



Universidad Nacional Autónoma De México

Facultad De Estudios Superiores Cuautitlán

Estandarización e implementación de una técnica de PCR en Tiempo Real para la determinación de la carga viral de Circovirus Porcino Tipo 2 (PCV2) en corazones fetales procedentes de falla reproductiva en cerdas.

Tesis

Que para obtener el título de:
Médica Veterinaria Zootecnista

Presenta:

Lilian Monserrat Ramos Santes

Asesora: Dra. Lucía Angélica García Camacho

Coasesor: M. en C. Alejandro Vargas Ruíz

Cuautitlán Izcalli, Estado de México 2016



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 ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos **La Tesis:**

Estandarización e implementación de una técnica de PCR en Tiempo Real para la determinación de la carga viral de Círcovirus Porcino Tipo 2 (PCV2) en corazones fetales procedentes de falla reproductiva en cerdas.

Que presenta la pasante: LILIAN MONSERRAT RAMOS SANTES

Con número de cuenta: 30815105-7 para obtener el Título de: Médica 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 ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 21 de octubre de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Lucía Angélica García Camacho	
VOCAL	Dr. Hugo Ramírez Álvarez	
SECRETARIO	Dra. Cynthia González Ruíz	
1er SUPLENTE	M.V.Z. Jesús Arturo Sandoval Romero	
2do SUPLENTE	M.V.Z. Alma Noemí Montes De Oca Chávez	

NOTA: Los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento.

(Art 127 REP)

LMCF/ntm*

**“Todos las personas adultas fueron alguna vez niños
(aunque pocas de ellas lo recuerden)”.**

Le Petit Prince

Antoine de Saint-Exupéry

AGRADECIMIENTOS

Este es uno de los momentos más felices de mi vida y quiero agradecer y compartir con quien ha estado conmigo toda mi vida, quien me crió, cuidó y es uno de mis ejemplos a seguir: **mi madre**; una mujer como ninguna, de carácter fuerte y corazón humilde, siempre trabajando para sacarnos adelante y muy a pesar de los malos ratos tu siempre tenías un abrazo y un beso que llegan al alma. Tus consejos e incluso regaños eran exactos, de ti aprendí lo importante que es dar siempre tu mayor esfuerzo para uno mismo y nuestros seres queridos. Tú confiaste en todo lo que soñé y me ayudaste siempre que lo necesite. Podemos pasar muchos males pero tu amor lo cura todo.

Agradezco también a la Universidad Nacional Autónoma de México, quien me acogió desde los estudios de bachillerato y posteriormente la licenciatura en mi alma mater la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán que me llenó de sabiduría, conocimiento y grandes momentos.

A mis asesores la Doctora Lucía Angélica García Camacho y el Maestro en Ciencias Alejandro Vargas Ruíz, quienes no sólo fueron mis mentores en este camino, sino también mis amigos, consejeros y maestros; quienes con paciencia y su tiempo lograron que este trabajo se concluyera, les tengo mucho cariño y respeto.

A mi querido y amado ingeniero David; es increíble como dos personas tan diferentes los puede unir el amor y la admiración. Gracias por todo este tiempo juntos y por apoyarme en esto, aunque muchas veces no sabías de lo que hablaba tu siempre escuchabas atentamente; gracias por creer en mí, soportarme cuando yo menos podía, darme ánimos y sobre todo darme mucho amor y cariño cuando lo necesite, cuando sentí que ya no podía tú estabas a mi lado. Te amo demasiado.

A mis queridos jefes, amigos y padres, la M.V.Z. Elisa Miranda Cortés y el M. en C. Ismael Hernández Avalos quienes me adoptaron y me han enseñado muchos años la dedicación, el trabajo y el esfuerzo para lograr cada día ser mejor y ayudar a muchos animalitos, gracias por confiar en mí y aceptarme en Can&Cat, en esa fenomenal familia donde tuve el gusto de formar amistades valiosas como la de sus padres Eli, Alex, Armando, Thaor, Andri, Nani, Alma, etc. Espero nunca en la vida defraudarlos y prometo poner en práctica todo lo aprendido.

Por su tiempo para revisar este trabajo y ayudarme a mejorarlo, a la Dra. Cynthia González Ruíz, a la M.V.Z. Alma Montes de Oca Chávez, al Dr. Hugo Ramírez Álvarez y al M.V.Z. Jesús Sandoval Romero.

Por último pero no menos importantes, los fabulosos amigos que hice en esta aventurada travesía llamada Medicina Veterinaria y Zootecnia, Angie, Jessi, Dani, Dulce, Yuli... y así una pequeña pero muy querida lista.

ÍNDICE

I.	Índice	1
II.	Resumen.....	3
III.	Abreviaturas.....	4
IV.	Índice de figuras y tablas.....	6
V.	Introducción.....	7
	5.1 Generalidades del circovirus.....	7
	5.2 Antecedentes de la enfermedad asociada a circovirus porcino.....	10
	5.3 Patogenia de la enfermedad asociada a circovirus porcino.....	12
	5.4 Falla Reproductiva asociada a circovirus porcino tipo 2.....	13
	5.5 Diagnóstico de la enfermedad asociada a circovirus porcino.....	16
	5.6. Uso de PCR en tiempo real para el diagnóstico de PCV2 y su asociación con PCVAD.....	17
	5.7 Prevención de PCV2.....	18
VI.	Justificación.....	20
VII.	Objetivos.....	21
VIII.	Material y métodos.....	22
	8.1 Diseño experimental.....	22
	8.2 Selección de muestras	22
	8.3 Extracción de ADN.....	22
	8.4 Amplificación de ADN por PCR.....	23
	8.5 Amplificación de ADN por qPCR.....	26
	8.6 Visualización en gel de agarosa.....	27
	8.7 Análisis de resultados.....	28

IX.	Resultados	29
X.	Discusión	38
XI.	Conclusiones.....	42
XII.	Bibliografía	43

II. RESUMEN

La falla reproductiva asociada a circovirus porcino tipo 2 (FR-PCV2) es una presentación clínica de la enfermedad asociada a PCV2 (PCVAD) que se caracteriza por incrementos de abortos, mortinatos y mortalidad neonatal. La detección de PCV2 se ha demostrado en mortinatos y recién nacidos aunado a la transmisión transplacentaria del virus en ausencia de otros agentes infecciosos. Las lesiones fetales y neonatales más consistentes son la miocarditis y la encefalitis no supurativa asociada a la detección de PCV2 en dichas lesiones. Se ha demostrado que existe una alta carga viral de PCV2 en casos de FR-PCV2. Con la finalidad de estandarizar una técnica de PCR en tiempo real que coadyuve al estudio de la FR-PCV2 en México, se utilizaron 15 muestras de miocardio fetal procedente de cerdas positivas a PCV2 por PCR punto final. Por lo cual se determinó que la temperatura de alineación, concentración de $MgCl_2$ y de iniciadores óptimas para la amplificación de un producto de 145 pb fueron de 60° C, 1.5 mM y 50 pM, respectivamente. Posteriormente, las condiciones de amplificación se optimizaron en tiempo real para la determinación de la carga viral de 15 corazones fetales con estatus pre-determinado de FR-PCV2. Los puntos de cruce (C_p) se observaron entre los ciclos 30-32 con curvas de desnaturalización definidas. La cuantificación relativa reveló una baja carga viral de los tejidos cardiacos evaluados. Los resultados demuestran que el protocolo validado es eficaz y sensible para la determinación de la carga viral de PCV2 en tejido cardiaco por lo que será de utilidad para el estudio de la FR-PCV2.

III. ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADV: Virus de la enfermedad de Aujeszky (por sus siglas en inglés, Aujeszky Disease Virus).

Cbp: Cuanto baste para.

CSFV: Virus de la fiebre porcina clásica (por sus siglas en inglés, Classical Swine Fever Virus).

Cp: Punto de cruce (por sus siglas en inglés, cross- point)

EDTA:Ácido etileno-diamino tetraacético (por sus siglas en inglés Ethylenediaminetetraacetic acid).

EMCV: Virus de la encefalomiocarditis (por sus siglas en inglés, Encephalomyocarditis Virus).

EtOH: Alcohol etílico.

FR: Falla reproductiva.

FR-PCV2: Falla reproductiva asociada a PCV2.

g.b.m.: Grado biología molecular.

HIS: Hibridación *in situ*.

HP: Histopatología.

HPRT: Hipoxantina fosforibosiltransferasa

IHQ: Inmunohistoquímica.

M: Mol o moles.

MgCl₂: Cloruro de magnesio.

ml: Mililitros.

mM: Milimolar.

MPB: Marcador de peso molecular.

NTC: Control sin templete (por sus siglas en inglés, Non templete control).

ORF: Marcos de lectura abierta (por sus siglas en inglés, Open reading frames).

pb: Pares de bases.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés, Polymerase chain reaction).

PCV: Circovirus porcino (por sus siglas en inglés porcine circovirus).

PCVAD: Enfermedad asociada a circovirus porcino (por sus siglas en inglés, porcine circovirus associated disease)

PCV1: Circovirus porcino tipo 1 (por sus siglas en inglés, porcine circovirus type 1).

PCV2: Circovirus porcino tipo 2 (por sus siglas en inglés, porcine circovirus type 2).

PDNS: Síndrome de dermatitis y nefropatía porcina (por sus siglas en inglés porcine dermatitis and nephropathy syndrome).

PEV: Enterovirus porcino.

pH: Potencial de hidrogeniones.

PK-15: Línea celular de riñón de cerdo.

PNP: Neumonía necrotizante proliferativa (por sus siglas en inglés, proliferative necrotizing pneumonia).

pM: Picomol

PMWS: Síndrome multisistémico de emaciación post-destete (por sus siglas en inglés, postweaning multisystemic wasting syndrome).

PPV: Parvovirus porcino (por sus siglas en inglés, porcine parvovirus).

rpm: Revoluciones por minuto.

PRRSV: Virus del síndrome respiratorio y reproductivo del cerdo (por sus siglas en inglés, porcine reproductive and respiratory syndrome virus).

SDS: Duodecil sulfato de sodio (por sus siglas en inglés, Sodium dodecyl sulfate).

Taq: *Thermus aquaticus*.

U: Unidades.

μl: Microlitros.

IV. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras

Figura 1: Representación del genoma de PCV2.....	9
Figura 2: Modelo de replicación de virus cadena simple.....	10
Figura 3: Amplificación de secuencias del gen ORF2 de PCV2 por PCR.....	30
Figura 4: Gradiente de temperatura para la amplificación del gen ORF2 de PCV2.....	30
Figura 5: Curvas de concentración de MgCl ₂ para la amplificación del gen ORF2 de PCV2.....	31
Figura 6: Amplificación de secuencias del gen endógeno HPRT1.....	31
Figura 7: Condiciones de amplificación del gen ORF2 de PCV2 por qPCR.....	33
Figura 8: Condiciones de amplificación del gen HPRT1 por qPCR.....	33
Figura 9: Curva de amplificación de PCV2 por qPCR.....	34
Figura 10: Curva de amplificación del gen HPRT1 por qPCR.....	34
Figura 11: Curva de amplificación comparativa entre un caso de PMWS y casos de FR-PCV2.....	35
Figura 12: Curva de disociación del gen ORF2 de PCV2 por qPCR.....	35
Figura 13: Curva de disociación del gen HPRT1 por qPCR.....	36
Figura 14: Amplificación de secuencias del gen ORF2 por PCR punto final.....	36
Figura 15: Visualización de secuencias del gen ORF2 por qPCR.....	37

Tablas

Tabla 1: Secuencia de iniciadores para la amplificación de PCV2 y HPRT1.....	24
Tabla 2: Gradiente de temperatura utilizados.....	24
Tabla 3: Composición de la mezcla de PCR para PCV2.....	24
Tabla 4: Condiciones de amplificación para PCV2.....	25
Tabla 5: Composición de la mezcla de PCR para la amplificación del gen HPRT1.....	25
Tabla 6: Condiciones de amplificación para la PCR del gen HPRT1.....	26
Tabla 7: Composición de la mezcla de la qPCR para la amplificación de un segmento del gen ORF2 de PCV2.....	27
Tabla 8: Cuantificación de la carga viral asociado a células en casos de FR-PCV2.....	37

V. INTRODUCCION

5.1 Generalidades del circovirus

El circovirus porcino (PCV) pertenece a la familia Circoviridae dentro del género Circovirus. El PCV presenta un ADN circular pequeño no envuelto de cadena sencilla de aproximadamente 1800 pares de bases que contiene seis marcos de lectura abiertos (ORFs) y se replica de forma autónoma en células de mamíferos (Yoon et al., 2003; Chae, 2004; Schmoll et al., 2008). El PCV fue originalmente identificado como contaminante de líneas celulares de riñón de cerdo (PK-15). Posteriormente, al ser caracterizado se determinó que existen dos tipos de virus los cuales se clasificaron como PCV1 y PCV2 (Charles et al., 2002; Chae, 2004; Meets et al., 2005, Madson et al., 2011).

El PCV1 es un contaminante persistente de líneas celulares PK-15 y hasta la fecha no ha sido asociado con el desarrollo de la enfermedad dado que la inoculación experimental de cerdos no promueve enfermedad clínica. Por tanto, se considera que el PCV1 no es virulento. En contraste, el PCV2 se identifica como patógeno porcino virulento (Bogdan et al., 2001; Chae, 2004) y ha sido recuperado a partir de tejidos positivos a PMWS en Europa, Asia y América del Norte. Por secuenciación, se demostró que el PCV2 difiere significativamente del PCV1 avirulento en la secuencia de la proteína de la nucleocápside. Mundialmente, se ha determinado una alta homología (>96%) entre las secuencias de diferentes tejidos aislados de PCV2, pero no así con las secuencias del PCV1 con las que presenta una similitud aproximada del 62%. Lo anterior ha sugerido que los aislados de PCV2 derivan de un solo genotipo de virus patógeno. Así mismo, se ha planteado la hipótesis de que diferentes cepas de PCV2 pueden ser responsables de diferentes presentaciones de enfermedades (Chae, 2004).

El PCV2 genera persistencia viral, ya que la infección es de larga duración en el huésped, rara vez causa enfermedad aguda y el propio virus es genéticamente estable (Villarreal et al., 2000). Comúnmente, los cerdos se infectan por cepas del mismo genotipo, aunque la coinfección con varios tipos ha sido también reportado (Grau-Roma et al., 2008). Se ha sugerido que el PCV2 puede generar cuasiespecies que se define como un grupo de

virus que se encuentran en el mismo huésped y que sufren mutaciones genéticas con el tiempo. La tasa de evolución rápida apoya dicha hipótesis (Firth et al., 2009).

El tropismo del PCV2 a los tejidos linfoides es bien reconocido, acumulándose en grandes cantidades en el citoplasma de los macrófagos en los folículos linfoides (Sorden et al, 2000), cardiomiocitos y hepatocitos (Sánchez, et al.; 2003), timo, bazo, hígado, riñón, nódulos linfáticos, mucosa nasal, pulmón, intestino delgado, médula ósea, encéfalo y testículo (Nielsen et al., 2004). Adicionalmente, por ser uno de los virus más pequeños conocidos (Todd et al., 2005), el PCV2 carece de enzimas virales propias para su replicación, por lo tanto, depende de las enzimas de la célula huésped presentes durante la fase de síntesis del ciclo celular para completar el ciclo de replicación (Tischer et al., 1987).

La región intergénica contiene el origen de replicación con una estructura de horquilla que incluye una secuencia palindrómica de ocho nucleótidos en ambos lados y está bordeado por dos marcos de lectura abierta, ORF1 y ORF2 (figura 1). El ORF1 se encuentra en la cadena positiva y codifica las proteínas Rep y Rep' implicadas en la iniciación de la replicación. El ORF2 está situado en la hebra negativa de la replicación del genoma de PCV2 de doble cadena y codifica la proteína Cap que compone la cápside del virus (Faurez et al, 2009).

La síntesis del filamento principal y la cadena retrasada se desacopla y la replicación de círculo rodante es tanto unidireccional y asimétrica. Después de la infección de células permisivas, la síntesis de la cadena retardada que implica un mecanismo que no ha sido totalmente esclarecido en el PCV (figura 2), comienza a partir del ADN de una sola hebra positiva viral. Esto produce la forma superenrollada de doble cadena de replicación (RF) del genoma (Faurez et al, 2009). A partir de entonces, un complejo de proteína iniciadora RCR se une a la estructura de la horquilla y desestabiliza el origen de replicación (Cheung et al., 2003).

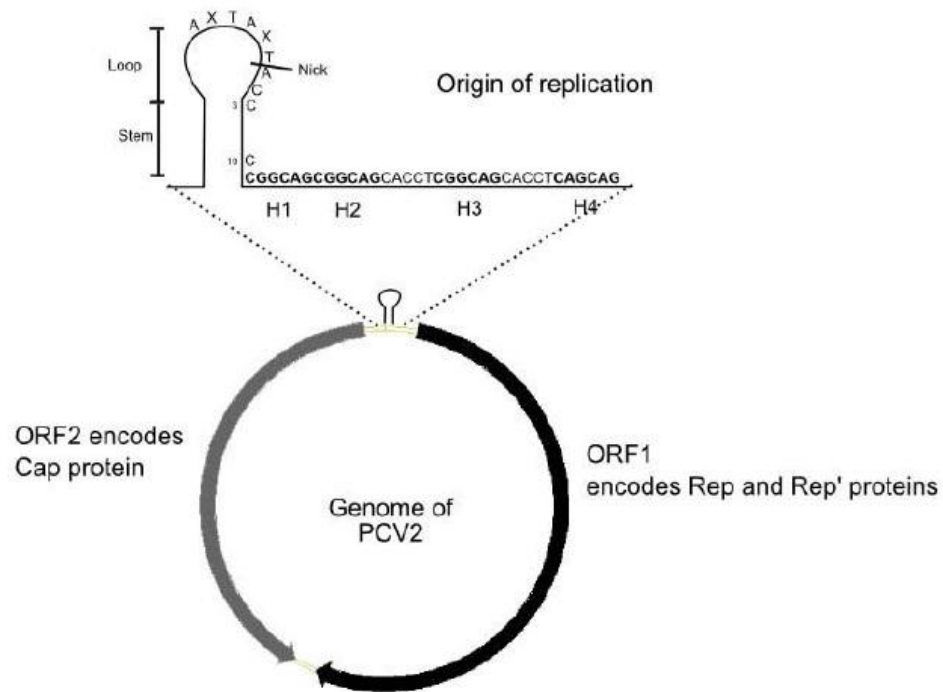


Figura 1. Representación del genoma de PCV-2. Flecha negra: Open Reading Frame 1 (ORF1), se encuentra en la cadena positiva, que codifica la proteína Rep y el Rep'. Flecha gris: Open Reading Frame 2 (ORF2), se encuentra en la cadena negativa, que codifica la proteína Cap. Entre ORF1 y ORF2 existen regiones intergénicas. El origen de replicación se encuentra en la región intergénica entre los comienzos de los dos ORFs. H1, H2, H3 y H4 son hexámeros (Faurez *et al.*, 2009).

Este complejo está compuesto por proteínas Rep y Rep' recién sintetizados en los PCV o de homodímeros de las proteínas Rep como se ha descrito en algunos plásmidos y geminivirus. La proteína iniciadora RCR de la horquilla se corta para generar un extremo 3 'OH libre y la unión covalente entre el complejo y de la extremidad del genoma viral 5'. La ADN polimerasa de la célula huésped inicia la replicación del ADN viral desde el extremo 3 'OH libre. Cuando la unidad 1 del genoma ha sido replicado, el complejo Rep cierra la horquilla de forma covalente. Esto conduce a la liberación de una molécula de ADN circular positiva de una sola hebra parental y una molécula de ADN de doble cadena circular compuesta de la hebra parental negativo y la cadena positiva de nueva síntesis. La molécula de ADN de cadena sencilla será encapsidada o, como en los geminivirus, participará en un segundo ciclo de replicación (Faurez *et al.*, 2009). Un incremento de 3 a 5 veces de ADN de doble cadena se observó para geminivirus en la ausencia o inactivación

de proteínas Cap (Padidam et al, 1999). Sin embargo, los mecanismos que gobiernan la regulación de estas dos posibilidades son desconocidos (Faurez et al, 2009).

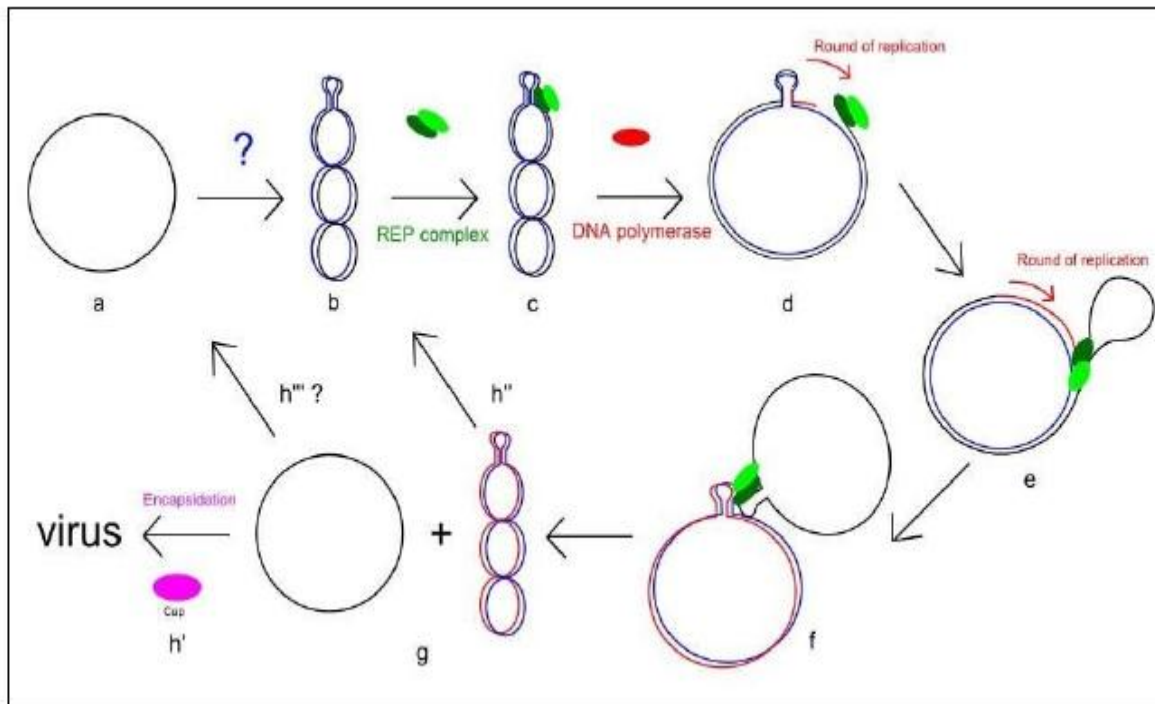


Figura 2. Modelo de replicación círculo rodante de virus de cadena simple. Hebra negra: cadena parental positiva y genoma viral. Hebra azul: Cadena retardada negativa. Hebra roja: cadena líder positivo. A y B: la conversión del genoma viral hebra única en el ADN de doble hebra replicativa intermedio se produce en la célula. c y d: REP complejo se une a la estructura de la horquilla, que es el origen de replicación e inicia la replicación por separar el ADN. d y e: celula DNA polimerasa inicia la replicación de ADN viral a partir de la extremidad 3 'OH libre y el complejo REP todavía se une el extremo 5'. F y G: después de una ronda de replicación, el complejo REP cierra el ADN y libera una sola cadena de ADN y un ADN de doble cadena. h ', h ''y h''': el ADN se puede utilizar para la replicación o puede encapsularse (Faurez *et al.*, 2009).

5.2. Antecedentes de la enfermedad asociada a circovirus porcino

El circovirus porcino tipo 2 (PCV2) fue descrito por primera vez en 1996, cuando se identificó la infección en pjaras libres de patógenos específicos en el oeste de Canadá. Posteriormente se informó de un nuevo síndrome, denominado síndrome multisistémico de emaciación post-destete (PMWS) (Chae, 2004). Desde la identificación de PCV2 y su aceptación como agente causal del PMWS, el PCV2 ha sido asociado en otras manifestaciones clínicas que afectan a los cerdos. En general, los síndromes clínicos y enfermedades asociadas con infecciones de PCV2 se dividen en manifestaciones prenatales y post-natales. En el primer caso, la infección por PCV2 está vinculada a fallos

reproductivos (Kim et al., 2004; Chae, 2004). En el segundo, se encuentran el PMWS y la enteritis granulomatosa las cuales afectan a cerdos en etapas de iniciación y a cerdos de mayor edad en etapa de crecimiento y finalización, respectivamente. Adicionalmente, se reconoce al circovirus como uno de los agentes importantes que participan en el desarrollo del Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina (PDNS) y que presenta un papel importante dentro de las etiologías del complejo respiratorio porcino (Chae, 2005). La infección por PCV2 es ubicua dentro de la población porcina, por tanto, se ve en los cerdos de todas las edades y géneros. La seropositividad de ganado porcino se ha detectado en diferentes países alrededor del mundo y se han encontrado enfermedades asociadas a PCV2 en las cuales pueden variar en su gravedad (Schmoll et al., 2008).

El análisis de la secuencia de los genes de ORF1 y ORF2 ha revelado que el grado de variación de nucleótidos es mayor en el ORF2, el cual codifica la principal proteína estructural de la cápside. Por tal motivo, se sugiere que puede existir una relación entre la variación de la proteína de la cápside y la patogenicidad de PCV2 debido a que cualquier modificación importante de la cápside viral puede alterar el tropismo tisular y/o las interacciones virus-huésped (Chae, 2004). En regiones de Inglaterra, Irlanda y otros países, el PDNS es más frecuente que el PMWS. Por otro lado, se ha sugerido que el PCV2 aislado de falla reproductiva y de PDNS puede ser fenotípica o genéticamente diferente de PCV2 asociado a PMWS (Chae, 2004; Pittman, 2007).

El PCV2 es un agente infeccioso que causa importantes pérdidas económicas a los porcicultores de todo el mundo. A partir de 15 análisis genómicos del PCV2 recuperados de piaras en 3 estados de los Estados Unidos que padecían "casos esporádicos de una enfermedad de comienzo agudo de alta mortalidad", se describió en 4 de estos la identificación de 2 genogrupos de PCV2. Así mismo, se determinó que estas diferencias presentaron relación verdaderamente significativas con respecto a la gravedad de la enfermedad (Allan et al., 2007). Con base a dicho hallazgo, se realizaron análisis filogenéticos que han demostrado que los aislados de PCV2 se pueden dividir en dos genogrupos principales que ahora se conocen comúnmente como PCV2a y PCV2b (Opriessing et al., 2008; Shen et al., 2010).

Debido a la diversidad de presentaciones clínicas en las que el PCV2 ha sido vinculado, el término de enfermedad asociada a circovirus porcino (por sus siglas en inglés

PCVAD) es comúnmente utilizado por consenso. La PCVAD incluye tanto la enfermedad subclínica y clínica (Shen et al., 2010; Madson et al., 2011).

Se ha detectado que los brotes de PCVAD más importantes y de mayor preocupación en Canadá, Carolina del Norte y el medio Oeste de Estados Unidos han sido provocados por el genogrupo PCV2b, de los cuales se confirma mayor prevalencia de ADN en el suero de calostro de cerdas y en la mayoría de las granjas con problemas de abortos, éstos lechones que nacieron débiles o muertos eran predominantemente positivos a PCV2b. Se cree que lo que produce esto es la transmisión de PCV2 en los hatos de cría y que puede provocar una exposición del genogrupo PCV2b continuamente creciente entre los hatos productores (Shen et al., 2010).

Estudios han comparado la virulencia de PCV2a y PCV2b en cerdos convencionales libres de patógenos específicos, quedando en común acuerdo que en los brotes graves de PCVAD se ha aislado con mayor frecuencia el genogrupo PCV2b (Opriessing et al., 2008).

5.3. Patogenia de la enfermedad asociada a circovirus porcino

La vía de entrada de PMWS es oronasal, cuando los cerdos entran en contacto directo con cerdos infectados, su diseminación es multisistémica a partir de los ganglios linfáticos y se puede transmitir horizontalmente por contacto directo a través de vía oronasal, fecal, y vías urinarias. Por otro lado, en FR-PCVAD la viremia en las cerdas es el mecanismo probable de transmisión vertical a los fetos y también se puede detectar PCV2 en el semen de verracos infectados, como se demuestra por la presencia de antígenos virales en el miocardio de los fetos nacidos muertos y momificados, así como los lechones nacidos vivos; dichos animales pueden servir potencialmente como fuente de transmisión de PCV2 en FR-PCVAD (Shen et al., 2010).

La PCVAD es considerada una enfermedad multifactorial en la que la presencia del virus es necesario para desencadenar la enfermedad clínica. Esta situación y la ubicuidad del PCV2 hacen que el diagnóstico de la enfermedad sea difícil, sin embargo se puede lograr a través de la detección de virus o anticuerpos. La coinfección con el PPV y el PRRSV provoca lesiones más graves, a veces con signos clínicos comparables a los observados en situaciones de campo. De hecho, en condiciones de campo, el PCV2 infecta

solo. Dentro de los posibles factores desencadenantes de PMWS y falla reproductiva en cerdos infectados por PCV2, la infección por PRRSV es considerada un importante factor de riesgo (Fraile et al., 2009). El aumento de tasas de detección de PCV2 en casos de neumonía necrotizante y proliferativa (PNP) son reflejo de altas incidencias de la infección en cerdos de engorda que son independientes de la enfermedad (Drolet et al., 2003).

5.4. Falla reproductiva asociada a circovirus porcino tipo 2

Se reconocen dos clases principales de falla reproductiva tardía en cerdas. La primera clase está representada por agentes infecciosos que causan la infección primaria del tracto reproductivo (considerado responsable de un 30-40% de abortos, fetos momificados y mortinatos) y dentro de la segunda clase se incluyen toxinas, tensiones ambientales y nutricionales, y enfermedad sistémica (de origen infeccioso y no infeccioso). Dentro de la primera categoría se incluyen los virus que se caracterizan por promover muerte fetal debido al ataque directo al feto y/o de la placenta tales como el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), el parvovirus porcino (PPV), el virus de la enfermedad Aujeszky (ADV), el virus de la fiebre porcina clásica (o del cólera porcino por sus siglas en inglés/HCV), el enterovirus porcino (PEV) y el virus de la encefalomiocarditis (EMCV) así como el PCV2 (Maldonado et al., 2005; Schmoll et al., 2008).

En falla reproductiva, la transmisión de la cerda a la camada es principalmente vía vertical (o transplacentaria). Las infecciones transplacentarias con diferentes virus ocurren con regularidad en las cerdas, la patogénesis y el resultado con cada uno de ellos puede ser muy variable. Virus de la fiebre porcina clásica (CSFV), PRRSV, PPV, PEV, EMCV y el ADV son conocidos por ser capaces de cruzar la barrera placentaria. En cada uno de estos casos, la transmisión vertical es una consecuencia de una infección primaria inicial en la cerda seguido de viremia, el virus se propaga por la circulación materna a los tejidos fetales, en estos casos, el efecto sobre la continuación de la gestación dependerá de la cantidad de fetos que se infectan durante la viremia materna, la rapidez con la que el virus se propaga de fetos infectados a los fetos no infectados dentro del útero y el número de fetos que permanecen vivos (Pensaert et al.; 2004). Estudios realizados muestran que PCV2 es capaz de replicarse y causar lesiones en los fetos después de la inoculación intrafetal, se demostró que el corazón contiene el mayor número de células infectadas por el virus lo que

confirma que este órgano es el principal sitio de la replicación de PCV2 en los fetos. La disminución del número de cardiomiocitos infectados en los fetos difiere según el tiempo de gestación; además se puede observar lesiones macroscópicas en los fetos infectados en gestación media, lo cual indica que las lesiones eran una consecuencia de una amplia replicación del virus y que puede estar relacionado con la ausencia de inmunocompetencia fetal en esta etapa (Sánchez et al; 2001, Sánchez et al; 2003).

La falla reproductiva asociada al PCV2 (FR-PCV2) fue descrita por primera vez a finales de 1990 en Canadá (West et al., 1999), su presentación es variable al momento en que ocurre la infección viral, debido al estado de los anticuerpos y la duración de la viremia en el animal. La manifestación clínica más consistente de FR-PCV2 se basa en el incremento de nacidos muertos y fetos momificados en el parto (O'Connor et al., 2001).

La presencia de PCV2 en fetos y lechones neonatales sugiere que la transmisión vertical puede ser un medio importante de transmisión viral, este modo de transmisión puede estar relacionado no sólo para el fracaso reproductivo, sino también para el desarrollo de la enfermedad multisistémica más tarde en la vida de los cerdos infectados (Bogdan et al., 2001; O' Connor et al., 2001; Charles et al., 2002). La diseminación inicial de PCV2 está 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. Los datos existentes, sugieren que en las infecciones subclínicas por PCV2 mantienen una baja carga viral del virus que se encuentra en sangre y en los órganos linfoides durante al menos unas 10 semanas. Se ha confirmado la transmisión transplacentaria y presencia de PCV2 en mortinatos y recién nacidos (Nielsen et al., 2004, Ritzmann et al. 2005).

En ocasiones, las cerdas jóvenes de reemplazo localizadas fuera de las instalaciones en los centros de aclimatación pueden mostrar signos clínicos de infección por PCV2 sistémica y pueden indicar posiblemente problemas reproductivos inminentes después de su introducción al hato de cría. Estudios confirman que durante un brote de fracaso reproductivo asociado a PCV2, un pequeño porcentaje de cerdas jóvenes en una unidad de desarrollo que suministra la granja muestran signos clínicos de neumonía, diarrea y falla sistémica (Pittman, 2007; Madson et al., 2011). Este fracaso reproductivo se caracteriza por mala implantación, resultado de un cambio irregular del estro, que en ocasiones puede

producir reabsorción embrionaria, fallas durante la gestación que terminan en aborto, la reducción de tamaño de la camada debido al aumento del número de lechones no viables en el parto y abortos de fetos nacidos muertos cerca de plazo o lechones prematuros. Aborto en gestación temprana, fetos momificados, muerte embrionaria temprana también se observó en estudios realizados en Corea (Madson et al., 2009; Kim et al., 2004). Sin embargo, la presentación clínica de abortos, fetos momificados y nacidos muertos en operaciones porcinas debe distinguirse de la infección por otros agentes, incluyendo el virus del PRRSV, PPV, ADV, PEV y otros (Madson et al., 2011).

La falta de detección de fallas en la reproducción asociada a PCV2 en 1999 era probablemente debido a que no existían pruebas para la detección de PCV2 y al desconocimiento de la patogénesis de la infección viral que se refiere a las hembras preñadas. Por otra parte, los signos clínicos pueden ser evidentes en el animal. El aborto no es una característica común y no todos los fetos son infectados en el útero; por lo tanto, el fracaso reproductivo asociado a PCV2 probablemente fue mal diagnosticado debido a las similitudes de PPV-asociado a fracaso reproductivo (Madson et al., 2009).

Antígenos de PCV2 se demostraron en lesiones del miocardio y el virus fue aislado en tejidos de corazones afectados o combinado de pulmón y el bazo de nacidos muertos y algunos lechones neonatales (Pensaert, 2004). PCV2 es ubicuo y todos los animales en las granjas convencionales son seropositivos en el momento de la madurez sexual (Labarque et al., 2000; Sánchez et al., 2001). La inmunidad de la cerda no juega un papel en el feto, ya que, los factores inmunes específicos no atraviesan la barrera placentaria de la madre hacia el feto durante la gestación (Tizard, 1996). Estos experimentos mostraron que PCV2 causa patología fetal y muerte sin afectar a la fisiología materna o la gestación; el virus, una vez en contacto con los tejidos fetales causa la muerte fetal con o sin respuesta inmune fetal en función de la edad de gestación, la propagación intrauterina del virus se produce con bastante lentitud y puede ser la razón de la progresión ininterrumpida de la gestación (Pensaert, 2004).

Una asociación entre PCV2 y el fracaso reproductivo se ha demostrado de forma limitada experimentalmente inoculando virus en el útero. El ácido nucleico de PCV2 se ha demostrado en el semen de verracos infectados experimentalmente, que plantea la posibilidad de infección de los fetos por PCV2 a través de la inseminación artificial y la

posible falla reproductiva. El efecto de la infección por PCV2 en el desarrollo inmunológico del feto también es de interés, ya que el virus se sabe que actúan sobre los linfocitos (Yoon et al., 2003).

Los resultados de un estudio sobre la distribución de ADN de PCV2 en el tracto reproductivo, demuestran que los ovocitos y embriones de cerdas con anticuerpos positivos a PCV2 pueden estar asociados con diferentes tejidos del tracto reproductivo. Aunque la presencia de PCV2 se ha demostrado en los casos de mortinatos, aun no se determina la cantidad de ADN viral presente en los animales afectados (Brunborg et al., 2007).

5.5. Diagnóstico de la enfermedad asociada a circovirus porcino

Para el diagnóstico de PCVAD necesariamente se deben cubrir 3 criterios: la presencia de signos clínicos compatibles, lesiones microscópicas características y la presencia del virus en estas lesiones (Kim et al., 2001; Calsamiglia, 2002; Chae 2005). En tejidos, el PCV2 puede ser detectado por inmunohistoquímica (IHQ), Hibridación *in situ* (HIS), inmunofluorescencia indirecta (IFA), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y aislamiento viral (Calsamiglia et al., 2002). Los productos de ADN generados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tienen la ventaja de que su producción es relativamente fácil y automatizada, permitiendo un eficiente marcaje simultaneo 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 la PCR, los dos iniciadores hibridan en secuencias específicas 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 la PCR puede producir grandes cantidades de productos a partir de cantidades mínimas de ADN genómico o de plásmidos linearizados. Además, el tamaño de los productos amplificados puede ser definido en las terminaciones 5' de los iniciadores permitiendo una producción sencilla de sondas de un tamaño requerido (Boehringer, 1996).

5.6. Uso de PCR en tiempo real para el diagnóstico de PCV2 y su asociación con PCVAD

La PCR en Tiempo Real (PCR-RT) es una excelente herramienta de diagnóstico de respuesta inmediata, éste sistema se llama así debido a que las amplificaciones acumuladas pueden ser directamente controladas durante el proceso de amplificación de ADN. La cuantificación de ADN se basa en la determinación del ciclo umbral cuando el producto amplificado por el PCR se detecta por primera vez, cuanto mayor sea el número de copias de ADN de entrada inicial, se detecta cuanto antes el producto de amplificación (Yang et al., 2007).

En comparación con la PCR convencional y el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), la PCR-RT ofrece una manera eficaz de detectar fragmentos específicos, rápida y cuantitativamente; y al mismo tiempo, los resultados falsos positivos y la contaminación se pueden prevenir con eficacia. El principal problema con la PCR convencional es la contaminación de los productos cuando se examinan en geles; por esta razón se comienza a utilizar más ampliamente la PCR-RT, ya que utiliza TaqMan que tiene una mayor sensibilidad, se realiza en un tubo cerrado, no requiere electroforesis post PCR y requiere menos tiempo (Yang et al., 2007; Zhao et al., 2010). La mayoría de los ensayos de PCR-RT para la detección de PCV2 utilizan una sonda de hibridación como método de detección y se aplican principalmente en muestras de suero. Los iniciadores suelen basarse en cepas de PCV2 locales (Yang et al., 2007). La principal región conservada de PCV2 se encuentra en el ORF2 por lo que constituye un marco de referencia ideal para detectar al virus. Esta región muestra una alta diversidad entre el PCV1 y el PCV2 (Zhao et al., 2010).

Además las expectativas han aumentado con la adopción tecnológica de PCR-RT cuantitativa (qPCR), debido a que se puede determinar la cantidad relativa de ADN de PCV2 en las muestras; esto tiene un potencial biológico importante porque las concentraciones de ADN del virus en los tejidos son positivamente relacionados con la disminución severa de linfocitos sistémicos y de células reticuloendoteliales infiltradas en los ganglios linfáticos (Harding et al., 2008). La causa y la epidemiología de PCVAD se han investigado y debatido. Debido a la ubiquidad del virus y que la infección por PCV2 es un requisito, se postula que otros cofactores son necesarios para activar o inducir la

enfermedad (Harding et al., 2008). Lo anterior sugiere que puede existir una relación entre la cantidad de ADN de PCV2 en el suero y el hígado, principalmente, y la gravedad de la PCVAD (McIntosh et al., 2009).

Por otro lado, la carga de PCV2 en heces determinada por PCR-RT es significativamente mayor en cerdos jóvenes procedentes de granjas afectadas por PCV2 que de cerdos de granjas no afectadas, mientras que en verracos y progenitoras, en la etapa de maternidad se detectan cargas similares de PCV2 en las heces. Se postula que posiblemente la diferencia en la carga viral observada en los jóvenes se asocia a la exposición temprana de PCV2 o a la dosis infecciosa por parte de la madre a la que fueron expuestos cuando eran lechones (McIntosh et al., 2008). Se espera que en las aplicaciones futuras de la PCR-RT el rendimiento e interpretación de los ensayos mejore para que sean usados en laboratorios de diagnóstico y poder incluir medidas de eficacia en la vacunación, el tratamiento y bioseguridad para PCVAD, con el fin de dar más recomendaciones a los veterinarios y productores porcícolas (Harding et al., 2008; McIntosh et al., 2008).

5.7. Prevención de PCV2

Desde la primera descripción de PMWS y la participación de PCV2 como el agente causal primario, se han diseñado vacunas eficaces para la prevención de PCV2. Dichos inmunógenos incluyen vacunas inactivadas, vacunas de ADN y vacunas recombinantes de subunidades que expresan proteínas virales de PCV2. Un elemento importante en la creación de éstas es la identificación de la proteína Cap como el principal inmunógeno, que induce la protección contra la estimulación subsiguiente con PCV2; esto contrasta con la proteína Rep, que es débilmente inmunogénica (Opriessnig et al., 2008). Sin embargo, en un estudio se demostró que la proteína Rep es casi tan inmunogénica como la proteína Cap basado en perfiles de anticuerpos de cerdos infectados procedentes de diferentes granjas (Pérez-Martín et al., 2008). Las vacunas subunitarias dan lugar a seroconversión de PCV2 y posterior a la exposición promueven la eliminación del virus. Se ha demostrado que las vacunas basadas en el ORF2 fueron superiores para activar las células T CD8⁺ y promover respuestas de anticuerpos neutralizantes frente al virus, sugiriendo un papel crucial del ORF2 en la protección inducida por la vacuna contra PCV2 (Opriessnig et al., 2008; Kekareinen et al., 2010).

Desde 2004, una serie de vacunas comerciales están disponibles para el mercado porcino en todo el mundo (Opriessnig et al., 2007). La primera vacuna en el mercado fue CIRCOVAC® (Merial), una vacuna con adyuvante oleoso basado en PCV2 inactivado para uso en cerdas adultas y cerdas jóvenes, de dos a cuatro semanas antes del parto. Los otros productos comerciales son vacunas recombinantes diseñadas para usarse en cerdos en crecimiento, alrededor de dos a cuatro semanas de edad o más. Ingelvac CircoFLEX se administra en una sola dosis, mientras que Porcilis PCV® / Circumvent® (Intervet-Schering Plough) se aplica en dos dosis. Ambas son vacunas de subunidades basadas en el producto de la ORF2 expresada por sistemas de baculovirus. Una cuarta vacuna es Suvaxyn PCV2 One Dose®, que se basa en un virus quimérico inactivado que lleva el gen de la cápside inmunogénica ORF2 de PCV2 en un esqueleto del genoma de PCV1 no patógeno. Las cuatro vacunas se basan en cepas de genotipo PCV2a (Kekarainen et al., 2010).

Los datos de estudios de campo han demostrado que todas las vacunas comerciales muestran una eficacia clara, una considerable reducción de las pérdidas productivas asociadas al PCV2 en cerdos en crecimiento, ya sea vacunado o procedentes de granjas de cría vacunadas; por lo tanto, la mejora gradual de ganancia y conversión alimenticia diaria, disminución de las tasas de mortalidad y la reducción del costo de los medicamentos son algunos de los beneficios observados en las granjas vacunadas (Fachinger et al, 2008; Segalés et al, 2009; Kekarainen et al., 2010).

En general se cree que la base principal de la eficacia de la vacuna de PCV2 se basa en el efecto protector de anticuerpos anti-PCV2, ya sea adquirido pasivamente o inducido activamente (Opriessnig et al., 2009). Sin embargo, las respuestas de anticuerpos bajos, así como la falta de desarrollo de anticuerpos después de la vacunación, no siempre se correlacionan por falta de protección. La inmunidad celular se propone como la más importante para la defensa protectora (Kekarainen et al., 2010). Los niveles de anticuerpos maternos PCV2 son un determinante importante de la respuesta de un lechón a la infección por PCV2, cuanto mayores sean los niveles de anticuerpos maternos mayor protección tendrán los lechones (McKeown et al., 2005). La capacidad de PCV2a de promover protección cruzada contra la infección de casos de PCV2b está respaldada por el éxito de las vacunas comerciales de PCV2 introducidas en el campo. Todas las vacunas comerciales disponibles en la actualidad se basan en PCV2a y sin embargo son muy exitosas en la reducción de la morbilidad y mortalidad en los granjas con PCVAD, la que ahora se detecta

más comúnmente es PCV2b. Anteriormente en el 2005 granjas de América fueron seropositivas antes de la aparición de los brotes de PCVAD y sin embargo los rebaños aparentemente no estaban protegidos, por lo cual pasaron a un estadio de PCVAD mas grave (Opriessnig et al., 2009).

VI. JUSTIFICACIÓN

La falla reproductiva es probablemente la enfermedad producida asociada a la infección por PCV2 con mayor impacto económico ya que incrementa notablemente la mortalidad y la proporción de lechones no viables y por causar pérdidas en la ganancia de peso media e índice de conversión. En México, la FR-PCV2 ha sido descrita desde el 2004 en casos de muertes neonatales de lechones de alrededor de tres días de nacidos en piaras selectas de granjas de cerdos sin la participación del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino y el parvovirus porcino. En dichas camadas se observó miocarditis, hepatitis y encefalitis no supurativas, lesiones características de circovirus fetal y neonatal, y se detectó la presencia de PCV2 por aislamiento viral, PCR e HIS (García-Reyna et al., 2004a, García-Camacho et al. 2006, García-Reyna, 2006). Así mismo, se han detectado casos bien documentados de FR-PCV2 en cerdas en diferentes estados de la República Mexicana (Quintero et al., 2010) en los que se determinó que la evidencia de necrosis y miocarditis en fetos y neonatos por histopatología es una buena prueba tamiz con respecto a su relación con el resultado de la hibridación *in situ*, pero que la asociación de FR-PCV2 debe ser confirmada por HIS y/o PCR anidada. En dicho estudio, se detectaron 39% casos compatibles con FR-PCV2 con base a los criterios diagnósticos y 47% de transmisión transplacentaria (Enríquez et al., 2010, Enríquez, 2009). Dichos parámetros son más altos que los descritos en otros países (Maldonado et al., 2005, Lyoo et al., 2001, Ritzmann et al., 2005). Así mismo, se determinó que la severidad de la lesión es dependiente de la edad y que la distribución de PCV2 en los corazones fetales por HIS fue sugestiva de una baja carga viral misma que puede ser confirmada por PCR en tiempo real (Enríquez et al., 2010, Enríquez, 2009). Por tal motivo, el presente trabajo tiene como objetivo estandarizar una técnica de PCR en tiempo real para la determinación de la carga viral de PCV2 con la finalidad de proporcionar datos cuantitativos de casos de FR-PCV2.

VII. OBJETIVOS

GENERAL

Estandarizar e implementar una técnica de PCR en tiempo real para determinar de la carga viral de Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2) en corazones fetales procedentes de falla reproductiva en cerdas.

PARTICULARES

- Determinar la temperatura de alineación óptima de los oligonucleótidos para la amplificación de un segmento de ORF2 de PCV2 y del gen constitutivo Hipoxantina fosforibosiltransferasa (HPRT1) por PCR punto final.
- Determinar la concentración óptima de $MgCl_2$ para la amplificación de PCV2 y del gen constitutivo Hipoxantina fosforibosiltransferasa (HPRT1) por PCR punto final.
- Determinar la concentración óptima de templado de ADN para la PCR en tiempo real.
- Determinar la concentración óptima de iniciadores para la PCR en tiempo real.
- Implementar la técnica de PCR en tiempo real para la determinación de la carga viral en corazones de fetos procedentes de casos de FR-PCV2.

VIII. MATERIALES Y MÉTODO

8.1 Diseño experimental

El estudio se realizó en el Laboratorio A de Patología Molecular Veterinaria de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4 (FESC C4), ubicada en la Carretera Cuautitlán – Teoloyucan Km 2.5 San Sebastián Xhala Cuautitlán Izcalli, Estado de México. Para la estandarización de la técnica de qPCR, se utilizaron 15 muestras de miocardio fetal procedente de cerdas positivas a PCV2 por PCR punto final. Una vez estandarizada la técnica se implementó para determinar la carga viral de éstas 15 muestras con estatus pre-determinado de FR-PCV2 con base a los criterios diagnósticos: signos clínicos de falla reproductiva, miocarditis no supurativa e hibridación *in situ* (HIS) positiva de forma aleatoria (Chae, 2005).

8.2 Selección de muestras de FR-PCV2

Se realizó la selección de tejido cardíaco incluido en parafina procedente de fetos abortados de cerdas que presentaron signología de FR-PCV2 del archivo de muestras del laboratorio de Patología Molecular Veterinaria de la FES-Cuautitlán, UNAM. Dichas muestras fueron recolectadas de distintos estados de la República Mexicana como Yucatán, Sonora, Veracruz, Guadalajara, Michoacán, Guanajuato. A estas muestras se les identificó el status de PCV2 por HIS y PCR punto final.

8.3 Extracción de ADN

A los corazones fetales seleccionados incluidos en parafina, se les realizaron cortes de 20 micras los cuales se colocaron en tubos cónicos de la marca Eppendorf de 2 ml estériles para realizar la extracción de ADN por un procedimiento estándar de precipitación en alcohol (Enríquez, 2009). Las muestras se desparafinizaron mediante tres pases de xilol (1000 µl) de 5 minutos cada uno, centrifugando a 12000 rpm durante 5 minutos en cada pase y se rehidrataron en un pase de 5 minutos en alcohol etílico absoluto (EtOH 100%) y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos y un pase de EtOH al 70%, se centrifugo a 12000 rpm durante 5 minutos. Se decantó el EtOH al 70% y posteriormente, se colocó en el

concentrator 5301 a 30°C durante 8 minutos para eliminar el exceso de alcohol y secar la muestra. Acto seguido, se agregaron 500 µl del buffer de digestión (Tris 10mM pH 8.5, EDTA 1mM, Tween 20, 0.5% con 200 µg/ml de proteinasa K) y se incubó por 20 horas a 56° C. Transcurrido el tiempo de incubación, se inactivó la enzima a 99°C durante 20 minutos para centrifugar a 12,000 rpm durante 5 minutos y se agregó 700 µl de cloroformo isoamílico (concentración 1:24) y se centrifugó nuevamente a 12000 rpm por 5 minutos. Después de este paso, la fase superior de la mezcla se retiró y se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf, evitando tomar la interface y se agregaron 350 µl de isopropanol y se mantuvo a -20°C durante toda la noche, la muestra se descongeló para realizar una centrifugación durante 10 minutos a 12000 rpm, se decantó el sobrenadante y se agregó 500 µl de EtOH al 70%. La muestra se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el EtOH al 70% y se agregó 500 µl de EtOH al 100% para centrifugar nuevamente a 12,000 rpm durante 5 minutos. Una vez que se eliminó el EtOH al 100%, se colocaron las muestras en el concentrator 5301 a 30°C durante 8 minutos para eliminar el exceso de alcohol y se secaron perfectamente las muestras. Finalmente, la muestra de ADN se resuspendió en 40 µl de agua grado molecular y se almacenó a -20°C hasta su uso. La concentración de las muestras se cuantificó mediante espectrofotometría (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Germany).

8.4 Amplificación de ADN por PCR punto final

Para la PCR se utilizaron los iniciadores descritos en la Tabla 1. Posteriormente se programó en el termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg, Germany) y se determinó la temperatura de alineación óptima mediante un gradiente de temperatura (57°, 58°, 59°, 60° y 61° C) con base a la T_m promedio de los iniciadores (Tabla 2) y se realizaron curvas de concentración de Cloruro de Magnesio $MgCl_2$ (1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mM) para determinar la concentración óptima. Se realizó la PCR a un volumen de 50µl: 50 ng de ADN (1 µl), 50 pM de cada uno de los iniciadores P1 y P2 (1 µl de cada uno), 10 µl de amortiguador de reacción de PCR a 1X de concentración (5X GoTaq Flexi Buffer), 0.2 mM de dNTPs (1 µl), 1.5 mM de $MgCl_2$ (3 µl), 2.5 U de Taq polimerasa (GoTaq, Promega Corp., Madison WI., USA) (0.5 µl) y agua grado biología molecular cbp 50 µl. La composición de la mezcla de la PCR se muestra en la Tabla 3 y sus condiciones de

amplificación en la Tabla 4; mientras que la composición de la mezcla del HPRT1 se muestra en la Tabla 5 y sus condiciones de amplificación en la Tabla 6.

Tabla 1. Secuencias de los iniciadores para la amplificación de PCV2 y del gen HPRT1

	Iniciadores		Tamaño del producto
PCV2	Fw	5'-ATAA CCCAGCCCTTCTCCTACC-3'	145 pb
	Rn	5'-GGCCTA CGTGGTCTACATTTCC-3'	
HPRT1	Fw	5'-TTG CTG ACC TGC TGG ATT AC-3'	229 pb
	Rn	5'-CTG ACC AAG GAA AGC AAA GT-3'	

Tabla 2. Gradientes de temperatura utilizados (59.5 ° C +/- 1.5 ° C)

○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
58.0*	58.1	58.2	58.6	58.8	59.2*	59.6	60.1*	60.4	60.8	61.0*	61.2

* Temperaturas de alineación probadas en la PCR

Tabla 3. Composición de la mezcla de PCR para PCV2.

Reactivos	Concentración
Amortiguador de reacción PCR	1X
MgCl ₂	1.5mM
DNTP's	0.2 mM
Iniciador sentido	1
Iniciador antisentido	1
Taq polimerasa	2.5 U/ μl
ADN	50 ng

Agua g.b.m	cbp 50 µl
------------	-----------

- g.b.m: grado biología molecular

Tabla 4. Condiciones de amplificación de un segmento del gen ORF2 de PCV2 por PCR

TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (segundos)	CICLOS	REACIÓ
95	300	1	Pre-desnaturalización
94	60	35	Desnaturalización
60	60	35	Alineación
72	30	35	Elongación
Repetir desde el paso 2			
72	600	1	Elongación final
4			Conservación

Tabla 5. Composición de la mezcla de PCR para la amplificación del gen HPRT1.

Reactivos	Concentración
Amortiguador de reacción PCR	1X
MgCl ₂	1.5 mM
DNTP's	0.2 mM
Iniciador sentido	50 pM
Iniciador antisentido	50 pM
Taq polimerasa	2.5 U/ µl

ADN	50 ng
Agua g.b.m	cbp 50 μ l

- g.b.m: grado biología molecular

Tabla 6. Condiciones de amplificación para la PCR del gen HPRT1

TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (segundos)	CICLOS	REACCIÓN
95	300	1	Pre-desnaturalización
94	30	35	Desnaturalización
50	30	35	Alineación
72	30	35	Elongación
Repetir desde el paso 2			
72	600	1	Elongación final
4			Conservación

8.5 Amplificación de ADN por PCR cuantitativa (qPCR)

Previo a la estandarización de la qPCR, la temperatura de alineación y la concentración de $MgCl_2$ e iniciadores óptimos para la amplificación se determinaron por PCR punto final utilizando las siguientes condiciones: un paso de desnaturalización inicial de 94°C durante 300 segundos, seguido de un paso de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 60 segundos; alineación a 60 °C por 60 segundos, un paso de elongación a 72 °C por 30 segundos, y un ciclo de elongación final de 72 °C durante 600 segundos. La qPCR se realizó en reacciones de 25 μ l en un equipo Agilent Technologies Stratagene Mx 3005P usando QuantifastSYBR Green Master Mix (QIAGEN, USA) como sistema de amplificación y detección y 50 ng de ADN. Se realizaron curvas para determinar la concentración óptima de los iniciadores. Cada muestra se ejecutó por triplicado y con una

reacción control sin template de ADN (NTC, Non Template Control) en placas ópticas de 8 pozos (UltraFlux[®] Low Profile 8-strip 0.1 mL w/8-strip of Flat cap). Posterior a la activación de la enzima a 94°C por 5 minutos, se siguieron las condiciones estándar de amplificación siguiendo 35 ciclos de desnaturalización a 60°C por 30 segundos, alineación y elongación a 72°C por 30 segundos. Posterior a la amplificación, se incrementó la temperatura de 65°C a 95°C para construir una curva de disociación y se determinó la especificidad del producto amplificado.

Tabla 7. Composición de la mezcla de la qPCR para la amplificación de un segmento del gen ORF2 de PCV2

Reactivos	Volumen en µl
QuantifastSYBR Green Master Mix	12.5
Iniciador sentido	1
Iniciador antisentido	1
ADN	1
Agua g.b.m	9.5
Volumen total	25

- g.b.m: grado biología molecular

8.6 Visualización de los productos de amplificación en gel de agarosa

La visualización de los productos de amplificación de la PCR se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio. El gel se preparó con 1 gramo de agarosa (Promega Corp., Madison WI., USA) en 49 ml de amortiguador TBE 1X (Promega Corp., Madison WI., USA) La mezcla se colocó en horno de microondas en potencia alta en ciclos de 15 segundos sin alcanzar ebullición hasta la disolución. Acto seguido, se agregó bromuro de etidio (2.5µg/ml). La cámara horizontal de electroforesis (Owl separation systems, Inc. Portsmouth, NH, USA) se cargó como sigue: Se tomaron 4 µl del producto de la PCR y se agregaron 4µl del amortiguador de carga (Loading buffer, Promega Corp., Madison WI., USA) y la mezcla total se depositó en los pozos seleccionados del gel de agarosa al 2%. En el primer carril consistentemente se cargaron 4µl de marcador

de pares de bases (PCR Markers y/o 1Kb marker, Promega Corp., Madison WI., USA) el cual se diluyó de la manera descrita. Posteriormente, se realizó la electroforesis a 80 volts por una hora y las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (Apollo, Instrumentation, Calif, USA). Los resultados de la electroforesis se documentaron usando el programa Doc-It Software (UVP, Cambridge UK) utilizando una cámara digital (Olympus camera, Tokyo, Japan).

8.7 Análisis de resultados

Para la determinación de la carga viral de PCV2 se utilizó el método de cuantificación relativa, comparando del punto de cruce (cross- point/CP) de la muestra desconocida con una muestra blanco (Non Template Control). Todas las cuantificaciones de las muestras desconocidas y de la muestra blanco fueron normalizadas con un control interno. En este estudio se utilizó el gen constitutivo (housekeeping) hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT). Primero, el Cp de la muestra y del Cp control interno HPRT (Cp HPRT) fueron determinados para cada muestra para el cálculo de la ΔCp el cual resulta de la diferencia del Cp de la muestra y Cp HPRT. Posteriormente, al ΔCp de cada muestra se resta el ΔCp del blanco. Esta diferencia es llamada $\Delta\Delta\text{Cp}$ y la cantidad relativa se calcula por $2^{-\Delta\Delta\text{Cp}}$. Así, la diferencia en la expresión de la muestra se expresa como n-veces relativa al calibrador.

Las ecuaciones para calcular $\Delta\Delta\text{Cp}$ en el método de cuantificación relativa son:

Cp de la muestra – CpHPRT = ΔCp .

ΔCp de la muestra – ΔCp del blanco = $\Delta\Delta\text{Cp}$.

Cantidad relativa = $2^{-\Delta\Delta\text{Cp}}$.

Los resultados de los triplicados se expresaron como la media + el error estándar.

IX. RESULTADOS

Con base a las condiciones descritas para la amplificación de secuencias de PCV2 con los iniciadores utilizados (Yang et al. 2007), se obtuvieron productos de 145 pb los cuales corresponden al tamaño esperado. Sin embargo, en los primeros ensayos las bandas no presentaron una buena definición (Figura 3). Posteriormente, se procedió a la amplificación utilizando un gradiente de temperatura en la cual se observaron bandas moderadamente definidas de 145 pb en la temperatura de 58, 59.2, 60.1, 61° C (Figura 4). Con base al gradiente, se seleccionó la temperatura de 60.1° C como temperatura óptima de alineación.

Con respecto a la composición de la mezcla de PCR, se realizaron curvas de concentración de $MgCl_2$ e iniciadores. La amplificación con base a una curva de concentración de $MgCl_2$ reveló bandas bien definidas de 145 pb en las concentraciones de 1.5 mM y 2.25 mM (Figura 5) por lo que se eligió la de 1.5 mM como concentración óptima de $MgCl_2$. La concentración óptima de iniciadores fue de 50 pM. Así mismo, se determinó que la concentración mínima de detección de templado fue de 20 ng, por lo que se seleccionó una concentración estándar de 50 ng para la amplificación por PCR punto final.

Así mismo, para la cuantificación relativa de la carga viral de PCV2, se estandarizaron la composición de la mezcla de PCR y la temperatura óptima de alineación para la amplificación del gen constitutivo hipoxantín-guanín fosforibosil transferasa 1 (HPRT1) por PCR punto final. Se determinó que las concentraciones de $MgCl_2$ y de iniciadores así como temperatura de alineación para dicha amplificación fueron de 1.5 mM, 40pM y 50° C, respectivamente. El gel representativo de la amplificación de secuencias HPRT1 con un tamaño de 225 pb se presenta en la Figura 6.

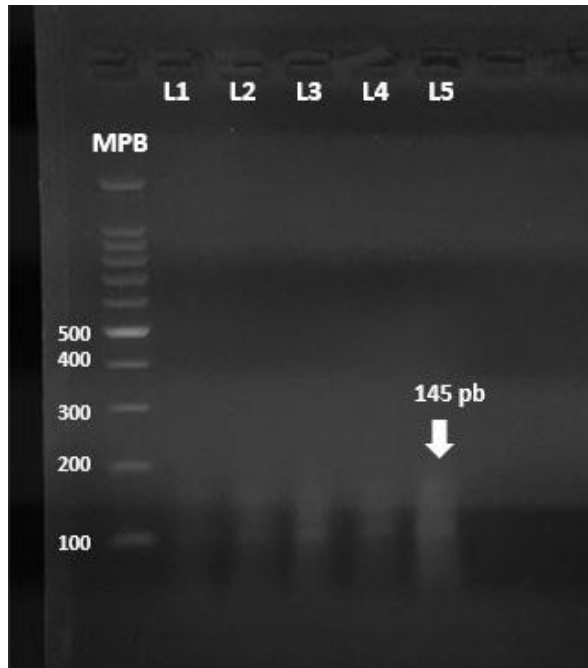


Figura 3. Amplificación de secuencias del gen ORF2 de PCV2 por PCR con base a las condiciones descritas previamente (Yang et al. 2007). Gel de agarosa al 1.5%. En el primer carril se muestra el marcador de pares de bases (MPB), en las líneas (L) 1 a 4 se aprecia mala visualización de productos amplificados de 145 pb .

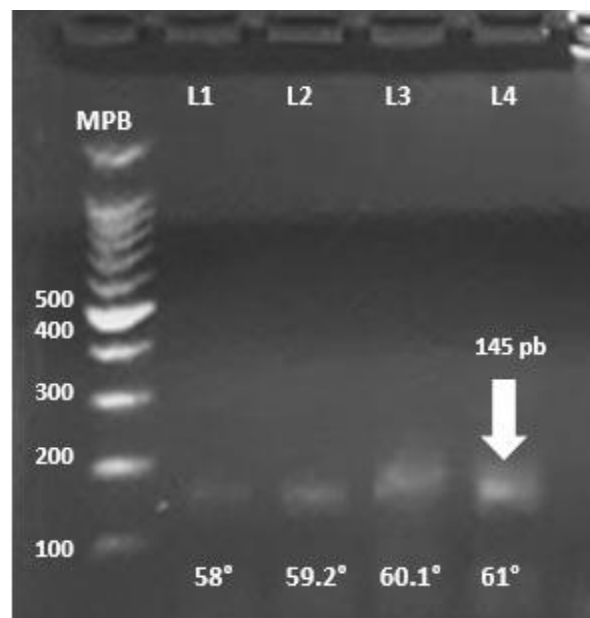


Figura 4. Gradiente de temperatura para la amplificación del gen ORF2 de PCV2. Gel de agarosa al 1.5%. En el primer carril se muestra el marcador de pares de bases (MPB), las líneas (L) 1 a 4 corresponden a las temperaturas del gradiente en grados centígrados (58, 59.2, 60.1, 61, respectivamente). Se muestran productos amplificados de PCV2 (145pb).

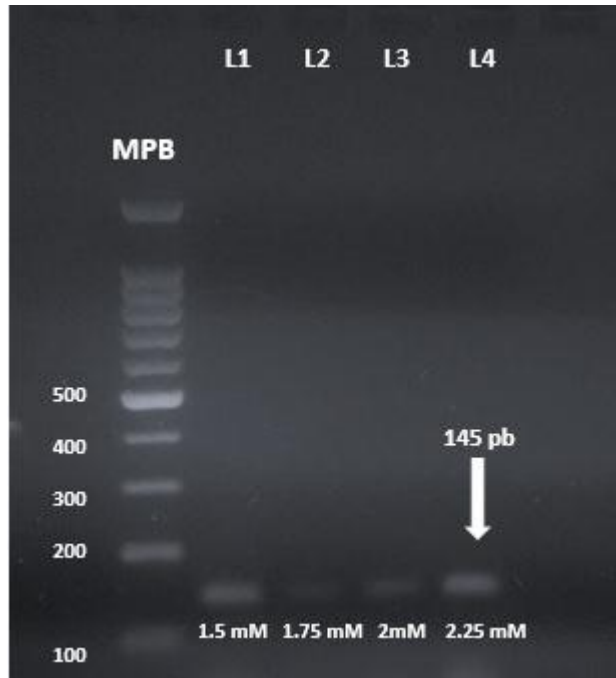


Figura 5. Curva de concentración de MgCl₂ para la amplificación del gen ORF2 de PCV2. Gel de agarosa 1.5%. En el primer carril, marcador de pares de bases (MPB), las líneas (L) 1 a 4 corresponden a las concentraciones de Cloruro de Magnesio de 1.5, 1.75, 2 y 2.5 mM, respectivamente. Se muestran productos amplificados de PCV2 (145pb).

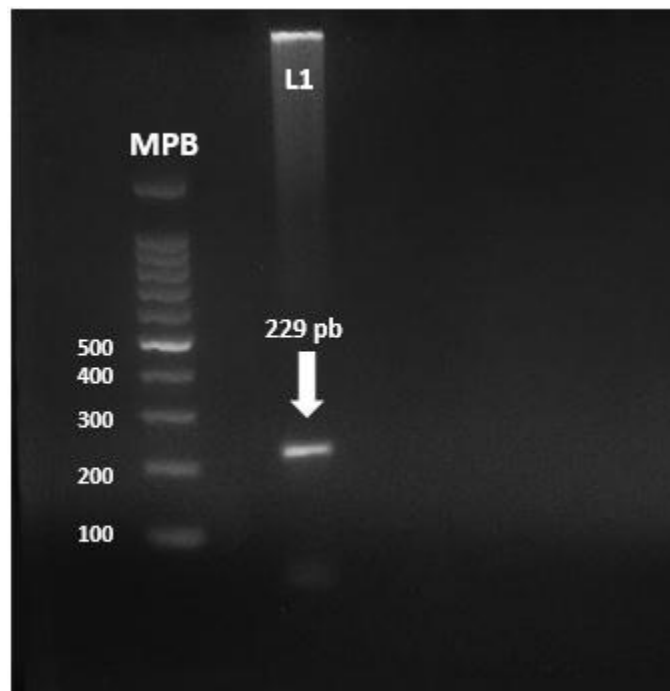


Figura 6. Amplificación de secuencias del gen endógeno HPRT1. Gel de agarosa al 1.5%. En el primer carril se encuentra el marcador de pares de bases (MPB). En la línea L1 se visualiza producto amplificado de 229 pb del gen HPRT1.

Las condiciones de amplificación determinadas en las técnicas de la PCR punto final para la amplificación de secuencias del gen ORF2 de PCV2 por PCR (Figura 7) y del gen HPRT1 (Figura 8) se utilizaron para la optimización de la qPCR. Con dichas condiciones, se realizaron curvas de concentración de templado y de iniciadores para la determinación de la concentración mínima de detección. Con base a los resultados de las curvas, para ambos protocolos se eligió una concentración de 50 ng y concentraciones de iniciadores de 50pM y 40pM para PCV2 y para el gen de HPRT1, respectivamente. De este modo, las condiciones finales de amplificación para la cuantificación relativa de la carga viral de PCV2 y del gen endógeno fueron: concentración de MgCl₂ de 1.5mM, concentración de iniciadores de 50pM y concentración de templado de 50 ng con temperaturas de alineación de 60°C y de 50°C para PCV2 y del gen HPRT1, respectivamente. Las curvas representativas de amplificación de PCV2 y del gen HPRT1 por qPCR se muestran en las Figuras 9 y 10, respectivamente, se anexa también una curva comparativa entre PMWS y muestras de FR-PCV2 (Figura 11). Así mismo, se realizaron de curvas de disociación para determinar la especificidad de los productos de PCV2 por qPCR (Figura 12) y de HPRT1 (Figura 13). En las curvas de disociación de PCV2, se observaron picos inespecíficos pequeños de amplificación. Por tal motivo, los productos amplificados por qPCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa, observándose únicamente productos de 145 pb para PCV2.

La implementación de la técnica de qPCR para la detección de PCV2 en los 15 casos de FR-PCV2 reveló que todos los casos de tejido cardiaco con estatus positivo de PCV2 por PCR punto final fueron positivos por qPCR. Las Figuras 14 y 15 muestran los resultados de electroforesis en gel de agarosa correspondiente a 10 casos de FR-PCV2 por PCR en punto final y de los productos amplificados por qPCR, respectivamente. De cada muestra se realizó la amplificación del gen constitutivo y se determinó la carga viral. Los resultados de la cuantificación relativa se presentan en la Tabla 7. En general, la carga viral de los casos fue baja.

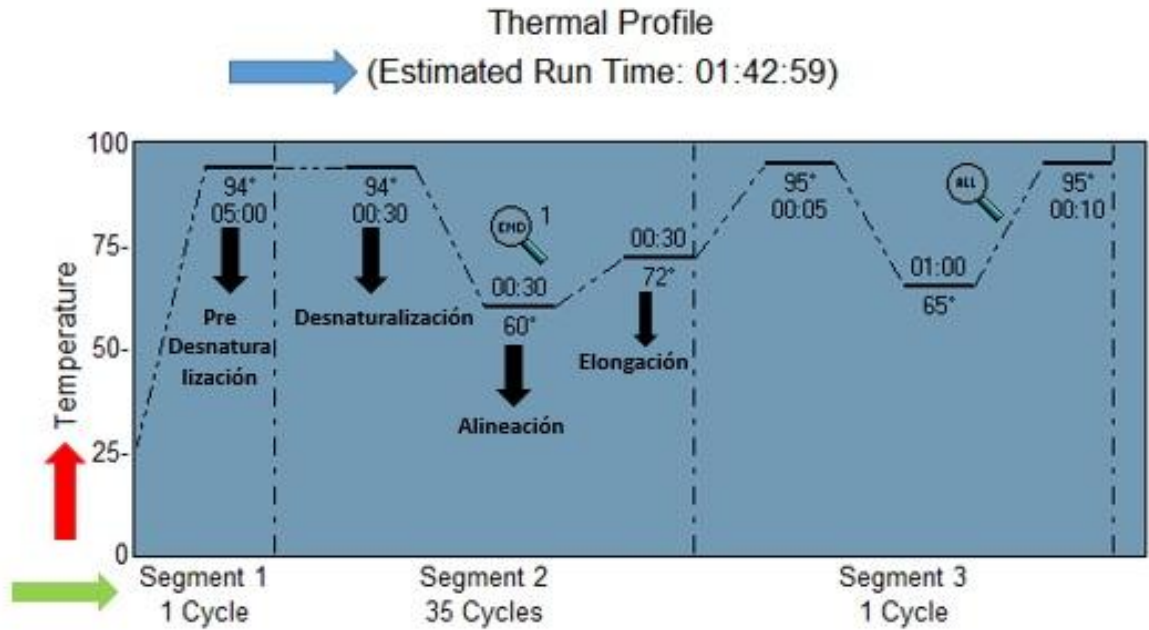


Figura 7. Condiciones de amplificación del gen ORF2 de PCV2 por qPCR. Se indican el tiempo estimado del programa de qPCR para la amplificación de los productos (flecha azul), el rango de temperatura (Y-axis, flecha roja), los segmentos del perfil de amplificación (flecha verde), y las temperaturas específicas de cada segmento (flecha negra).

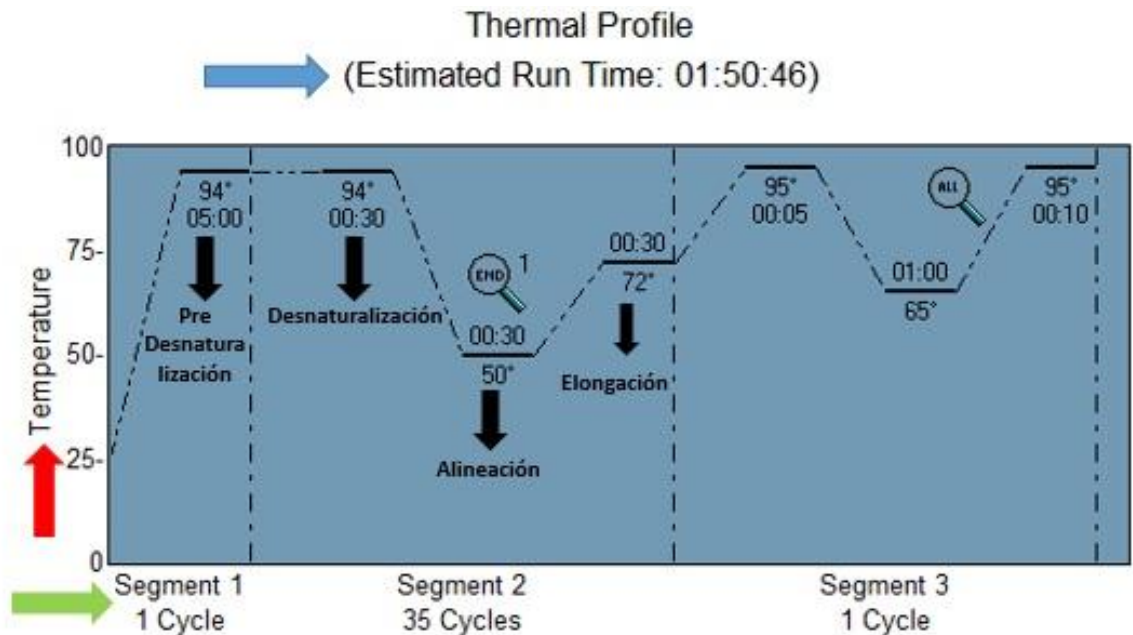


Figura 8. Condiciones de amplificación del gen HPRT1 por qPCR. Se indican el tiempo estimado del programa de qPCR para la amplificación de los productos (flecha azul), el rango de temperatura (Y-axis, flecha roja), los segmentos del perfil de amplificación (flecha verde), y las temperaturas específicas de cada segmento (flecha negra).

Amplification Plots

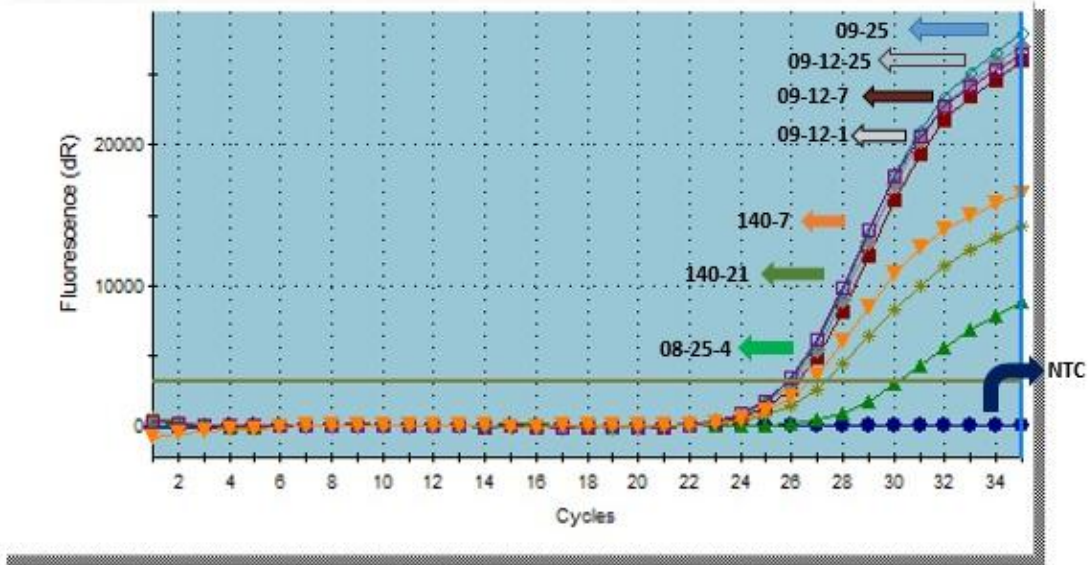


Figura 9. Curva de amplificación de PCV2 por qPCR. Se puede observar el Cp (Punto de cruce /cross-point) de muestras plenamente identificadas y el NTC (non-templete control/reacción control sin templete de ADN/).

Amplification Plots

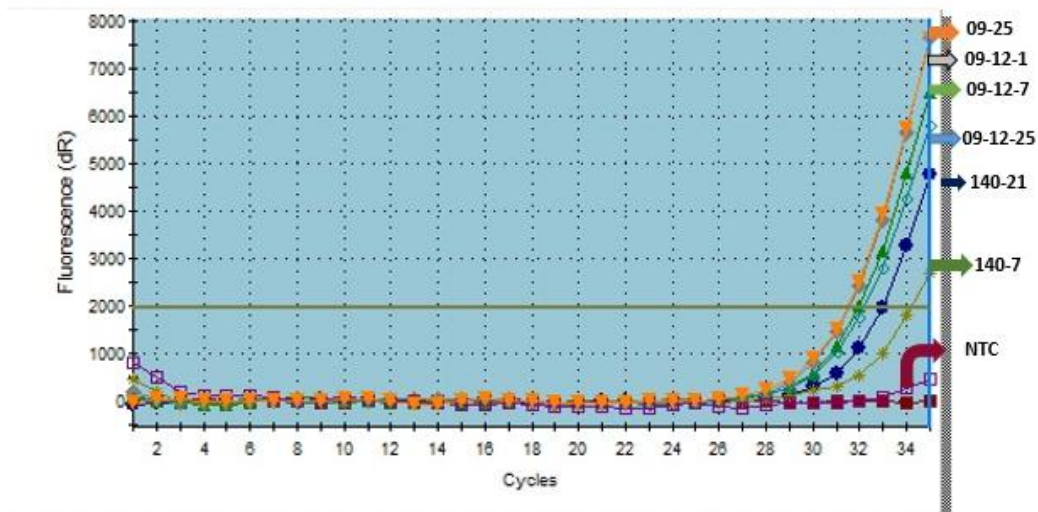


Figura 10. Curva de amplificación del gen HPRT1 por qPCR. Se puede observar el Cp (cross-point /punto de cruce) de muestras plenamente identificadas y el NTC (non-templete control/reacción control sin templete de ADN/).

Amplification Plots

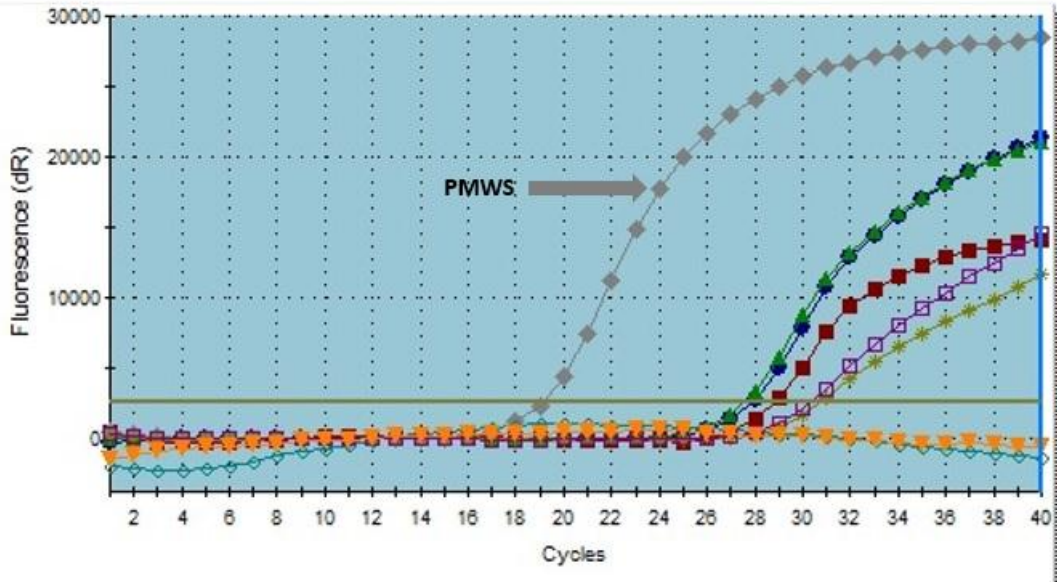


Figura 11. Curva de amplificación comparativa entre un caso de PMWS y casos de FR-PCV2. Se puede observar el Cp (cross- point /punto de cruce) de muestras plenamente identificadas y el NTC (non-templete control/reacción control sin templete de ADN/).

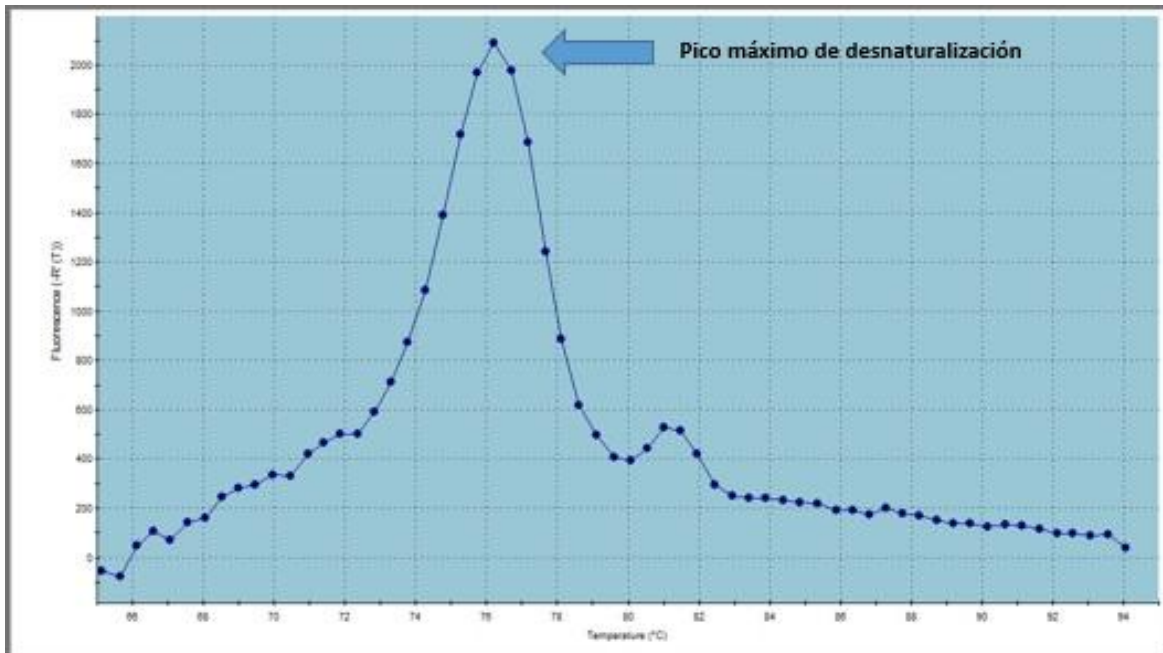


Figura 12. Curva de disociación de la amplificación del gen ORF2 de PCV2 por qPCR. Al lado derecho de la curva se observa un pico discreto sugestivo de producto inespecífico.

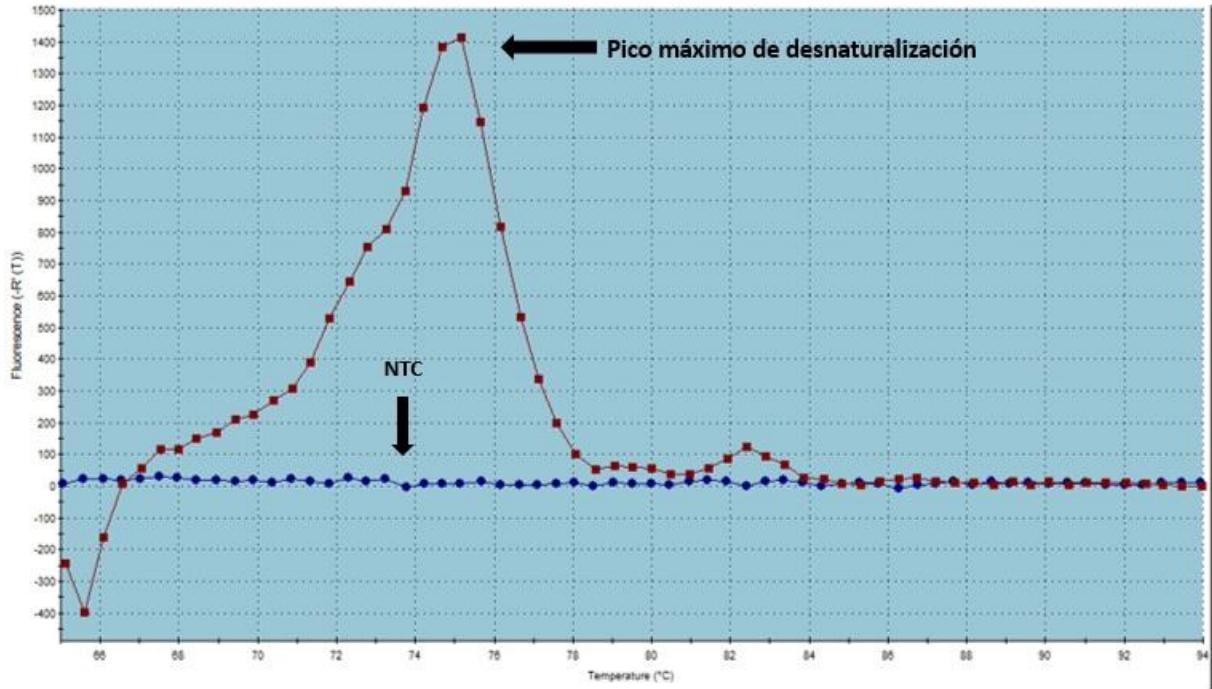


Figura 13. Curva de disociación del gen HPRT1 por qPCR.

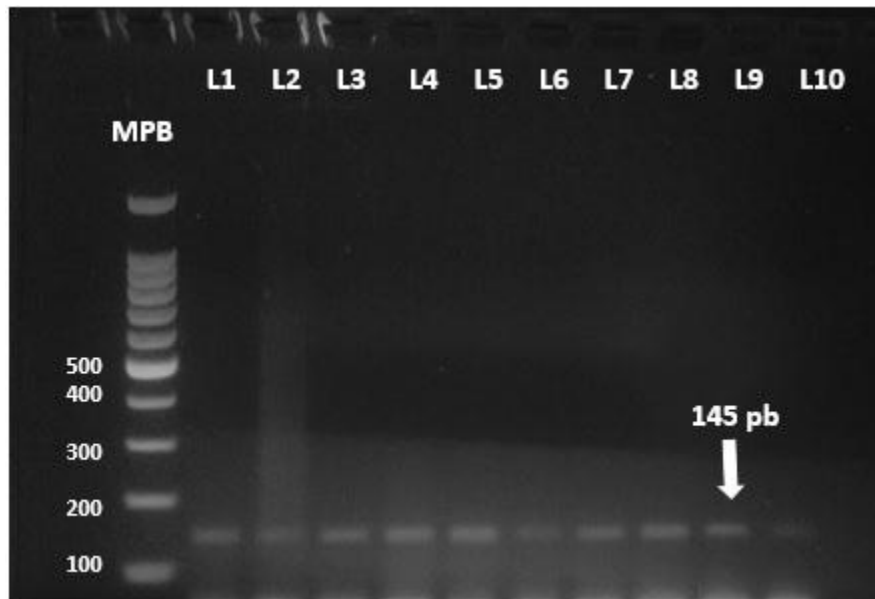


Figura 14. Amplificación de secuencias del gen ORF2 de PCV2 en tejido cardiaco procedente de casos de FR-PCV2 por PCR de punto final. Gel de agarosa al 1.5%. En el primer carril se muestra el marcador de pares de bases (MPB), en las líneas (L) 1 al 10 se visualizan productos amplificados de 145 pb.

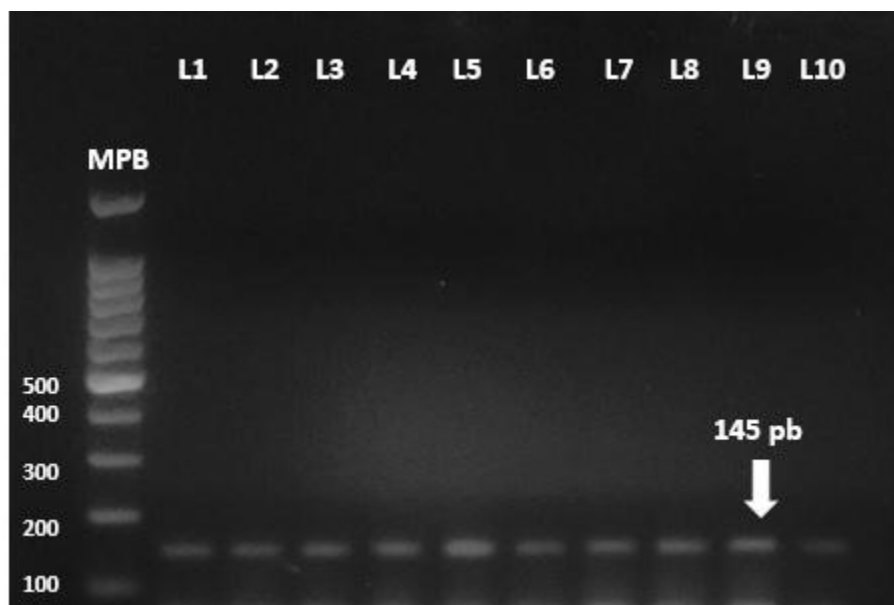


Figura 15. Visualización de secuencias del gen ORF2 de PCV2 amplificadas por qPCR a partir de casos de FR-PCV2. Gel de agarosa al 1.5%. En el primer carril se muestra el marcador de pares de bases (MPB), en las líneas (L) 1 al 10 se aprecian productos amplificados de 145 pb.

Tabla 8. Cuantificación de la carga viral asociado a células en casos de FR-PCV2

Muestra	$2^{-\Delta\Delta C_p}$	Expresión
1	49.52	$10^{1.694}$
2	45.88	$10^{1.661}$
3	50.21	$10^{1.700}$
4	47.21	$10^{1.674}$
5	82.13	$10^{1.914}$
6	174.85	$10^{2.242}$
7	09.78	$10^{0.990}$
8	27.28	$10^{1.435}$
9	47.17	$10^{1.673}$
10	91.77	$10^{1.962}$
11	11.47	$10^{1.059}$
12	167.73	$10^{2.224}$
13	106.89	$10^{2.028}$
14	138.14	$10^{2.140}$
15	125.36	$10^{2.098}$
PMWS	11585.23	$10^{4.063}$

X. DISCUSIÓN

Con la técnica de PCR es posible amplificar un segmento de ADN de manera exponencial, ya que después de cada ciclo se duplica la cantidad de ADN cuando la reacción ocurre con máxima eficiencia. Sin embargo, en la práctica estas reacciones alcanzan su meseta ya que se agotan los reactivos después de varios ciclos; además los productos se pueden autohibridar. Lo anterior dificulta la cuantificación de ADN inicial mediante la determinación de la concentración final de ADN. Debido a estas limitaciones es que surgió la necesidad de diseñar un método de PCR cuantitativa (qPCR) cuyo fundamento consiste en amplificar el ADN eficientemente y crear una correlación entre el ADN que se forma durante la fase exponencial y el ADN inicial, por lo que es más sencillo cuantificar éste último. En los últimos años, la qPCR ha demostrado ser una metodología válida y ampliamente utilizada en investigación biológica ya que puede detectar y cuantificar cantidades muy pequeñas de secuencias específicas de ácidos nucleicos. Como herramienta de investigación, la principal aplicación de esta tecnología es la rápida y precisa valoración de cambios en la expresión de genes. Su simplicidad, especificidad y sensibilidad junto con su potencial como técnica en aplicaciones futuras y la evolución hacia nuevos conocimientos de la química, además de la confiabilidad en la instrumentación y protocolos mejorados, han hecho del qPCR una tecnología altamente competitiva para la detección de ADN (Rodríguez et al, 2006).

En el presente trabajo, se utilizaron iniciadores previamente validados (Yang et al., 2007) para la amplificación de secuencias de nucleótidos del ORF2 de PCV2 en casos de PMWS. La elección de secuencias del ORF2 para el estudio de la PCVAD principalmente se basa en el alto grado de diversidad que esta región presenta y que sirve para la diferenciación entre el PCV1 y el PCV2 (Qiang et al. 2000, Brunborg et al., 2004, Zhao and Shen, 2010). Adicionalmente, se sugiere que en esta zona se determina la patogenicidad debido a que codifica la proteína de la cápside (Zhao and Shen, 2010). Por otro lado, la amplificación de secuencias del ORF2 del PCV2 han sido utilizadas para la determinación de carga viral en casos de falla reproductiva en cerdas (Brunborg et al., 2007). Con base a los elementos descritos, se eligieron dichos iniciadores con la finalidad de probar su eficiencia para la determinación de la carga viral de PCV2 en tejido cardiaco procedente de casos de FR-PCV2 previamente validados por HIS y PCR punto final.

Por otra parte, los iniciadores utilizados para la amplificación de secuencias de HPRT1 han sido validados en muestras provenientes de ganado bovino (Favila, 2010), ovino y caprino e incluso de murciélago (Rodríguez, 2008). En el presente trabajo, se demostró que dichos iniciadores pueden emplearse en tejido porcino, incluyendo tejidos fetales, lo anterior es relevante dado que la expresión génica suele ser menor en tejidos fetales y no todos los genes constitutivos arrojan resultados positivos.

Con base al rendimiento estándar mediante la utilización de equipos de reactivos para la extracción de ADN a partir de tejidos incluidos en parafina, se obtuvo una recuperación de ADN mayor con el método tradicional de precipitación utilizado en el presente trabajo. A pesar de ser una técnica laboriosa y demorada, la disponibilidad de esta técnica de extracción tradicional reduce considerablemente el costo de los experimentos y se puede emplear en el caso de que los equipos comerciales no sean abastecidos con celeridad en el laboratorio.

A pesar de la disponibilidad de una gran variedad de técnicas de la PCR en sus diferentes variedades se requiere la estandarización de las condiciones de amplificación en el termociclador disponible en cada laboratorio. En este trabajo, se determinaron las condiciones óptimas de amplificación por PCR punto final antes de validarla en el termociclador en tiempo real para reducir los costos. En primera instancia, se probaron las condiciones de amplificación descritas en la literatura para los iniciadores empleados, sugiriendo que la temperatura descrita no era la óptima para la obtención de productos bien definidos. En este rubro la utilización del gradiente de temperatura fue determinante para la elección de la temperatura óptima de alineación.

Con respecto a la concentración de Cloruro de Magnesio, se describe que es relevante ya que la eficiencia de la enzima ADN polimerasa es dependiente de magnesio y determina la fidelidad de la misma, pero puede ser contraproducente si se utiliza en alta concentración dado que estabilizan la doble cadena de ADN e interfieren con la alineación de los iniciadores (Cateses et al., 1997). Por ende, es crucial la determinación de la concentración óptima de Cloruro de Magnesio. La amplificación de bandas positivas en las concentraciones de 1.5mM y de 2.25mM constituye un hallazgo interesante ya que generalmente la amplificación de productos presenta una relación inversamente proporcional a la concentración de $MgCl_2$ (Favila, 2010). Posiblemente, la falta de

amplificación que se apreció en la concentración de 2.0 mM haya sido producto de un error de pipeteo. Sin embargo, se optó por la elección de la concentración de 1.5mM debido a que representa una concentración estándar misma que es empleada en las mezclas maestras comerciales. La concentración óptima de iniciadores y de templado fueron acordes con los estándares actuales.

La principal meta de la qPCR es distinguir y cuantificar de manera sensible y específica una secuencia de ADN en una muestra incluso cuando ésta se presenta en baja concentración. En el presente trabajo, la sensibilidad constituía un punto importante ya que la carga viral estimada en casos de FR-PCV2 es muy baja, particularmente en tejido cardíaco (Sánchez et al., 2003; Pensaert et al., 2004) en comparación con la que se observa en casos de PMWS que concentra mucha carga viral en linfonodos y en hígado, lo cual está relacionado con el curso de la enfermedad, la severidad de las lesiones y la distribución del virus en los tejidos por HIS (Rosell et al., 1999). Así mismo, el patrón de HIS que se obtuvo a partir de las muestras seleccionadas en este trabajo para la implementación de la técnica estandarizada, era compatible con un baja carga viral dado que las señales de hibridación fueron escasas, aleatorio y en focos pequeños (Enríquez, 2009).

Con base a lo anterior, los iniciadores utilizados habían mostrado eficiencia para la amplificación de secuencias de PCV2 a partir de tejidos frescos con alta carga viral ya que procedían de cerdos entre 21 a 90 días de edad con signología de PMWS (Yang et al., 2007). En este estudio, los iniciadores también demostraron ser específicos con base a las curvas de disociación y sensibles en la detección de cargas virales muy bajas en tejido cardíaco con estatus positivo de PCV2, ya que se observó una concordancia perfecta. Otro indicador de la carga viral en los tejidos se realiza al observar el ciclo de inicio de la amplificación (que corresponde al C_p). En la amplificación comparativa (Figura 11), se observa claramente que la muestra del caso de PMWS comienza su amplificación entre los ciclos 18-20 mientras que los de FR-PCV2 inicia entre los ciclos 26-30.

Cabe señalar, que con el uso de estos iniciadores se observó un producto inespecífico en las curvas de disociación. En la publicación original este hallazgo también fue descrito, mismo que se interpretó como la presencia de formación de dímeros entre los iniciadores lo que fue más frecuente conforme la carga viral era más baja (Yang et al., 2007). Lo anterior, constituye una limitante dado que en los tejidos fetales procedentes de FR-PCV2

se espera una carga viral muy baja. No obstante, la técnica pudo detectar todos los casos con estatus positivo de PCV2.

En varias publicaciones, se utiliza un plásmido de PCV2 como control positivo para incrementar la sensibilidad y obtener los resultados por cuantificación absoluta (Yang et al., 2007; Qiang et al., 2000; Brunborg et al., 2004; Zhao y Shen et al., 2010). En este trabajo, se optó por la cuantificación relativa, utilizando como calibrador una muestra negativa a PCV2 y a un gen constitutivo por ser un método consensuado de bajo costo que permite la determinación de la carga viral.

XI. CONCLUSIONES

- Se establecieron las condiciones óptimas para la amplificación de productos de PCV2 mediante la PCR punto final y la qPCR.
- Los iniciadores utilizados para la amplificación de secuencias de los productos de HPRT1 pueden ser utilizados en tejido cardíaco fetal porcino.
- Se observó concordancia diagnóstica perfecta entre la PCR punto final y la qPCR para la detección de secuencias parciales del gen ORF2 de PCV2.
- Se logró optimizar el uso de los iniciadores en casos de FR-PCV2 a pesar de tener cargas virales muy bajas, demostrando alta sensibilidad.

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Allan GM, Mcneilly F, McMenamy M, McNair I, Krakowka SG, Timmusk S, et al. 2007. Temporal distribution of porcine circovirus 2 genogroups recovered from postweaning multisystemic wasting syndrome affected and nonaffected farms in Ireland and Northern Ireland. *Vet. J. Diagn. Invest.* 19(6):668-73.
2. Boehringer M. 1996. General Introduction to In situ Hybridization. In: *Nonradiative In situ Hybridization Application Manual*. Second Edition. Boehringer Mannheim. Germany.
3. Bogdan J, West K, Clark E, Konoby C, Haines D, Allan G, et al. 2001. Association of porcine circovirus 2 with reproductive failure in pigs: a retrospective study, 1995-1998. *Can. Vet. J.* 42(7):548-50.
4. Brunborg IM, Jonassen CM, Moldal T, Bratberg B, Lium B, Koenen F, et al. 2007. Association of myocarditis with high viral load of porcine circovirus type 2 in several tissues in cases of fetal death and high mortality. A case study. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19(4):368-75.
5. Brunborg IM, Moldal T, Jonassen CM. 2004. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting using a TaqMan-based real-time PCR. *J. Vet. Met.* 112: 171-178.
6. Chae C., 2004. A review of porcine Circovirus 2-associated síndromes and diseases. *The Vet. J.* 169: 326-336.
7. Chae C. 2005. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases, *The Vet. J.* 169: 326–336.
8. Calsamiglia, M., Segalés, J., Quintana, J., Rosell, C., Domingo, M. 2002. Detection of Porcine Circovirus Types 1 and 2 in Serum and Tissue Samples of Pigs with and without Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome. *J. Clin. Microbiology*. Volumen. 40 (5): 1848-1850.
9. Charles S. J., Han S. J., Kochakorn D., Kyoung-Jin Y., Young K. C. 2002. Experimental in utero inoculation of late-term swine fetuses with porcine circovirus type 2. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14:507–512.

10. Cheung A.K. 2003. The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and DNA replication of porcine circovirus type 2. *Viol.* 313:452-459.
11. Drolet R., Laroche R., Morin M., Delisle B., Magar R. 2003; Detection Rates of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, Porcine Circovirus Type 2, and Swine Influenza Virus in Porcine Proliferative and Necrotizing Pneumonia; *Vet. Pathol.* 40: 143.
12. Enríquez R. K. 2009. “Evaluación de la participación del circovirus porcino tipo 2 (PCV-2) en la falla reproductiva”. Tutora: Dra. Lucía Angélica García Camacho. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlan Izcalli.
13. Enríquez K. Quintero V., Rangel-Rodríguez I.C., Perez-Razo M.A. Romero Y., Lucía A. García-Camacho. 2010. Proceedings of the 21st. IPVS Congress, Vancouver, Canadá- July 18-21. P.467.
14. Fachinger V., Bischoff R., Jedidia S. B., Saalmuller A., Elbers K. 2008. The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex. *Vaccine* 26:1488–99.
15. Faurez F, Dory D., Grasland B., Jestin A. 2009. Replication of porcine circoviruses. *Viol. J.* 6:60
16. Firth, C., Charleston, M. A., Duffy, S., Shapiro, B., Holmes, E. C., 2009, Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: porcine circovirus 2. *J. Virol.* 83, 12813-12821.
17. Fraile L., Calsamiglia M., Mateu E., Espinal A., Cuxart A., Seminati Ch., Martín M., Domingo M., Segalés J., 2009. Prevalence of infection with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in an integrated swine production system experiencing postweaning multisystemic wasting syndrome, *The Can. J. of Vet. Res. Canadá.* 73: 308-312
18. García Camacho, LA., Enríquez Ramírez K., Araiza Nava D., Rangel Rodríguez I.C., Quintero Ramírez V., García Reyna P.B. 2006. Porcine circovirus 2-associated syndromes in mexican farms as detected by in situ hybridization. *L.A. Vet. Pathol.* 43(5):15.

19. García Reyna P.B. Rodríguez R.A., Vargas, C.V., Mercado, P.M., Batalla C.D., Quintero R.V., García C.L.A., 2004a. Reporte de un caso de circovirus porcino tipo 2 en cerdos recién nacidos procedentes del estado de México. Memorias del XIX Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, Buenos Aires, Arg.
20. García Reyna PB; Quintero Ramírez V; Rangel Rodríguez IC; Romero Sánchez Y; García Camacho LA. 2006. Circovirus neonatal detectada por hibridación *in situ* y microscopía electrónica en México (Neonatal circovirus detected by *in situ* Hybridization and electron microscopy in Mexico). Memorias XX Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, 14° Congreso Chileno de Medicina Veterinaria. Santiago, Chile.
21. Grau-Roma, L., Hjulsager, C.K., Sibila, M., Kristensen, C.S., López-Soria, S., Enøe, C., Casal, J., Bøtner, A., Nofrarías, M., Bille-Hansen, V., Fraile, L., Baekbo, P., Segalés, J., Larsen, L.E., 2008. Infection, excretion and seroconversion dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and Denmark. *Vet. Microbiol.* 135: 272–282.
22. John C.S. Harding, C. Baker, C. Rhodes, K. A. McIntosh, M. Bonneau, 2008; Ring tests to evaluate the performance of Porcine circovirus-2 (PCV-2) polymerase chain reaction (PCR) assays used in North American diagnostic laboratories. *Can. J. Vet. Res.* 73: 7–14.
23. Kekarainen T., K. McCullough, M. Fort, C. Fossumc, J. Segalés, G.M. Allan. 2010. Immune responses and vaccine-induced immunity against Porcine circovirus type 2. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 136 (2010) 185–193.
24. Kim J, Jung K, Chae C. 2004. Prevalence of porcine circovirus type 2 in aborted fetuses and stillborn piglets. *Vet. Rec.* 155(16):489-92.
25. Kim, J., Chae, C., 2001. Differentiation of porcine Circovirus 1 and 2 in formalin-fixed, paraffin-wax-embedded tissues from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome by in-situ hybridization. *Vet. Sci.* 70: 265-269.
26. Labarque, G.G., Nauwynck, H.J., Mesu, A.P., Pensaert, M.B., 2000. Seroprevalence of porcine circovirus types 1 and 2 in the Belgian pig population. *Vet. Quart.* 22: 234–236.

27. Madson DM, Patterson AR, Ramamoorthy S, Pal N, Meng XJ, Opriessnig T. 2009. Reproductive failure experimentally induced in sows via artificial insemination with semen spiked with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Vet Pathol.* 46:4. 707-716.
28. Madson D.M., Opriessnig T. 2011. Infection effect in reproduction of porcine circovirus type 2 (PCV2): the disease, vertical transmission, the diagnostics and the vaccination. *Anim. Health Res. Rev.* 12; 47–65.
29. Maldonado J, Segalés J, Martínez Piug D., Calsamiglia M, Riera P, Domingo M, et al. 2005. Identification of viral pathogens in aborted fetuses and stillborn piglets from cases of swine reproductive failures in Spain. *Vet. J.* 169: 454-456.
30. McIntosh K. A., Harding J. C.S., Parker S., Krakowka S., Allan G., Ellis J. A., 2008. Quantitative polymerase chain reaction for Porcine circovirus-2 in swine feces in a Porcine circovirus disease-affected commercial herd and a nonaffected commercial herd. *Can. Vet. J.* 49:1189–1194.
31. McIntosh K. A., Tumber A., Harding J. C.S., Krakowka S., Ellis J. A., Hill J. E., 2009, Development and validation of a SYBR green real-time PCR for the quantification of porcine circovirus type 2 in serum, buffy coat, feces, and multiple tissues. *Vet. Microbiol.* 133: 23-33.
32. McKeown, N.E., Opriessnig, T., Thomas, P., Guenette, D.K., Elvinger, F., Fenaux, M., Halbur, P.G., Meng, X.J., 2005. Effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) maternal antibodies on experimental infection of piglets with PCV2. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12: 1347–1351.
33. Meerts P., Misinzog., McNeilly F., Nauwynck H. J. 2005. Replication kinetics of different porcine circovirus 2 strains in PK-15 cells, fetal cardiomyocytes and macrophages. *Arch Virol* 150: 427–441.
34. Nielsen, J., Vincent, I.E., Botner, A., Ladekaer-Mikkelsen, A.S., Allan, G., Summerfield, A., McCullough, K.C., 2004. Association of lymphopenia with porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 92: 97–111.

35. O'Connor B., Gauvreau H., West K., Bogdan J., Ayroud M., Clark Edward G., Konoby C., Allan G., Ellis J. A. 2001. Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. *Can Vet J.* 42:551-553.
36. Opriessnig, T., Meng, X. J. & Halbur, P. G., 2007. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19: 591–615.
37. Opriessnig, T., Patterson, A.R., Madson, D.M., Pal, N., Halbur, P.G., 2009. Comparison of efficacy of commercial one dose and two dose PCV2 vaccines using a mixed PRRSV-PCV2 SIV clinical infection model 2–3- months post vaccination. *Vaccine* 27: 1002–1007.
38. Opriessnig T., S. Ramamoorthy, D. M. Madson, A. R. Patterson, N. Pal, S. Carman, X. J. Meng and P. G. Halbur, 2008; Differences in virulence among porcine circovirus type 2 isolates are unrelated to cluster type 2a or 2b and prior infection provides heterologous protection; *J. Gen. Virol.* 89: 2482–249.
39. Padidam M, Beachy RN, Fauquet CM: A phage single-stranded DNA (ssDNA) binding protein complements ssDNA accumulation of a geminivirus and interferes with viral movement. *J. Virol.*73:1609-1616.
40. Pensaert M.B., Sánchez Jr., R.E., Ladekjær-Mikkelsen A-S., Allan G.M. Nauwynck H.J. 2004. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. *Vet. Microbiol.* 98: 175-183.
41. Pérez-Martín, E., Grau-Roma, L., Argilagué, J.M., Nofrarías, M., Escribano, J.M., Gómez-Sebastián, S., Segalés, J., Rodríguez, F., 2008. Development of two *Trichoplusia ni* larvae-derived ELISAs for the detection of antibodies against replicase and capsid proteins of porcine circovirus type 2 in domestic pigs. *J. Virol.* 154: 167–174.
42. Pittman J. S. 2007. Reproductive failure associated with porcine circovirus type 2 in gilts. *J Swine Health Prod.* 16 (3):144–148.
43. Qiang L., Li W., Phill W., Lorne B. 2000. Quantitative, competitive PCR analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 38:9. 3474-3477.

44. 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.
45. Ritzmann M, Wilhelm S, Zimmermann P., Etschmann B, Bogner KH, Selbitz HJ, et al. 2005. Prevalence and association of porcine circovirus type 2 (PCV2), porcine parvovirus (PPV) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in aborted fetuses, mummified fetuses, stillborn and nonviable neonatal piglets. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 112(9):348-51.
46. Sanchez Jr. R.E., Nauwynck H.J., McNeilly F., Allan G.M., Pensaert, M.J. 2001. Porcine circovirus 2 infection in swine foetus inoculated at different stages of gestation. *Vet. Microbiol.* 83: 169-176.
47. Sanchez Jr., R.E., Meerts, P., Nauwynck, H.J., Pensaert, M.B., 2003. Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life. *Vet. Microbiol.* 95: 15–25.
48. Schmoll F., Lang C., Steinrigl A.S., Schulze K., Kauffold J. 2008. Prevalence of PCV2 in Austrian and German boars and semen used for artificial insemination. *Vet. J.* 69, 814-821.
49. Segalés, J., Urniza, A., Alegre, A., Bru, T., Crisci, E., Nofrarías, M., López- Soria, S., Balasch, M., Sibila, M., Xu, Z., Chu, H.J., Fraile, L., Plana-Duran, J., 2009. A genetically engineered chimeric vaccine against porcine circovirus type 2 (PCV2) improves clinical, pathological and virological outcomes in postweaning multisystemic wasting syndrome affected farms. *Vaccine* 27: 7313–7321.
50. Shen H., Wang C., Madson D. M., Opriessnig T., 2010; High prevalence of porcine circovirus viremia in newborn piglets in five clinically normal swine breeding herds in North America, *Prev. Vet. Med.* 97. 228–236
51. Sorden S.D., Harms P.A., Nawagitgul P., Cavanaugh D., Paul P.S., 1999. Development of apolyclonal-antibody-based immuno histochemical method for the detection of type2 porcine circovirus informalin-fixed,paraffin-embedded tissue. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11: 528-530.

52. Tischer, I., W. Miels, D. Wolff, M. Vagt, and W. Griem. 1987. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch. Virol.* 91:271–276.
53. Tizard, I.R., 1996. *Veterinary Immunology: An Introduction*. Saunders, Pennsylvania, pp. 237–250
54. Todd, D., Bendinelli, M., Biagini, P., Hino, S., Mankertz, A., Mishiro, S., Niel, C., Okamoto, H., Raidal, S. & other authors, 2005. Family Circoviridae. In *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 327–334. Edited by C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L. A. Ball. San Diego: Elsevier Academic Press. type 2 in gilts. *Journal of Swine Health and Production*. 144-148.
55. Villarreal, L.P., Defilippis, V.R., Gottlieb, K.A., 2000. Acute and persistent viral life strategies and their relationship to emerging diseases. *Virology* 272: 1–6.
56. West, K.H., Bystrom, J.M., Wonjnarowicz, C., Shantz, N., Jacobson, M. Allan, G.M., Haines, D.M., Clark, E.G., Krakowwka, 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.
57. Yang Z-z, Habib M, Shuai J-b, Fang W-h, 2007, Detection of PCV2 DNA by SYBR Green I-based quantitative PCR, *Journal of Zhejiang University Science B.* 8(3):162-169.
58. Yoon K-J, Jepsenb R. J., Pogranichniya R.M. Sordena Steve, Stammerc Rich, Evans Lawrence E. 2003. A novel approach to intrauterine viral inoculation of swine using PCV type 2 as a model. *Inter. J. Animal Rep.* 1025-1037.
59. Zhao K., Han F., Zou Y., Zhu L., Li C., Xu Y., Zhang C., Tan F., Wang J., Tao S., He X., Zhou Z., Tang X., 2010; Rapid detection of porcine circovirus type 2 using a TaqMan-based real-time PCR; *Vir. J.* 7:374.