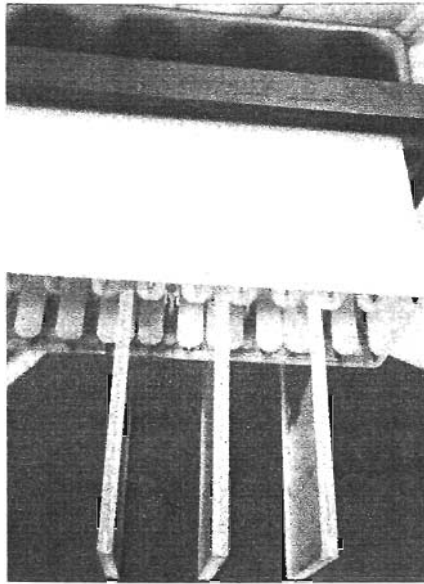


Fig. 6a. Acoplamiento por pares de las laminillas en el sujetador, quedando en contacto por la cara que contiene el tejido.

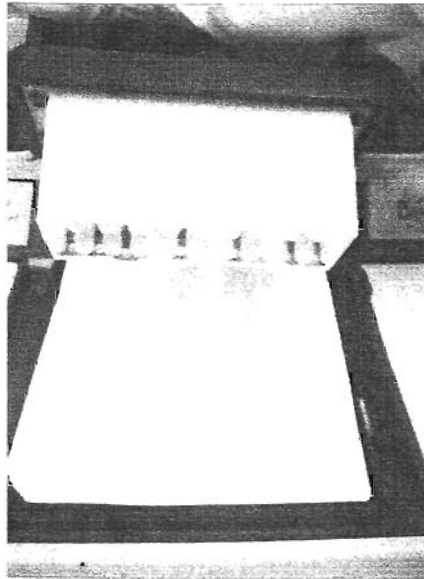


Fig. 6b. Absorción por capilaridad.

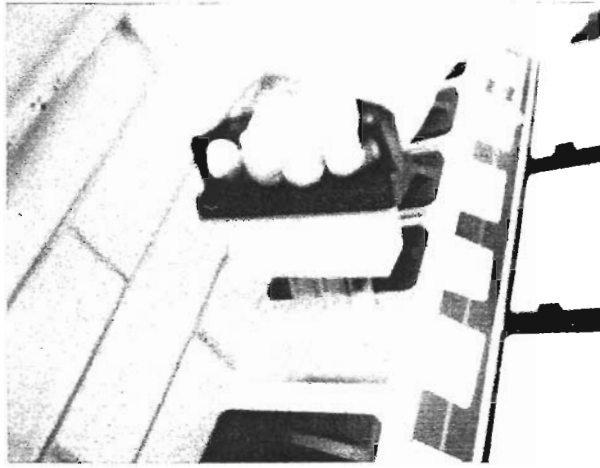


Fig. 7. Manejo de la estación de trabajo sumergiendo en el amortiguador de automatización.

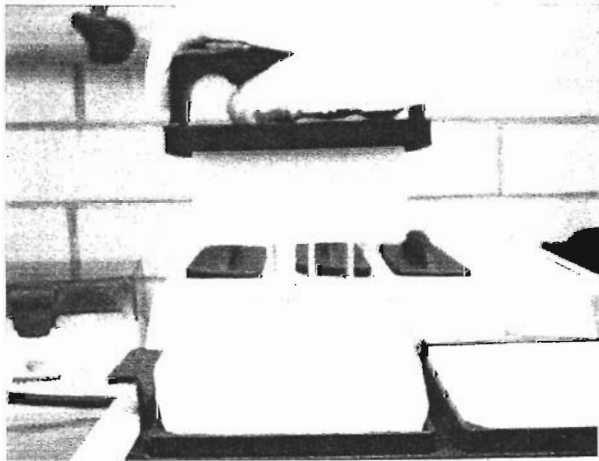


Fig. 8. Realización del secado en almohadillas de absorción (blot).

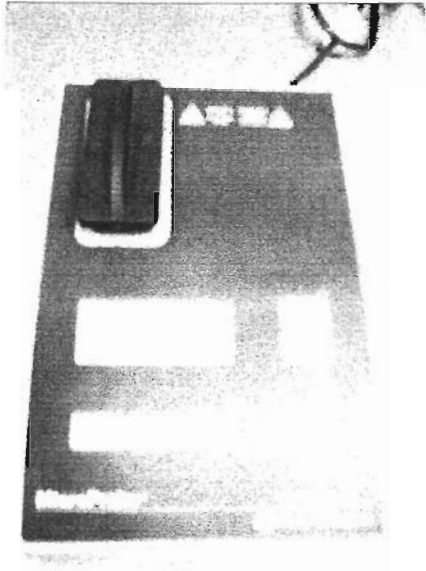


Fig. 9. Incubadora Fisher Scientific Microprobe Pittsburg, USA.

V. RESULTADOS

El método de marcaje de la sonda utilizado consistió en la incorporación directa de dUTP marcado con DIG durante la amplificación por la PCR. Este método produce una sonda para HIS altamente marcada mediante la incorporación en proporción 2:1 de dTTP y dUTP-DIG. La visualización de los productos en el gel de agarosa se muestra en la figura 10 en donde se aprecian en el carril 1 las bandas de los marcadores de peso molecular (PM), en el carril 2 una banda con un PM > 500 pares de bases (bp) que corresponde el producto del control de tPA. En el carril 3 se ubica la banda del control no marcado de PCV2 con un PM de aproximadamente 425 bp y en el carril 4 con un PM aparente de > 500 bp la banda que corresponde a la sonda DIG-marcada de PCV2.

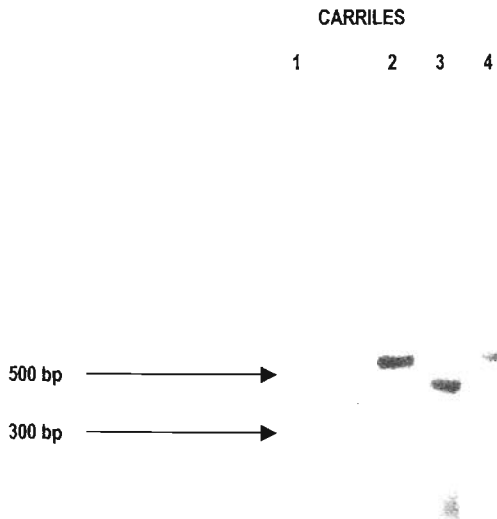


Fig. 10. Muestra en gel de agarosa, de los productos de ADN de PCV2 por amplificación a través de PCR. En el carril 1, esta el marcador de peso molecular, en el carril 2 el producto del control de tPA, en el carril 3 el control no marcado de PCV2 y en el carril 4 la sonda DIG-marcada.

Para la estandarización de HIS se utilizaron tres diferentes concentraciones de la sonda de cDNA-DIG marcada derivada por PCR con el fin de determinar la concentración óptima que proporcionara una adecuada señal de hibridación. Dichas concentraciones fueron 534 ng, 200 ng y 134 ng en 200 μ l de solución de hibridación. En todos los experimentos de HIS descritos se incluyeron preparaciones histológicas de tejidos linfoides (tonsilas y linfonodos submandibulares) controles negativos procedentes de un animal sano libre de circovirus porcina. En estos controles la mezcla de hibridación incluyó la sonda específica para PCV. En todos los controles negativos utilizados no hubo ninguna señal de hibridación y los fondos de las preparaciones se aprecian limpios (Figura 11).



Fig. 11. Control negativo de animal sano en el cual no se muestran ninguna reacción de hibridación y fondos limpios.

Tonsila. Verde rápido. 400x.

Adicionalmente, en cada experimento de HIS se emplearon controles internos de hibridación para cada tejido positivo a PCV2 en los cuales la mezcla de hibridación no contenía la sonda marcada. Estos controles se corrieron paralelamente a los controles positivos de PMWS y PDNS. En todos los experimentos de HIS, los controles de hibridación exhibieron fondos limpios los cuales representan ausencia de reacción inespecífica. Con respecto al caso de PMWS, todos las HIS de los controles positivos presentaron señal de hibridación positiva a las concentraciones utilizadas. Las figuras 12A y 12B representan el control interno de hibridación del caso de PMWS a magnificaciones de 100x y 400x, respectivamente, observándose la ausencia de la reacción y fondos limpios lo que indica que en ausencia de la sonda no se dan reacciones inespecíficas.

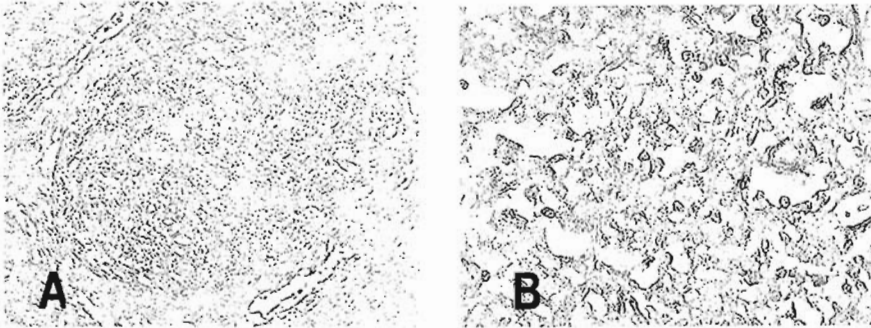


Fig. 12. A. Control interno de hibridación de un caso positivo a PMWS muestra fondos limpios evidenciando ausencia de reacciones inespecíficas Bazo, Verde Brillante. 100x. B. Detalle de la figura anterior en donde claramente se observan la ausencia de fondos inespecíficos. Bazo, Verde Brillante. 400x.

La HIS a la concentración de 534 ng promovió una fuerte señal de hibridación en grandes grupos celulares predominantemente en el citoplasma y ocasionalmente en núcleos distribuida de manera difusa a lo largo del corte (Figuras 13A y 13B). En la concentración de 200 ng la señal de hibridación es similar en distribución e intensidad (figura 14A). Asimismo, se aprecia que la hibridación abarca la totalidad del citoplasma celular y en ocasionalmente se aprecian señales positivas en el núcleo (Figura 14B). Por último en la concentración de 134 ng la señal de hibridación es ligeramente más tenue, pero claramente identificable y con la misma distribución observada en las concentraciones anteriores (Figura 15A). En 400x, se observa que las células no están totalmente cubiertas como en las otras concentraciones, pero aún así se determina cuáles células son positivas a la hibridación (Figura 15B).

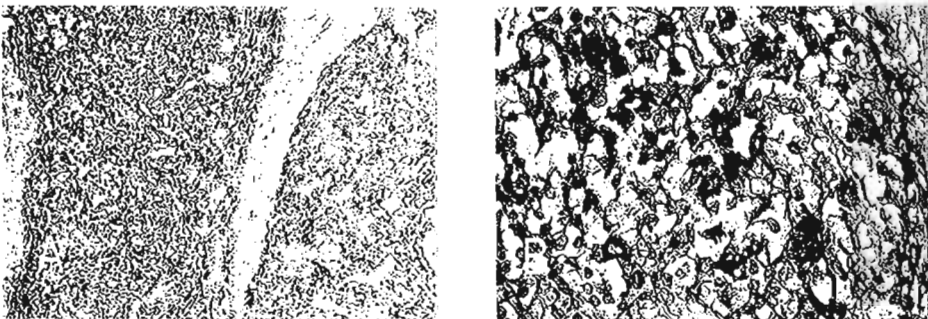


Fig. 13. A. Reacción de hibridación positiva a la concentración 534ng, en la cual se muestra una distribución difusa a través de los centros germinales. Bazo, Hematoxilina. 100x. B. Señal de hibridación positiva en la concentración 534ng, en la cual se observa una gran intensidad de dicha reacción, que predomina en el citoplasma y en menor proporción al núcleo. Bazo, Hematoxilina. 400x.

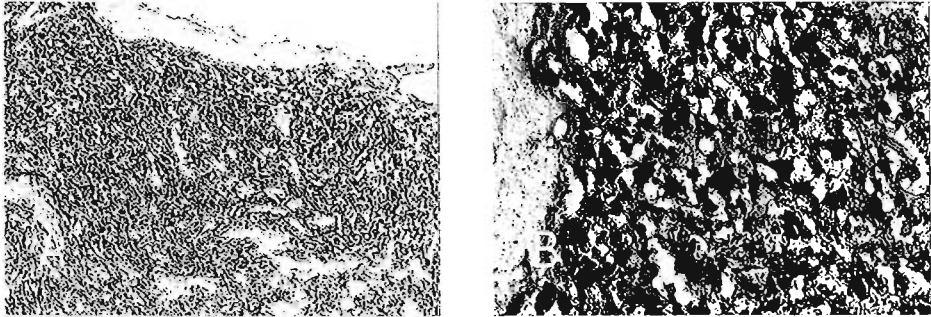


Fig. 14 A. Reacción de hibridación positiva a la concentración 200ng con distribución e intensidad similares a la concentración de 534ng. Bazo, Verde Rápido. 100x. B. La reacción de hibridación abarca el citoplasma celular en su totalidad y las señales positivas se alcanzan a apreciar ocasionalmente en el núcleo. Bazo, Verde Rápido. 400x.

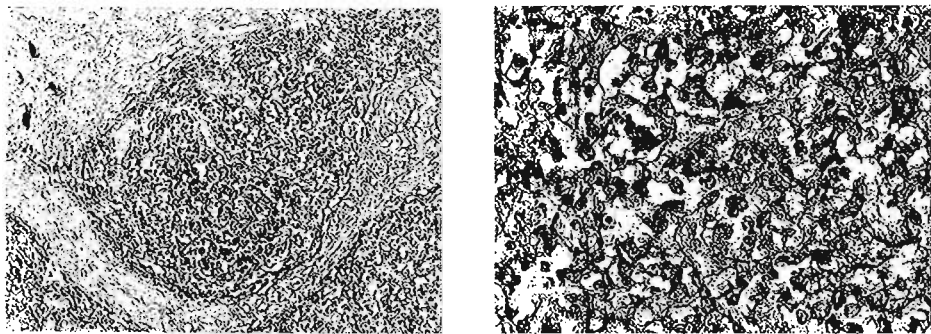


Fig. 15 A. La concentración 134ng muestra que la reacción de hibridación se vuelve ligeramente más tenue, en comparación con las dos concentraciones anteriores, pero conserva la misma distribución observada en dichas concentraciones. Bazo, Verde Rápido. 100x. B. . La reacción de hibridación no se observa recubriendo la totalidad de las células como en las concentraciones anteriores. Sin embargo, la reacción aun permite determinar cuales son las células positivas. Bazo, Verde Rápido. 400x.

Los controles de hibridación de PDNS se observan igual que los controles de hibridación de PMWS. Como puede apreciarse en las figuras 16A y 16B, el fondo se encuentra libre de reacciones inespecíficas.

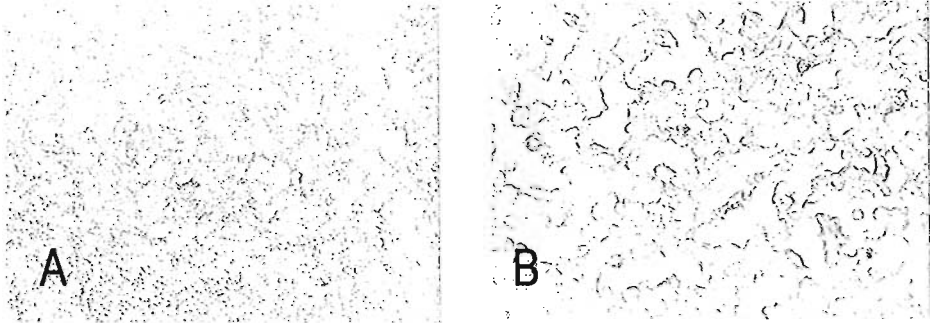


Fig. 16A y 16B. Bazo. Órganos positivos a PDNS utilizados como controles internos de hibridación, en el cual se muestra la ausencia de señal de hibridación, y la inespecificidad causada en ausencia de la sonda, así como la ausencia de fondos inespecíficos. Verde Rápido. 100x y 400x

Con respecto a las laminillas del caso de PDNS, todas las concentraciones utilizadas detectaron focos múltiples de reacción positiva de hibridación distribuidas principalmente en folículos linfoides (Figura 17A, 17B y 18A). Sin embargo, a la concentración de 534 ng se observaron señales de hibridación puntiformes en células individuales (Figura 17A), que no fueron apreciadas por las otras concentraciones utilizadas. Así mismo, al igual que en las laminillas de PMWS, la intensidad de la reacción fue descendiendo gradualmente de manera proporcional a las concentraciones utilizadas tal y como se observa en la figura 18B en donde se observa una fuerte señal de hibridación y en las figuras 19A y 19B en las que se observan reacciones de hibridación menos intensas que la descrita para 534 ng, siendo ligeramente más tenue a la concentración de 134 ng en donde la señal se alcanza a apreciar claramente dentro de las células.

Por último, utilizando el mismo diseño y controles referidos anteriormente, se probó la capacidad de hibridación de la sonda recién producida sin purificar a la concentración recomendada para HIS (50ng/50µl) y se obtuvieron señales de hibridación similares que en la sonda purificada para los casos de PMWS y de PDNS.

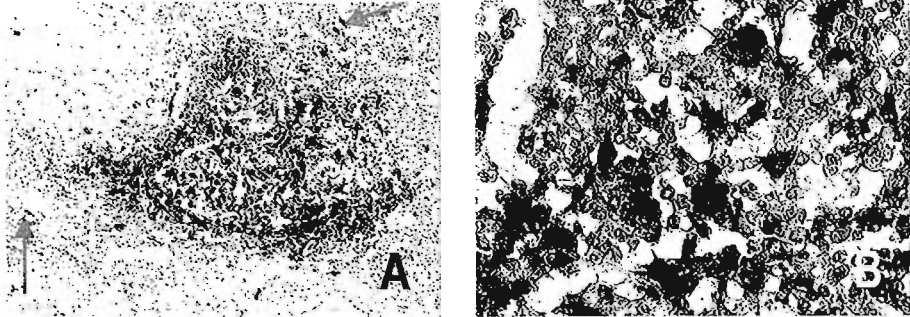


Fig. 17A. La concentración de 534ng muestra que la señal de hibridación se encuentra distribuida en focos múltiples localizados principalmente en folículos linfoides. Particularmente en esta concentración, se observan con claridad reacciones de hibridación en células individuales. Linfonodo, Hematoxilina. 10x. B. Reacción de hibridación positiva en la concentración 534ng, en la cual se presenta una gran intensidad, predominando esta en el citoplasma y en una menor proporción en el núcleo. Linfonodo, Hematoxilina. 40x.

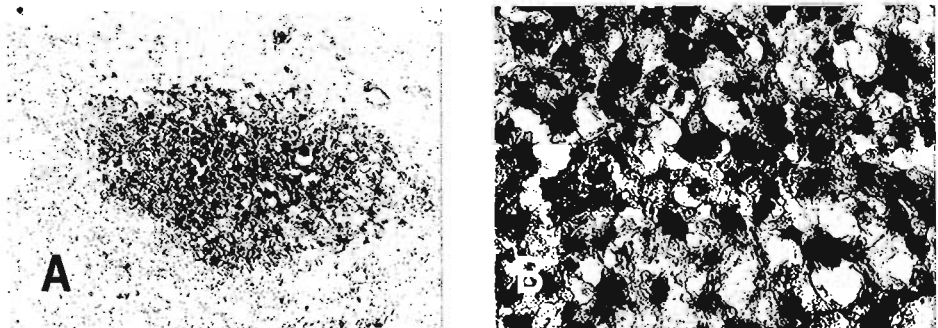


Fig. 18 A. Se muestra un foco de reacción de hibridación positiva localizada en los folículos linfoides. Linfonodo, Verde Rápido. 100x. B. Se observa a la reacción de hibridación abarcando el citoplasma de las celular en su gran totalidad, aunque se alcanzan a apreciar en el núcleo ocasionalmente algunas señales positivas. Linfonodo, Verde Rápido. 400x.

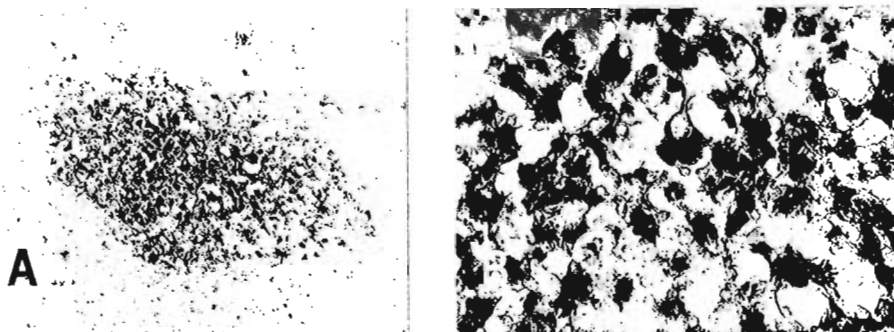


Fig. 19 A. Se muestra la reacción de hibridación menos intensa que la anterior concentración (534 ng), siendo de la misma afectada, mostrándose una disminución de la concentración de la misma. Linfonodo, Verde rápido. 100x. B. Se observa la disminución de la intensidad de la señal de hibridación comparándose con la anterior concentración. Linfonodo, Verde Rápido. 400x.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

VI. DISCUSIÓN

Entre las ventajas de la utilización de sondas de cADN obtenido por PCR se encuentra la facilidad de producción y la optimización del tamaño de las sondas de hibridación aunado a la alta sensibilidad que le confiere la alta proporción de nucleótidos incorporados en el marcaje con DIG (Boehringer Mannheim 1996a; Brown, C. 1998; Herrington, et. al. 1992; Mullink, et. al. 1989; Speel, et. al. 1994). Dentro de los métodos de marcaje con digoxigenina para la producción de sondas de cADN se encuentran el marcaje aleatorio y el marcaje directo mediante incorporación de nucleótidos DIG-modificados durante la PCR. Estos métodos proporcionan sondas altamente marcadas con DIG mediante la incorporación de nucleótidos modificados en proporción 2:1 de dTTP: dUTP-DIG (Boehringer-Mannheim, 1996b). Los protocolos de hibridación reportados para la detección de PCV-2 utilizan oligosondas (Rosell, et. al. 1999) o sondas de cDNA-DIG marcadas mediante random primed (Rosell, et. al. 1999, Choi, et. al. 2000). La utilización de oligosondas como métodos de detección tiene las ventajas de que al ser pequeñas (20-40 bases) penetran con facilidad los tejidos y su reducido costo, sin embargo la sensibilidad de la detección es más baja en comparación con las sondas de cDNA debido que el marcaje mediante la transferasa terminal incorpora poca cantidad de nucleótidos marcados con DIG (Brown, C. 1998, Boehringer Mannheim 1996a). Por tal motivo en el presente trabajo se optó por el empleo de sondas de cDNA para aumentar la sensibilidad de la detección. Adicionalmente y a pesar de que los métodos descritos para el marcaje de sondas de cADN proporcionan sondas altamente marcadas con DIG, se optó por el marcaje directo con incorporación de nucleótidos DIG-marcados durante la amplificación por PCR debido a que las sondas así obtenidas pueden utilizarse directamente en protocolos de HIS. Sin embargo, lo anterior es recomendable cuando las sondas son utilizadas inmediatamente después de su producción (Roche, 2002) y sólo aplica en situaciones en las cuales el laboratorio desarrolle una gran carga de trabajo de HIS. Por lo tanto en casos donde las sondas no se utilicen inmediatamente y sea necesario su almacenamiento a -20°C es recomendable la purificación de la misma debido a que existe un alto riesgo de desnaturalización. Los métodos de purificación recomendados para sondas de cDNA DIG-marcadas incluyen a la precipitación directa con etanol y la purificación en membranas de fibras de vidrio en presencia de sales caotrópicas. Este último es recomendable en sondas de más de 100 bp y tiene la ventaja de eliminar restos de iniciadores y de nucleótidos no incorporados (Boehringer-Mannheim, 1996b). Por tal motivo, para la estandarización del protocolo de HIS para la

detección de PCV2 se realizaron ambos métodos; la purificación inmediata de la sonda mediante el uso de columnas y la utilización inmediata de la sonda posterior a su producción, observándose resultados y señales de hibridación similares. De este modo se cuenta con dos opciones diferentes que cubren necesidades específicas acordes a las necesidades y carga de diagnóstico en el laboratorio. Si se cuenta con un número alto de casos se puede optar por utilizar las sondas sin purificación inmediatamente a su producción. Y si no se están realizando HIS de manera rutinaria y constante se realizaría la purificación de la sonda para su adecuado almacenamiento y conservación. Adicionalmente, el método elegido utilizándolo de forma directa sin purificación disminuye el costo y reduce el tiempo de producción ya que se requieren menos número de pasos para la obtención de la sonda marcada.

Con respecto a la comprobación del marcaje de la sonda realizada en el gel de agarosa (figura 8) se aprecia que existe una diferencia en el PM de las bandas correspondientes el control no marcado de PCV2 (carril 3) y a la sonda DIG-marcada (carril 4). La diferencia en el PM se debe a la presencia de digoxigenina en los nucleótidos incorporados en el marcaje durante la PCR haciendo que el producto corra más lentamente en el gel. De hecho, el control DIG-marcado de tPA que se observa en el carril 4 corresponde un tamaño aparentemente mayor de 500 bp, cuando en realidad el amplicon sin marcar es de 442 bp (Roche Applied Sciences, 2003). Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en el gel.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la intensidad de las señales de hibridación fue directamente proporcional a la concentración de la sonda de cDNA-DIG marcada. Dichas concentraciones correspondieron a 534ng, 200ng, y 134ng en 200 μ l de solución de hibridación. Se menciona que la concentración recomendada para la HIS es de 50ng/50 μ l (Choi *et. al.* 2000). De tal modo, la concentración de 200ng/200 μ l de los experimentos realizados corresponde a la concentración recomendada misma que resultó ser también la concentración óptima para la detección del PCV2. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre dicha concentración óptima y la concentración de 134 ng/200 μ l por lo que ésta última podría utilizarse para el diagnóstico rutinario. Lo anterior reduciría significativamente los costos de la prueba y la operatividad en el laboratorio puesto que una sonda marcada en las condiciones referidas proporcionaría 25 reacciones de HIS. Por tal motivo se sugiere que esta concentración se utilice en los casos donde los hallazgos clínicos e histopatológicos sean altamente compatibles con PDNS y PMWS puesto que corresponde a la concentración mínima probada para la detección de PCV2.

Cabe señalar que es muy importante estandarizar y determinar la concentración óptima de cada sonda puesto que al determinar la cantidad mínima necesaria para obtener una adecuada señal de hibridación se reducen los costos de la prueba.

En los casos de PMWS la única diferencia entre las concentración máxima (534 ng) y la mínima (134ng) fue la intensidad en la señal de hibridación. En la máxima concentración la señal es más intensa y cubren en su totalidad los grupos celulares predominantemente en el citoplasma y ocasionalmente en núcleos mientras que en la concentración de 134 ng la señal de hibridación es ligeramente más tenue y se observa que las células no están totalmente cubiertas como en las otras concentraciones, sin embargo, este resultado es suficiente para el diagnóstico de la enfermedad y su asociación con PCV2.

En los casos de PDNS en la concentración de 534 ng se observaron señales de hibridación puntiformes en células individuales no observables en la concentración mínima, pero la intensidad de la reacción se observa similar que en los casos de PMWS, por lo que de igual modo el resultado de la concentración mínima proporciona un diagnóstico positivo de la presencia de PCV2. Las células reaccionaron ante la hibridación tomando una tonalidad oscura a negro, por el ácido nucleico del PCV2, y en las tres concentraciones hubo más reacción dentro del citoplasma y ocasionalmente en el núcleo, siendo la parte con mayor reacción dentro del tejido el área de los centros germinativos tal y como se describe en la literatura (Choi *et. al.* 2000). Durante el desarrollo de las pruebas se encontró una diferencia en cuanto a la variación en intensidad y distribución de lesiones en los tejidos linfoides. Se menciona que dichas variaciones dependen del estado de la enfermedad en la cual se encuentren los cerdos (Rosell, *et. al.* 1999).

Los resultados obtenidos revelan que las señales de hibridación de PMWS y PDNS sin importar la concentración utilizada mostraron distribuciones similares a las descritas en la literatura (Rosell *et. al.* 1999; Choi *et. al.* 2000; Segalés *et al.* 2002). La distribución de la detección del PCV2 es más difusa en PMWS que en PDNS y se menciona que está relacionado con que la enfermedad de PMWS el cuadro clínico es más agudo dando por resultado lesiones más marcadas sugiriendo una mayor presencia del virus en los tejidos. En los casos de PDNS, debido a la reacción de hipersensibilidad tipo III asociada a la presencia de depósitos de inmunoglobulina y de factores de complemento en el bazo y glomérulo que desencadena la patología característica sugiere que no son necesarias grandes cargas virales para el desarrollo de la enfermedad (Higgins, 1993, Helie, *et.*

al. 1995, Sierra, et. al. 1997). De este modo la distribución del virus y por lo tanto de las señales de hibridación son más discretas y multifocales.

Con base a los resultados obtenidos y considerando las cargas virales asociadas en los diferentes síndromes asociados a circovirus porcino se recomienda el uso de la concentración máxima utilizada (534 ng/200 μ l) en los casos sospechosos de circovirus fetal y neonatal que presenten lesiones de miocarditis y encefalitis no supurativa (West *et. al.* 1999; O'Connor *et. al.* 2001; Ellis *et. al.* 2004), además de una congestión hepática crónica (O'Connor *et al.* 2001) puesto que en dichos casos se esperaría una menor carga viral que podría ser detectada con la concentración máxima ya que con ésta pudieron detectarse señales intensas de hibridación en células aisladas incrementando de dicho modo la sensibilidad en la detección. Sin embargo, tomando en cuenta que la severidad de las lesiones depende del momento en que ocurre la infección fetal y la detección del virus por HIS estará limitada a la gravedad de la infección puesto que el virus necesita que en la célula del hospedero haya una gran cantidad de actividad mitótica y (Sánchez, *et. al.* 2003; Pensaert, *et al.* 2004).

Por último, cabe señalar que aunque se cuenta con el método de PCR para el diagnóstico de PCV2, éste último por si solo no es considerado una prueba contundente de la participación del PCV2 en los síndromes mencionados ya que la distribución del PCV2 en la población porcina es muy amplia por lo que puede obtenerse con frecuencia una amplificación positiva en cerdos clínicamente sanos. Por tal motivo, la HIS constituye un método de diagnóstico más confiable en el estudio y diagnóstico de la patología asociada a PCV2 ya que determina la presencia del virus asociada a las lesiones características de la enfermedad constituyendo una herramienta de gran valor diagnóstico con aplicaciones múltiples.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Allan, G. M., Meehan, B., Todd, D., Kennedy, S., Ellis, I., Clark, F. G., Harding, J., España, E., Botner, A., Charreyre, C. 1998. Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndrome. *Veterinary Record*. 142, 467
- 2.- Allan, G. M. and Ellis J. A. 2000. Porcine circoviruses: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 12, 3-14.
- 3.- Bassami, M. R., Berryman, D., Wilcox, G. E., Raidal, S. R. 1998. Psittacine Beak and Feather Disease Virus Nucleotide Sequence Analysis and Its Relationship to Porcine Circovirus, Plant Circoviruses, and Chicken Anaemia Virus. *Virology*. 249, 453-459.
- 4.- Boehringer Mannheim. 1996. General Introduction to *In situ* Hybridization. In: Nonradioactive *In situ* Hybridization Application Manual. Second Edition. Boehringer Mannheim. Germany.
- 5.- Brown, C. 1998. *In situ* Hybridization with Riboprobes: An overview for Veterinary Pathologists. *Vet. Patol*. 35, 159-167.
- 6.- Choi, C. and Chae, C. 1999. In situ Hybridization for the Detection of Porcine Circovirus in Pigs with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome. *J. Comp. Path.* 121, 265-270.
- 7.- Choi, C. and Chae, C. 2000. Distribution of Porcine Parvovirus in Porcine Circovirus 2-infected Pigs with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome as shown by In-situ Hybridization. *J. Comp. Path.* 123, 302-305.
- 8.- Darwich, L., Segalés, J., Mateu, E. 2004. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: en immune riddle. *Arch Virol*. 149, 857-874.
- 9.- Ellis, J., Clark, E., Haines, D., West, K., Krakowka, S., Kennedy, S., Alla, G.M. 2004. Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. *Veterinary Microbiology*. 98, 159-163.
- 10.- Helie, P., Drolet, R., Germain, M., Bourgault, A. 1995. Systemic necrotising vasculitis and glomerulonephritis in grower pigs in southwestern Quebec. *Canadian Veterinary Journal*. 36, 150-154.
- 11.- Herrington, C.S. and McGee, J.O'D. 1992. Principles and basic methology of DNA/RNA detection by *in situ* hybridization. In: *Diagnostic Molecular Pathology. A Practical Approach Series*. IRL Press/Oxford University Press. USA. 35, 69-102.
- 12.- Higgins, R., 1993. Glomerulo-nephropathy síndrome. *Pig Veterinary Journal*. 31, 160-163
- 13.- Jestin, J.L., Volioti, G., Winter, G. 2001. Improving the display of proteins on filamentous phage. *Res Microbiol*. 152,187-191.

- 14.- Kim J, Choi C, Han DU, Chae C. 2001 Simultaneous detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome by multiplex PCR. *Vet Rec.* 149, 304–305.
- 15.- Kyoung-jin, Y., Jepsen, J., Pogranichniy, M., Sorden, S., Stammer, R., Evans, L. 2004. A novel approach to intrauterine viral inoculation of swine using PCV type 2 as a model. *Theriogenology.* 61, 1025-1037.
- 16.- Mankertz, A., Hattermann, K., Ehlers, B., Soike, D. 2000. Cloning and sequencing of columbid circovirus (coCV), a new circovirus from pigeons. *Arch Virol.* 145, 2469-2479.
- 17.- Mateusen, B., Sanchez, E., Van Soom, A., Meerts, P., Maes, D.G., Nauwynck, J. 2004. Susceptibility of pig embryos to porcine circovirus type 2 infection. *Theriogenology.* 61, 91-101.
- 18.- Mullink, H., Walboomers, J.M.M., Tadema, T.M., Jansen, D.J., and Meijer, C.J.L.M. 1989. Combined Immuno- and Non-radioactive Hybridocytochemistry on Cells and Tissue Sections: Influence of Fixation, Enzyme Pre-treatment, and choice of chromogen on Detection of Antigen and DNA Sequences. *J.Histochem. Cytochem.* 37, 603-609.
- 19.- Nielsen, J., Ladekjaer Hansen, A-S., Bille-Hansen, V., Lohse, I., Botner, A. 2004. PCV2-Associated disease following intrauterine infection. *Proceedings of the 18th IPVS Congress, Hamburg, Germany, Volume I.* p. 14
- 20.- O'Connor, B., Gauvreau, H., West, K.H., Bogdan, J., Ayroud, M., Clark, E.G., Konoby, C., Allan, G.M. Ellis, J.A. 2001. Multiple porcine circovirus –2 associated abortions and reproductive failure in a multisystemic swine production unit. *Can. Vet J.* 42, 551-553.
- 21.- Pensaert, B., Sanchez, E., Ladehjaer-Mikkelsen, A., Allan, G. M., Nauwynck, J. 2004. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. *Veterinary Microbiology.* 98, 175-183.
- 22.- Phenix, K.V., Weston, J.H., Ypelaar, I., Lavazza, A., Smyth, J.A., Todd, D., Wilcox, G.E., Raidal, S.R. 2001. Nucleotide sequence analysis of a novel circovirus of canaries and its relationship to other members of the genus *Circovirus* of the family *Circoviridae*. *J Gen Virol.* 82, 2805-2809.
- 23.- Ramos-Vara, J., Durán, O., Render, J., Craft, D. 1997. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in the USA. *Veterinary Record.* 141, 479-480.
- 24.- Rosell, C., Segalés, J., Plana-Durán, J., Balasch, M., Rodríguez-Arriola, G.M., Kennedy, S., Allan, G.M., McNeilly, F., Latimer, K.S., Domingo, M. 1999. Pathological, Immunohistochemical, and In-situ Hybridization Studies of Natural Cases of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in Pigs. *J. Comp. Path.* 120, 59-78.
- 25.- Rosell, C., Segalés, J., Ramos-Vara, J.A., Folch, J.M., Rodríguez-Arriola, G.M., Durán, C.O., Balasch, M., Plana-Durán, J., Domingo, M. 2000. Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Vet. Rec.* 146, 40-43.

- 26.- Sanchez, E., Meerts, P., Nauwynck, H., Pensaert, M. 2003. Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life. *Veterinary microbiology*. 95, 15-25.
- 27.- Saoulidis, K., Kyriakis, S.C., Kennedy, S., Lekkas, S., Miliotis, Ch. C., Allan, G.M., Balkamos, G.C., and Papoutsis, P.A. 2002. First report of Post-Weaning Multisystemic Wasting Síndrome and Porcine Dermatitis and Nephropathy Síndrome in Pigs in Greece. *J. Vet. Med.* 49, 202-205.
- 28.- Segalés J., Piella, J., Domingo, M. 1998. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Spain. *Veterinary Record*. 142, 483-486.
- 29.- Segalés J., Rosell C., Rodríguez-Arrijo G. And Domingo M. 2000. Patología de la circovirosis porcina. *Porci* 56: 41-54.
- 30.- Segalés J., Pastor J., Cuenca R. And Domingo M. 2000. Haematological parameters in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. *Veterinary Record*. 146, 675-676.
- 31.- Segalés J. and Domingo M. 2002. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Vet. Quartely*. 24, 109-124.
- 32.- Sierra, M., De las Mulas, J., Molenbeek, R., Quezada, M. 1997. Porcine immune complex glomerulonephritis dermatitis síndrome. *European Journal of veterinary pathology*. 3, 63-70
- 33.- Smith, W., Thomson, J., Done, S. 1993. Dermatitis/nephro syndrome of pigs. *Veterinary Record*. 132, 47
- 34.- Solignac, T. 1997. Syndrome dermatite-néphropathie Quelques obstructions cliniques chez le porcelet. *Seminaire Veterinaire*. 841
- 35.- Speel, E.J.M., Jansen, M.P.H.M., Ramaekers, F.C.S., Hopman, A.H.N. 1994. A novel triple-color detection procedure for brightfield microscopy, combining *in situ* hybridization with immunocytochemistry. *J. Histochem Cytochem*. 42, 1299-1307.
- 36.- Syrjänen, S.M. 1992. Viral Gene Detection by *in situ* hybridization. In: *Diagnostic Molecular Pathology. A practical approach*. Vol. I. C.S. Edited by Herrington and J.O'D. McGee. The Practical Approach Series. IRL Press/Oxford University Press. USA. 45, 103-139.
- 37.- Thibault, S., Drolet, R., Germain, M., D'allaire, I., Larochelle, R., Magar, R. 1998. Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine. *Veterinary Pathology*. 35, 108
- 38.- Tischer I, Rasch R, Tochtermann G. 1974. Characterization of papovavirus- and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg Ser A*. 226, 153-167.
- 39.- Todd, D., Weston, J.H., Soike, D., Smyth, J.A. 2001. Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. *Virology*. 286,354-362.

40.-Trujano, M., Iglesias, G., Segalés J., Palacios J.M., 2001. PCV-2 from emaciated pigs in México. *Vet. Rec.* Jun 23, 148 (25) 792.

41.- Van Halderen, A., Bakker, S., Wessels, J. 1995. Dermatitis/nephropathy syndrome pigs. *Veterinary Record.* 132, 199.

42.- West, K.H., Bystrom, J.M., Wonjnarowicz, C., Shantz, N., Jacobson, M. Allan, G.M., Haines, D.M., Clark, E.G., Krakowka, D., McNeilly, F., Konoby, C., Martin, K., Ellis, J.A. 1999. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus-2. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11, 530-532.

43.- Woods, L.W., Latimer, K.S., Barr, B.C., Niagro, F.D., Campagnoli, R.P., Nordhausen, R.W., Castro, A.E. 1993. Circovirus-like infection in a pigeon. *J Vet Diagn Invest.* 4, 609-612.