



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA**

**DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO E
INMUNOHISTOQUÍMICO DE AGENTES VIRALES
INVOLUCRADOS EN EL COMPLEJO
RESPIRATORIO PORCINO EN CASOS DE CAMPO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
PRESENTA :**

OSCAR AGUAYO AVALOS



**ASESORES:
MVZ MC MIREYA JUÁREZ RÁMIREZ
MVZ MC JUAN CARLOS ÁNGELES
HERNÁNDEZ**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A mi Padre celestial y a los hermosos padres terrenales que Él me ha regalado, su instrucción, corrección e infinito amor han moldeado y dado sentido a la vida que ustedes me dieron.

Todo honor que pueda haber en mis acciones es solo para ustedes.

Contenido

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Situación de la industria porcina mundial y nacional.	2
1.2 Impacto de las enfermedades respiratorias en la producción porcina	4
1.3 Complejo Respiratorio Porcino (CRP).....	5
1.3.1 Influenzavirus A (SIV)	6
1.3.2 Virus del Síndrome respiratorio y reproductivo del cerdo (PRRSV).....	9
1.3.3 Circovirus porcino tipo 2 (PCV-2)	11
1.3.4 Agentes bacterianos primarios del CRP	13
1.3.5 Agentes bacterianos secundarios del CRP	15
1.4 Diagnóstico de los agentes del CRP.....	15
1.4.1 Histopatología (HP)	16
1.4.2 Inmunohistoquímica	19
1.5 Justificación	23
2. HIPÓTESIS	24
3. OBJETIVO GENERAL	24
4. MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1 y 4.2 Histopatología.....	25
4.3 Inmunohistoquímica	26
4.3.1 Evaluación	29
4.4 Análisis estadístico	29
4.4.1 Potencia de la prueba estadística	29
4.4.2 Análisis de los datos	30
5. RESULTADOS	33
5.1 Clasificación y gradificación histológica de los 122 casos de CRP	33
5.2 Diagnóstico mediante histopatología	34
5.3 Diagnóstico mediante inmunohistoquímica	38
5.3.1 Localización de los antígenos	38
5.4 Análisis estadístico	42

6. DISCUSIÓN	46
5. CONCLUSIONES.....	54
6. PERSPECTIVAS.....	55
7. LITERATURA CITADA.....	56

Índice de Figuras

Figura 1. Origen de la carne consumida en el mundo (FAO, 2012) ⁵	3
Figura 2. Producción de carne de cerdo en México del 1993 a 2013.7	3
Figura 3. Estructura de <i>Influenzavirus A</i> ¹⁵	7
Fig.4. Esquema que muestra la estructura y los principales componentes de PRRSV. ¹⁴	9
Fig. 5. IHQ directa e indirecta ³⁴	21
Figura 7. Pulmón H y E, lesiones características de SIV	35
Figura 8. Pulmón H y E, lesiones características de PCV-2	36
Figura 9. Pulmón H y E. lesiones características de PRRSV.....	37
Figura 10. Pulmón. Inmunopositividad para nucleoproteína de SIV	40
Figura 11. Pulmon 40x. Inmunopositividad para antígenos de PCV-2.....	41
Figura 12. Pulmón 40x. Inmunopositividad para proteína de nucleocápside de PRRSV.....	42

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Criterios histológicos para designar el tipo de lesión histológica principal.	25
Cuadro 2. Lesiones pulmonares utilizadas para asignar un caso positivo a cada uno de los agentes mediante histopatología.	26
Cuadro 3. Frecuencia de las lesiones principales en los 122 casos de CRP	33
Cuadro 4 Frecuencia de casos con las lesiones utilizadas para determinar casos positivos de SIV .	35
Cuadro 5 Frecuencia de casos con las lesiones utilizadas para determinar casos positivos de PRRSV	36
Cuadro 6 Frecuencia de casos con las lesiones utilizadas para determinar casos positivos de PCV-2.....	37
Cuadro 7 Casos positivos determinados por Histopatología y por IHQ.....	38
Cuadro 8. Frecuencia de las asociaciones entre SIV, PRRSV y PCV-2 en 122 pulmones de cerdo. ..	38
Cuadro 9. Tabla de contingencia SIV	43
Cuadro 10. Tabla de contingencia PRRSV	44
Cuadro 11. Tabla de contingencia PCV-2.....	44
Cuadro 12. Resultados de Ji-cuadrada, F de Fisher y Odds Ratio, obtenidos por medio del programa R studio.	45
Cuadro 13 . Indicadores de la histopatología como prueba diagnóstica para los tres agentes.	45

RESUMEN

AGUAYO AVALOS OSCAR. Diagnóstico histopatológico e inmunohistoquímico de agentes virales involucrados en el Complejo Respiratorio Porcino en casos de campo. (Bajo la dirección de MC Mireya Juárez Ramírez y MC Juan Carlos Ángeles Hernández)

La histopatología es una de las técnicas utilizadas para diagnosticar los agentes participantes en el complejo respiratorio porcino, sin embargo, se piensa que debido a las interacciones entre los múltiples agentes, la identificación de las lesiones se dificulta. En este trabajo, se realizó el análisis microscópico detallado de las lesiones pulmonares características de la infección por virus de *Influenza Porcina* (SIV), *Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo del Cerdo* (PRRSV) y *Circovirus Porcino tipo 2* (PCV-2) en 122 casos de campo de Complejo Respiratorio Porcino y para conocer su certeza diagnóstica se contrastaron los resultados con una técnica semi-cuantitativa, la inmunohistoquímica. Con la histopatología se encontraron 34 casos (27%) de SIV, siendo la lesión más común la hiperplasia epitelial, 27 (22.1%) de PRRSV con la presencia de restos celulares y macrófagos necróticos en la luz alveolar en todos los casos y 14 (11.4%) de PCV-2 con necrosis fibrinoide de vasos sanguíneos en la mayoría de los casos. Mientras que con la inmunohistoquímica se encontró el antígeno de SIV en 119 casos (97.5%), en ninguno de ellos en epitelio bronquial y bronquiolar, el de PRRSV en 99 casos (81.1%), destacando su presencia en epitelio bronquial degenerado (no mencionado en la literatura) y el de PCV-2 en 36 casos (29.5%), en neumocitos, epitelio bronquial y células linfáticas. El análisis por medio de la prueba de Ji cuadrada arrojó que los resultados de ambas pruebas no están relacionados para ninguno de los tres agentes, siendo la magnitud de la diferencia más grande en el caso de SIV, seguido de PRRSV y por último PCV-2.

1. INTRODUCCIÓN

La histopatología y la inmunohistoquímica son dos de las técnicas utilizadas en el campo de la anatomía patológica para el diagnóstico de enfermedades infecciosas; ambas se basan en la examinación microscópica de secciones de tejido en busca de evidencia de la presencia de los agentes infecciosos, la primera por medio de las lesiones provocadas por estos y la segunda por la demostración de antígenos específicos en los tejidos.^{1,2}

El presente trabajo consiste en el diagnóstico mediante ambas técnicas de tres agentes virales: *Circovirus porcino tipo 2 (PCV2)*, virus de *influenza porcina (SIV)* y *virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo del cerdo (PRRSV)* y la relación entre los resultados de ambas pruebas.

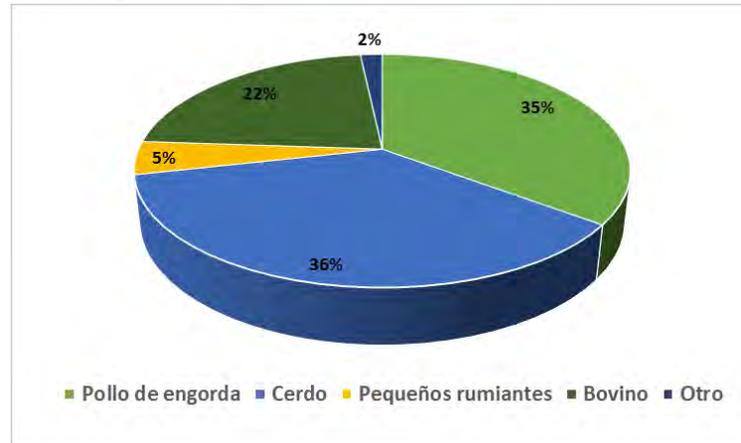
El estudio de métodos diagnósticos de estos tres agentes virales es muy importante debido a que son los principales agentes primarios del Complejo Respiratorio Porcino (CRP), considerado el problema más desafiante y con mayor importancia económica de la industria porcina,³ posicionada como uno de los subsectores pecuarios más importantes en México y el Mundo.⁴

1.1 Situación de la industria porcina mundial y nacional.

El aumento en la producción alimenticia mundial observado desde los años ochenta se ha sustentado principalmente en el sector pecuario, el cual ha mostrado mayor crecimiento que el sector agrícola debido a cambios en las tendencias de consumo y a mayor demanda de la creciente población en los países en desarrollo.⁴

Uno de los subsectores que más ha crecido es la industria porcina, la cual produjo 115.5 millones de toneladas en el 2014 y provee la carne de mayor consumo en el mundo (**Fig. 1**).

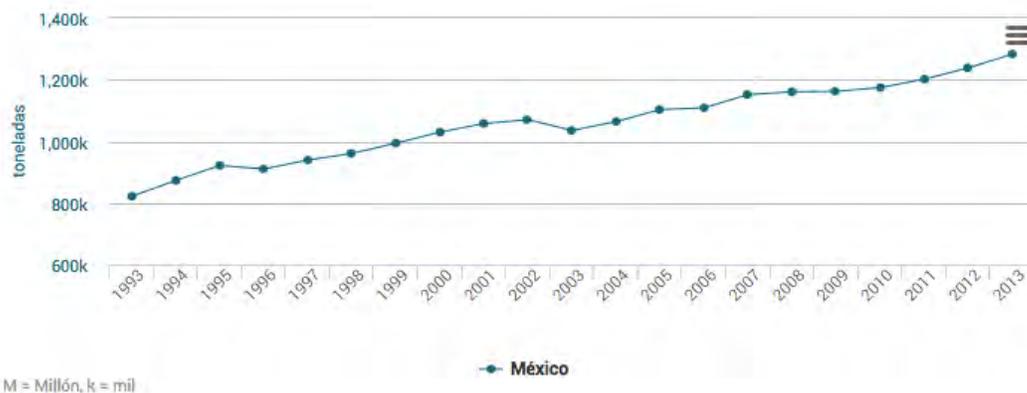
Figura 1. Origen de la carne consumida en el mundo (FAO, 2012) ⁵



La carne de cerdo es la carne de mayor consumo en el mundo debido a la gran preferencia que se tiene por esta en regiones con alta densidad de población, como China.⁵

En México, la producción porcina ha seguido la misma tendencia de crecimiento que la observada en el resto del mundo (**Fig.2**), lo cual ha posicionado a este subsector pecuario en el tercer lugar en la producción de carne durante el 2014 con 1 290 591 toneladas, detrás de la industria cárnica avícola y la producción de carne de bovino, con 2 879 686 y 1 827 152 T respectivamente.⁶

Figura 2. Producción de carne de cerdo en México del 1993 a 2013.(FAO 2013)7



Este importante aumento en la producción porcina en México en los últimos 20 años está sustentado en el aumento del inventario porcino, que llegó a 16 098 680 en el 2014; además

de la optimización de recursos que permiten producir la mayor cantidad posible de carne por animal, ambos avances se han dado gracias al cambio de condiciones extensivas a intensivas o industriales.^{4,6} Estos sistemas de producción se caracterizan por brindar alimento formulado con altas concentraciones de energía y nutrientes como nitrógeno y fósforo y elevados índices de digestibilidad en sistemas completamente estabulados, con elevada densidad de población en instalaciones cerradas y en regiones productoras geográficamente definidas, lo que lleva a que las unidades de producción estén cercanas unas de otras.^{3,7}

Las zonas de producción intensiva en México se encuentran en los estados de Jalisco, Sonora Michoacán, Guanajuato y Yucatán e incorporan importantes cambios en todas las áreas de la zootecnia, sin embargo, a la par de la mejora que estos han traído a los parámetros productivos, las características propias de estos sistemas de producción han propiciado condiciones sanitarias, comerciales y ambientales que han generado desafíos para la industria mundial y nacional como el surgimiento o el cambio en la dinámica de las enfermedades, dentro de las cuales las respiratorias son de las más importantes.³

1.2 Impacto de las enfermedades respiratorias en la producción porcina

Las enfermedades respiratorias son consideradas el problema más desafiante que enfrenta la industria porcina moderna, con una importancia económica tal, que representan del 10 al 14% del gasto total generado por enfermedades.³

La magnitud de los gastos por estas enfermedades se sitúa alrededor de 5.42 USD por animal por año en algunos estudios^{8,9} y es resultado de la suma de las pérdidas por mortalidad, disminución en ganancia de peso, aumento del consumo de alimento y de los gastos propios del control como vacunación, tratamiento, procedimientos de limpieza y horas de trabajo extra.³

La suma de los elementos ambientales y agentes infecciosos que producen enfermedad respiratoria, es conocida como **Complejo Respiratorio Porcino (CRP)** y comprende diversas interacciones en las cuales cada uno de los elementos juega un papel determinante en la presentación, severidad y lesiones observadas.¹⁰

1.3 Complejo Respiratorio Porcino (CRP)

El CRP incluye numerosos agentes infecciosos virales y bacterianos, dichos agentes presentan diversos sistemas de interacción en los que pueden actuar de manera primaria tal como lo hacen los virus de *Influenza Porcina (SIV)*, del *Síndrome Respiratorio y Reproductivo del cerdo (PRRSV)*, *Circovirus Porcino tipo 2 (PCV-2)* y bacterias como *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuroneumoniae*; o de manera secundaria bacterias como *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida* y *Streptococcus suis*.¹¹

De manera general, se considera que los agentes primarios debilitan los mecanismos de inmunidad innata del organismo hospedero, y los secundarios son organismos que forman parte de la flora normal del organismo o están presentes de manera común en el ambiente, pero que son capaces de proliferar y causar infección solo cuando dichos mecanismos están afectados.¹² Un ejemplo de este tipo de interacción es la que se da entre un virus o *Mycoplasma* y una bacteria que forma parte de la flora normal del aparato respiratorio, tal es el caso de la Neumonía enzoótica, donde *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Pasteurella multocida*, actuando en combinación, causan daños más severos; sin embargo, son reconocidos otros modelos de interacción como el dado entre virus-bacteria pero en el cual la bacteria involucrada es un microorganismo que normalmente coloniza otros tejidos diferentes al tracto respiratorio, un ejemplo de esta interacción ocurre entre *PRRSV* y *Salmonella choleraesuis*. Finalmente un tercer tipo de interacción es la que se da entre

agentes considerados primarios como *Mycoplasma*-virus o virus-virus, un ejemplo de esto es la interacción que se da entre *Mycoplasma hyopneumoniae* y SIV.¹⁰

En la siguiente sección se describirán los agentes infecciosos del CRP haciendo mayor énfasis en los agentes virales objeto de este estudio.

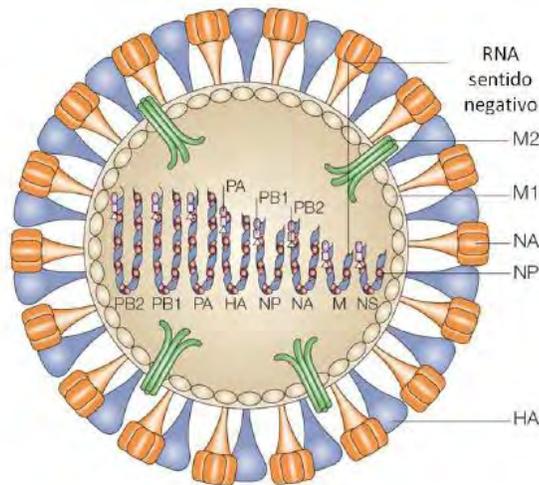
1.3.1 Influenzavirus A (SIV)

Los virus de influenza pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae* y se clasifican en los tipos A, B y C según la naturaleza antigénica de dos moléculas, la proteína matriz (M1) y la nucleoproteína (NP), de estos tipos, es el *Influenzavirus A* el que causa enfermedad en los cerdos, además de otras especies entre las que se encuentran aves, caballos y humanos. El *Influenzavirus A*, a su vez, es dividido en subtipos según las variantes antigénicas de dos de sus glicoproteínas de superficie, la hemaglutinina (HA) y la Neuraminidasa (NA), para las cuales existen 18 y 11 variantes, respectivamente. Los subtipos de *Influenzavirus A* causantes de enfermedad en los cerdos son H1N1, H1N2 y H3N2.^{11,13,14}

La partícula viral es esférica o pleomórfica con 80-120 nm de diámetro y envoltura derivada de la célula huésped, en la cual se encuentran proyecciones espaciadas de manera estrecha de 10 a 12 nm de longitud correspondientes a la HA y NA. En la envoltura se encuentran también las proteínas M2, que son tetrámeros que forman un canal iónico; debajo de esta se encuentra la proteína M1, la cual es la principal proteína estructural y se encuentra rodeando a las moléculas de RNA, que a su vez se encuentran relacionadas cada una con la nucleoproteína (NP), dos polimerasas básicas (PB1 y PB2) y una polimerasa ácida (PA)¹⁵.

(Fig. 3)

Figura 3. Estructura de *Influenzavirus A* (Hiromoto T, Kawaoka Y., 2005).¹⁵



El genoma de *Influenzavirus A* está compuesto por 8 segmentos de RNA lineal de una cadena en sentido negativo (ssRNA-); la naturaleza segmentada del genoma del virus permite mayor recombinación y es uno de los principales factores que promueven su variabilidad antigénica. La entrada del virus es por vía aerógena y las principales células blanco son las células epiteliales de vías aéreas superiores e inferiores. Al entrar en contacto con la célula, la HA se une con los residuos de ácido siálico terminales de las glicoproteínas y glucolípidos de la membrana celular,¹⁵ la afinidad de las HA es variable y se ha observado que los virus que circulan en las aves tienen mayor afinidad por el ácido siálico de conformación $\alpha 2,3$, mientras que los virus adaptados a la infección en mamíferos son más afines a la molécula con conformación $\alpha 2,6$.¹³ Estudios anteriores demostraban la presencia de ambas conformaciones de ácido siálico en el epitelio respiratorio del cerdo, sin embargo, estudios más recientes han concluido que la conformación $\alpha 2,3$ es escasa en el epitelio traqueal del cerdo y que además la distribución de las dos conformaciones de ácido siálico en el epitelio respiratorio humano es similar a la encontrada en el cerdo, lo cual descarta a este último como un huésped intermedio obligado para las infecciones por virus aviáres en humanos.¹³

La unión de la HA con el ácido siálico desencadena el proceso de endocitosis mediado por receptor, dentro del endosoma la disminución del pH genera dos fenómenos: el cambio conformacional en la HA provoca la fusión de la membrana viral con la membrana endocítica y la activación de los canales iónicos formados por la proteína M2 aumentan la concentración de protones dentro de la partícula viral, lo cual provoca la disociación de la proteína M1 con el RNA; de esta manera el RNA liberado de su interacción con la principal proteína estructural es capaz de pasar del endosoma al citoplasma de la célula, para finalmente llegar al núcleo donde comenzará su transcripción.¹⁵

La vía de excreción del virus es por medio de aerosoles generados por tos o estornudos, el contacto directo de cerdo a cerdo y los ambientes cerrados favorecen la transmisión. El periodo de incubación es corto (de 24 a 72 horas), y la excreción ha sido detectada desde las 24 horas hasta 7-10 días post infección.^{13,15}

La mayor parte del daño causado por los *Influenzavirus A* es atribuible a la destrucción de las células infectadas por medio de la supresión de la expresión de algunos genes, sin embargo, la infección y la necrosis desencadenan la inmunidad innata y adaptativa, cuyos mecanismos, en especial la secreción de citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-1 de manera desmedida, provoca daño y destrucción de las células epiteliales de las vías aéreas.¹³

La morbilidad observada es cercana al 100%, sin embargo, infecciones simples sin factores u otros agentes complicantes provocan mortalidad de apenas 1%. La recuperación comienza 5-7 días después del inicio de la enfermedad y se da de manera súbita.^{3,15}

1.3.2 Virus del Síndrome respiratorio y reproductivo del cerdo (PRRSV)

También llamado “*arterivirus* porcino”, fue identificado en 1991 y encontrado como responsable de la que hasta ese año fue llamada “enfermedad misteriosa”, la cual causaba desde 1989 manifestaciones clínicas como afectaciones reproductivas, neumonías post destete y disminución general en la productividad. Estudios retrospectivos han demostrado seropositividad incluso en muestras de años anteriores a la asociación de las manifestaciones clínicas con la enfermedad misteriosa, siendo las muestras positivas más antiguas del año 1979 en Canadá.¹⁶

Pertenece al género *Arterivirus* de la familia *Arteriviridae*, dentro del orden *Nidovirales*, con dos variedades genéticas identificadas: genotipo europeo (tipo 1 o Lelystad) y genotipo Americano (tipo 2 o 16244B).^{16,17}

La partícula viral es esférica, de alrededor de 50-65 nm de diámetro y cuenta con envoltura lipídica, en la cual se encuentran las proteínas E, GP2, GP3, GP4, GP5 y M. Al interior de esta se encuentra la nucleocápside cúbica de 25-35 nm de diámetro, formada por la proteína N. (Fig.4)¹⁴.

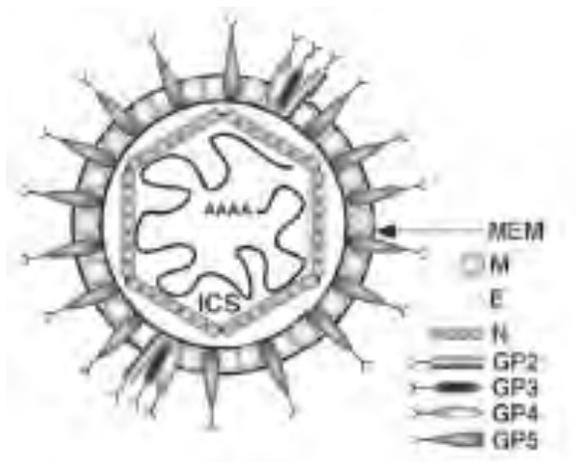


Fig.4. Esquema que muestra la estructura y los principales componentes de PRRSV.(MacLachlan,Duvobi,2011)¹⁴

El genoma de los *Arterivirus*, comprendidos también por el virus de arteritis equina (da nombre al género), el virus elevador de lactato-deshidrogenasa (en ratones) y el virus de la fiebre hemorrágica de los simios, consiste en una sola molécula lineal de RNA de cadena simple en sentido positivo (ssRNA⁺), el del genotipo europeo consta de 15.1 kb y el americano de 15.4 kb.^{18,14}

El *PRRSV* tiene tropismo muy restringido igual que el resto de los *Arterivirus* tanto en especies como en células que afecta. El blanco del virus son los macrófagos, sin embargo, la información sobre que proteínas estructurales y de las que se encuentran en la envoltura median el reconocimiento y la entrada del virus a la célula es limitada; se ha encontrado que glicoproteínas que contienen ácido siálico en la envoltura viral y moléculas parecidas a la heparina están implicadas en la adhesión del virus a los macrófagos, mientras que la internalización de las partículas virales es por medio de endocitosis mediada por clatrina, y parece estar dada por la interacción de la sialoadhesina (CD169, una lectina propia de los macrófagos) y el heterodímero GP5/M en la superficie de la partícula viral. El papel de otras moléculas, tanto virales como de los macrófagos en el proceso de internalización del virus permanece incierta.¹⁷

La patogenia del virus está basada sobre todo en la inducción de la apoptosis en los macrófagos, y es acentuada por la inducción de esta en células adyacentes que no están infectadas por el virus (apoptosis indirecta); otros mecanismos de daño por la infección son la inducción de citocinas y la reducción en la función de los macrófagos.

Las vías de eliminación detectadas son saliva, secreciones nasales, orina, semen y heces; la transmisión vertical está bien documentada y se sabe que la mayoría de las cepas del virus son eficientes para pasar a la placenta solo en el último tercio de la gestación.¹⁶

El virus tiene múltiples vías de entrada, entre las que se encuentran la intranasal, oral, intramuscular, intrauterina (durante inseminación artificial) y vaginal; las prácticas de manejo empleadas en el campo proveen vías de entrada parenteral que son altamente eficaces para la transmisión del virus, como el aretado o muesqueo, corte de cola y descolmille y aplicación de medicamentos y biológicos.

Los sistemas de producción intensivos acentúan conductas normales de los cerdos, como las peleas por jerarquía, que resultan en la inoculación de saliva de un animal a otro por medio de mordidas, cortadas, abrasiones, y lesiones en orejas y cola. Además, prácticas zootécnicas que predominan en la industria, como la inseminación artificial, pueden representar la vía de entrada de una granja a otra.^{16,19}

Las infecciones por *Arterivirus* en general, son crónicas y pueden cursar durante largo tiempo de manera asintomática, esta es la razón por la cual PRRS es una enfermedad altamente persistente y con una gran circulación en las granjas; la severidad de la enfermedad y las lesiones observadas depende de la experiencia inmunológica de la granja ante la cepa implicada y la patogenicidad de esta.^{14,16}

1.3.3 Circovirus porcino tipo 2 (PCV-2)

Pertenece al género *Circovirus* dentro de la familia *Circoviridae*, es responsable de las llamadas “enfermedades asociadas a *circovirus* porcino” o PCVD por sus siglas en inglés,²⁰ entre las que se encuentran el síndrome multisistémico post destete, el síndrome de dermatitis y nefropatía porcino, fallas reproductivas, enteritis granulomatosa, epidermitis exudativa, linfadenitis necrotizante, temores congénitos y como parte del Complejo Respiratorio Porcino (CRP).²¹

Las partículas virales son muy pequeñas, de alrededor de 20-25 nm de diámetro, lo que lo coloca como el virus conocido más pequeño que es capaz de replicarse de manera autónoma

en mamíferos.²² Es un virus no envuelto cuyo genoma consta de una cadena sencilla de DNA en disposición circular con alrededor de 1.8 kb. Se considera que todas las cepas secuenciadas alrededor del mundo pertenecen a un mismo grupo con una homología genética de más del 93%.²¹

Debido a que el reducido genoma del virus no codifica enzimas propias para la replicación del virus como las polimerasas, este tiene tropismo por células de rápida multiplicación; en vida prenatal, de los días 40 al 70, es capaz de replicarse en cardiomiocitos, hepatocitos y en macrófagos, en la etapa fetal disminuyen sus posibles células blanco. En la vida postnatal, en cerdos de cualquier edad, es capaz de infectar principalmente linfoblastos y macrófagos; a mayor número de linfoblastos en un organismo, mayor es la replicación del virus.²³

La adhesión del virus a las células blanco se da por medio de glucosaminoglucanos como el heparán sulfato y condroitin sulfato, los cuales forman parte de glicoproteínas en la superficie celular. Regiones con residuos expuestos de lisina y arginina en la cápside viral parecen ser los responsables de la adhesión con las moléculas mencionadas en la superficie celular.²³

El mecanismo de internalización del virus en sus células blanco esta dilucidado solo parcialmente; se sabe que es por medio de endocitosis dependiente de clatrina y que es un proceso muy ineficiente (solo logra entrar al 50% de las células con las que establece contacto) y lento. La salida de las partículas virales de los endosomas al citoplasma es dependiente de cambios en el pH, sin embargo, se ha observado que a pesar de lograr entrar en células de la línea fagocítico-mononuclear, no existe replicación dentro de estas.^{22,23}

El conocimiento del papel del *PCV-2* en el desarrollo de los diferentes síndromes en los que está involucrado ha cambiado en los últimos años; de inicio se consideró que la coinfección generada por otros agentes generaba inmunosupresión que facilitaba los mecanismos de patogenia del virus,²⁰ sin embargo, estudios recientes han encontrado que la

inmunoestimulación por parte de otros agentes o, incluso, la inoculación de sustancias en un animal crónicamente infectado y asintomático, genera la aparición de signos clínicos y lesiones características, además de aumento de títulos de anticuerpos contra el virus. Esto ha llevado a pensar que debido a la dependencia del virus de enzimas que participan en la replicación celular como las DNA polimerasas, la multiplicación de precursores de células linfáticas (principal célula en la cual el virus es capaz de entrar y replicarse) provocada por la inmunoestimulación promueve la replicación del agente.²²

La replicación del virus en sus células blanco tiene efecto citopático sobre estas, sin embargo, la expresión de los signos clínicos y la afectación a los parámetros productivos parece estar dada en mayor medida por la respuesta inmune hacia el virus, la cual genera daños a células adyacentes y secreción excesiva y sostenida de citocinas proinflamatorias, lo cual lleva al animal a un estado catabólico prolongado que puede explicar, al menos, los signos resultantes del PMWS.^{22,24}

PCV-2 ha sido detectado por medio de PCR en prácticamente todas las excreciones y secreciones, y la vía de entrada más probable es la oronasal. Las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad son resultado de la interacción de múltiples factores y la presencia de *PCV-2* resulta un factor para la expresión de la totalidad de los signos clínicos.

La enfermedad se considera ubicua, la prevalencia puede ser muy alta y no ser detectada a nivel clínico debido a la presentación subclínica persistente.²⁰

1.3.4 Agentes bacterianos primarios del CRP

Además de los agentes virales primarios del CRP, existen agentes bacterianos cuya infección debilita los mecanismos de inmunidad innata conforme a las interacciones mencionadas anteriormente y otros que funcionan como agentes complicantes. Debido a la alta prevalencia

y la influencia que tienen sobre la presentación de lesiones y de la enfermedad clínica, son mencionadas de manera breve a continuación.

Mycoplasma hyopneumoniae. Es el agente bacteriano primario causal de la Neumonía Enzoótica del cerdo, es considerado el agente respiratorio que provoca las mayores pérdidas económicas en la producción porcina debido a su alta prevalencia y por el papel principal que juega en la presentación del complejo respiratorio porcino.²⁵

M. hyopneumoniae se adhiere a los cilios de las células del epitelio respiratorio, provocando ciliostasis y pérdida de estos, así como desprendimiento de células epiteliales y caliciformes. La colonización de las vías respiratorias compromete seriamente la función del aparato mucociliar para limpiar las vías aéreas de partículas y patógenos potenciales, especialmente bacterias, además, la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-8 y TNF- α por parte de los macrófagos en respuesta a la infección genera daño tisular, lo cual afecta aún más a los mecanismos de inmunidad innata.

Actinobacillus pleuroneumoniae. Este agente es el causante de la Pleurobronconeumonía contagiosa del cerdo, enfermedad presente en prácticamente todos los países productores de cerdo. Ocasiona lesiones tan severas que llevan a la muerte del animal o a la afectación permanente de la función respiratoria incluso de animales recuperados.^{26,27}

Es un cocobacilo Gram negativo que cuenta con los siguientes factores de virulencia: fimbrias y adhesinas que permiten que la bacteria se adhiera a células endoteliales y alveolares, y citotoxinas como APx que provocan necrosis en neutrófilos, macrófagos, células epiteliales y endoteliales, provocando la extravasación de los elementos sanguíneos y trombosis, además de afectar la función de macrófagos alveolares y de la carpeta mucociliar.²⁶

1.3.5 Agentes bacterianos secundarios del CRP

Se considera que los agentes secundarios son agravantes de la enfermedad respiratoria y generan lesiones de tipo supurativo sobre todo en lóbulos craneoventrales que dificultan el diagnóstico histopatológico de los agentes primarios,²⁷ además de estas lesiones generales, en lo particular *Haemophilus parasuis* genera la enfermedad de Glässer, que consiste en poliserositis que en pulmones se manifiesta como pleuritis fibrinosa,^{28,11} mientras que dentro del género *Streptococcus* la especie *suis* provoca además meningitis y septicemia.^{11,27}

1.4 Diagnóstico de los agentes del CRP

Debido a los múltiples agentes que pueden estar interactuando en la enfermedad respiratoria, el diagnóstico etiológico de estas en la producción porcina es desafiante y se basa en una combinación de historia clínica, registros productivos, análisis de laboratorio y estudios post mortem, tanto en necropsias como en revisiones en rastro.³

Los datos clínicos y productivos son indicativos de la presencia y severidad de enfermedad respiratoria en la población, sin embargo, la inespecificidad de los signos provee poca información sobre los agentes participantes. Por su parte, los análisis de laboratorio (serología, PCR, RT-PCR) y el aislamiento microbiológico proveen evidencia inequívoca de la presencia del agente en el organismo, aunque no necesariamente de la participación de este en la enfermedad respiratoria. Un ejemplo del caso anterior se da con dos de los agentes virales objeto de este trabajo, *PRRSV* y *PCV-2*, los cuales pueden afectar otros aparatos aparte del respiratorio y además estar presentes de manera crónica en una población, de esta manera pueden ser detectados por medio de serología o incluso ser aislados pero no se tiene la certeza de su participación en el proceso mórbido respiratorio.²⁹

Los estudios post-mortem, por su parte, permiten observar los cambios tisulares de la enfermedad respiratoria a nivel macroscópico y microscópico y contrastarlas con lo descrito en la literatura para sugerir la participación de uno u otro agente.³⁰

El método diagnóstico basado en la observación de las lesiones microscópicas es llamado histopatología (**HP**) y provee evidencia sugerente del efecto de algún agente sobre el tejido, sin embargo, la confirmación de la presencia de este directamente sobre el tejido asociado a dicho daño, es lo que permite llegar al diagnóstico definitivo. Esta última evidencia es provista por técnicas como la inmunohistoquímica (**IHQ**), que permite establecer la localización tisular e incluso celular de uno o varios antígenos de un agente en específico.¹

Ambas técnicas, la **HP** y la **IHQ**, las cuales son herramientas ampliamente utilizadas en el campo de la Anatomía Patológica, son explicadas en los siguientes apartados junto con sus ventajas y limitaciones, así como los elementos requeridos para establecer un diagnóstico para los tres agentes virales objeto de este trabajo.

1.4.1 Histopatología (HP)

Consiste en la revisión sistemática y ordenada por medio de microscopía óptica de cortes de tejido procesados mediante la técnica histológica para buscar cambios morfológicos (lesiones) e incluso observar el agente responsable de estos.³¹

Las muestras para llevar a cabo esta técnica son obtenidas de animales muertos (necropsia) y fijadas en formaldehído al 10%, para después pasar por el procesamiento histológico el cual consiste en enjuague del fijador, deshidratado, aclarado, impregnación e inclusión en bloques de parafina.³² Del bloque se obtiene un corte de 5 micrómetros con micrótopo, el cual es desparafinado y montado en una laminilla y teñido en forma rutinaria con Hematoxilina y Eosina (**H y E**). La hematoxilina es una base que tiñe de manera preferencial los ácidos de la célula de azul, debido a que la mayoría de los componentes ácidos de la

célula son DNA y RNA, el núcleo y las regiones del citoplasma ricas en ribosomas se tiñen de azul oscuro; por su parte, la Eosina es un ácido que tiñe los componentes básicos de la célula de rosa, y en virtud de que la mayoría de los componentes del citoplasma tienen pH básico, la mayor parte de este se tiñe de una tonalidad rosada.

El contraste que se obtiene con **H y E** hace de esta tinción la mejor para histopatología rutinaria, la cual consiste en la identificación de cambios en la estructura normal de los tejidos (lesiones), en este caso los pulmones.³³ Estas lesiones funcionan como evidencias para establecer la naturaleza o causa de la enfermedad, y en el caso de las enfermedades infecciosas, llegar incluso a identificar el agente.

En el caso de las enfermedades virales, se pueden observar cambios morfológicos celulares causados por el ciclo de replicación del virus, así como la respuesta inmune asociada a la infección, e incluso la formación de cuerpos de inclusión. Las lesiones a nivel celular y tisular que permiten sugerir la infección por *SIV*, *PRRSV* y *PCV-2* están caracterizadas en la literatura y se mencionan a continuación.

1.4.1.1 Lesiones características de SIV, PRRSV y PCV-2.

PCV-2 y *PRRSV*, dos de los agentes objeto de este trabajo, generan lesiones en varios órganos y sistemas, y solo *SIV* se encuentra mayormente restringido al aparato respiratorio¹³, sin embargo, debido al enfoque de este trabajo sobre el diagnóstico de CRP, se enlistarán solo las lesiones microscópicas en pulmones.

SIV. Existen numerosos estudios que relacionan la patogenia con las lesiones histopatológicas en los pulmones de cerdos infectados de manera experimental y en casos de campo, los cuales determinan que la lesión microscópica característica es bronquitis y bronquiolitis necrótica en fases tempranas (24-48 horas PI), aplanamiento del epitelio (48-72 horas PI), hiperplasia de epitelio columnar de bronquios y bronquiolos (72 h PI).¹³ En vías

aéreas severamente dañadas, la proliferación de fibroblastos de la lámina propia expuesta genera formación de pólipos y bronquiolitis obliterante.¹³ Además del daño al epitelio respiratorio, de manera simultánea ocurren cambios en los alvéolos; las paredes alveolares cercanas a los bronquios y bronquiolos se observan engrosadas por congestión y edema, los neumocitos tipo I y II se hinchan y se observa un ligero infiltrado polimorfonuclear (24 horas PI), el cual se vuelve predominantemente mononuclear, conformado sobre todo por macrófagos y restos de neumocitos hinchados (48 horas PI). Si la infección cede, al cabo de unas dos semanas PI se observa la recuperación del epitelio bronquial y solo se observa infiltrado linfocítico peribronquiolar.^{13,11}

PRRSV. Las lesiones histológicas que se observan en los pulmones son engrosamiento de los septos alveolares por infiltrado formado por linfocitos y macrófagos. En la luz alveolar se observa infiltrado formado por linfocitos, macrófagos, y escasos neutrófilos, además de células epiteliales degeneradas y necróticas.¹¹ Se observa hiperplasia de neumocitos tipo II y el epitelio bronquiolar no está afectado. Se observa infiltrado linfoplasmocítico e histiocítico con localización perivascular y en algunos casos se presenta necrosis endotelial.

En los linfonodos, tonsilas y bazo, se observan hiperplasia folicular paracortical y apoptosis de linfocitos, también se pueden llegar a observar células multinucleadas.^{11,27}

PCV-2. Las lesiones pulmonares microscópicas de la infección por Circovirus porcino tipo 2 corresponden a engrosamiento de los septos alveolares por abundante cantidad de macrófagos, células epitelioides y células multinucleadas, con ligera cantidad de linfocitos, acompañada de hiperplasia de neumocitos tipo II; el infiltrado histiocítico y linfocítico se agrega también alrededor de vasos sanguíneos y bronquiolos. En los linfonodos, placas de Peyer y el bazo se observa despoblación linfoide, con aumento en el número de macrófagos en los folículos y formación de células gigantes multinucleadas, se observan cuerpos de

inclusión basofílicos múltiples en el citoplasma de los macrófagos, dichos cuerpos de inclusión son llamados botrioides y asemejan racimos de uvas, dichas inclusiones son rara vez vistas en células epiteliales bronquiales y renales.^{11,27}

1.4.1.2 Limitaciones de la histopatología

Muchas de las lesiones mencionadas para cada agente en el apartado anterior han sido descritas, en su mayoría, a partir de estudios individuales sobre la patogenia de cada agente, es decir, representan las lesiones de cada uno de ellos actuando de manera individual, muchas veces bajo condiciones experimentales.

Los diferentes tipos de interacciones en casos de campo de CRP (**sección 1.3**) generan lesiones más complejas que dificultan el establecimiento del diagnóstico etiológico por histopatología, además, existen pocos estudios sobre los cambios tisulares generados por los agentes en conjunto.¹²

Debido a lo anterior, la histopatología se vale de técnicas complementarias que permiten detectar moléculas específicas a grupos de agentes o a alguno de estos en particular, una de las técnicas más utilizadas y viables es la IHQ.

1.4.2 Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica es una técnica utilizada para localizar antígenos específicos en secciones de tejido obtenidas mediante la técnica histológica de rutina,³² basado en la interacción antígeno anticuerpo. Los anticuerpos específicos contra el antígeno de interés son visualizados por medio de una señal de color, comúnmente generada por la acción de una enzima sobre un cromógeno, lo que permite evaluar la prueba mediante microscopía óptica simple. La principal ventaja de los resultados de esta prueba cualitativa o semi-cuantitativa es que permite observar el contexto alrededor del antígeno buscado, es decir, los cambios

celulares o tisulares en los tejidos en los que se encuentre el antígeno, por lo cual resulta un excelente complemento a la histopatología.¹

Las muestras que se utilizan para IHQ siguen el mismo procedimiento que las utilizadas para histopatología hasta el montaje de las secciones de tejido en las laminillas, sin embargo, es importante considerar una condición: se recomienda que el tiempo de fijación en formol al 10% no sobrepase las 24 horas para no provocar una pérdida definitiva de los determinantes antigénicos en el tejido.¹

Una vez montado el tejido en la laminilla, el procedimiento es a grandes rasgos el siguiente:

- a) Recuperación antigénica: se utilizan enzimas o procedimientos físicos para habilitar los antígenos que hayan podido sufrir daño en el proceso de fijación.
- b) Bloqueo de enzimas endógenas: normalmente se busca bloquear las peroxidasas propias del tejido para que estas no interfieran con las reacciones posteriores que darán el color visible a la prueba.
- c) Aplicación de anticuerpo primario: Se emplea un anticuerpo contra el antígeno que se busca, este anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal.
- d) Aplicación de anticuerpo secundario: debe de ser específico contra el anticuerpo primario y lleva unida la enzima responsable de generar el color en el siguiente paso.
- e) Aplicación del cromógeno: se aplica una sustancia química la cual, al reaccionar con la enzima unida al anticuerpo secundario, cambia de color haciendo visible la ubicación de los complejos Antígeno-Anticuerpo primario-Anticuerpo secundario.
- f) Contratinción. Se utiliza hematoxilina (colorante básico) para visualizar los componentes de la célula y la arquitectura tisular.

El número de anticuerpos utilizados y el tipo de sistema de detección de la unión antígeno anticuerpo dan lugar a distintas variantes de este proceso, las cuales han sido utilizadas según han evolucionado a través del tiempo o por presentar ciertas particularidades.

La primera clasificación viene en función del número de anticuerpos utilizados: en la técnica conocida como **directa**, se utiliza solo el anticuerpo contra el antígeno buscado, y este ya se encuentra unido a la enzima que reaccionará con el cromógeno o a una partícula que marca directamente. Mientras que, en la técnica conocida como **indirecta**, posterior a la aplicación del anticuerpo primario se utiliza un anticuerpo secundario específico contra el primario, el cual ya se encuentra unido al antígeno, es este anticuerpo secundario el que tiene unida la enzima responsable de oxidar al cromógeno. (Fig. 5)



Fig. 5. IHQ directa e indirecta. (Petersen & Pedersen, 2013)

Dentro de la técnica **indirecta**, hay varios métodos de detección, entre los que se encuentran el sistema avidina-biotina, el método basado en polímeros (Envision TM), amplificación de señal catalizada y amplificación por fluoresceil tiramida.³⁴

En cuanto a los anticuerpos utilizados, los primarios pueden ser **monoclonales** o **policlinales**, los **monoclonales** son una solución que contiene anticuerpos dirigidos únicamente contra un epítipo, es decir, una molécula específica, estos son comúnmente fabricados en ratones a los cuales se les implanta un hibridoma creado a partir de una clona

de linfocitos que producen el anticuerpo contra la molécula buscada, el hibridoma se implanta en la cavidad peritoneal y los anticuerpos son obtenidos drenando el líquido de la cavidad.³⁴ La ventaja de un anticuerpo **monoclonal** es mayor especificidad, consistencia en los resultados y pureza de la solución, sin embargo, también pueden ser poco afines y con sensibilidad reducida, así como ver afectada su utilidad si el epítipo blanco tiene algún ligero cambio conformacional. Los anticuerpos **policlonales** son obtenidos generalmente por medio de técnicas de inmunización tradicionales llevadas a cabo en conejos, que consisten en inocular de manera repetida en el animal el agente para el cual se quieren producir los anticuerpos, para obtener de su suero la mezcla de anticuerpos que irán dirigidos no solo contra un epítipo, sino contra todos los determinantes antigénicos que existan en el agente. Los anticuerpos **policlonales** tienen la ventaja de mayor afinidad y sensibilidad debido a que tienen la capacidad de unirse con varios epítopes, lo cual permite disminuir los efectos negativos sobre los antígenos en procesos como la fijación y el resto del procesamiento, sin embargo, también pueden presentar reacción cruzada con otros agentes que no sean el que se busca o dar un marcaje menos claro y con mayor fondo.³⁴

1.4.2.1 Utilización de la inmunohistoquímica para el diagnóstico de *SIV*, *PCV-2* y *PRRSV*

La inmunohistoquímica está indicada como uno de los métodos diagnósticos para *SIV* y *PRRSV* según los manuales de procedimientos de ambas enfermedades, detallados en la lista de enfermedades de la OIE.^{35,36} Así mismo, se encuentran en el grupo 3 del acuerdo mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas de los animales, exóticas y endémicas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos. Además, está recomendada por la literatura^{3,24} para establecer la presencia de estos dos agentes y *PCV-2* en el caso de presentación de lesiones sugerentes de infección viral pulmonar.

En experimentos hechos con anticuerpos monoclonales contra la proteína de la cápside y otros hechos con anticuerpos policlonales, el antígeno viral de **PCV-2** ha sido encontrado en el citoplasma de macrófagos alveolares y en el citoplasma y núcleo de gran cantidad de células, entre las que se encuentran células endoteliales y otras células cercanas a los vasos sanguíneos como musculares lisas y leucocitos en la capa media, asociados a grados variables de daño en los vasos sanguíneos.^{22,37}

La localización de **PRRSV**, observada a partir de ensayos de IHQ con anticuerpos monoclonales contra la nucleocápside, se ha descrito en el citoplasma de macrófagos alveolares y ocasionalmente en células multinucleadas en los alvéolos, se observó marcaje también en células mononucleares en los septos engrosados y en neumocitos tipo II.^{38,17}

En cuanto a la distribución tisular de **SIV**, ensayos con anticuerpos monoclonales contra la nucleoproteína (**NP**) han arrojado que la localización del antígeno viral se encuentra en el citoplasma de las células epiteliales bronquiales y bronquiolares degeneradas por el efecto del virus, células de las glándulas bronquiales, macrófagos alveolares y en algunas células mononucleares del infiltrado adyacente.^{39,40,13}

1.5 Justificación

Se sabe que la histopatología como herramienta diagnóstica tiene varias limitaciones en la identificación de los agentes etiológicos virales del CRP, por lo cual es indispensable complementar los hallazgos histológicos con técnicas como la IHQ, sin embargo, no se han obtenido datos numéricos que apoyen la idea de la insuficiencia diagnóstica de la histopatología, así como de la utilidad y características de la IHQ para estos tres agentes. El presente es un estudio potente de 122 casos de campo diagnosticados por ambas técnicas que permitirá establecer de forma cuantitativa y con parámetros numéricos la certeza diagnóstica de la histopatología para el diagnóstico de **SIV**, **PCV-2** y **PRRSV** al compararla con la IHQ.

El conocimiento de estos parámetros permitirá sugerir o descartar la necesidad de utilizar la IHQ a pesar de representar un mayor gasto para el laboratorio de diagnóstico o el productor. Además, el estudio brindará elementos suficientes para convencer a los médicos y productores de la importancia de realizar el diagnóstico integral para orientar las medidas adecuadas para el control de los agentes participantes en cada caso.

2. HIPÓTESIS

Hipótesis nula: El diagnóstico etiológico viral de los 122 casos obtenido mediante histopatología coincidirá con el obtenido mediante inmunohistoquímica.

Hipótesis alterna: El diagnóstico etiológico viral de los 122 casos obtenido mediante histopatología no tendrá relación con el obtenido mediante inmunohistoquímica.

3. OBJETIVO GENERAL

-Determinar los agentes virales involucrados en 122 casos de neumonía porcina mediante histopatología e inmunohistoquímica y relacionar los hallazgos de ambas técnicas.

3.1 Objetivos específicos

1. Clasificar y gradificar histológicamente los casos de neumonía porcina.
2. Determinar los agentes virales involucrados en los casos de complejo respiratorio porcino mediante la identificación de lesiones microscópicas características.
3. Identificar los agentes virales involucrados en los casos de complejo respiratorio porcino mediante inmunohistoquímica indirecta y determinar su localización histológica.
4. Analizar estadísticamente la relación entre los resultados de ambas técnicas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio se utilizaron muestras de 122 aparatos respiratorios de cerdos con diagnóstico presuntivo de neumonía bacteriana remitidos al Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos de la FMVZ-UNAM. Dichas muestras fueron colectadas de enero de 2013 a enero de 2014. La edad, género, fin zootécnico, y otros datos relacionados con la ubicación y características de la explotación no se incluyen en este estudio, ya que en la mayor parte de los casos la información estaba incompleta.

4.1 y 4.2 Histopatología

Se colectaron muestras de cada uno de los lóbulos pulmonares de los 122 aparatos respiratorios las cuales fueron conservadas en formol al 10% y procesadas por las técnicas de rutina de inclusión en parafina y tinción con hematoxilina y eosina.^{41,32} Los cortes histológicos fueron evaluados mediante el uso de microscopia óptica de manera sistemática y ordenada, realizándose lo siguiente en concordancia con los objetivos específicos planteados:

1. Para determinar la severidad de la enfermedad respiratoria, se determinó el tipo de neumonía en cada caso (**Cuadro 1**) y se gradificó utilizando 5 campos escogidos de manera aleatoria en cada fragmento de tejido.

Cuadro 1. Criterios histológicos para designar el tipo de lesión histológica principal.

Clasificación histológica de las neumonías^{27,11}	
Neumonía intersticial	Septos alveolares engrosados por infiltrado inflamatorio polimorfonuclear (agudo) o mononuclear (crónico).
Bronconeumonía supurativa	Abundantes neutrófilos y neutrófilos degenerados en el espacio alveolar y vías terminales (bronquiolo respiratorio y bronquiolo terminal).

Pleuritis	Infiltrado inflamatorio en la serosa que recubre el pulmón, el cual puede ser polimorfonuclear, mononuclear, fibrinoso, hemorrágico o combinaciones de estas.
-----------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

2. Se registró la presencia o ausencia de lesiones en bronquios y bronquiolos, alvéolos y vasculatura, con especial énfasis en las lesiones mencionadas en el **Cuadro 2**, las cuales son exclusivas para cada uno de los agentes según la literatura y permitieron determinar la positividad o negatividad a *PCV-2*, *SIV* y *PRRSV* en cada uno de los casos mediante la técnica de histopatología.

Cuadro 2. Lesiones pulmonares utilizadas para asignar un caso positivo a cada uno de los agentes mediante histopatología.

Agente	Lesiones consideradas para determinar caso positivo	Referencia
PCV-2	Neumonía intersticial granulomatosa, Necrosis fibrinoide vascular. Cuerpos de inclusión botrioides en macrófagos y epitelio bronquial*.	42,11,43,37,27
SIV	Bronquitis y bronquiolitis necrótica, aplanamiento del epitelio. Displasia y/o hiperplasia epitelial.	13,11
PRRSV	Abundantes células necróticas en luz alveolar. Epitelio alveolar intacto.	27,11

*Los cuerpos de inclusión son raros, sobre todo en epitelio bronquial y bronquiolar; su presencia determinará un caso positivo para circovirus pero la ausencia no será determinante para descartar este agente.

4.3 Inmunohistoquímica

De los bloques de parafina de los 122 casos se realizaron cortes de 3 micrómetros de grosor, los cuales fueron montados en laminillas electrocargadas para inmunohistoquímica para la detección de *SIV*, *PCV-2* y *PRRSV*.

A continuación, se presenta de manera breve el procedimiento detallado en los **Anexos 1 al 3**; en los casos que no se especifique lo contrario, el procedimiento fue el mismo para los tres agentes:

Desparafinación e hidratación

Se desparafinaron los cortes por medio de calor y baños en concentraciones decrecientes de alcohol.

Recuperación antigénica

Se realizó la recuperación antigénica con calor (3 min potencia 5 en horno de microondas, inmersos en solución recuperadora y dentro de una olla de presión con agua hasta la marca indicada) para SIV y PRRSV y con proteasa al 0.5% durante 10 minutos a 37°C en cámara húmeda para PCV-2.

Bloqueo de peroxidasa endógena

El bloqueo se llevó a cabo con una solución de peróxido de hidrógeno y metanol en proporción 1:8 durante 30 min.

Bloqueo de proteínas endógenas

El bloqueo de inmunoglobulinas endógenas se realizó con una solución de leche svelty®:amortiguador, incubando a 37°C durante 30 min.

Anticuerpos primarios

Se realizó la incubación en un horno con anticuerpo primario (SIV: Anticuerpo monoclonal anti-nucleoproteína dilución 1:800; PRRSV: Anticuerpo Monoclonal anti-nucleocápside dilución 1:200 PCV-2: Anticuerpo policlonal dilución 1:500) durante toda la noche a 4°C.

Anticuerpo secundario

Para *SIV* y *PRRSV*, la unión antígeno anticuerpo-primario fue demostrada por medio de un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con un polímero marcado con peroxidasa del rábano (envision® Flex/HRP), mientras que para *PCV-2* se utilizó un anticuerpo secundario anti-IgG porcino conjugado con peroxidasa del rábano.

Revelado

Se utilizaron 50 µl de diaminobencidina (DAB) (1ml de sustrato buffer DM823 + 1 gota de DMB) sobre los tejidos. Para establecer el tiempo de revelado se evaluó el control positivo después de aplicar DAB y se estableció el tiempo en el momento que el marcaje era claramente apreciable (café ocre) y sin marcaje inespecífico (fondo). El resto de las laminillas se revelaron con ese tiempo.

Contratinción

Finalmente, los tejidos fueron teñidos con hematoxilina para brindar contraste y facilitar la evaluación microscópica.

Controles positivos

Para *SIV* y *PCV-2*, se utilizaron secciones de tejido de casos previos con positividad conocida, mientras que para *PRRSV*, se utilizaron secciones de tejido pulmonar provenientes de animales inoculados experimentalmente.

Controles negativos

Se utilizaron secciones de los mismos casos que los controles positivos, los cuales fueron cubiertos con solución amortiguadora (*PCV-2*: carbonatos; *SIV*: PBS; *PRRSV*:TRIS) en lugar de anticuerpo primario.

4.3.1 Evaluación

Para la evaluación de las laminillas procesadas se revisaron primero los controles positivos y negativos para dar validez a cada una de las corridas de la prueba, posteriormente se revisó de manera minuciosa cada una de las laminillas procesadas para los tres agentes en los 122 casos.

Se determinó un caso positivo cuando se observó marcaje café ocre granular intracelular que no estuviera rodeado por marcaje de fondo.

Se registró el marcaje observado por medio de fotomicroscopio.

4.4 Análisis estadístico

La relación entre las frecuencias de casos positivos y negativos obtenidos se estudió mediante la prueba de asociación Ji- cuadrada, esta prueba permitió establecer o descartar la independencia de los conjuntos de datos binomiales con la prueba utilizada para obtenerlos.

El primer paso fue calcular la utilidad de esta prueba tomando en cuenta indicadores calculados a partir de las características de la muestra utilizada, lo cual se muestra en el siguiente apartado:

4.4.1 Potencia de la prueba estadística

Se determinó un número de casos adecuado mediante el programa G-Power para saber si el tamaño de muestra utilizada en el presente estudio era suficiente para realizar una prueba fiable; el programa necesita la siguiente información para poder determinar el número de unidades de estudio a utilizar:

Familia de la distribución: Ji cuadrada

Estadístico de prueba: Tabla de contingencia

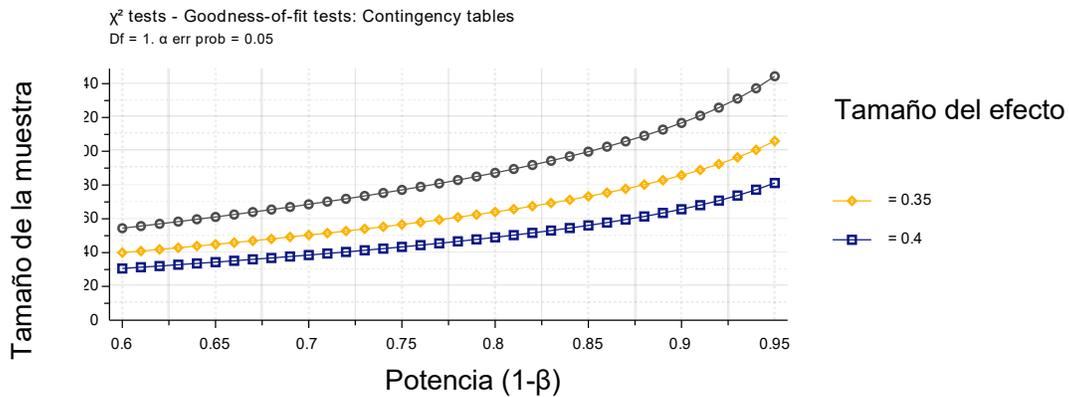
Valor de α : 0.05

Tamaño del efecto: 0.30

Grados de libertad: 1

Al no existir antecedentes en la revisión de literatura con datos estadísticos que permitan calcular el tamaño del efecto se consideró un valor bajo de 0.30 y se probaron dos tamaños de efecto más: 0.35 y 0.40, para determinar el número de casos necesarios para lograr una potencia de al menos 0.90.

Figura 6. Relación entre la potencia estadística y el número de réplicas del experimento planteado



En la **figura 6** se puede observar que con 120 réplicas en el estudio se obtiene una potencia estadística de 0.91 por lo cual se determinó que el tamaño de muestra utilizado (122) era adecuado. Para los valores exacto de tamaño de muestra consultar **anexo 4**

4.4.2 Análisis de los datos

Los datos obtenidos del presente estudio son de naturaleza binomial medidos en una escala nominal cualitativa con dos categorías mutuamente excluyentes: positivo y negativo para ambas pruebas.

Cada uno de los 122 casos funcionó como un ensayo de Bernoulli y el conjunto de estos resultó en un proceso, a partir del cual fue posible estimar parámetros para establecer una distribución binomial de probabilidad para cada una de las pruebas.

La prueba de Ji-cuadrada, realizada para identificar las diferencias entre las distribuciones obtenidas de ambas pruebas diagnósticas se obtuvo utilizando la **Fórmula 1** y también mediante el paquete estadístico R (entradas: **anexo 5**)

Fórmula 1: Ji-cuadrada

$$X^2 = \sum_i \frac{[(y_i) - E(y_i)]^2}{E(y_i)} + \sum_i \frac{[(n_i + y_i) - E(y_i)]^2}{E(n_i - y_i)} \quad (1)$$

Donde: y_i = valor observado, $E(y_i)$ = valor esperado; con una distribución Ji cuadrada con $(k - 1)$ grados de libertad, k es el número de categorías.

Para realizar la prueba de hipótesis, se compara el valor de Ji-cuadrada obtenido con el valor crítico de tablas de una prueba con significancia $\alpha = 0.05$ y 1 grado de libertad (2 categorías $k - 1$), el cual es de 7.879. Si el valor obtenido era mayor al de tablas, se determinó que existía suficiente evidencia para rechazar la hipótesis de nulidad o independencia.

El valor esperado $E(y_i)$ de positivos y negativos fue calculado a partir de la proporción obtenida mediante las fórmulas 2 y 3.

Fórmula 2: Proporción esperada de casos positivos (p_0):

$$p_0 = \frac{\sum y_1}{\sum n_1} \quad (2)$$

Donde:

y_1 = casos positivos obtenidos de ambas pruebas

n_1 = total de casos de las dos pruebas

Fórmula 3 Proporción esperada de casos negativos (q_o)

$$q_o = 1 - p_o \quad (3)$$

Con los datos ingresados al programa R se realizó otra prueba de asociación, la F de Fisher (Entradas: Anexo 5), además del odds ratio (razón de momios) para conocer la magnitud de la diferencia.

Finalmente, tomando a la inmunohistoquímica como prueba diagnóstica de referencia debido a que permite conocer con certeza la positividad y negatividad de cada caso y a que tiene una sensibilidad similar al aislamiento viral ³⁹ se obtuvieron los siguientes indicadores de la histopatología como método diagnóstico para los tres agentes.

Sensibilidad. Verdaderos positivos / (verdaderos positivos + falsos negativos) x 100

Especificidad. Verdaderos negativos / (verdaderos negativos + falsos positivos) x 100

VPP (valor predictivo positivo). Verdaderos positivos / (verdaderos positivos + falsos positivos) x 100.

VPN (valor predictivo negativo). Verdaderos negativos / (verdaderos negativos + falsos negativos) x 100.

En donde:

-Verdaderos positivos: Casos con lesiones características y positivos a la IHQ.

-Falsos negativos: Casos sin lesiones características pero positivos a la IHQ.

-Verdaderos negativos: Casos sin lesiones y negativos a la IHQ.

-Falsos positivos: Casos con lesiones características pero negativos a la IHQ.

5. RESULTADOS

5.1 Clasificación y gradificación histológica de los 122 casos de CRP

De acuerdo a los criterios establecidos en el cuadro 1, la mayoría de los casos (94%) presentaron neumonía intersticial predominantemente moderada, por su parte, la bronconeumonía se presentó en menos de la mitad de los casos, la mayoría de ellos de intensidad moderada. La pleuritis se presentó en 44% de los casos. **(Cuadro 3)**

Cuadro 3. Frecuencia de las lesiones principales en los 122 casos de CRP			
	Frecuencia (n=122)	Frecuencia relativa lesión principal (%)	Frecuencia relativa severidad/lesión principal
Neumonía intersticial	115	94	
Grave	25		23
Moderada	49		42
Leve	41		35
Bronconeumonía	45	37	
Grave	10		22
Moderada	19		42
Leve	16		35
Pleuritis	44	36	
Grave	8		18
Moderada	19		43
Leve	17		38

Como puede suponerse al observar el cuadro 3, existieron casos que presentaban más de una de las lesiones principales, de hecho, en cuanto a las dos lesiones observadas en el parénquima (neumonía intersticial y bronconeumonía), la neumonía intersticial se presentó sola en 70 casos (57%), y la lesión compuesta, conocida como bronconeumonía intersticial en 48 ocasiones (39%), por su parte, la bronconeumonía sola no se presentó en ningún caso. En cuanto a la pleuritis, de los 44 casos que presentaron esta lesión 24 fueron en conjunto con neumonía intersticial (20%) y 20 presentaron la pleuritis acompañada de

bronconeumonía y neumonía intersticial (16%), no se presentó en ningún caso como lesión simple.

5.2 Diagnóstico mediante histopatología

El número de casos en los que se encontraron las lesiones enumeradas en el **Cuadro 2.** se muestran en los siguientes apartados junto con sus imágenes representativas, el total de casos positivos para cada agente se muestra en el **Cuadro 7.**

SIV

El aumento en el número de células (hiperplasia) del epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado con células caliciformes fue el observado más frecuentemente (21.3%), seguido de bronquitis necrótica con el 16.3% de los casos; por su parte, el cambio de epitelio cilíndrico pseudoestratificado a cúbico simple (atenuación epitelio) se presentó en el 9% de los casos y el cambio de epitelio respiratorio hacia un tejido diferente y poco funcional (displasia) fue observada en el 5.7% de los casos. (**Cuadro 4, Fig. 7**)

PRRSV

La presencia de neumocitos tipo I descamados y tumefactos acompañados de restos celulares en los espacios alveolares, junto con macrófagos necróticos constituyeron las dos lesiones para identificar los casos positivos; ambas se encontraron juntas en el 20.4% de los casos. (**Cuadro 5, Fig.8**)

Cuadro 4
Frecuencia de casos con las lesiones utilizadas para determinar casos positivos de SIV

	Frecuencia (n=122)	%
Hiperplasia epitelial bronquial o bronquiolar	26	21.3
Bronquitis necrótica	20	16.3
Atenuación epitelial bronquial o bronquiolar	11	9
Displasia epitelial bronquial o bronquiolar	7	5.7

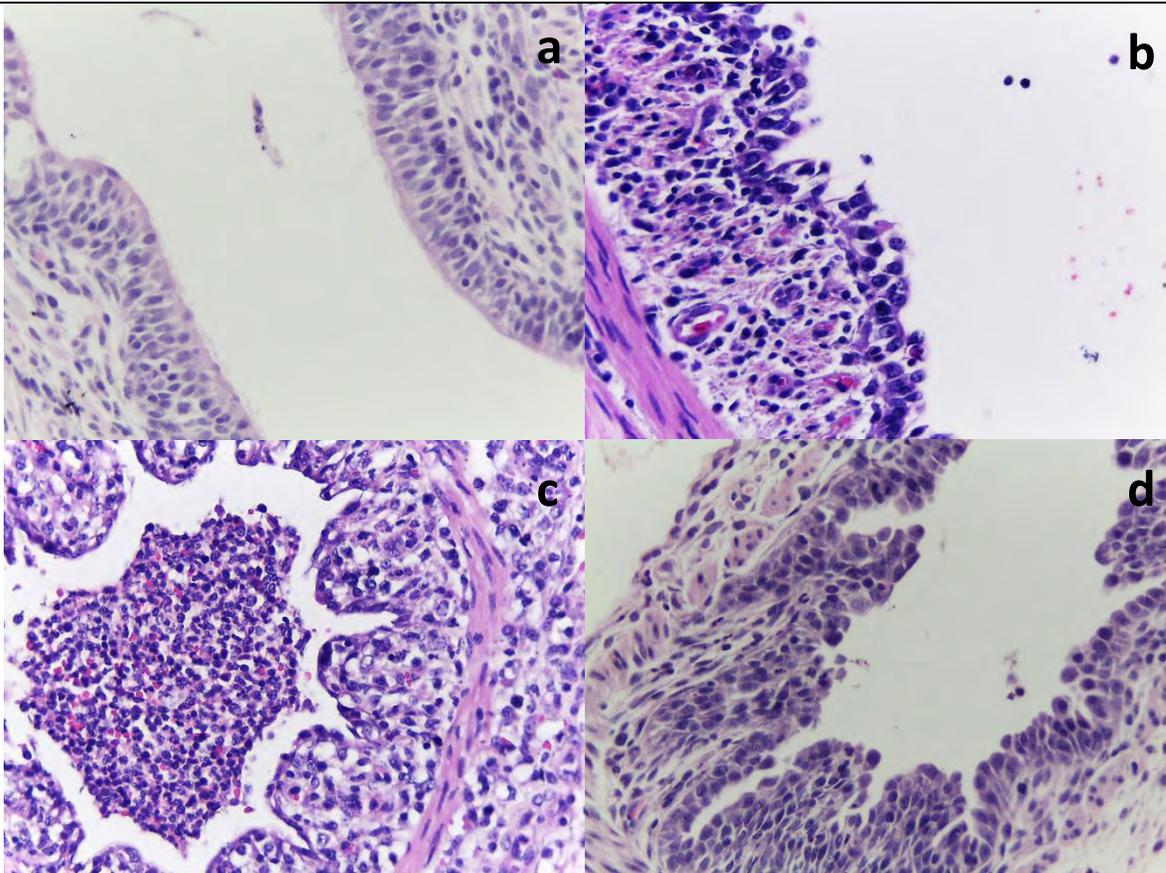


Figura 7. Pulmón H y E (40x). Lesiones características de SIV **a.** Hiperplasia epitelial **b.** Bronquitis necrótica. **c.** Atenuación epitelial. **d.** Displasia epitelial.

Cuadro 5
Frecuencia de casos con las lesiones utilizadas para determinar casos positivos de PRRSV

	Frecuencia (n=122)	%
Abundantes restos celulares en luz alveolar	25	20.4
Abundantes macrófagos alveolares necróticos	25	20.4

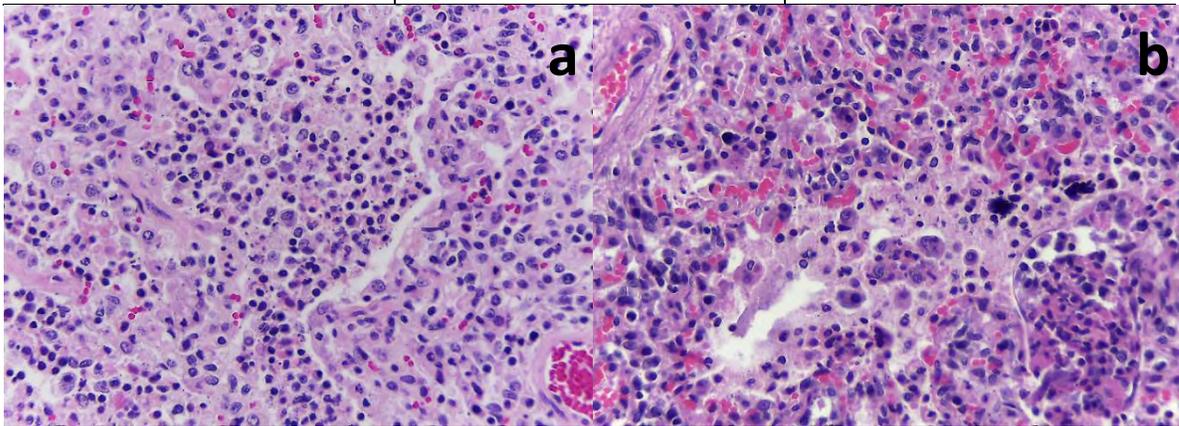


Figura 8. Pulmón H y E (40x) Lesiones características de PRRSV. **a.** Alveolitis histiocítica y linfocítica con restos celulares **b.** Alveolitis histiocítica con múltiples macrófagos necróticos.

PCV-2

La necrosis fibrinoide de vasos linfáticos y sanguíneos, presente sobre todo en vasos de poco calibre, fue observada en el 11.4% de los casos. Por su parte, la neumonía intersticial granulomatosa se presentó en el 3.2% de los casos. **(Cuadro 6, Fig. 9)**

Los cuerpos de inclusión botrioides en el citoplasma de células epiteliales o en macrófagos es una de las lesiones más representativas de la infección, sin embargo, no se observó en ninguno de los casos.

Cuadro 6
Frecuencia de casos con las lesiones utilizadas para determinar casos positivos de PCV2

	Frecuencia (n=122)	%
Necrosis fibrinoide	14	11.4
Neumonía intersticial granulomatosa	4	3.2
Cuerpos de inclusión en epitelio o macrófagos	0	0

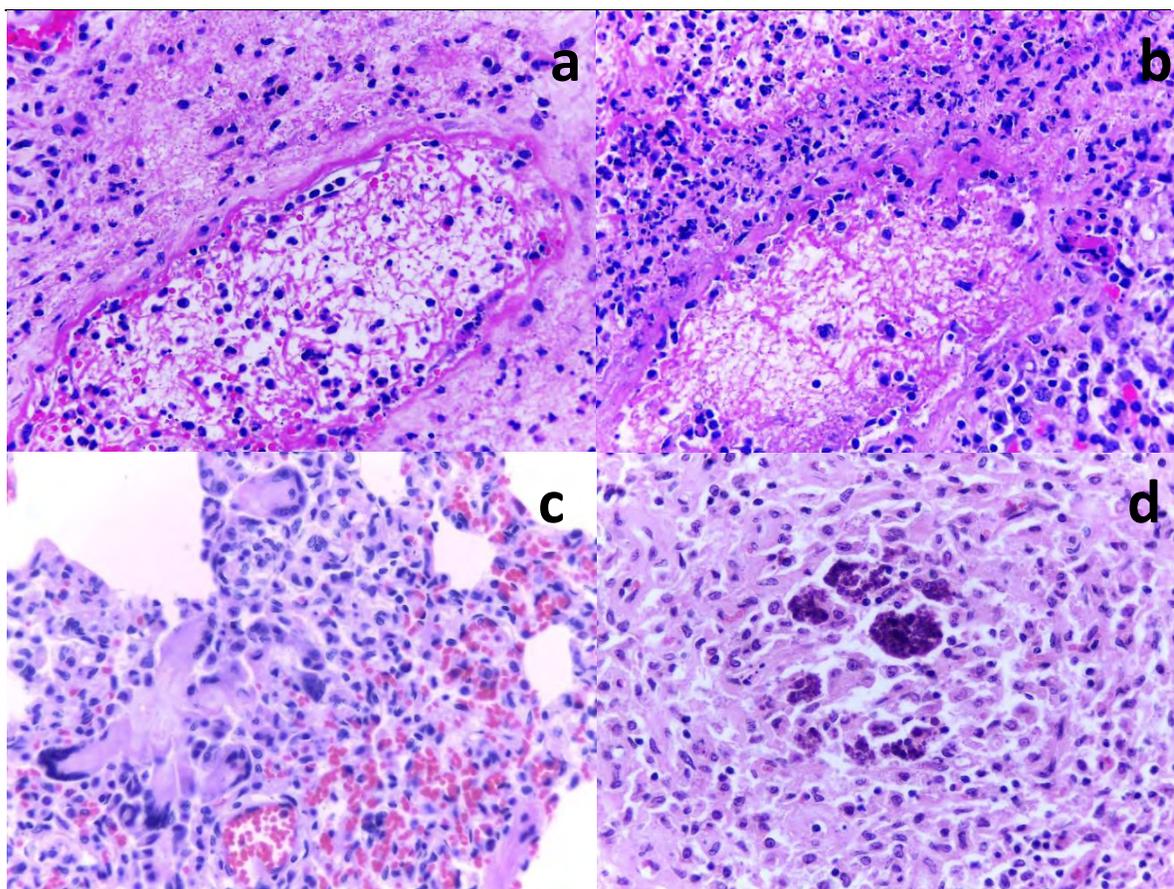


Figura 9. Pulmón H y E. (40x) a. Necrosis fibrinoide en vaso sanguíneo. **b.** Necrosis fibrinoide vaso linfático. **c.** Neumonía intersticial granulomatosa **d.** Cuerpos botrioides en Macrófagos. Linfonodo*. *No se observaron en los 122 casos estudiados, la imagen fue obtenida de un caso positivo por histopatología solo para ejemplificar la lesión.

5.3 Diagnóstico mediante inmunohistoquímica

El número de casos determinado por IHQ se muestra en el **cuadro 7** junto con el total de casos positivos obtenidos mediante histopatología.

Cuadro 7 Casos positivos determinados por Histopatología y por IHQ

	Histopatología	%	Inmunohistoquímica (IHQ)	%
SIV	34	27.8	119	97.5
PRRSV	27	22.1	99	81.1
PCV-2	14	11.4	36	29.5

La mayoría de los casos presentaron inmunopositividad para más de uno de los agentes, las diferentes combinaciones se muestran en el **cuadro 8**.

Cuadro 8. Frecuencia de las asociaciones entre SIV, PRRSV y PCV-2 en 122 pulmones de cerdo.

	Frecuencia n=120	Frecuencia relativa
SIV	14	11.6
SIV+PRRSV	68	56.6
SIV+PCV2	8	6.6
SIV+PRRSV+PCV2	27	22.5
PRRSV	2	1.6
PRRSV+PCV2	1	0.8
PCV2	0	0
Negativo a los tres	0	0
Total	120*	1

*2 casos no fueron evaluados mediante IHQ para PCV2 y no fueron incluidos en este conteo.

5.3.1 Localización de los antígenos

SIV

La inmunopositividad fue abundante y clara en fibroblastos de los septos interlobulillares y perivascular, neumocitos, células endoteliales y macrófagos alveolares. (**Fig. 10**)

PCV-2

La inmunopositividad fue localizada en el citoplasma de células epiteliales bronquiolares y glandulares en la submucosa de los bronquios, en neumocitos en los septos y descamados,

asi como en restos celulares en los espacios alveolares y en el núcleo y citoplasma de linfocitos en el tejido linfoide asociado a bronquios. **(Fig. 11)**

PRRSV

La inmunopositividad fue clara en el citoplasma de células epiteliales bronquiales y bronquiolares, en el epitelio de las glándulas submucosas de bronquios, y con menor frecuencia en el citoplasma de macrófagos alveolares moderadamente degenerados y en neumocitos. **(Fig.12)**

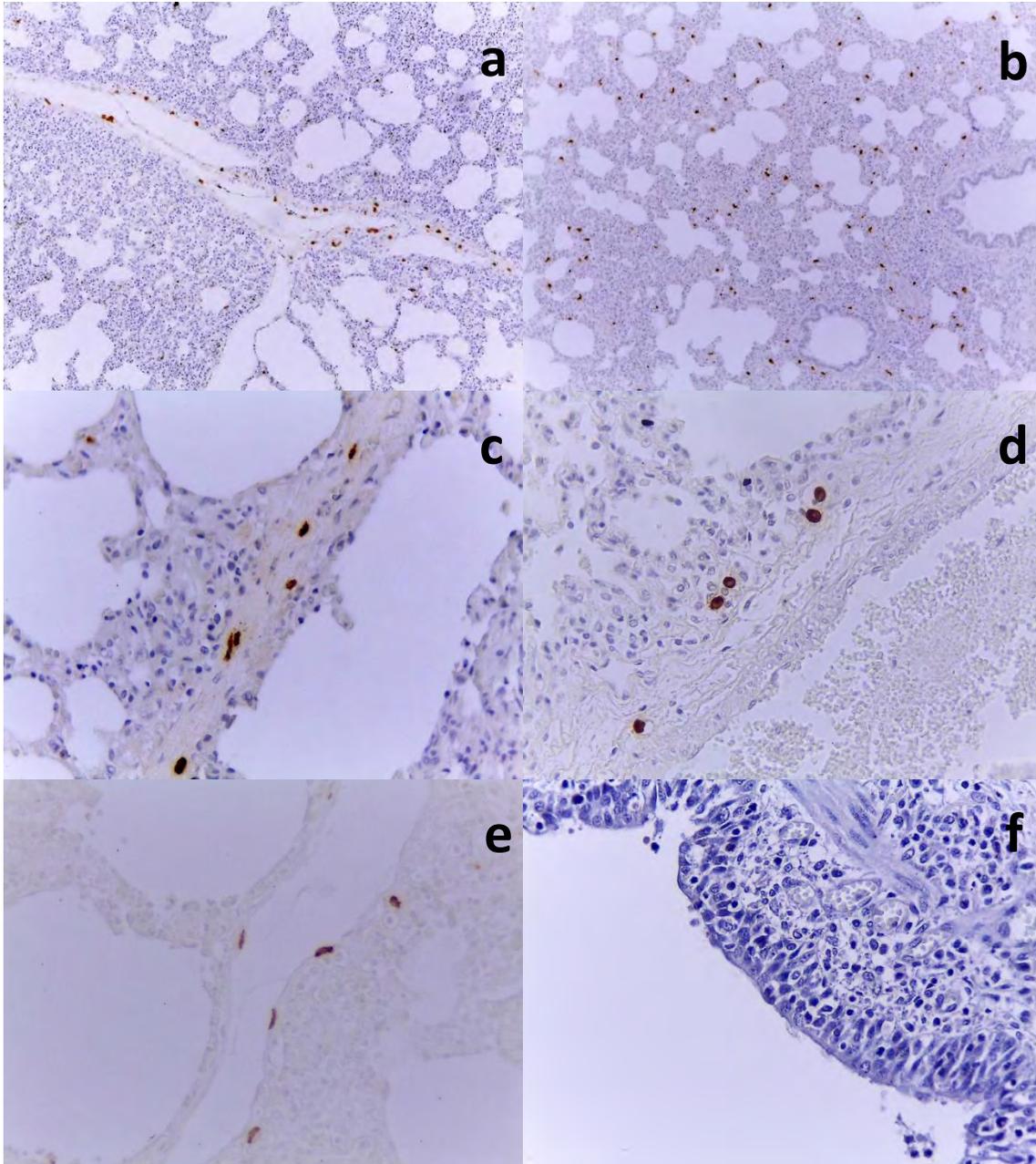


Figura 10. Pulmón. Inmunopositividad para nucleoproteína de SIV.a) Marcaje claro en estroma alrededor de vasos linfáticos. 10x b) Septos alveolares engrosados.10x c) fibroblastos en el septo interlobulillar.40x d) Neumocitos.40x e) células endoteliales de vasos linfáticos. 40x f) Epitelio hiperplásico inmunonegativo.40x (IHQ Método indirecto con anticuerpo primario monoclonal y polímero envision flex TM, cromógeno DAB, contratinción con Hematoxilina.)

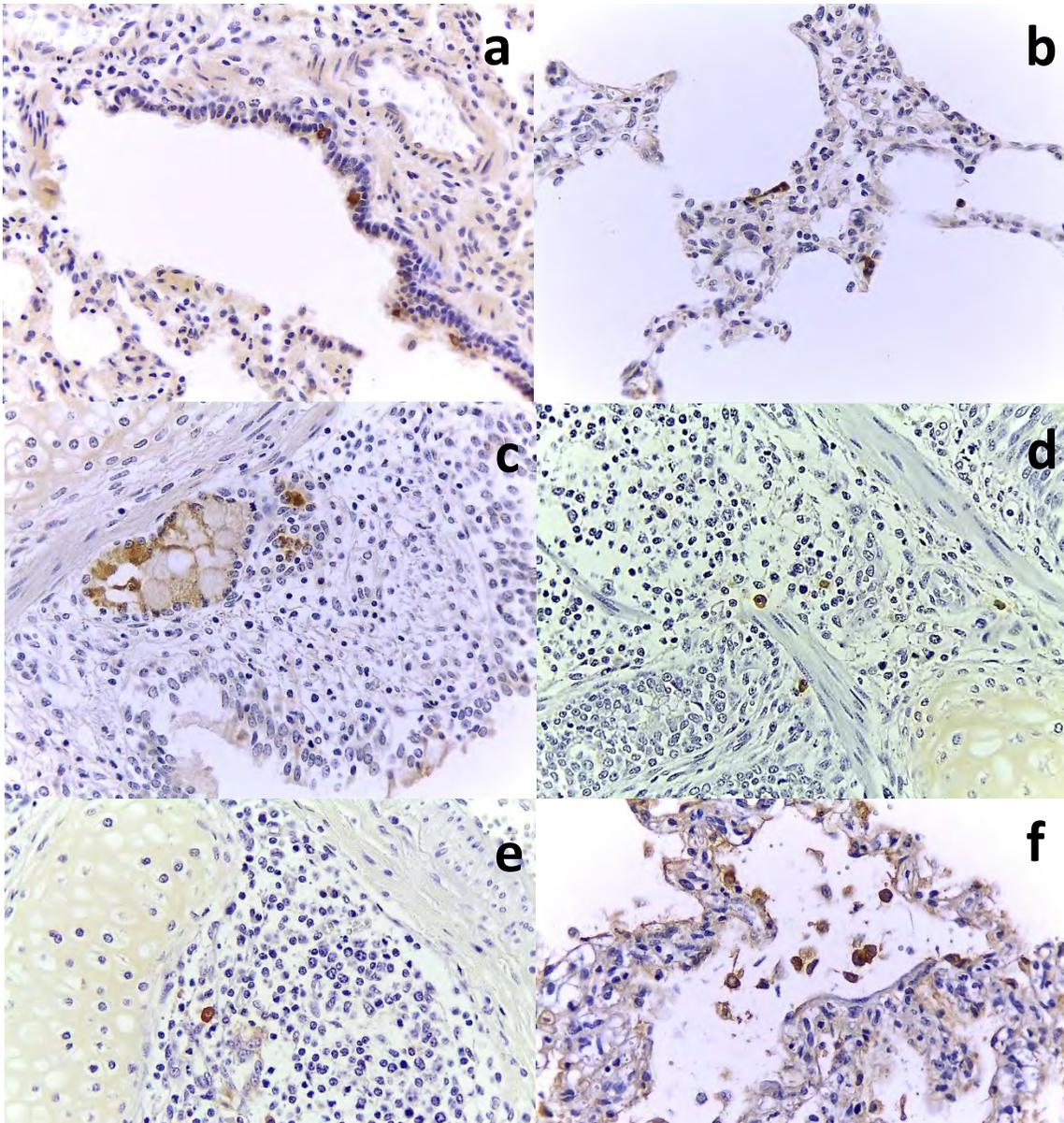


Figura 11. Pulmon 40x. Inmunopositividad para antígenos de PCV-2. a) Células epiteliales bronquiales. b) Neumocitos tipo I c) Glándula submucosa bronquial y células mononucleares adyacentes. d) Células dispersas en infiltrado inflamatorio peribronquial. e) Células linfoides del tejido linfoide asociado a bronquios (BALT). f) Neumocitos descamados en la luz alveolar. (IHQ método indirecto con anticuerpo primario policlonal y anticuerpo secundario conjugado con HRP, cromógeno DAB, contratinción con hematoxilina)

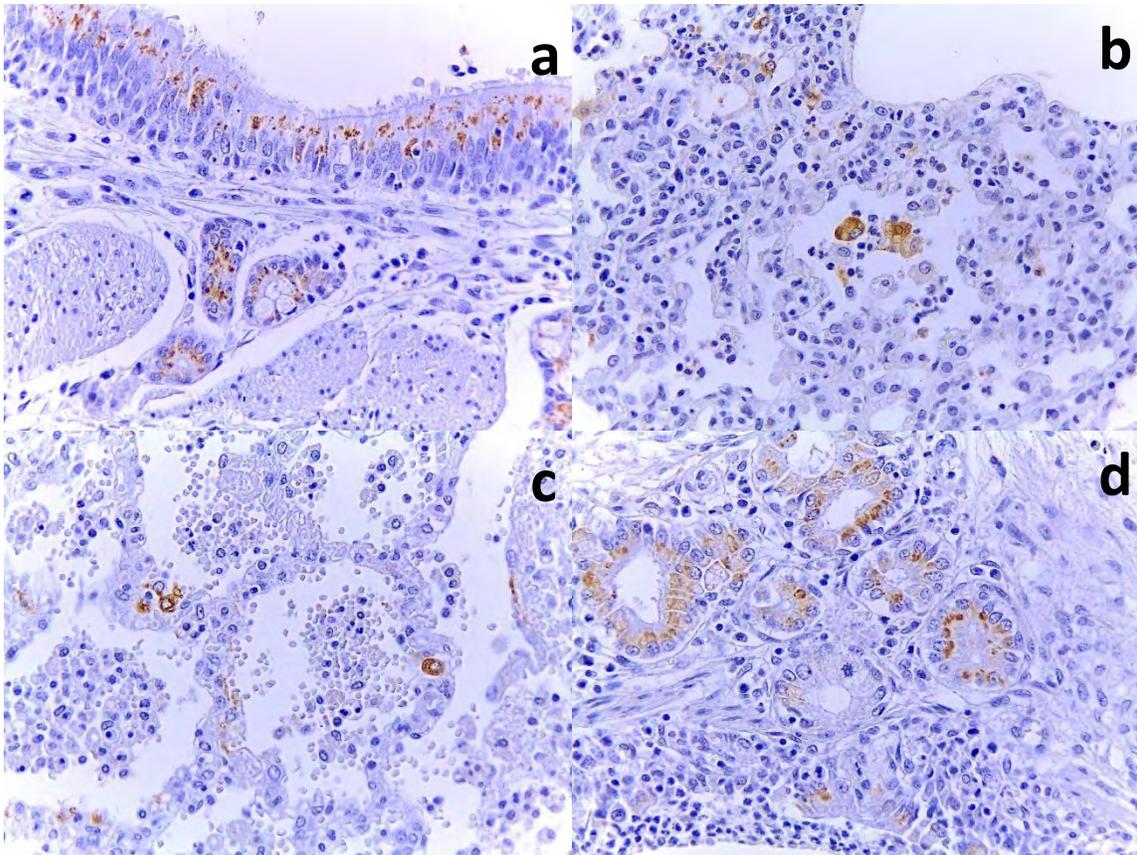


Figura 12. Pulmón 40x. Inmunoposividad para proteína de nucleocápside de PRRSV. a) Epitelio bronquial y glándulas submucosas bronquiales b) Neumocitos y macrófagos alveolares. c) Neumocitos. d) Porción apical de células epiteliales de glándulas submucosas bronquiales. (IHQ. Método indirecto con anticuerpo primario monoclonal y polímero envision Flex™, cromógeno DAB, contraindicación con hematoxilina)

5.4 Análisis estadístico

Con el objetivo de evaluar si existía independencia de los resultados con la prueba utilizada se llevó a cabo una prueba de Ji cuadrada a partir de los datos escritos en las tablas de contingencia (**Cuadros 9,10, 11**) utilizando las fórmulas 1,2 y 3 para los tres agentes.

SIV

Proporción esperada de casos positivos (Fórmula 2)

$$p_o = \frac{34 + 119}{122 + 122} = \frac{153}{244} = 0.62$$

Proporción esperada de casos negativos (Fórmula 3)

$$q_o = 1 - 0.62$$

$$q_o = 0.38$$

Cuadro 9. Tabla de contingencia SIV

Prueba	Número de animales			Esperados	
	Positiva	Negativa	Total	Positivas	Negativas
Histopatología	34	88	122	(0.62)(122)=75.64	(0.38)(122)=46.36
IHQ	119	3	122	(0.62)(122)=75.64	(0.38)(122)=46.36

Ji- cuadrada (Fórmula 1)

$$X^2 = \sum_i \frac{[34 - 75.64]^2}{75.64} + \frac{[119 - 75.64]^2}{75.64} + \frac{[88 - 46.36]^2}{46.36} + \frac{[3 - 46.36]^2}{46.36}$$

$$X^2 = 22.9229 + 25.0625 + 37.4 + 40.5 = 125.88$$

Debido a que nuestro valor de Ji-cuadrada es mayor al de tablas con $(2-1)=1$ grados de libertad y una significancia de $\alpha=0.05$ se rechaza la hipótesis de independencia, lo que significa que la proporción de casos positivos y negativos es dependiente de la prueba utilizada para el diagnóstico de SIV.

PRRSV

Proporción esperada de casos positivos (Fórmula 2)

$$p_o = \frac{27 + 99}{122 + 122} = \frac{126}{244} = 0.51$$

Proporción esperada de casos negativos (Fórmula 3)

$$q_o = 1 - 0.51$$

$$q_o = 0.49$$

Cuadro 10. Tabla de contingencia PRRSV

Prueba	Número de animales			Esperados	
	Positiva	Negativa	Total	Positivas	Negativas
Histopatología	27	95	122	(0.51)(122)=62.22	(0.49)(122)=59.78
IHQ	99	23	122	(0.51)(122)=62.22	(0.49)(122)=59.78

Ji-cuadrada (Fórmula 1)

$$X^2 = \frac{[27 - 62.22]^2}{62.22} + \frac{[99 - 62.22]^2}{62.22} + \frac{[95 - 59.78]^2}{59.78} + \frac{[23 - 59.78]^2}{59.78}$$

$$X^2 = 19.93 + 21.74 + 20.75 + 22.62 = 85.04$$

El valor de tablas de Ji-cuadrada es 7.879 y al igual que en el caso anterior, se rechaza la hipótesis de independencia, lo que indica que el número de casos positivos y negativos es dependiente de la prueba utilizada.

PCV-2

Proporción esperada de casos positivos (Fórmula 2)

$$p_o = \frac{14 + 36}{122 + 122} = \frac{50}{244} = 0.20$$

Proporción esperada de casos negativos (Fórmula 3)

$$q_o = 1 - 0.20$$

$$q_o = 0.80$$

Cuadro 11. Tabla de contingencia PCV-2

Prueba	Número de animales			Esperados	
	Positiva	Negativa	Total	Positivas	Negativas
Histopatología	14	108	122	(0.20)(122)=24.4	(0.80)(122)=97.6
IHQ	36	86	122	(0.20)(122)=24.4	(0.80)(122)=97.6

Ji-cuadrada (Fórmula 1)

$$X^2 = \frac{[14 - 24.4]^2}{24.4} + \frac{[36 - 24.4]^2}{24.4} + \frac{[108 - 97.6]^2}{97.6} + \frac{[86 - 97.6]^2}{97.6}$$

$$X^2 = 4.43 + 5.51 + 1.10 + 1.37 = 12.41$$

Para PCV-2, los resultados son también dependientes de la prueba utilizada, debido a que la Ji-cuadrada calculada es mayor que la Ji-cuadrada de tablas con $(2-1)=1$ grados de libertad y una significancia de $\alpha=0.05$.

En el cuadro 12, se observa que los resultados de la Ji-cuadrada obtenidos con el programa R son muy similares a los calculados manualmente, además se muestran los resultados de una prueba de asociación adicional (F de Fisher) y del “Odds Ratio”.

Cuadro 12. Resultados de Ji-cuadrada, F de Fisher y Odds Ratio, obtenidos por medio del programa R studio.

	SIV		PRRSV		PCV-2	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
Histopatología	34	88	27	95	14	108
Inmunohistoquímica	119	3	99	23	36	86
Ji-cuadrada	126.61		85.07		12.17	
Valor de P	0.001		0.001		0.005	
Odds ratio	102.66		15.14		3.22	
Prueba de Fisher	0.001		0.001		0.001	

El Odds Ratio da magnitud a la diferencia entre ambos métodos diagnósticos, así, para SIV, es 102 veces más probable encontrar un caso positivo por medio de IHQ, para PRRSV es 15 veces más probable y para PCV-2 3 veces. Tomando como prueba diagnóstica de referencia la IHQ se llevó a cabo el cálculo de 4 indicadores de la histopatología mostrados en el cuadro 13.

Cuadro 13 . Indicadores de la histopatología como prueba diagnóstica para los tres agentes.

Histopatología	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
SIV	34/119 (29%)	3/3 (100%)	34/34 (100%)	3/88 (3.4%)
PRRSV	22/99 (22%)	17/23 (74%)	22/28 (78%)	17/94 (18%)
PCV-2	5/40 (12%)	73/82 (89%)	5/14 (36%)	73/108 (68%)

6. DISCUSIÓN

Las lesiones histológicas características de infección por SIV, PRRSV y PCV-2 han sido descritas en la literatura reciente y en los textos de referencia en patología y son el marco de referencia para sugerir la infección por estos agentes virales, sin embargo, en la práctica de la patología diagnóstica veterinaria, comúnmente se dificulta la identificación de estas lesiones en el tejido pulmonar. Esta dificultad se ha evidenciado en estudios hechos en casos de campo, en los cuales se pretendían identificar lesiones de agentes parte del CRP diagnosticados mediante PCR^{12,44} y no se encontró asociación entre los patógenos encontrados y lesiones histopatológicas. Los resultados del presente trabajo, en el cual se comparó el diagnóstico por histopatología con una prueba complementaria semicuantitativa, la IHQ, apoyaron los resultados de estos estudios al arrojar una diferencia significativa entre las dos técnicas para el diagnóstico de los tres agentes virales en una muestra de 122 casos.

La etiología múltiple del CRP,^{45,10} con interacciones complejas que pueden ser aditivas o sinérgicas, aunado a otros factores como el curso de la infección, estado inmunológico del animal e incluso las condiciones ambientales,⁴⁵ provoca respuestas tisulares diversas y variables que dificultan la observación de las lesiones características en las que se basa la histopatología,^{31,2} independientemente del criterio y destreza del observador.

La **clasificación y gradificación** de las lesiones principales (**Cuadro 3**) es utilizada para sugerir de manera general la naturaleza (virus, bacteria) de los patógenos que se encuentran en cada caso sin llegar a un diagnóstico definitivo; se determinó el número de casos con neumonía intersticial, la cual es la lesión microscópica general sugerente de infección viral en el tejido pulmonar, así como el número de casos con bronconeumonía supurativa que es sugerente de infección bacteriana secundaria y además es uno de los elementos principales

que enmascaran y dificultan la observación de lesiones en casos de CRP.^{45,11}

La neumonía intersticial se observó en 115 de 122 casos, el 42% de estos casos de intensidad moderada, lo que sugiere que la mayoría de los casos cursaron con infección viral, sin embargo, es importante mencionar que *Mycoplasma hyopneumoniae*, cuyo diagnóstico no es considerado en este estudio, es altamente prevalente y produce también este tipo de lesión con severidad leve a moderada.²⁷ El hecho de que la mayoría de los casos presenten evidencia general de infección viral es compatible con el papel de los virus como agentes primarios en el modelo simple de interacción del CRP,^{10,45} el cual establece que el inicio de la enfermedad respiratoria es generado por la afectación de la inmunidad innata por parte de los agentes virales o *Mycoplasma*.

Este esquema de interacción, el cual considera que la enfermedad progresa al ocurrir infección con agentes bacterianos oportunistas, fue respaldado por la evidencia microscópica en 39% de los casos al encontrar neumonía intersticial en conjunto con bronconeumonía, mientras que la mayoría de los casos (57%) presentaron solo neumonía intersticial sin la presencia de bronconeumonía. La infección viral simple o múltiple o por mycoplasma-virus es el modelo de interacción apoyado por la evidencia microscópica en estos casos.

Para el **Objetivo 2**, se buscaron lesiones específicas (**Cuadro 2**) para determinar la infección por cada uno de los tres agentes. La lista consistió solo de unas pocas lesiones por agente debido a que algunas de estas descritas en varios estudios como la hiperplasia de neumocitos tipo II, hiperplasia de BALT, peribronquitis linfocítica, peribronquiolitis linfocítica y perivasculitis linfocítica eran mencionadas para más de uno de los tres agentes, por lo cual se consideró que estas no serían útiles para discriminar cada caso.

Para el caso de SIV, la lesión más comúnmente observada (hiperplasia epitelial) aparece, según estudios detallados de las lesiones producidas por el virus¹³, a las 72 horas post-infección, mientras que la lesión considerada el marco de la infección (Bronquitis necrótica), cuyo tiempo de aparición es a las 24-48 horas post-infección fue observada en solo 20 casos. La atenuación epitelial bronquiolar y la displasia de este mismo tejido, son propias de 48-72 PI.

La frecuencia mayor de lesiones que aparecen de forma subaguda o crónica concuerda con el hecho de que la mayoría de los subtipos de influenza porcina que circulan en las granjas generan alta prevalencia pero baja mortalidad²⁷ a menos que se compliquen con otros agentes primarios o secundarios. Teniendo en cuenta el tiempo que estos factores complicantes tardan en aparecer, es esperado que las lesiones observadas en animales cuya causa de muerte sea la enfermedad respiratoria, como los recolectados para este estudio, lleven un tiempo cursando la infección por el virus.

Las lesiones consideradas marco de la infección por SIV son claras y prácticamente no se dificulta su observación a pesar de la reacción inflamatoria exacerbada o compleja provocada por otros agentes, por lo cual una revisión cuidadosa del tejido debe permitir la observación de estas.

En cuanto a **PRRSV**, el conocimiento sobre la patogenia y el tropismo del virus difiere ligeramente de los hallazgos mencionados por la literatura para caracterizar la infección por este virus; mientras que el daño celular en los macrófagos ocurre principalmente por la inducción de la apoptosis, el hallazgo microscópico referido por la literatura⁴⁶ es la presencia de restos celulares necróticos, en especial macrófagos, en la luz alveolar.

La presencia de macrófagos alveolares necróticos y neumocitos descamados y tumefactos sobre la presencia de figuras sugerentes de apoptosis en macrófagos podría explicarse por el efecto en mayor extensión sobre el tejido pulmonar por la sobreexpresión de citocinas como IL-1, IL-6, TNF- α , e IFN- γ , registrado en la infección por las cepas más virulentas.⁴⁶

La identificación de las lesiones utilizadas para diagnosticar PRRSV por histopatología fueron las más difíciles de identificar cuando se encontraban en conjunto con lesiones propias de complicación bacteriana como la bronconeumonía y alveolitis supurativa o linfoplasmocítica, además, distinguir neumocitos tumefactos y descamados con histiocitos necróticos resultó difícil.

Para **PCV-2**, en 14 casos las lesiones vasculares fueron observadas en vasos linfáticos y sanguíneos de bajo calibre sobre todo en el estroma, estas son explicadas por efecto citopático directo del virus sobre células endoteliales, miocitos de la capa media y/o pericitos; otros posibles mecanismos de daño vascular en la infección por PCV2 son el efecto de la sobresecreción de citocinas por células infectadas y la exacerbada reacción inmune consecuente, o por mecanismos humorales como el depósito o la formación *in situ* de complejos inmunes.^{37,47}

La neumonía intersticial granulomatosa, caracterizada por la formación de células gigantes multinucleadas,²⁷ fue un hallazgo raro, además, la lesión más representativa de la infección por PCV2 registrada en la literatura, que es la formación de cuerpos de inclusión botrioides, los cuales tienen forma de racimo de uva y son encontrados en el citoplasma de macrófagos¹¹ y con menor frecuencia en células epiteliales alveolares,⁴² no fue encontrada en ninguno de los 122 casos estudiados.

La revisión exclusiva de tejido pulmonar en el presente estudio pudo haber limitado el hallazgo de los cuerpos de inclusión debido a que estos son considerados muy raros en el epitelio bronquial y bronquiolar, sin embargo, aunque excede el alcance de este trabajo, se examinaron microscópicamente los linfonodos regionales de los casos en los que se tuvieran disponibles, no encontrándose cuerpos de inclusión en ninguno de ellos, sin embargo, es importante considerar que la presencia de cuerpos de inclusión en cualquiera de los órganos y sistemas afectados por PCV-2 es mucho menos común actualmente de lo que era en el tiempo que surgió la enfermedad.⁴³

El procedimiento de inmunohistoquímica (IHQ) correspondiente al **Objetivo 3** permitió establecer los casos positivos para cada agente al observar el marcaje sobre los antígenos buscados. Además de la clara diferencia en la frecuencia de casos positivos arrojados por la IHQ con la histopatología, la cual será discutida más adelante, la IHQ arrojó datos interesantes sobre la interacción virus-virus que se exponen a continuación.

Con esta técnica, se pudo caracterizar el tercer modelo de interacción¹⁰ en los 122 casos, el cual se da entre agentes primarios del CRP, ya sea entre virus o virus-*Mycoplasma*. En los 122 casos, la interacción más frecuente (SIV-PRRSV) apoya los datos epidemiológicos que establecen que SIV presenta morbilidad cercana al 100% y que PRRSV se considera ubicuo en los países con producción industrial de cerdos. Se han encontrado diferentes efectos sobre la presentación de la enfermedad respiratoria según el orden de infección por los dos agentes⁴⁵ y el intervalo entre la infección por cada uno,⁴⁸ lo cual es imposible de saber en este estudio. Sin embargo, un dato importante es que se considera que a pesar de que la infección dual provoca efectos sinérgicos,¹¹ la infección por PRRSV disminuye la replicación de SIV, probablemente por la secreción de citocinas como IFN α .^{45,48} Esta disminución en la

replicación de SIV, puede interferir no solo en su patogenicidad, sino también en la presentación de lesiones características de este virus e incluso en la localización de la inmunopositividad, revisada más adelante.

En cuanto a PCV-2, no fue encontrado ningún caso con infección única por este virus, lo cual puede ser explicado a pesar de su alta prevalencia en la producción porcina²⁰ por el hecho de que la replicación del virus es potenciada por la activación de la respuesta inmune hacia otro agente y la multiplicación de células precursoras linfáticas,^{23,49} por lo cual no se observaría expresión de la enfermedad respiratoria por la infección simple por PCV-2. La participación de este agente se observó la mayoría de las veces junto con los otros dos virus estudiados (27 casos), interacción que se sabe es la que más potencializa la replicación y distribución de PCV-2⁴⁵ y concuerda con la dependencia del agente de la activación de la respuesta inmune para replicarse.

Algunos de los hallazgos más importantes ocurrieron al determinar la localización celular de los antígenos de los tres agentes; la nucleoproteína de *SIV* se encontró en fibroblastos, células endoteliales, células musculares lisas de la capa media de vasos sanguíneos, neumocitos y macrófagos. Esta inmunopositividad fue validada por los controles positivos y negativos y difiere de lo descrito en la literatura, en donde las células epiteliales bronquiales y bronquiolares son las que presentan inmunopositividad en la mayoría de los casos. Esta inmunopositividad no fue encontrada en el epitelio bronquial y bronquiolar en ninguno de los casos, incluso en los que presentaban degeneración y necrosis epitelial.

El marcaje en fibroblastos no es mencionado en las descripciones más detalladas sobre ensayos de IHQ ni como una célula que esté implicada en la patogenicidad del virus.^{13,40} Para

explicar la ausencia de inmunopositividad en epitelio y su presencia abundante en fibroblastos, debemos considerar los datos de estos estudios que relacionaron los hallazgos con diferentes tiempos PI, los cuales situaron el tiempo de eliminación del virus a los 7 días post infección. Este rápido tiempo de eliminación del virus, junto con los datos sobre la patogenia que sitúan al daño epitelial bronquial y bronquiolar como uno de los primeros efectos por la infección por SIV, sugieren que los casos de campo evaluados en este estudio llevaron un curso de enfermedad al menos mayor a los 7 días, tiempo en el cual el virus fue eliminado de células lábiles como el epitelio pero permaneció en células estables, como los fibroblastos. Los casos con daño epitelial pero sin inmunopositividad en estas células hacen pensar que estos daños eran causados por otro agente, dentro de los cuales *Mycoplasma* es el más probable.²⁵

En los mismos estudios sobre la patogenia de *SIV*, se registró daño endotelial que se atribuyó a la exacerbación de la respuesta inflamatoria y secreción de citocinas, sin que fuera demostrada la replicación o la presencia del antígeno en estas células. Sin embargo, partículas virales han sido observadas en el citoplasma de estas células por medio de microscopía electrónica de transmisión.¹⁵

La localización de la proteína de la nucleocápside de *PRRSV* difirió considerablemente con lo descrito en la literatura: la inmunopositividad fue observada de manera clara y abundante en el citoplasma de células epiteliales bronquiales, bronquiolares y glandulares, además, el epitelio con marcaje claro se observó tumefacto, en algunos casos vacuolado y con ausencia parcial de cilios.

El marcaje y degeneración de las células epiteliales no coincide con el rango de células blanco

consideradas, sin embargo, el conocimiento sobre los mecanismos moleculares de reconocimiento de las células blanco por el virus y el mecanismo de entrada no están claramente entendidas,^{16,17} por lo que no se puede descartar la participación de las células epiteliales en la replicación y propagación del virus.

El ensayo llevado a cabo con anticuerpos policlonales para **PCV-2** fue el menos claro de los tres y en muchos casos el marcaje de fondo no permitió confirmar casos sospechosos, lo que pudo haber llevado a subestimar la cantidad de casos positivos para este agente. El tropismo del virus por gran cantidad de células y la patogenia estudiada^{23,37,47} coincide con la inmunopositividad observada en este trabajo.

Si bien existe la noción en el ámbito del diagnóstico anatomopatológico que la determinación de la etiología primaria de CRP es complicada por medio de histopatología, no se tiene una magnitud numérica obtenida de un número amplio de casos ni se han examinado a detalle las causas de esta dificultad.

El **análisis estadístico** de ambas pruebas diagnósticas arrojó qué para los tres agentes, los resultados son dependientes de la prueba utilizada, es decir, que son diferentes de manera significativa y el resultado será diferente según el método utilizado y no por la presencia o ausencia del agente, la magnitud de esta diferencia (dada por el Odds Ratio) es un punto muy importante a considerar.

Al examinar el caso de **SIV**, la magnitud de la diferencia es tal, que prácticamente resulta que en una misma muestra que fuera lo suficientemente amplia, por cada caso de influenza diagnosticado por histopatología, se podrían detectar 102 casos por medio de IHQ que escaparon a la primera prueba. Tal diferencia hace evidente que es necesaria la utilización de

pruebas complementarias como la IHQ.

Las pruebas para **PRRSV** y **PCV-2** arrojaron la misma falta de correspondencia, incluso la menor magnitud de la diferencia para PCV-2 indica que aún es 4 veces más probable encontrar un caso positivo por medio de IHQ. Además, como se indica en el apartado de histopatología, la lesión que más veces permitió sugerir a PCV-2 por histopatología fueron las lesiones vasculares en vasos sanguíneos muy pequeños en los septos, las cuales resultaron difíciles de observar.

Finalmente, fue posible determinar la sensibilidad y especificidad, proporciones que hablan de la habilidad diagnóstica de la histopatología y que no han sido determinados en otro estudio. Para los tres agentes, la especificidad fue considerablemente más alta debido a que fueron muy pocos casos en los que fueron observadas las lesiones. Estos datos apoyan la falta de coincidencia entre las pruebas determinada por la prueba de Ji-cuadrada.

5. CONCLUSIONES

- En las condiciones de campo características de los 122 casos utilizados en este trabajo los resultados del diagnóstico histopatológico son significativamente diferentes de los obtenidos mediante la demostración de los antígenos virales en los tejidos mediante IHQ.
- A pesar de que estos datos sugieren que la evidencia histopatológica no es suficiente para llegar al diagnóstico etiológico final, esta permitió determinar, de manera general, que la mayoría de los casos cursaban con infección solamente por parte de agentes virales o bacterias-virus.

- Las lesiones pulmonares microscópicas caracterizadas en la literatura no son representativas y útiles para sugerir la infección por *SIV*, *PRRSV* y *PCV2*, a diferencia de lo observado en estudios experimentales en los que no existe interacción con otros agentes.
- La inmunopositividad de *SIV* y *PRRSV* fue clara e intensa pero su localización fue diferente a lo reportado previamente, en cuanto a *PCV-2* el marcaje no fue tan claro y presentó marcaje de fondo que en algunos casos dificultó la interpretación. Para respaldar estos resultados, será útil llevar a cabo otras técnicas moleculares que permiten localizar a los agentes en los tejidos, como la hibridación *in situ*.
- Con los resultados de este estudio, podemos determinar que la utilidad de la histopatología radica solo en orientar la utilización de pruebas diagnósticas complementarias, como la IHQ, hacia los grandes grupos de patógenos (virus y bacterias) en función de las lesiones generales, sin embargo, quedó clara la poca utilidad que esta tiene para llegar por si sola a un diagnóstico etiológico definitivo.

6. PERSPECTIVAS

La inspección exclusiva de tejido pulmonar en el presente estudio pudo haber limitado la capacidad diagnóstica de la histopatología, es necesario, sobre todo para los dos virus que provocan enfermedad multisistémica (*PRRSV* y *PCV-2*), realizar un estudio similar que incluya otros tejidos como los linfonodos o que se complemente con otros órganos afectados por estas enfermedades para llegar a conclusiones definitivas sobre el diagnóstico por medio de esta técnica. Para respaldar los datos sobre la habilidad diagnóstica de la histopatología (sensibilidad y especificidad), será conveniente realizar una comparación

similar, pero identificando a los agentes por medio de otra técnica de biología molecular como PCR, la cual puede ser llevada a cabo también en tejidos incluidos en parafina.

La localización tisular de los antígenos resultó diferente a lo esperado según la patogenia y a estudios previos, por lo cual sería conveniente llevar a cabo otra técnica que permita determinar la localización del agente, pero con otro fundamento; la hibridación *in situ* sería adecuada ya que permite determinar la localización del agente pero basándose en la búsqueda de secuencias de ácidos nucleicos específicas.

Definitivamente, conocer los datos de los animales incluidos en el estudio, como historia clínica, signología, edad, estado productivo y estatus inmunológico respecto a las enfermedades buscadas, permitirá conocer la muestra utilizada y decidir si es posible trasladar los datos obtenidos a la población porcina en general o solo a cierto sector o etapa productiva. Además, permitirá relacionar las diferentes interacciones virales determinadas mediante IHQ con la afectación a los parámetros productivos y por consiguiente la importancia económica.

7. LITERATURA CITADA

1. Schacht V, Kern JS. Basics of Immunohistochemistry. *Journal of Investigative Dermatology*. 2015;135(3):e30.
2. Gupta E, Bhalla P, Khurana N, Singh T. Histopathology for the diagnosis of infectious diseases. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2009;27(2):100-106.
3. Vibeke S, Jorsal SE, Mousing J. Diseases of the Respiratory System. In: *Diseases of Swine*. 9° ed. Iowa: Blackwell Publishing; 2009:149-177.
4. Food and Agriculture Organization. *El Estado Mundial de La Agricultura Y La Alimentación*. La ganadería a examen.[Libro electrónico]. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación; 2009 [consultado el 10/09/15]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/012/i0680s/i0680s.pdf>
5. Fao.org. Agriculture and Consumer Protection Department. Animal Production and

- Health, Sources of Meat [sede web] Roma: FAO.org;2012 [actualizada el 28 de noviembre de 2014; acceso 5 de enero de 2016] Disponible en:
http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/meat/backgr_sources.html
6. Fao.org. Agriculture and Consumer Protection Department. Animal Production and Health, Sources of Meat [sede web] Roma: FAO.org;2012 [actualizada el 28 de noviembre de 2014; acceso 5 de enero de 2016] Disponible en:
http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/meat/backgr_sources.html
 7. FAO's Animal Production and Health Division: Meat & Meat Products. [sedeweb]Roma:FAO;2013[Actualizada noviembre 2014, acceso enero 2016] Disponible en:
http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/meat/backgr_productions.html.
 8. Miller G, Dorn C. An economic summary of the National Animal Health Monitoring System data in Ohio. *Proc USA Heal Assoc.* 1987;91:154-172.
 9. Boessen C, Kliebenstein J, Cowart R, Moore K, Brurbee C. Effective use of slaughter checks to determine economic loss from morbidity in swine. *Acta Veterinaria Scandinava.* 1988;84:436-438.
 10. Sahagún GI, Castillo MT. Diversos modelos de interacciones que ocurren en el complejo respiratorio porcino. *Rev Vet Mex.* 2000;31(1):1-14.
 11. Caswell J, Williams K. Respiratory System. In: Grant M, ed. *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals.* Vol 2. 5th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2007:523-650.
 12. Hansen MS, Pors SE, Jensen HE, et al. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. *Journal of Comparative Pathology.* 2010;143(2-3):120-131.
 13. Janke BH. Influenza A virus infections in swine: pathogenesis and diagnosis. *Vet Pathol.* 2014;51(2):410-426..
 14. MacLachlan NJ, Duvobi JE. *Fenner's Veterinary Virology.* 4th ed. San Diego: Academic Press; 2011.
 15. Juárez M EVALUACIÓN CLÍNICO-PATOLÓGICA Y SEROLÓGICA DE DOS CEPAS DEL VIRUS DE INFLUENZA SUBTIPO H1N1 EN CERDOS CALOSTRADOS Y NO CALOSTRADOS [Tesis maestría]. Ciudad de México: FMVZ UNAM; 2012.
 16. Zimmerman J, Benfield D. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. In: *Diseases of Swine.* 9º ed. Iowa: Blackwell Publishing; 2006:387-417.
 17. J. Snijder Eric , Kikkert Marjolein Arterivirus molecular biology and pathogenesis. *Journal of general virology.* 2013;94:2141-2163
 18. Nodelijk G. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) with special

- reference to clinical aspects and diagnosis. A review. *Vet Q.* 2002;24(2):95-100.
19. Chand RJ, Tribble BR, Rowland RRR. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Curr Opin Virol.* 2012;2(3):256-263.
doi:10.1016/j.coviro.2012.02.002.
 20. Ségales J, Gordon MA, Domingo M. Porcine Circovirus diseases. In: *Diseases of Swine.* 9° ed. Iowa: Blackwell publishing; 2006:299-322.
 21. Chae C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet J.* 2005;169(3):326-336.
 22. Ellis J. Porcine Circovirus: A Historical Perspective. *Vet Pathol.* 2014;51(2):315-327.
 23. Nauwynck HJ, Sanchez R, Meerts P, et al. Cell tropism and entry of porcine circovirus 2. *Virus Res.* 2012;164(1-2):43-45.
 24. Chae C. Postweaning multisystemic wasting syndrome: A review of aetiology, diagnosis and pathology. *Vet J.* 2004;168(1):41-49.
 25. Thacker EL. Mycoplasmal Diseases. In: *Diseases of Swine.* 9° ed. Iowa: Blackwell Publishing; 2009:701-718.
 26. Gottchalk M, Taylor DJ. Actinobacillus pleuroneumoniae. In: *Diseases of Swine.* 9th ed. Iowa; 2009:563-576.
 27. López A. Respiratory System, Mediastinum, and Pleurae. In: Zachary J, McGavin D, eds. *Pathologic Basis of Veterinary Disease.* 5th ed. Missouri: Elsevier Saunders; 2012:458-538.
 28. Rapp-Gabrielson VJ, Oliveira SR, Piojan C. Haemophilus parasuis. In: *Diseases of Swine.* 9th ed. Iowa; 2009:681-690.
 29. Hansen MS, Hjulsgaard CK, Bille-Hansen V, et al. Selection of method is crucial for the diagnosis of porcine circovirus type 2 associated reproductive failures. *Vet Microbiol.* 2010;144(1-2):203-209.
 30. Myers RK, McGavin MD, Zachary JF. Cellular Adaptations, Injury, and Death: Morphologic, Biochemical, and genetic Bases. In: Zachary J, McGavin D, eds. *Pathologic Basis of Veterinary Disease.* 5th ed. Missouri: Elsevier Saunders; 2012:2-49.
 31. Watts J, Chandler F. The surgical pathologist's role in the diagnosis of infectious diseases. *J Histotechnol.* 1995;18:191-193.
 32. Hall J. Inclusion de Tejidos. In: Prophet E, Mills B, Arrington J, Sobin L, eds. *Métodos Histotecnológicos.* Washington: Instituto de Patología de las fuerzas armadas de los Estados Unidos de América; 1995:55-60.
 33. William B, Bacha L. Respiratory System. In: *Color Atlas of Veterinary Histology.*

Second edition :Iowa:Blackwell publishing: 195-209. 2000.

34. Petersen K, Pedersen HC. Detection methods. In: Immunohistochemical staining methods. IHC guidebook. Denmark:DAKO; 2013. 78-93
35. OIE. PRRS manual procedures.Paris: *OIE*. 2015;53:160.
36. OIE. *Reference Manual Influenza*.Paris: OIE. 2015 .
37. Szeredi L, Dan a., Solymosi N, Csagola a., Tuboly T. Association of Porcine Circovirus Type 2 With Vascular Lesions in Porcine Pneumonia. *Vet Pathol*. 2012;49(2):264-270.
38. Wagner J, Kneucker A, Liebler-Tenorio E, et al. Respiratory function and pulmonary lesions in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet J*. 2011;187(3):310-319.
39. Jime MA, H. Janke Bruce. A monoclonal antibody based immunohistochemical method for the detection of swine influenza virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues Brief communications. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1999;216(1):1.
40. Rajão DS, Couto DH, Gasparini MR, et al. Diagnosis and clinic-pathological findings of influenza virus infection in Brazilian pigs. *Pesqui Vet Bras*. 2013;33(1):30-36.
41. Hall J. Hematoxilina y Eosina. In: Prophet E, Mills B, Arrington J, Sobin L, eds. *Métodos Histotecnológicos*. Washington: Instituto de Patología de las fuerzas armadas de los Estados Unidos de América; 1995:55-60.
42. Huang YY, Walther I, Martinson S a, et al. Porcine circovirus 2 inclusion bodies in pulmonary and renal epithelial cells. *Vet Pathol*. 2008;45(5):640-644.
43. Opriessnig T, Langohr I. Current State of Knowledge on Porcine Circovirus Type 2-Associated Lesions. *Vet Pathol*. 2012;50(1):23-38.
44. Fablet C, Marois C, Dorenlor V, et al. Bacterial pathogens associated with lung lesions in slaughter pigs from 125 herds. *Res Vet Sci*. 2012;93(2):627-630.
45. Opriessnig T, Giménez-Lirola LG, Halbur PG. Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Anim Heal Res Rev*. 2011;12(02):133-148. d
46. Hu SP, Zhang Z, Liu YG, et al. Pathogenicity and distribution of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs. *Transbound Emerg Dis*. 2013;60(4):351-359.
47. Resendes a. R, Segales J. Characterization of Vascular Lesions in Pigs Affected by Porcine Circovirus Type 2-Systemic Disease. *Vet Pathol*. 2014;52(3):497-504.
48. Van Reeth K, Nauwynck H, Pensaert M. Clinical effects of experimental dual infections with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by

- swine influenza virus in conventional and colostrum-deprived pigs. *J Vet Med Ser B*. 2001;48(4):283-292.
49. Segalés J, Kekarainen T, Cortey M. The natural history of porcine circovirus type 2: From an inoffensive virus to a devastating swine disease? *Vet Microbiol*. 2013;165(1-2):13-20.

Anexo 1. Protocolo IHQ anti-nucleoproteína de Virus de Influenza Porcina (SIV)

Desparafinación:

En horno a 60° C durante una hora

Xilol un cambio de 10'

Alcohol absoluto un cambio de 10'

Alcohol al 96 % un cambio de 10'

Alcohol al 70 % un cambio de 10'

Alcohol al 50 % un cambio de 10'

Lavar con PBS, un cambio de 10'

Recuperación antigénica:

Colocar las laminillas en solución Target Retrieval Solution (diluida 1:50 en agua destilada) en un vaso coplin de plástico cerrado dentro de la olla con 400 ml de agua destilada en el horno de microondas por 3 minutos potencia 5

Lavar con PBS, un cambio de 5'

Bloqueo de peroxidasa:

Peróxido de Hidrógeno + metanol en relación 1:8¹, un cambio de 30' a TA

Lavar con PBS, un cambio de 5'

Bloqueo de inmunoglobulinas endógenas:

Decantar el PBS y agregar 50µl de leche Svelty³ al 0.5 % e incubar en cámara húmeda durante 30' en estufa a 37° C

Lavar con PBS, un cambio de 5'

Incubación con el anticuerpo primario:

Decantar el PBS y agregar 50µl de anticuerpo primario anti-nucleoproteína dilución 1:800, incubar en cámara húmeda durante toda la noche a 4 °C

Lavar con PBS, un cambio de 10'

Incubación con el anticuerpo secundario:

Agregar 50µl de POLIMERO ENVISION FLEX/HRP (DM 822), incubar en cámara húmeda durante 20' a temperatura ambiente

Lavar con PBS, un cambio de 15'

Revelado:

Preparar DAB (1ml de Sustrato buffer DM823 + 1 gota de DMB)

Revelar las laminillas aplicando 50µl de DAB.

Observar la reacción del colorante al microscopio y establecer el tiempo de reacción 5' máximo.

Tiempos de revelado_____

Colocar las laminillas en agua destilada para detener la reacción

Lavar con agua destilada, tres cambios de 5'

Contratinción:

Aplicación de Hematoxilina¹⁰ como contraste durante 1'

Lavar con agua 10 pases

Lavar con agua amoniacal 10 pases

Lavar con agua 10 pases

Alcohol 70% 10 pases

Alcohol 80% 10 pases

Alcohol 96% 10 pases

Alcohol absoluto 10 pases

Xilol 10 pases

Montaje con resina sintética

Anexo 2: Protocolo IHQ Anti-nucleocápside de Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo del Cerdo (PRRSV)

Desparafinación:

En horno a 60° C durante una hora

Xilol un cambio de 10'

Alcohol absoluto un cambio de 10'

Alcohol al 96 % un cambio de 10'

Alcohol al 70 % un cambio de 10'

Alcohol al 50 % un cambio de 10'

Lavar con TRIS, un cambio de 10'

Recuperación antigénica:

Colocar las laminillas en solución Target Retrieval Solution (diluida 1:50 en agua destilada) en un vaso coplin de plástico cerrado dentro de la olla con 400 ml de agua destilada en el horno de microondas por 3 minutos potencia 5

Lavar con TRIS, un cambio de 5'

Bloqueo de peroxidasa:

Peróxido de Hidrógeno + metanol en relación 1:8¹, un cambio de 30' a TA

Lavar con TRIS, un cambio de 5'

Bloqueo de inmunoglobulinas endógenas:

Decantar el TRIS y agregar 50µl de leche Svelty³ al 0.5 % e incubar en cámara húmeda durante 30' en estufa a 37° C

Lavar con TRIS, un cambio de 5'

Incubación con el anticuerpo primario / potencializador

Decantar el TRIS y agregar 50µl de anticuerpo primario anti-nucleocápside dilución 1:200, incubar en cámara húmeda durante toda la noche a 4 °C

Lavar con TRIS, un cambio de 10'

Incubación con el anticuerpo secundario:

Agregar 50µl de POLIMERO ENVISION FLEX/HRP (DM 822), incubar en cámara húmeda durante 20' a temperatura ambiente

Lavar con TRIS, un cambio de 15'

Revelado:

Preparar DAB (1ml de Sustrato buffer DM823 + 1 gota de DMB)

Revelar las laminillas aplicando 50µl de DAB.

Observar la reacción del colorante al microscopio y establecer el tiempo de reacción 5' máximo.

Tiempos de revelado _____

Colocar las laminillas en agua destilada para detener la reacción

Lavar con agua destilada, tres cambios de 5'

Contratinción:

Aplicación de Hematoxilina¹⁰ como contraste durante 1'

Lavar con agua 10 pases

Lavar con agua amoniacal 10 pases

Lavar con agua 10 pases

Alcohol 70% 10 pases

Alcohol 80% 10 pases

Alcohol 96% 10 pases

Alcohol absoluto 10 pases

Xilol 10 pases

Montaje con resina sintética

Anexo 3. Protocolo IHQ anti partícula completa de Circovirus Porcino Tipo 2 (PCV2)

Desparafinación:

En horno a 60° C durante una hora

- Xilol un cambio de 10'
- Alcohol absoluto un cambio de 10'
- Alcohol al 96 % un cambio de 10'
- Alcohol al 70 % un cambio de 10'
- Alcohol al 50 % un cambio de 10'
- Lavar con CARBONATOS , un cambio de 10'

Recuperación antigénica:

Aplicar 50µl de proteasa e incubar en cámara húmeda durante 10' en estufa a 37° C _____

- Lavar con CARBONATOS, un cambio de 5'

Bloqueo de peroxidasa:

Peróxido de Hidrógeno + metanol en relación 1:7, un cambio de 30' a TA _____

- Lavar con CARBONATOS, un cambio de 5'

Bloqueo de inmunoglobulinas endógenas:

Decantar los CARBONATOS y agregar 50µl de leche Svelty al 0.5 % e incubar en cámara húmeda durante 30' en estufa a 37° C _____

- Lavar con CARBONATOS, un cambio de 5'

Incubación con el anticuerpo primario 1:500

Decantar los CARBONATOS y agregar 50µl de anticuerpo primario anti-circovirus (1:500 / CARBONATOS), incubar en cámara húmeda durante toda la noche a 4 °C _____

- Lavar con CARBONATOS, un cambio de 10'

Incubación con el anticuerpo secundario 1:500

Agregar 50µl de anticuerpo secundario anti-porcino (1:500 / carbonatos), incubar en cámara húmeda durante 30' en estufa a 37° C _____

Lavar con CARBONATOS, un cambio de 15'

Revelado:

Preparar DAB (1ml de Sustrato buffer DM823 + 1 gota de DMB), revelar las laminillas aplicando 50µl de DAB. Observar la reacción del colorante al microscopio y establecer el tiempo de reacción 5' máximo.

Tiempos de revelado_____

Colocar las laminillas en agua destilada para detener la reacción

Lavar con agua destilada, tres cambios de 5'

Contratinción:

Aplicación de Hematoxilina como contraste durante 1'

Lavar con agua 10 pases

Lavar con agua amoniacal 10 pases

Lavar con agua 10 pases

Alcohol 70% 10 pases

Alcohol 80% 10 pases

Alcohol 96% 10 pases

Alcohol absoluto 10 pases

Xilol 10 pases

Montaje con resina sintética

Anexo 4. Efecto del tamaño de muestra (n) sobre la potencia del estudio planteado

Potencia (1- β)	Tamaño de efecto 0.30	Tamaño de efecto 0.35	Tamaño de efecto 0.40
0.600000	54.428599	39.988359	30.616087
0.610000	55.713690	40.932507	31.338951
0.620000	57.023312	41.894678	32.075613
0.630000	58.358866	42.875902	32.826862
0.640000	59.721861	43.877286	33.593547
0.650000	61.113928	44.900029	34.376585
0.660000	62.536832	45.945428	35.176968
0.670000	63.992490	47.014890	35.995775
0.680000	65.482987	48.109949	36.834180
0.690000	67.010600	49.232277	37.693462
0.700000	68.577822	50.383706	38.575025
0.710000	70.187391	51.566246	39.480407
0.720000	71.842323	52.782115	40.411307
0.730000	73.545956	54.033764	41.369600
0.740000	75.301993	55.323913	42.357371
0.750000	77.114561	56.655596	43.376941
0.760000	78.988282	58.032207	44.430909
0.770000	80.928352	59.457564	45.522198
0.780000	82.940645	60.935984	46.654113
0.790000	85.031837	62.472370	47.830408
0.800000	87.209561	64.072331	49.055378
0.810000	89.482602	65.742320	50.333964
0.820000	91.861141	67.489818	51.671892
0.830000	94.357074	69.323564	53.075854
0.840000	96.984420	71.253859	54.553736
0.850000	99.759867	73.292963	56.114925
0.860000	102.703499	75.455632	57.770718
0.870000	105.839792	77.759847	59.534883
0.880000	109.199010	80.227844	61.424443
0.890000	112.819194	82.887571	63.460796
0.900000	116.749105	85.774852	65.671371
0.910000	121.052701 *	88.936679	68.092145
0.920000	125.816244	92.436424	70.771637
0.930000	131.160120	96.362537	73.777567
0.940000	137.259766	100.843910	77.208618
0.950000	144.385657	106.079258	81.216932

*Tamaño de muestra utilizado en el estudio.

Anexo 5. Procedimiento para el cálculo de la prueba de Ji- cuadrada y F de fisher usando el paquete R studio.

1. Calculo de la prueba de Ji cuadrada para SIV

-Ordenes

```
library(MASS)
```

```
> SIVji=matrix(c(34,119,88,3), nrow=2)
```

```
> SIVji
```

```
  [,1] [,2]
```

```
[1,] 34 88
```

```
[2,] 119 3
```

```
>chisq.test(SIV)
```

-Resultados

Pearson's Chi-squared test with Yates' continuity

correction

data: SIV

X-squared = 123.66, df = 1, p-value < 2.2e-16

2. Calculo de la prueba de Ji cuadrada para PRRSV

-Ordenes

```
> PRRSV=matrix(c(27,99,95,23), nrow=2)
```

```
> PRRSV
```

```
  [,1] [,2]
```

```
[1,] 27 95
```

```
[2,] 99 23
```

```
> chisq.test(PRRSV)
```

-Resultados

Pearson's Chi-squared test with Yates' continuity

correction

data: PRRSV

X-squared = 82.728, df = 1, p-value < 2.2e-16

3. Calculo de la prueba de Ji cuadrada para PCV-2.**-Ordenes**

```
> PCV.2=matrix(c(14,36,108,86), nrow=2)
```

```
> PCV.2
```

```
  [,1] [,2]
```

```
[1,]  14 108
```

```
[2,]  36  86
```

-Resultados

```
> chisq.test(PCV.2)
```

Pearson's Chi-squared test with Yates' continuity

correction

data: PCV.2

X-squared = 11.093, df = 1, p-value = 0.0008665

4. Calculo de la prueba exacta de Fisher para SIV**-Ordenes**

```
SIV=matrix(c(34,119,88,3), nrow=2)
```

```
> SIV
```

```
  [,1] [,2]
```

```
[1,] 34 88
```

```
[2,] 119 3
```

```
fisher.test(SIV)
```

-Resultados

Fisher's Exact Test for Count Data

data: SIV

p-value < 2.2e-16

alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

95 percent confidence interval:

```
0.001906256 0.033065976
```

sample estimates:

odds ratio

```
0.009986427
```

5. Calculo de la prueba exacta de Fisher para PRRSV.

-Ordenes

```
> PRRSV=matrix(c(27,99, 95,23), nrow=2)
```

```
> PRRSV
```

```
 [1,] [2,]
```

```
[1,] 27 95
```

```
[2,] 99 23
```

```
>Fisher.test(PRRSV)
```

-Resultados

Fisher's Exact Test for Count Data

data: PRRSV

p-value < 2.2e-16

alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

95 percent confidence interval:

0.03368792 0.12848301

sample estimates:

odds ratio

0.06703923

6. Calculo de la prueba exacta de Fisher para PCV-2

-Ordenes

```
PCV.2=matrix(c(14,36,108,86), nrow=2)
```

```
> PCV.2
```

```
  [,1] [,2]
```

```
[1,]  14 108
```

```
[2,]  36  86
```

```
➤ fisher.test(PCV.2)
```

-Resultados

Fisher's Exact Test for Count Data

data: PCV.2

p-value = 0.0007542

alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

95 percent confidence interval:

0.1452322 0.6359215

sample estimates:

odds ratio

0.3111519