



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores
Cuautitlán

CORRELACIÓN DE LESIONES HISTOLÓGICAS Y PATRONES DE
HIBRIDACIÓN IN SITU EN EL DIAGNÓSTICO DE SÍNDROMES
ASOCIADOS A CIRCOVIROSIS PORCINA.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Presentan
Daniel Araiza Nava
Karina Enríquez Ramírez

Asesora: Dra. Lucía Angélica García Camacho

Cuautitlan, Estado de México 2007



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.



Agradecimiento

A la Máxima Casa de Estudios

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

En especial

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Por mi raza hablara el espiritu.

***Cuautitlan Izcalli* Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores
Cuautitlán**

2007

Divinum est opus sedrate dolorum

Eduardo Enríquez

Por ti y para ti; porque si algo bueno hay en mi es gracias a ti, porque lo mejor y mas grande que esta vida pudo regalarme eres tu. Daría, todo lo que soy y tengo por estar a tu lado siempre. Te amo con todo mí ser papa.

Jaime, Erika y Gabriel

*Por ser mis hermanos de vida, amor y dolor, porque jamás pensé que la alegría y felicidad podrían presentarse en tantas formas tan diferentes, que la tristeza es menor a su lado, porque han hecho mi vida y a este mundo mejor de lo podría soñar. Gracias eternas por ser y estar. Los amo.
Mención honorífica a Yukary.*

Dra. Lucía

Gran amiga, confidente, compañera, Gracias por ser tal y como es, porque el amor que hay dentro de su corazón es un rayo mas de luz para alumbrar. Gracias por alentarme cuando lo necesito, porque un abrazo suyo me calma y conforta. Porque disfruto enormemente los momentos a su lado Gracias por permitirme caminar a su lado y confiar en mi. La quiero.

Dra. Andrea

Gracias porque yo estaría en otro lado si no fuera por usted, gracias por todo el cariño, tranquilidad confianza e ímpetu que me hace sentir porque quisiera darle un mundo donde muchos puedan reír, compartir y darse tanto como me ha dado a mi. Porque encontrar y tener a alguien como usted es un placer y ejemplo a seguir. La quiero. OHANA.

Gloria Baeza

13 años de ser amigas (¡¡guau!!), compartiendo pensamientos, sentimientos e ideales y aunque nuestros caminos se han separado no se ha desvanece todo el cariño y respeto que siento por ti.

Antonio Roldán

Amistad maravillosa... tantos paseos divertidos, por ser un gran amigo, mi confidente,, apoyarme y sobre todo aguantarme una que otra vez en Tepotzotlán; te quiero por compartir tantos sueños conmigo.

José Antonio Torres

Gracias por cruzarte en mi camino cuando menos lo esperaba, por compartir parte de tu vida conmigo, espero siempre sea igual No dejes que le de sed al árbol del que eres sol

Fernando García

Espero siempre continúe la amistad que nos une, Gracias por el tiempo regalado, y la alegría que dejas en mi. Y por favor no te alejes tanto porque te extraño. Te quiero mucho.

Valeria Vargas

De verdad gracias por llenar mi vida de sonrisas, dibujos y caricaturas; por tantas y tantas cosas locas, por los abrazos, sorpresas, diversión, por todo el cariño, apoyo, paciencia, por escuchar sin juzgar; simplemente por estar y sobre todo por ser tu misma a mi lado. Te quiero.

Gustavo Huerta

La verdad el que debe agradecer por ser mi amigo eres tu, pero vamos a hacerlo a la antigua: Te quiero Gustavito, se que estas ahí, sin importar la hora ni el lugar y es todo lo que necesito saber. Gracias por ayudarme y consolarme aquel día, no lo olvido.

David Tavera

Porque estoy segura que los buenos momentos se recordaran, repetirán y lo mejor es que aumentaran, Gracias por ser amigo. Te quiero. Daniel Araiza

A mi gemelo fantástico Gracias por estar conmigo en algo tan importante. Gracias por compartir tantas horas de incubación, por cambiar el buffer 1 por el 2, por hacerme reír, por darme tú cariño y amistad. Te quiero mucho.

Arturo Gazano

Tanto tiempo, tanto espacio, tanto mundo... 9 2784 3782667. 767783 52 8432 37 63567 2 88 5236. 88 63 266753636827, 83 266 9 7766386 736727 36 758725.

Gracias por la alegría de los momentos juntos, siempre serán una parte muy importante de mi vida. Los recuerdo siempre y los extraño aun más.

Cristal te adoro, Laura Lugo, Angy Romero, Claudia Vazquez, Miriam Gonzales, Ergar Galicia, Israel Villafranca, Jorge Lozano, Carlos Velarde, Vicente Castro, Perla Contreras, Martin, Ramon, Ivan, Gallo, Toño Lozano, Jose Yañes, Goyos, Victor Malvaez,

Karina Enríquez

Agradecimientos:

A Daniel e Irma

Al Arq. Inri

A María Medrano Alvarado

A Sara Sánchez Valdez

Al Ing. Joaquín Araiza Sánchez gracias.

A la Dra. Lucía Angélica García Camacho por el tiempo invertido en mí y por ser amiga y soportarme a pesar de que hice muchas cosas mal no me corrió del laboratorio, gracias.

A la MVZ Ana Laura Hernández Cadenas por ser parte de mi vida en el término de esto, y por que espero seas parte toda la vida.

A MVZ Karina Enríquez Ramírez por soportarme tanto tiempo, sabes que eres mi hermana o sea mi gemela fantástica.

Al MVZ. Víctor Quintero Ramírez, por ser ejemplo a seguir.

A todos mis amigos:

Eva González (Rigo), Valeria Vargas (Vale), Leona Valverde Ángeles de Charly, Frine Vélez (, Gustavo Huerta (Don Gus), Erendira (Ponce), Eli Vargas y sus piedras, Rox López (Maniguis), Miriam López (Maniguis), Teresa Montoya (Tele), Reyna Perea (Rodillitas), Eduardo Villanueva (Lalo), Eva García, Mariana Arango, Martis), Bruno Romero (Bruk), Salvador Flores (Chicho), Luis Antonio Valdez (Fay), Miguel Huerta Barabara Pérez (Barby), Fabiola (Fabiruchis), Fernando Goyos (Fer), Sr José López Torres y Sr José López Nieto gracias por su apoyo y confianza, Sra. Beatriz de los Reyes y Familia. .

INDICE

	Pags.
Indice de tablas.	1
Indice de figuras.	1
Abreviaturas.	2
1. Resumen.	4
2. Introducción.	6
2.1 Antecedentes.	6
2.2 Etiología.	6
2.3 Distribución.	6
2.4 Síndromes asociados a circovirus porcino.	7
2.4.1 Síndrome multisistémico y de adelgazamiento pos-destete (PMWS).	7
2.4.2 Síndrome de dermatitis y neuropatía porcina (PDNS).	7
2.4.3 Enfermedad del complejo respiratorio porcino (PRDC).	8
2.4.4 Falla reproductiva (FR).	9
2.4.5 Enteritis granulomatosa (EG).	10
2.5 Circovirus en México.	11
2.6 Transmisión y patogenia.	11
2.7 Diagnóstico.	12
2.7.1 Aislamiento vírico.	12
2.7.2 ELISA.	13
2.7.3 Inmunohistoquímica (IHQ).	13
2.7.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	13
2.7.5 Hibridación <i>in situ</i> (HIS).	14
3. Objetivos	15
3.1 General.	
3.2 Particulares.	
4. Marco teórico.	16
5. Material y método.	18
5.1 Diseño experimental.	18
5.2 Patología.	18
5.3 Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN).	18
5.4 Producción y marcaje de la sonda ADN.	19

5.5 Hibridación <i>in situ</i> .	23
6. Análisis de resultados.	24
7. Resultados.	26
8. Discusión.	37
9. Conclusión.	41
10. Bibliografía.	42

INDICE DE TABLAS

	Pags.
• Tabla 1. Líneas celulares más importantes susceptibles a la infección por PCV1 y PCV2.	12
• Tabla 2. Condiciones de amplificación seleccionadas para la reacción PCR (marcaje de la sonda ADN).	21
• Tabla 3. Programa de amplificación PCR para PCV2.	22
• Tabla 4. Resumen de los hallazgos histopatológicos y grado de severidad en los diferentes tejidos linfoides incluidos en el estudio.	28
• Tabla 5. Cuadro de contingencia de 2X2 para los valores obtenidos de las evaluaciones histopatológicas y de los resultados de la HIS	29
• Tabla 6. Resumen de los hallazgos histopatológicos evaluados en los tejidos linfoides y los patrones de HIS con respecto a los síndromes asociados a circovirus porcino diagnosticados en el estudio.	30

INDICE DE FIGURAS

• Figura 1. Depleción linfoide severa con proliferación histiocítica leve-moderada difusa. Bazo. Hematoxilina Eosina. 10x. PMWS.	31
• Figura 2. Depleción linfoide severa con proliferación histiocítica leve-moderada. Bazo. Hematoxilina Eosina. 40x. PMWS.	31
• Figura 3. Sincitios.	31
• Figura 4. Cuerpos de inclusión.	32
• Figura 5. Depleción linfoide difusa severa con proliferación histiocítica moderada. Linfonodo. Hematoxilina Eosina. 10X.	32
• Figura 6. En este acercamiento se observa claramente un sincitio en un campo de depleción linfoide. Linfonodo. Hematoxilina Eosina. 40X.	32
• Figura 7. Señal de hibridación intensa difusa. Linfonodo. Hibridación <i>in situ</i> . Verde rápido. 10X.	33
• Figura 8. Señal de hibridación intensa difusa. Bazo. Hibridación <i>in situ</i> . Verde rápido. 10x. PMWS.	33
• Figura 9. Señal de hibridación intensa en citoplasma. Linfonodo. Hibridación <i>in situ</i> . Verde rápido. 40X.	33
• Figura 10. Se observa depleción moderada con proliferación histiocítica difusa leve-moderada además de sincitios. Linfonodo. Hematoxilina Eosina. 10X. PDNS.	34
• Figura 11. Acercamiento de sincitios en el extremo superior izquierdo. Linfonodo. Hematoxilina Eosina. 40X. PDNS.	34
• Figura 12. Señal de hibridación multifocal muy intensa. Linfonodo. Hibridación <i>in situ</i> . Verde rápido. 10X. PDNS.	34
• Figura 13. Señal de hibridación intensa intracitoplasmática. Linfonodo. Hibridación <i>in situ</i> . Verde rápido. 40X. PDNS.	35
• Figura 14. Depleción linfoide leve-moderada con proliferación histiocítica leve multifocal. Tonsila. Hematoxilina Eosina. 10x. PDNS.	35
• Figura 15. Señal de hibridación multifocal intensa. Tonsila. Hibridación <i>in situ</i> . Verde rápido. 10x. PDNS.	35
• Figura 16. Señal de hibridación intracitoplasmático. Tonsila. Hibridación <i>in situ</i> . Verde rápido. 40x.	36

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

BFDV: Virus de la enfermedad del pico y de las plumas de los psitácidos (Beak and feather disease virus).

CaCV: Circovirus del canario (Canary circovirus).

cADN: ADN complementario.

CAV: Virus de la anemia del pollo (Chicken anemia virus).

cbp: Cuanto baste para.

d.d.g.: Dias de gestación.

DEPC: Dietilpirocarbonato.

DIG: Digoxigenina (esteroide que se obtiene de *Digitalis purpurea* y *Digitalis lanata*).

EDTA: Ácido etilendiamino tetraácetico (Ethylenediaminetetraacetic acid).

EG. Enteritis granulomatosa.

ELISA: Análisis de la enzima ligada a un inmunoabsorbente inerte (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

EtOH: Alcohol etílico.

FR: Falla reproductiva.

GCV: Circovirus del ganso (Goose circovirus).

HIS: Hibridación *in situ*.

HP: Histopatología.

IHQ: Inmunohistoquímica.

M: Mol o moles.

MgCl₂: Cloruro de magnesio.

ml: Mililitros.

mM: Milimolar.

nm: Nanometros.

ORF: Marcos de lectura abierta (Open reading frames).

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction).

PCV: Circovirus porcino (Porcine circovirus).

PCV1: Circovirus porcino tipo 1 (Porcine circovirus type 1).

PCV2: Circovirus porcino tipo 2 (Porcine circovirus type 2).

PDNS: Síndrome de dermatitis y nefropatía porcina.

pH: Potencial de hidrogeniones.

PK-15: Línea celular de riñón de cerdo.

PMWS: Síndrome multisistémico y de adelgazamiento post-destete (Postweaning multisystemic wasting syndrome).

PPV: Parvovirus porcino.

PRDC: Enfermedad del complejo respiratorio porcino.

rpm: Revoluciones por minuto.

PRRSV: Virus del síndrome respiratorio y reproductivo del cerdo.

SDS: Duodecil sulfato de sodio (Sodium dodecyl sulfate).

Taq: *Thermus aquaticus*.

tPA: Templado de Activador de Plasminógeno Tisular.

U: Unidades.

μl: Microlitros.

RESUMEN

La circovirus porcina causada por el Circovirus porcino tipo 2 (PCV2) afecta especialmente a cerdos de transición y engorde y a cerdas reproductoras produciendo retraso en el crecimiento y falla reproductiva, respectivamente. En general el PCV2 provoca retraso en el crecimiento y una mayor susceptibilidad a diversas infecciones produciendo una elevada mortalidad en lechones y un incremento en pérdidas fetales en hembras reproductoras. En México ha sido reportada en lechones neonatos y en animales con PMWS, PDNS y enteritis granulomatosa. Con el propósito de evaluar la correlación entre lesiones histopatológicas y patrones de hibridación *in situ* (HIS) se obtuvieron muestras de nodo linfático, bazo y tonsila de 30 cerdos procedentes de diferentes granjas del país los cuales presentaron manifestaciones clínicas sugestivas de circovirus. Las muestras se fijaron en formalina amortiguada al 10%, se procesaron y se incluyeron en parafina para obtener secciones de tejido. Se realizó la evaluación histopatológica para identificar las lesiones microscópicas características de circovirus y definir un patrón histopatológico y se efectuó la HIS para la detección de PCV2 en las lesiones referidas. Los resultados obtenidos de ambas evaluaciones se correlacionaron para evaluar el valor diagnóstico de la histopatología (HP) frente a la HIS mediante el cálculo de los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, entre otros. Posteriormente, de los casos positivos reales se determinó el síndrome asociado a circovirus y se correlacionó la severidad de los criterios histopatológicos con el patrón de HIS encontrado. La HP reveló que diversos grados de depleción linfoide fueron observadas en todos los tejidos linfoides evaluados y que la mayoría de los casos negativos por HP no presentaron sincitios celulares. Adicionalmente, las lesiones características fueron más consistentes y severas en los nodos linfáticos. La HP presentó una sensibilidad del 100%, una especificidad del 71.42 %, un índice de falsos negativos del 0 % y un índice de falsos positivos del 0.28% aunado a un alto valor predictivo positivo (92.0 %) y un excelente valor predictivo negativo (100%). Las lesiones de circovirus fueron más severas y difusas en los casos de PMWS mientras que en PDNS fueron leves a moderadas y correlacionaron con patrones de HIS difusos y multifocales, respectivamente. Con base a lo anterior, se determinó que a diferencia de la depleción linfoide (la cual estuvo presente tanto en casos positivos como negativos), la presencia de sincitios celulares tuvo alto criterio diagnóstico para confirmar o descartar circovirus porcina y que las muestras de nodo linfáticos tiene un mayor valor diagnóstico por presentar consistentemente las lesiones características aunada a la detección del PCV2 en las mismas. La alta sensibilidad, los altos valores predictivos tanto positivo como negativo y los bajos índices de falsos positivos y falsos negativos nos indican que la evaluación microscópica constituye una excelente prueba de tamizaje para la realización de

una posterior detección del PCV2 por HIS. Sin embargo, la especificidad obtenida revela que a pesar de que las lesiones son altamente sugestivas de circovirosis, existe la posibilidad de que lesiones similares sean ocasionadas por otro agente patógeno que genere una respuesta granulomatosa y enfatiza la necesidad de demostrar la presencia del PCV2 como prueba confirmatoria. Con respecto a los patrones de HIS, los resultados obtenidos están en congruencia con lo reportado en estudios previos y confirman que la distribución del virus presenta una alta correlación con el grado de severidad de las lesiones producidas por PCV2.

Debido a que el diagnóstico de los síndromes asociados a circovirosis porcina debe incluir la presencia de signos clínicos compatibles y el diagnóstico de lesiones microscópicas características con la detección del PCV2 en las mismas es importante realizar una eficiente evaluación HP con el fin de reducir lo más posible la proporción de resultados falsos positivos.

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

El Circovirus porcino (PCV) es un agente infeccioso que se descubrió en los últimos años, de fácil difusión y que infecta a la especie porcina. El PCV fue descrito como un virus contaminante de la línea celular de riñón de cerdo PK-15 (Tischer et al., 1982). Hasta el momento se han caracterizado dos tipos distintos, el Circovirus tipo 1 (PCV1), apatógeno para el cerdo, y el Circovirus tipo 2 (PCV2) el cual es antigénica y genómicamente distinto al anterior (Bassami et al., 1998). El PCV2 fue descrito inicialmente en Saskatchewan (Canada) en 1991 en casos de síndrome de emaciación multisistémica post-destete o postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) en inglés (Harding, 1996). Actualmente por consenso, el PMWS es el proceso clínico en el cual se ha aceptado la relación etiopatogénica con el PCV2 (Hamel et al., 1998). El PMWS afecta especialmente a cerdos de transición y engorde, provocando retraso en el crecimiento, alteraciones respiratorias, palidez corporal y elevada mortalidad (Rosell et al., 1999). Desde su primera descripción, este síndrome ha sido descrito en la mayor parte de zonas del mundo donde la producción porcina es una actividad económica importante (Allan y Ellis, 2000).

Etiología

El PCV pertenece a la familia *Circoviridae*, la cual está dividida en dos géneros; *Gyrovirus* y *Circovirus* (McNulty et al., 2000). El único miembro del género *Gyrovirus* es el virus de la anemia del pollo (CAV) (Kato et al., 1995) y el género *Circovirus* contiene el virus de la enfermedad del pico y de las plumas (BFDV) (Bassami et al., 1998), el circovirus del ganso (GCV) (Todd et al., 2001), el circovirus del canario (CaCV) (Phenix et al., 2001); además del PCV1 (Mankertz et al., 1997), y PCV2 (Hamel et al., 1998). El circovirus es un virus no envuelto e icosaédrico, pequeño (15 a 16 nm de diámetro), cadena de ADN sencilla y circular (1.76 Kb) (Tischer et al., 1982). El ADN del virus tiene una longitud de 1759 a 1768 nucleótidos (nt) (Meehan et al., 1997; Hamel et al., 1998; Fenaux et al., 2000). El PCV2 contiene seis marcos de lectura abiertos (ORFs) (Mankertz et al., 1997). Los dos principales serían el ORF1 que codifica para una proteína de 37.5 kDa involucrada en la replicación viral y el ORF2 que codifica para una proteína estructural de la cápside de 27.8 kDa considerada la mas importante (Mankertz et al., 2000).

Distribución

El PCV2 presenta una distribución mundial, como se mencionó anteriormente es el agente causal de PMWS en cerdos, donde clínicamente afecta la condición corporal, principalmente en animales después del destete y durante la engorda (Harding, 1996, Allan, et. al. 2000; Segalés, et. al. 2002). También se ha asociado a casos de síndrome de dermatitis y nefropatía porcina (PDNS), enfermedad del complejo respiratorio porcino (PRDC), falla reproductiva (FR) y enteritis granulomatosa (EG), entre otros (Chae, 2004).

Síndromes asociados a circovirus porcino.

Debido a las características particulares del PCV2, no se puede descartar que la aparición de los síntomas clínicos y lesiones esté relacionada con otros factores como el estrés y las condiciones inmunológicas del animal. En este sentido, también se ha confirmado que la presencia de otros microorganismos concomitantes con PCV2, favorece la aparición de formas clínicas y lesiones más severas asociadas a PCV2 (Segalés, et. al. 2002).

PMWS: Se ha descrito una participación primaria del PCV2 en el PMWS por ser asociado consistentemente a cuadros patológicos de la enfermedad (Choi, et. al. 1999; Choi, et. al. 2000; Rosell et. al. 1999; Saoulidis, et. al. 2002; Segalés, et. al. 2002) misma que origina signos clínicos bastante inespecíficos y no siempre evidentes, caracterizados por adelgazamiento rápido, palidez de la piel, leve a moderada, hipertermia, letargo, depresión y emaciación, en algunos casos ictericia, aumento de tamaño de linfonodos (inguinales, maxilares, mesentéricos y mediastínicos principalmente), aparición de trastornos respiratorios leves o moderados y una mayor susceptibilidad a infecciones bacterianas (Allan, et. al. 2000; Kim, et. al. 2001; Segalés, et. al. 2002). El PMWS frecuentemente se ve en combinación con otros patógenos virales y bacterianos tal como el virus del síndrome respiratorio y reproductivo del cerdo (PRRSV), virus de la influenza porcina, parvovirus porcino (PPV), *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* y *Mycoplasma hyopneumoniae* (Kim et al., 2001). Estas coinfecciones pueden confundir y complicar la presentación clínica. Microscópicamente se observa depleción linfocitaria variable en órganos linfoides, necrosis celular de hepatocitos y procesos inflamatorios mononucleares de intensidad leve a moderada en distintos tejidos, principalmente los linfonodos, pulmón, intestino, hígado, riñón y corazón. En dichos procesos es característica la abundante infiltración de macrófagos que con frecuencia forman sincitios celulares y que ocasionalmente llegan a exhibir cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos basofílicos múltiples en racimos en tejidos linfoides y otros tejidos (Allan, et. al. 2000; Segalés, et. al. 2002).

PDNS: Se considera al PDNS como otra patología asociada a la infección por PCV2 el cual fue descrito por primera vez en el Reino Unido en 1993 (Smith, et. al. 1993). Desde entonces han sido reportados casos en Canada, España, Italia, Chile, Holanda, Sudáfrica, Estados Unidos de América y Francia (Helie, et. al. 1995, Van Halderen, et. al. 1995, Ramos-Vara, et. al., Sierra, et. al. 1997, Solignac, 1997, Segalés et. al. 1998). Los cerdos afectados generalmente tienen una edad de 12 a 14 semanas, aunque también se presenta en cerdos de engorda de mayor edad y en cerdos de reemplazo de forma discreta (Chae, 2004); los animales afectados se caracterizan por tener un curso afebril o un curso febril medio, depresión y edema subcutáneo en la región ventrocaudal, pérdida severa de peso y anorexia (Chae, 2004). El curso de la enfermedad es corto y la mayoría de los cerdos infectados mueren dentro de los tres primeros días. La mortalidad en los cerdos afectados es aproximadamente de un 20% (Duran et al., 1997). En animales muy afectados, se encuentran lesiones multifocales en piel, circunscritas, rojo oscuro de forma circular a irregular con un diámetro de 1 a 2 mm en los miembros pelvianos y en el área perianal, así como; riñones pálidos y aumentados de tamaño con hemorragias petequiales corticales (Higgins, 1993). Microscópicamente hay una vasculitis sistémica necrotizante, una glomerulitis exudativa y necrotizante, y una nefritis intersticial (Higgins 1993, Helie et. al. 1995, Segalés et. al. 1998, Thibault et. al. 1998). La patógenia de este síndrome es desconocida, pero las lesiones microscópicas y la presencia de depósitos de inmunoglobulina y de factores de complemento en el bazo y glomérulo renal sugieren que puede ser clasificado como una reacción sistémica de hipersensibilidad tipo III (Higgins 1993, Helie et. al. 1995, Sierra et. al. 1997). La etiología aún no está bien definida, pero hay una fuerte asociación del PCV2 como posible causante de la enfermedad lo cual es reforzado por las fuertes similitudes entre las lesiones de PMWS y PDNS como son la depleción linfoide, la presencia de sincitios, infiltración inflamatoria granulomatosa en tejido linfoide y neumonía intersticial (Allan et. al. 1998) aunado a la frecuente detección del PCV2 por hibridación *in situ* en lesiones de tejido linfoide (Rosell et. al. 2000; Saoulidis et. al. 2002; Segalés et. al. 2002, García Reyna et al., 2003).

PRDC: La enfermedad del complejo respiratorio porcino es un problema de salud serio en cerdos de engorda de entre 16 y 22 semanas de edad y en cerdas reproductoras. Se caracteriza por un crecimiento lento, baja eficiencia alimenticia, letargia, anorexia, fiebre, tos y disnea (Thacker 2001). El papel que juega el PCV2 en PRDC envuelve una interacción o sinergismo con otros factores respiratorios patógenos. Los signos clínicos que se observan en campo son no específicos y variables. En cerdas y marranos de engorda con PCV2 asociado a PRDC se caracteriza por bajo crecimiento, tos prolongada y disnea que es refractaria a la terapia con

antibióticos. Esto es también un incremento en la mortalidad por una o múltiples infecciones bacterianas concurrentes. Histológicamente lo más llamativo consistente de la asociación de PCV2 – PRDC son la neumonía broncointersticial con fibrosis peribronquial y peribronquiolar (Chae, 2004).

FR: Recientemente, el PCV2 ha sido asociado al desarrollo de falla reproductiva en cerdas, asociado a muertes fetales y desórdenes en lechones neonatales. Lo anterior ha sido relacionado principalmente en co-infección con otros agentes etiológicos tales como parvovirus porcino y virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) por lo que el consenso general es que el PCV2 por sí solo no causa falla reproductiva y necesita la participación de otro agente infeccioso (Segalés, et. al. 2002). Consistentemente los signos clínicos en granjas afectadas incluye un aumento de abortos, de fetos nacidos muertos y momias (Josephson and Charbonneau, 2001; Kim et al., 2004; Ladekjaer- Mikkelsen et al., 2001; O' Connor et al., 2001; West et al., 1999). Esta falla reproductiva se caracteriza por abortos casi al término de la gestación con expulsión de fetos nacidos muertos o cerdos prematuros. Los abortos a la mitad de la gestación producen fetos momificados y también ha sido reportada la muerte embrionaria en un estudio reciente en Corea (Kim et al., 2004). Sin embargo, la detección de PCV2 en mortinatos y recién nacidos y la transmisión transplacentaria del virus en ausencia de otros agentes infecciosos y en condiciones experimentales controladas sugieren una participación primaria del PCV2 (Sánchez et al., 2001; Pensaert et al., 2004; Nielsen et al., 2004). También, de manera experimental la inoculación fetal con PCV2 resultó en fallas reproductivas manifestadas por nacidos muertos, momificaciones parciales y lechones nacidos débiles junto con cerdos clínicamente normales (Jonson et al., 2002). Se ha demostrado que el PCV2 puede replicar en el corazón, pulmón, hígado, riñones, encéfalo, bazo y linfonodos de fetos inoculados intrafetalmente a los 57, 75 y 92 días de gestación (d.d.g). Dentro de las lesiones fetales y neonatales más consistentes se encuentran la miocarditis no supurativa y la encefalitis no supurativa asociada a la detección de antígenos de PCV2 (Nielsen et al, 2004). Adicionalmente, las lesiones más severas y la detección de antígeno viral fueron encontradas en lechones infectados a los 57 d.d.g. (Sánchez et al., 2001; Pensaert et al, 2004) justo antes del desarrollo de inmunocompetencia fetal la cual está descrita a los 70 d.d.g. (Pensaert et al, 2004). También se ha detectado la presencia de PCV2 en lechones nacidos vivos a partir de madres infectadas (Allan et al, 2000; Nielsen et al., 2004). La transmisión transplacentaria fue confirmada en lechones nacidos vivos con títulos de anticuerpos frente a PCV2 precalostrales nacidos a partir de una cerda con anticuerpos positivos frente PCV2 e inoculada intranasalmente con PCV2 a los

92 días de gestación. En ese mismo experimento, no se observó transmisión transplacentaria en la cerda con anticuerpos positivos frente PCV2 e inoculada intranasalmente con PCV2 a los 72 días de gestación (Nielsen et al., 2004). Puesto que ambas cerdas fueron inoculadas posteriormente al desarrollo de la inmunocompetencia fetal, es posible que los títulos de anticuerpos maternos hayan marcado la diferencia. Los títulos de anticuerpos frente a PCV2 (31,250) de la cerda inoculada a los 72 d.d.g. fueron considerablemente mayores que los de la cerda inoculada a los 92 d.d.g (6,250). Lo anterior sugiere que la inmunidad materna puede limitar el desarrollo de viremia y consecuentemente puede disminuir las posibilidades de transmisión vertical por lo que la evaluación de la serología frente a PCV2 e incluso la inmunización contra PCV2 previa a la inseminación artificial puede resultar de gran utilidad en el manejo reproductivo y sanitario de las granjas porcinas (Nielsen et al., 2004).

EG. La enteritis granulomatosa es otra manifestación clínica de la infección por PCV2. Hasta el momento sólo 10 casos han sido reportados en ocho piaras de cerdos presentándose una morbilidad del 10 al 20% con una mortalidad del 50 al 60%. La enfermedad se presenta en cerdos entre 40 y 70 días edad los cuales presentan diarrea amarillenta que progresa a negro con retardo del crecimiento. La terapia antibiótica ha sido inefectiva en todos los casos. La característica histopatológica predominante y consistentemente observada es la inflamación granulomatosa y depleción linfoide de las placas de Peyer en intestino grueso y delgado. La inflamación granulomatosa se caracteriza por infiltración de células epitelioides y células gigantes multinucleadas. Otra característica histopatológica típica fue la presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos anfófilos o basófilos largos, múltiples en forma de racimos observados en el citoplasma de macrófagos y células gigantes multinucleadas. En dichas lesiones se aprecian señales de hibridación positivas a PCV2 en el citoplasma de células histiocíticas y células gigantes multinucleadas. Por tal motivo los tres criterios para el diagnóstico de PCV2 asociado a enteritis granulomatosa son la presencia de diarrea, la presencia de lesiones microscópicas características en las placas de Peyer, sin afectar los linfonodos y detectar la presencia de PCV2 dentro de esas lesiones. Lo anterior dificulta la diferenciación entre el PCV2 asociado con enteritis y el PMWS clínica e histopatológicamente. Si las lesiones microscópicas características de circovirus porcino son observadas en linfonodos el caso definitivamente debe diagnosticarse como PMWS. De cualquier modo es necesario realizar estudios posteriores para determinar si la enteritis granulomatosa asociada a PCV2 constituye una entidad patológica diferente clínicamente para que la enfermedad sea considerada en el

diagnóstico diferencial de enfermedades diarreicas en cerdos en crecimiento y a término que no responden al tratamiento con antibióticos (Chae, 2004).

Circovirus en México

La presencia de PCV2 en México ha sido reportada en animales con PMWS y PDNS (Trujano, et al, 2001; García-Reyna et al., 2003; García-Reyna et al. 2004a) mediante hibridación *in situ* (HIS) en tejidos afectados con lesiones características de circovirus porcina. Con respecto a la falla reproductiva, se han observado muertes neonatales de lechones de alrededor de 3 días de nacidos en camadas selectas de granjas de cerdos sin historia ni evidencia serológica de enfermedades que cursan con trastornos reproductivos tales como PRRS y parvovirus. Los lechones de dichas camadas presentaron lesiones sugestivas de circovirus fetal y neonatal tales como miocarditis, hepatitis y encefalitis no supurativas. Adicionalmente, en tejido linfoide se observó una marcada apoptosis multifocal significativamente diferente a la observada en lechones sanos de la misma edad. En dichos lechones se detectó la presencia de PCV2 por aislamiento viral, PCR (García-Reyna et al., 2004a, García-Reyna et al., 2004c) e hibridación *in situ* y en la granja referida es común la frecuencia de camadas afectadas.

Transmisión y patogenia

Se considera que la vía aerógena es la ruta más probable de transmisión natural de PCV2 entre cerdos (Resendes et al., 2001a). En lechones infectados de forma natural o experimental se ha detectado en heces, orina, saliva y secreciones oculares; por lo que es probable que éstas puedan ser vías de excreción del virus (Krakowka et al., 2000; Calsamiglia et al., 2001; Resendes et al., 2001; Sibila et al., 2001b).

El PCV2 se localiza principalmente en las células de la línea monocito/macrófago, así como en otras células presentadoras de antígeno (Rosell et al., 1999). En sangre periférica las alteraciones son similares a las detectadas en los órganos linfoides, donde se observa una disminución en linfocitos T (especialmente linfocitos CD4+ y CD8+) y linfocitos B, así como un aumento de los monocitos circulantes (Segalés et al., 2000; Darwich et al., 2000). En el PMWS, la enfermedad se inicia unas 2-3 semanas después del destete, en cerdos de entre 8-13 semanas de edad (Harding y Clark, 1997; Madec et al., 2000) y la morbilidad varía entre 5 y 10% (Clark y Harding, 1998) con mortalidad variable que oscila entre 4 y 20% (Clark y Harding, 1998; Segalés *et al.*, 2000b).

Diagnostico

La detección de PCV2 en sí mismo no necesariamente confirma el diagnóstico de circovirus porcina ya que debe hacer frente a tres criterios: (i) presencia de signos clínicos compatibles, (ii) presencia de lesiones microscópicas características y (iii) la presencia de PCV2 con estas lesiones. Estos tres criterios separados no son diagnóstico de circovirus porcina (Choi and Chae, 1999; Choi et al., 2000; Kim and Chae, 2001b).

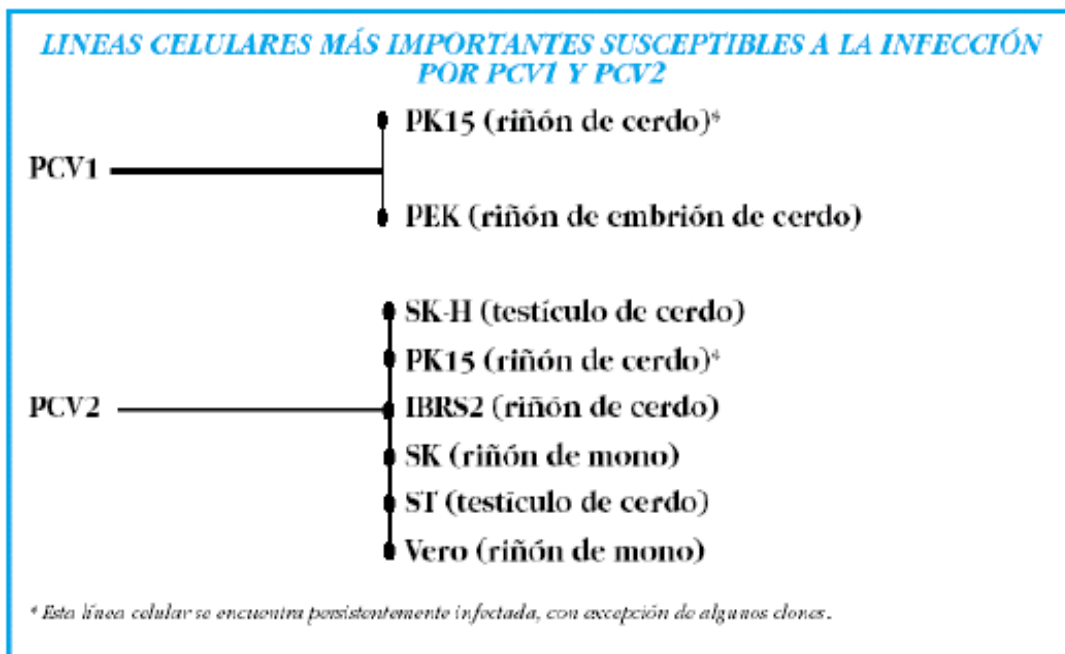
Las técnicas que se utilizan actualmente son:

- **Aislamiento vírico** (células susceptibles).

El aislamiento de PCV1 y PCV2 se realiza por inoculación de macerados de muestras sospechosas sobre cultivos primarios de macrófagos y líneas celulares sensibles de riñón de cerdo, como la línea PK-15, asegurándose que éstas no se encuentran persistentemente infectadas. Como los Circovirus no producen efecto citopático, la replicación viral se observa mediante el empleo de técnicas de detección viral, principalmente inmunohistoquímica o PCR. (<http://www.sanidadanimal.info/curso/5/5-circovirus.htm>).

Tabla 1.

Líneas celulares más importantes susceptibles a la infección por PCV1 y PCV2.



(<http://www.sanidadanimal.info/curso/5/5-circovirus.htm>)

- **ELISA** (detección de anticuerpos específicos).

Recientemente se ha desarrollado un ELISA de captura que emplea anticuerpo monoclonal específico de PCV2. Este ELISA detecta positivamente aislados de PCV2 de distintos países,

con resultados de positividad comparables a los títulos de infectividad de estos virus, en cultivos celulares de PK15. La sensibilidad de este método es algo inferior a las técnicas de IHQ y como era de esperar, significativamente menor a la obtenida empleando distintos métodos de PCR descritos, ya que el ELISA requiere de la presencia de grandes cantidades de antígenos virales en la muestra. Este hecho, a priori podría suponer una desventaja del método, pero sin embargo un estudio reciente demuestra que tiene capacidad para detectar todos los animales experimentalmente inoculados con PCV2 y que manifiestan signos clínicos de enfermedad o lesiones histológicas, donde existen grandes cantidades de virus en tejidos.

- **Inmunohistoquímica** (detección de antígenos virales).

Permite la detección de antígenos virales sobre improntas de tejido fijadas en acetona, cortes de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, o cultivos celulares inoculados. Es una técnica rápida, emplea de 5 a 6 horas hasta la obtención de resultados, y de sensibilidad muy elevada, en algunos estudios incluso superior a la hibridación *in situ*. La técnica emplea un anticuerpo policlonal o monoclonal específico frente a cada Circovirus en cuestión, que reacciona con los antígenos virales de la muestra. La detección se realiza mediante un anticuerpo secundario conjugado con una enzima o complejo enzimático.

- **PCR.**

La técnica de PCR permite la detección de PCV1 o de PCV2 por amplificación de un fragmento específico de su ácido nucleico, a partir de muestras de suero o macerados de órganos de los animales sospechosos, así como tejidos embebidos en parafina. Se han desarrollado distintas técnicas de detección virológica por PCR para Circovirus porcinos, entre las que cabe destacar la PCR múltiple, método que permite la detección simultánea y caracterización de PCV1 y PCV2 en una sola reacción de PCR. La reacción de PCR en este caso emplea dos parejas de "primers" o iniciadores para PCV1 y PCV2, que amplifican productos específicos de 180 y 300 pb respectivamente. Hay que tener en cuenta que un mismo animal puede resultar infectado por ambos tipos de Circovirus a un mismo tiempo. Las técnicas de PCR son rápidas, específicas y permiten realizar un diagnóstico fiable de la presencia de PCV1 y/o PCV2, así como llevar a cabo los estudios epidemiológicos a gran escala, que están permitiendo conocer la incidencia real de estos virus entre la población porcina y clarificar su importancia real como patógeno concomitante. Su elevada sensibilidad limita sin embargo su uso como herramienta diagnóstica de patógenos endémicos, que como PCV2 con frecuencia cursan de forma subclínica. Un resultado positivo de PCV2 por PCR en animales enfermos no significa

necesariamente que la enfermedad esté relacionada con PCV2. El desarrollo de técnicas de PCR cuantitativas podría en este caso aportar una mayor información diagnóstica.

- **Hibridación in situ.**

Permite la detección del genoma viral directamente sobre los tejidos infectados. La técnica se realiza de forma similar a la IHQ, utilizando sondas de DNA específicas que híbridan con fragmentos de genoma presentes en muestras sospechosas de contener PCV1 y/o PCV2, dependiendo de la sonda empleada. La sonda normalmente lleva una molécula diana anclada, que será posteriormente reconocida por un anticuerpo específico conjugado con una enzima o un complejo enzimático. La sensibilidad de la técnica respecto a la técnica de Inmunohistoquímica depende de la sonda empleada (<http://www.sanidadanimal.info/curso/5/5-circovirus.htm>).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Correlacionar las lesiones histopatológicas con los resultados de la hibridación *in situ* con el fin de determinar el valor diagnóstico de la histopatología como prueba de tamizaje en el diagnóstico de circovirus porcina.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar la evaluación HP de tejidos linfoides de casos compatibles con circovirus porcina para determinar la presencia de lesiones características y determinar el grado de severidad de las mismas en los diferentes tejidos linfoides colectados.
- Implementar un protocolo de Hibridación *in situ* para el diagnóstico de PCV2.
- Correlacionar las lesiones histopatológicas con los resultados de la hibridación *in situ* con el fin de establecer un patrón histológico y determinar el mejor criterio microscópico para el diagnóstico de circovirus porcina.
- Determinar el patrón de HIS en los diferentes síndromes asociados a circovirus porcina diagnosticados en el estudio.

MARCO TEÓRICO

En la actualidad, el diagnóstico específico de enfermedades infecciosas es prioritario porque permite la implementación adecuada de programas de control y prevención, establece la prevalencia de enfermedades en cada especie animal o región geográfica determinada y detecta a las enfermedades de reciente descripción.

La hibridación *in situ* (HIS) es la detección específica de la presencia de ácidos nucleicos en secciones de tejidos, la cual combina a la perfección los conocimientos básicos de histopatología con las modernas técnicas de biología molecular. La HIS es particularmente útil en el diagnóstico de enfermedades infecciosas debido a su alta especificidad y sensibilidad. Los métodos modernos indirectos de HIS utilizan digoxigenina (DIG) como marcador. La DIG es un esteroide que se obtiene de *Digitalis purpurea* y *Digitalis lanata*. Debido a que éstas son la única fuente natural de DIG, los anticuerpos contra DIG no se unen a otro material biológico. Esto permite que las sondas hibridizadas puedan ser detectadas con alta afinidad por los anticuerpos anti-DIG conjugados con fosfatasa alcalina, peroxidasa, fluoresceína u oro coloidal (Boehringer Mannheim 1996; Brown, C. 1998; Herrington, *et. al.* 1992; Mullink, *et. al.* 1989; Speel, *et. al.* 1994).

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

Los tipos de sondas empleadas en la HIS pueden ser cadenas cortas de oligonucleotidos, preferentemente de 20-25 bases, que se denominan oligosondas, sondas de ADN complementario (cADN) generado mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y ribosondas. Las sondas obtenidas por PCR tienen la ventaja de que su producción es relativamente fácil y automatizada y permite la optimización del tamaño de las sondas de hibridación. Adicionalmente, estas sondas pueden marcarse de manera eficiente mediante la incorporación de nucleótidos marcados durante la PCR por lo que se puede producir grandes cantidades de sondas a partir de cantidades mínimas de ADN genómico o de plásmidos linearizados. En la PCR, los dos iniciadores hibridizan en secuencias específicas de los extremos opuestos de las cadenas de ADN. Posteriormente, una polimerasa termoestable (Taq polimerasa) amplifica los dos iniciadores en una serie repetitiva de ciclos lo cual resulta en una acumulación exponencial de copias. Además, el tamaño de la sonda amplificada puede ser

definido en las terminaciones 5' de los iniciadores permitiendo una producción sencilla de sondas de un tamaño requerido (Boehringer Mannheim. 1996).

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

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental

Para la correlación de lesiones histopatológicas y patrones de hibridación *in situ* se utilizaron tejidos linfoides de 30 lechones con manifestaciones clínicas sugestivas de circovirus porcina, las cuales consistieron en retraso en el crecimiento, emaciación progresiva, depresión y aumento de tamaño de linfonodos superficiales acompañados en la mayoría de los casos con trastornos respiratorios leves o moderados. Adicionalmente, también fueron incluidos lechones que presentaron la mayoría de los signos descritos con presencia de dermatitis necrotizante multifocal. Los tejidos se fijaron en formalina amortiguada al 10% con inclusión en parafina para el diagnóstico histopatológico de lesiones compatibles con circovirus porcina considerando la presencia de depleción linfoide, proliferación histiocítica, sincitios celulares y cuerpos de inclusión característicos. Posteriormente, en ensayos ciegos, los tejidos se sometieron a protocolos de hibridación *in situ* utilizando una sonda específica para PCV2 derivada de PCR y marcada con digoxigenina, con el fin de establecer los patrones de distribución del virus. Los resultados de ambas evaluaciones se agruparon en un cuadro de 2X2 para determinar los valores de especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo del estudio histopatológico frente a la hibridación *in situ*. Adicionalmente se realizó de manera descriptiva mediante el uso de tablas los patrones histológicos y de hibridación *in situ* que resultaron más relevantes para el diagnóstico de circovirus porcina.

Patología

Se procesaron muestras de bazo, tonsilas, linfonodos superficiales y placas de Peyer. Los tejidos se fijaron inmediatamente en formalina amortiguada al 10% durante 24-48 horas para su inclusión en parafina mediante métodos rutinarios. De los bloques se obtuvieron secciones de tres μm y se utilizaron para la tinción de hematoxilina y eosina y protocolos de HIS.

Extracción de ADN

Para la obtención del templado para la PCR empleada para la síntesis de la sonda se realizaron cortes con un grosor de tres micras a partir de bloques de parafina de tejidos que exhibieron las lesiones características de circovirus porcina. Los cortes se colocaron en tubos Eppendorf de dos mililitros estériles y se desparafinaron en dos pases de xilol (1000 μl) de 5 minutos cada uno, se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos en cada pase y se rehidrataron en un pase de 5 minutos en alcohol etílico absoluto (EtOH 100%), se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos y un pase de EtOH al 70%, se centrifugaron a 12000 rpm durante

5 minutos. Se decanto el EtOH al 70%. Posteriormente, se dejó secar la muestra a temperatura ambiente o en estufa (36° C), hasta eliminar cualquier residuo de alcohol y se agregaron 500 µl del amortiguador de digestión (Tris 10mM pH 8.5, EDTA 1mM, Tween 20 al 0.5% con 200 µg/ml de proteinasa K) y se incubo por 3 horas a 56° C para lograr la desnaturalización de las proteínas. Transcurrido el tiempo de incubación se agregó 700 µl de alcohol isoamílico-cloroformo (1:24), se agito por 10 segundos y se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos teniendo como objetivo acabar de digerir las proteínas y separarlas del ADN. Posteriormente, se transfirió el sobrenadante a otro tubo Eppendorf estéril, evitando tomar la interfase, se agregó 350 µl de isopropanol y se mantuvo a -20° C por 30 minutos seguido de una centrifugación durante 10 minutos a 12000 rpm. Se decanto el sobrenadante y posteriormente se lavo el botón obtenido con 500 µl de EtOH 70% y después con 500 µl de EtOH 100%, centrifugando a 12000 rpm durante 5 minutos entre cada lavado. Se decanto el sobrenadante. El ADN se dejó secar y se resuspendió en 35-40 µl de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) o agua grado biología molecular (Eppendorf, Hamburg, Germany) y se congeló a -20° C hasta su uso. La concentración del ADN genómico se cuantificó por medio de un espectrofotómetro.

Producción y Marcaje de la sonda

La producción de la sonda de cADN se obtuvo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un volumen total de 50 µl utilizando los iniciadores PCV7 y PCV10 publicados por Rosell, et al. 1999 con condiciones de amplificación pre-establecidas en el laboratorio utilizando un marcaje directo utilizando un kit comercial (PCR DIG Probe synthesis Kit, Roche Biochemical, Diagnostic, Mannheim, Germany). Durante el marcaje de la sonda se emplearon dos controles, uno no marcado en los que se utilizó el mismo templado de CVP2 empleado en la sonda marcada y otro marcado (control de marcaje) en el que se utilizó el templado de Activador de Plasminógeno Tisular (tPA) proporcionado en el kit comercial. Los tubos fueron identificados y se realizaron las mezclas como se describe en la tabla 1. Posteriormente, una vez realizadas las mezclas se procedió a la PCR utilizando un termociclador MasterCycler (Eppendorf, Hamburg, Germany), empleando las condiciones de amplificación referidas en la tabla 2. La visualización de los productos amplificados se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con solución amortiguadora Tris 1M, ácido bórico anhidro 1M, Na₂ EDTA 2H₂O 20M (TBE, Promega Corp. Madison, WI, USA) teñido con 4 µl de bromuro de etidio (Promega Corp. Madison, WI, USA). En el llenado de los pozos se utilizaron 5 µl de cada mezcla con 5 µl del amortiguador de corrida (Glycerol 50% v/v, Na₂ EDTA 2H₂O 100mM, duodecil sulfato de sodio 1% w/v, azul de bromofenol 0.1% w/v) y un marcador de peso molecular (PCR marker,

Promega Corp, Madison WI, USA). El gel se corrió a 90 volts durante 40-50 minutos y los productos se visualizaron en un transiluminador de luz UV (Apollo, Instrumentation, Claremont CA.,USA).

TABLA 2.

Condiciones de amplificación seleccionadas para la reacción (marcaje de la sonda ADN).

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

TABLA 3.

Programa de amplificación PCR para PCV2.

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

Hibridación *in situ*

Desparafinización

Los cortes de tejidos de tres μm se colocaron en portaobjetos Probe On Plus (Fisher Scientific, Pittsburg, USA). Las laminillas se calentaron en una plancha a 60°C por 30 minutos aproximadamente, se colocaron en las canastillas y se desparafinaron de manera rutinaria con xilol realizando 3 pases de 5 minutos cada uno y se rehidrataron en gradientes de EtOH; dos veces durante 5 minutos en EtOH 100%, dos minutos en EtOH 95% y 2 minutos en EtOH70%.

Digestión

Se colocaron las laminillas en el soporte de la estación de trabajo Fischer Microprobe (Fisher Scientific, Pittsburg, USA) y se introdujeron en Automation buffer™ 1x (Biomedica Corp., Foster City CA. USA) durante un minuto, se secaron en papel absorbente. Posteriormente se digirieron con pepsina al 0.25% pH 2.0 por 10 minutos a 37°C y posteriormente 8 minutos a 105°C , en una estación de trabajo Fisher Microprobe, se secaron. La digestión se detuvo con 4 lavados en automatión buffer™ 1x secando entre cada uno de ellos, se introdujeron en formamida al 100%, 5 minutos a 105°C , se secaron.

Hibridación

La hibridación se realizó con $2\mu\text{l}$ de la sonda de cDNA específica para PCV2 y $200\mu\text{l}$ de solución de hibridación para cada par de laminillas y se incubo 5 minutos a 105°C e inmediatamente 60 minutos a 37°C .

Detección

Las laminillas se lavan 3 veces en solución salina de citratos al 0.5x, (Promega Corp. Madison, WI, USA), 3 veces en solución salina de citratos al 0.2x, secando entre cada lavado. Posteriormente se incubaron con la solución salina de citratos al 0.2x por 5 minutos a 37°C , secar. Las laminillas se introducen en amortiguador 1 (NaCl 0.15M, Tris HCl 0.1M, pH 7.5) suplementado con 0.3% de Triton X-100 (Fisher Scientific, Pittsburg, PA) y 1% de suero de borrego, secar.

La detección se realizó mediante la incubación por 45 minutos a 37°C con anti-DIG-AP (Roche Applied Sciences, Mannheim, Germany), dilución 1:500 en amortiguador 1 con 0.3% de Triton-X-100 y 1% de suero de borrego secar, lavar 6 veces en amortiguador 1, secando entre cada uno de ellos. Remover las laminillas del soporte y agitarlas en Automation buffer™ durante 2 minutos. Colocar nuevamente las laminillas en el soporte (revisar que no se formen burbujas),

secar. Se introducen las laminillas en amortiguador 2 ($MgCl_2$ 0.06M, NaCl 0.12M, Tris 0.1M pH 9.5) suplementado en el momento de ser utilizado con Tween 20 al 0.4% (Hycel de México SA. De CV), y Brij 35 (Fisher Scientific, Pittsburg, USA) al 0.25%.

Revelado

Se realiza una mezcla de amortiguador 2 con NBT-BCIP (Roche Applied Sciences, Mannheim, Germany) incubándose durante 30-60 minutos hasta que se revele. Detener la reacción con agua destilada, secar y remover las laminillas del soporte.

Teñido y Montaje

Se introducen las laminillas en verde rápido durante 5 minutos, se realiza 1 pase en agua destilada, 1 pase en EtOH 70%, 1 pase en EtOH 95% y 1 pase en EtOH 100%. Posteriormente las laminillas se montan en medio permanente con Entellan (Merk, Hamburg, Germany).

Análisis de resultados

Los valores obtenidos de las evaluaciones histopatológicas y de la HIS se agruparon en un cuadro de contingencia de 2X2 para el calculo de los valores de sensibilidad, especificidad, índice predictivo positivo, índice predictivo negativo, índice de falsos positivos e índice de falsos negativos de la prueba de HP frente a la HIS utilizando las siguientes fórmulas (Duncan, 2005):

		HIS		Total
		Positivo	Negativo	
HP	Positivo	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a + b</i>
	Negativo	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>c + d</i>
Total		<i>a + c</i>	<i>b + d</i>	Gran total

- Positivo verdadero (*a*) = Proporción de tejidos HP positivos, en donde el resultado de HIS será positivo.
- Falso positivo (*b*) = Proporción de tejidos HP positivos, en donde el resultado de HIS será negativo.
- Falso negativo (*c*) = Proporción de tejidos HP negativos, en donde el resultado de HIS será positivo.

- Negativo verdadero (a) = Proporción de tejidos HP negativo, en donde el resultado de HIS será negativo.
- Sensibilidad = $\frac{a}{a+c} \times 100$
- Especificidad = $\frac{d}{b+d} \times 100$
- Índice de falsos negativos (I.F.N.) = $\frac{c}{a+c} = \%$
- Índice de falsos positivos (I.F.P.) = $\frac{b}{b+d} = \%$
- Valor predictivo positivo (V.P.P.) = $\frac{a}{a+b} \times 100$
- Valor predictivo negativo (V.P.N.) = $\frac{d}{c+d} \times 100$

RESULTADOS

Los tejidos linfoides procedentes de los 30 lechones con signos clínicos sugestivos de circovirus porcina se evaluaron histológicamente para establecer los criterios microscópicos descritos en la metodología. Dichos hallazgos y grados de severidad de las lesiones observadas se agrupan en la tabla 4. De este modo, los 30 nodos linfáticos que se evaluaron presentaron diversos grados de depleción linfoide siendo en su mayoría de moderada a severa (M/S) a severa (25/30). Así mismo la proliferación histiocítica que presentaron fue de moderado a M/S (16/30) y la presencia de sincitios en este tejido vario de leve a moderado (18/30). Se remitieron 28 muestras de bazo las cuales presentaron depleción linfoide con proliferación histiocítica de moderada a M/S (25/28 y 20/28, respectivamente) y presencia de sincitios leve a moderada (19/28). De los 30 casos evaluados sólo en 12 se remitieron tonsilas las cuales presentaron depleción linfoide leve a moderada (11/12) y proliferación histiocítica leve (6/12). La presencia de sincitios en tonsilas fue leve (5/12). Las figuras representativas de los criterios histológicos evaluados se aprecian en las figuras 1, 2, y 3. La presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos característicos de circovirus se observó sólo en el 10% de los casos evaluados y se observaron tanto en bazo como en nodos linfáticos (Figura 4).

Los resultados obtenidos de la evaluación histopatológica y de la HIS se presentan en la tabla de contingencia de 2x2 (tabla 5). Con base a estos resultados y aplicando las fórmulas se obtuvo un 100% de sensibilidad, 71.42 % de especificidad, un índice de falsos negativos del 0 % y un índice de falsos positivos del 0.28%. El valor predictivo positivo fue de 92.0 % y el valor predictivo negativo correspondió al 100%. Cabe señalar que los cinco casos negativos verdaderos (negativos por ambas pruebas) corresponden a los casos que resultaron negativos a la presencia de sincitios celulares en nodos linfáticos, bazo y tonsilas (tabla 4). Los dos casos falsos positivos por histopatología presentaron proliferación histiocítica y presencia de sincitios leve.

Una vez que se realizaron las evaluaciones microscópicas de los tejidos linfoides con los datos de historia clínica y las lesiones observadas en otros tejidos derivadas de vasculitis necrotizante (dermatitis y glomerulitis supurativa) se diagnosticó el síndrome asociado a circovirus de los casos positivos para determinar el patrón de HIS que presentaron. Los casos así agrupados se muestran en la tabla 6. De este modo, el 60% de los casos evaluados corresponden a PMWS los cuales de manera característica exhibieron una depleción linfoide severa con proliferación histiocítica moderada, presencia de sincitios moderada a severa y un patrón de HIS de distribución difusa. Las imágenes representativas de los casos de PMWS se aprecian en las figuras 5, 6, 7 y 8. Por otro lado, el 16.6% de los casos corresponde a PDNS los

cuales exhibieron una depleción linfoide moderada-severa, proliferación histiocítica leve-moderada, presencia leve de sincitios y una distribución multifocal de la señal de hibridación (figuras 9, 10, 11, 12). El 23.33% restante corresponde a los casos que resultaron negativos a la HIS.

TABLA 4.

Resumen de los hallazgos histopatológicos y grado de severidad en los diferentes tejidos linfoides incluidos en el estudio

Hallazgos microscópicos	NL*		Bazo		Tonsila	
	30 Casos		28 Casos		12 Casos	
	Grado	No.	Grado	No.	Grado	No.
Depleción linfoide	Leve	1	Leve	1	Leve	3
	Moderado	4	Moderado	12	Moderado	8
	M/S**	8	M/S	13	M/S	0
	Severo	17	Severo	2	Severo	1
	Negativo	0	Negativo	0	Negativo	0
Proliferación Histiocítica	Leve	4	Leve	1	Leve	6
	Moderado	8	Moderado	8	Moderado	3
	M/S	8	M/S	12	M/S	0
	Severo	6	Severo	4	Severo	0
	Negativo	4	Negativo	3	Negativo	3
Sincitios	Leve	12	Leve	12	Leve	5
	Moderado	6	Moderado	7	Moderado	1
	M/S	6	M/S	2	M/S	0
	Severo	1	Severo	1	Severo	0
	Negativo	5	Negativo	6	Negativo	6

* NL = Nodo linfático

** M/S= Moderado/ Severo

TABLA 5.

Cuadro de contingencia de 2X2 para los valores obtenidos de las evaluaciones histopatológicas y de los resultados de la HIS

		HIS*		Total
		Positivo	Negativo	
HP**	Positivo	23	2	25
	Negativo	0	5	5
Total		23	7	30
				Gran total

*HIS= Hibridación *in situ*

**HP = Histopatología

TABLA 6.

Resumen de los hallazgos histopatológicos evaluados en los tejidos linfoides y los patrones de HIS con respecto a los síndromes asociados a circovirus porcina diagnosticados en el estudio.

Hallazgos Microscópicos	PMWS 18 Casos (60%)	PDNS 5 Casos (16.6%)
Depleción linfoide	Severa	Moderada-severa
Proliferación histiocítica	Moderada	Leve-moderada
Sincitios	Moderada-severa	Leve
Distribución del virus en HIS	Difuso	Multifocal

El 23.33% restante de los casos corresponde a los 7 casos negativos a la prueba de hibridación *in situ*.



Figura 1. Depleción linfoide severa con proliferación histiocítica leve- moderada difusa.
Bazo. Hematoxilina Eosina 10x. PMWS.

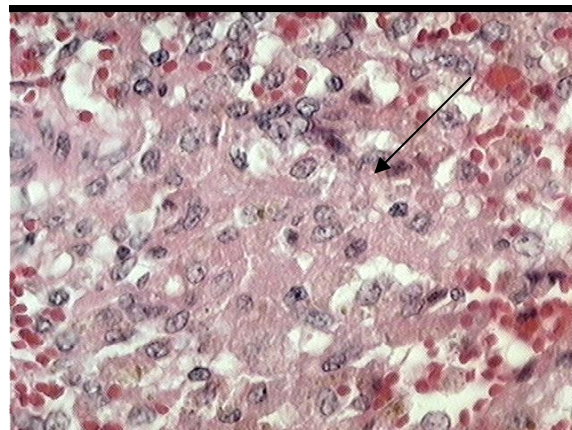


Figura 2. Depleción linfoide severa con proliferación histiocítica leve- moderada.
Bazo. Hematoxilina Eosina 40x. PMWS.

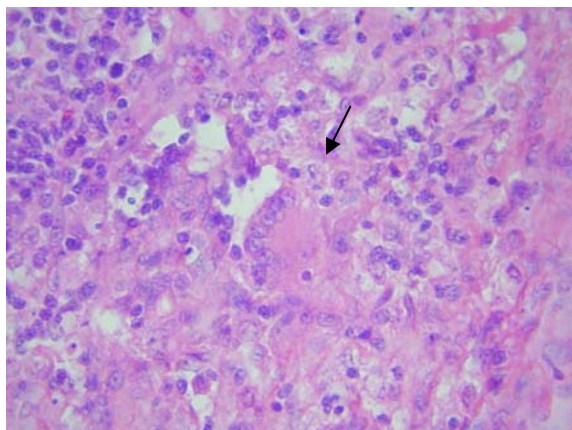


Figura 3. Sincitios

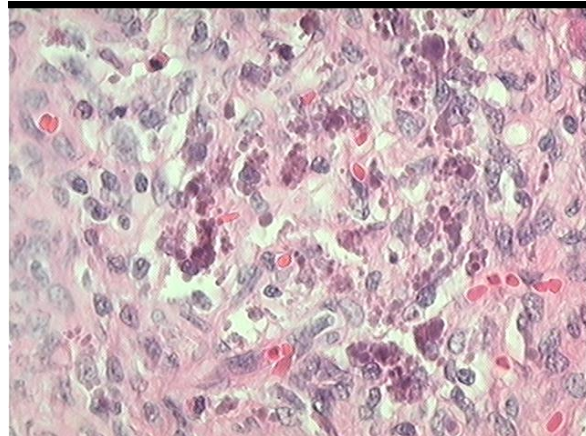


Figura 4. Cuerpos de inclusión.

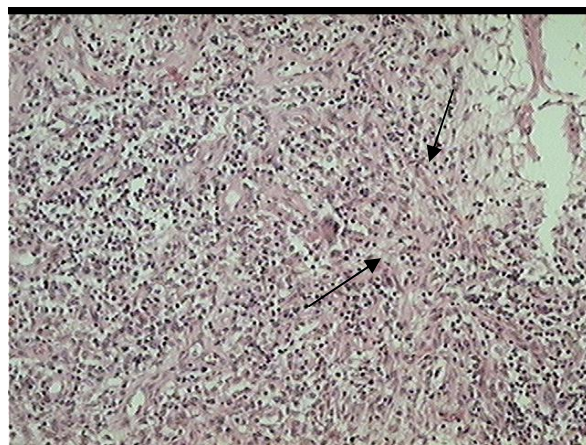


Figura 5. Depleción linfoide difusa severa con proliferación histiocítica moderada.
Linfonodo. Hematoxilina Eosina 10X.

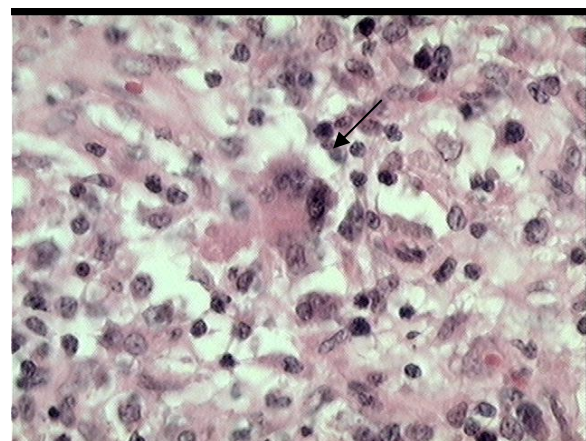


Figura 6. En este acercamiento se observa claramente un sincitio en un campo de depleción linfoide. Linfonodo. Hematoxilina Eosina 40X.

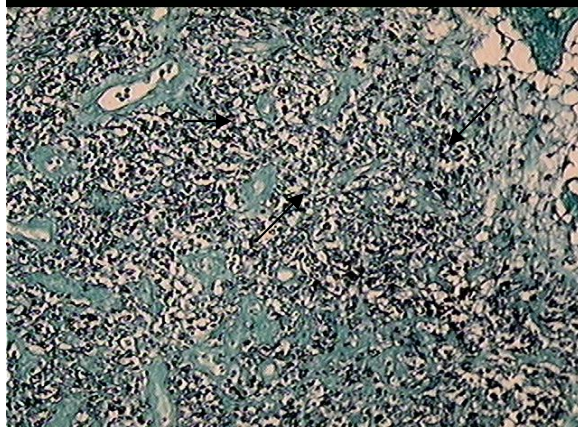


Figura 7. Señal de hibridación intensa difusa.
Linfonodo. Hibridación *in situ*. Tinción verde rápido 10X.

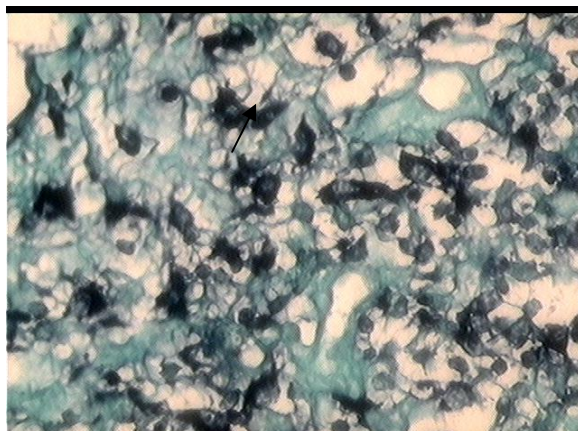


Figura 8. Señal de hibridación intensa en citoplasma.
Linfonodo. Hibridación *in situ*. Tinción verde rápido 40X.



Figura 9. Señal de hibridación intensa difusa.
Bazo. Hibridación *in situ*. PMWS. Tinción verde rápido 10x.

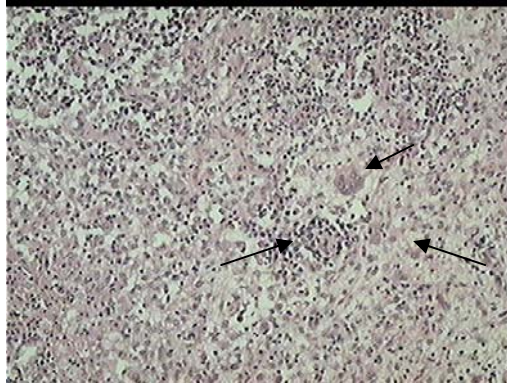


Figura 10. Se observa depleción moderada con proliferación histiocítica difusa leve-moderada además de sincitios.

Linfonodo. PDNS. Hematoxilina Eosina 10X.

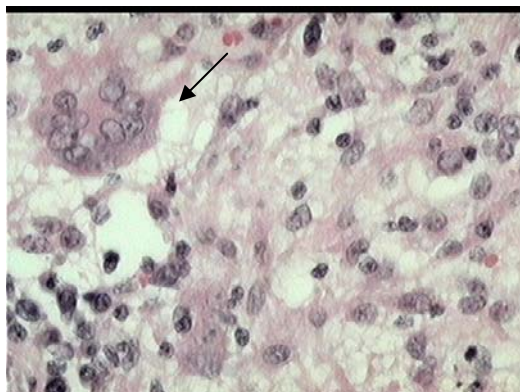


Figura 11. Acercamiento de sincitios en el extremo superior izquierdo.

Linfonodo. PDNS. Hematoxilina Eosina 40X.

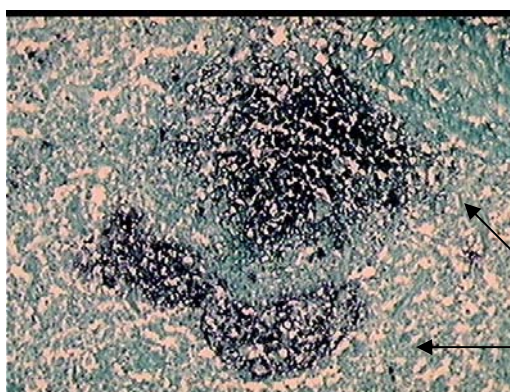


Figura 12. Señal de hibridación multifocal muy intensa.

Linfonodo. Hibridación *in situ*. PDNS. Tinción verde rápido 10X.

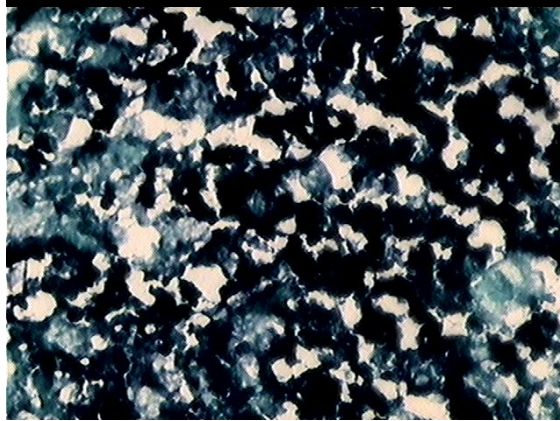


Figura 13. Señal de hibridación intensa intracitoplasmática.
Linfonodo. Hibridación *in situ* PDNS. Tinción verde rápido 40X.

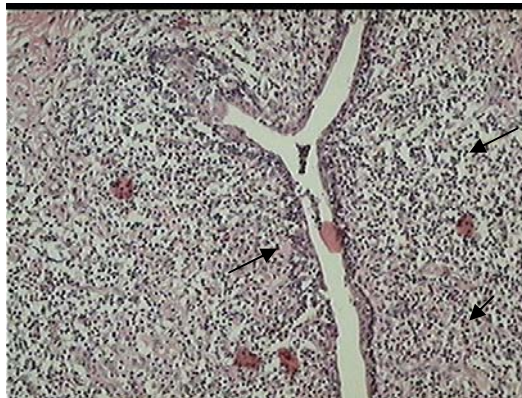


Figura 14. Depleción linfoide leve- moderada con proliferación histiocítica leve multifocal.
Tonsila. PDNS. Hematoxilina Eosina 10x.

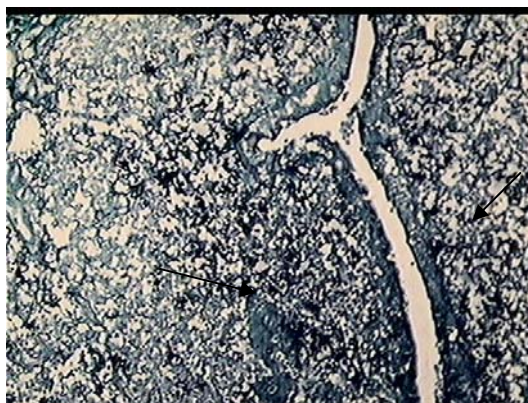


Figura 15. Señal de hibridación multifocal intensa.
Tonsila. Hibridación *in situ*. PDNS. Tinción verde rapido10x.

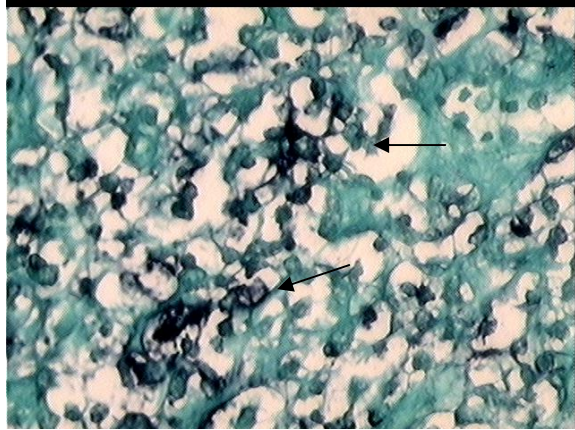


Figura 16. Señal de hibridación intracitoplasmático.
Tonsila. Hibridación in situ. Tinción verde rápido 40x

DISCUSIÓN

En el diagnóstico de PCV2 los tejidos frescos o congelados no siempre son disponibles para el diagnóstico. Por otro lado, la fijación en formol e inclusión en parafina es un método estándar de conservación de tejidos que permite utilizarlos inmediatamente o conservarlos por años para su posterior uso en procedimientos diagnósticos (Chae., 2004). Tal es el caso de la histopatología y de la hibridación *in situ* los cuales forman parte de los principales criterios diagnósticos de la circovirus.

El PCV2 se caracteriza histopatológicamente por inflamación granulomatosa con presencia de células gigantes multinucleadas (sincitios celulares) y un número variable de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos basofílicos múltiples (Kim y Chae, 2004). Estos últimos se reportan en el 10% de los casos (Rosell et al., 1999). La detección del PCV2 habitualmente se observa en el citoplasma, y más raramente en el núcleo de macrófagos y células gigantes multinucleadas de los tejidos linfoides de cerdos afectados de circovirus porcina (Clark, 1997, Rosell et al., 1999; Krakowka et al., 2000). Por otro lado, a pesar de la marcada depleción linfocitaria observada en casos intensos de circovirus porcina, el PCV2 no se detecta prácticamente en linfocitos. Desde un punto de vista clínico, existe una marcada correlación entre la severidad de la sintomatología clínica, la intensidad de las lesiones microscópicas en órganos linfoides y la cantidad de PCV2 en las mismas (Krakowka et al., 2001; Quintana et al., 2001, Rovira et al., 2002).

Por tal motivo, en el presente trabajo la evaluación microscópica y la detección de PCV2 se realizaron en tejidos linfoides puesto que son el blanco de infección por PCV2. Se encontró que en todos los tejidos linfoides evaluados (nodo linfático, bazo y tonsila) que se determinaron positivos a circovirus por HP se presentaron los criterios microscópicos de depleción linfoide, proliferación histiocítica y en la mayoría de los casos la presencia de sincitios. Por otro lado, los cuerpos de inclusión, aunque característicos, al igual que en otros estudios no constituyeron un criterio diagnóstico importante para descartar o confirmar la circovirus porcina ya que solo se presentaron en un bajo porcentaje de los casos (10%). De este modo los resultados de histopatología están en congruencia con lo descrito en la literatura.

Con respecto al grado de severidad y la distribución de lesiones en tejido linfoide en los casos de circovirus porcina se menciona que probablemente depende del estado de la enfermedad en los cerdos afectados (Rosell et al. 1999) y de la carga viral en los tejidos infectados (Chae, 2004; Huerta., G. 2005). En el presente estudio se observó que las muestras de nodo linfático presentaron consistentemente depleción linfoide de forma severa, proliferación

histiocítica moderada y presencia moderada a severa de sincitios celulares mientras que de manera general las muestras de bazo exhibieron una tendencia a presentar lesiones más moderadas e incluso leves. Las lesiones en tonsilas fueron más inconsistentes ya que el rango de lesiones fue muy variado aunque con una tendencia moderada; sin embargo hay considerar que sólo se evaluaron 12 cortes de tonsilas. En estudios similares, la detección de PCV2 en lesiones características fue mayor en nodos linfáticos (Rosell, et al.1999). Por tal motivo, las muestras de nodos linfáticos tienen un mayor valor diagnóstico por presentar consistentemente y con mayor severidad las lesiones características ya que esto incrementa la probabilidad de detección del PCV2 en las mismas.

La depleción linfoide es una lesión que se observa en diversas enfermedades virales que conducen a inmunosupresión tales como la infección por el virus de PRRS (Rosell, C., Segalés, J., 1999, Choi and Chae., 2001) o incluso en casos de fiebre porcina clásica (Morrilla, G. A., Carvajal. V. M., 2003), entre otros. Sin embargo, también forma parte de los criterios histológicos descritos para circovirus (Rosell et. al. 1999) y estuvo presente en todos los casos evaluados en la presente revisión; es decir se observó tanto en casos positivos como en casos negativos por HIS. Por tal motivo, la depleción linfoide a pesar de ser un criterio microscópico importante en el diagnóstico de circovirus porcina por si sola no debe ser considerada como un fuerte criterio de diagnóstico HP. Por otro lado, es importante remarcar que los negativos verdaderos de este estudio fueron aquellos en los que no estuvieron presentes los sincitios celulares en nodos linfáticos, bazo y tonsilas y que los únicos 2 casos falsos positivos por histopatología fueron muy escasas la presencia de sincitios además de una baja proporción de infiltrado histiocítico. Este hallazgo revela que a diferencia de la depleción linfoide la presencia de sincitios celulares en compañía de una fuerte presencia de infiltrados histiocíticos representa un criterio de alto valor diagnóstico para confirmar o descartar circovirus porcina mediante la evaluación histopatológica. Sin embargo, debido al tamaño de la población evaluada este hallazgo debe ser validado en estudios posteriores y con un número mayor de casos.

De cualquier modo, el diagnóstico definitivo de enfermedad relacionada con PCV2 está basado en la detección de antígeno y/o ácido nucleico asociada con las lesiones de los cerdos enfermos. La infección por PCV2 actualmente debe ser considerada en todos los casos en los que se presente retraso en el crecimiento, independientemente del diagnóstico presuntivo obtenido por el examen clínico. La hibridación *in situ* en tejidos se utiliza para detectar ácido nucleico de PCV2. Los protocolos de HIS empleados para la detección de PCV2 utilizan oligosondas y sondas de cDNA derivadas de la PCR (Rosell et. al. 1999; Choi et. al. 2000; Segalés et al. 2002, Huerta, 2005) y es uno de los métodos más populares y contundentes de la

participación del PCV2 en los síndromes descritos debido a que se puede detectar la presencia del virus asociado a las lesiones características. Adicionalmente, la identificación específica de PCV2 en tejidos lesionados puede realizarse por IHQ de tejidos fijados con formalina y embebidos en parafina.

En este punto, hay que enfatizar que la mayor problemática inherente a la demostración de la participación del PCV2 en los síndromes asociados es la alta prevalencia del virus en cerdos clínicamente sanos (Segalés, 2002). Por un lado se tiene que el aislamiento viral es laborioso y requiere varias semanas para perfeccionarlo (Kim y Chae; 2004) y que la PCR a pesar de ser referida como un método más sensible para la detección de PCV2 que la IHQ y la HIS (Kim y Chae, 2004), sólo demuestra la presencia de DNA de PCV2 en los tejidos linfoides mientras que la HIS y la IHQ revelan el ácido nucleico y antígenos de PCV2; respectivamente, en macrófagos de tejidos lesionados (Rosell, C., *et al*/1999). Por tal motivo el aislamiento viral y la PCR de tejidos no representan métodos de confirmación de circovirus porcino y la información obtenida mediante la HIS y la IHQ es más representativa del proceso infeccioso ya que estos métodos muestran una localización celular del virus y/o un nivel relativo de expresión de gene viral específico en secciones de tejido. Por lo tanto, en una condición en la que las lesiones microscópicas características son un importante criterio para el diagnóstico sobresalen las ventajas de la HIS e la IHQ como las técnicas más adecuadas para este fin (Kim y Chae; 2004).

El valor diagnóstico de la HIS y la IHQ en el establecimiento de un diagnóstico confirmativo de circovirus ha sido investigado. Al realizar una comparación de ambas pruebas para la detección de PCV2 en tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina se demostró que la HIS es más sensible en el diagnóstico de PCV2 (Kim y Chae, 2004). Sin embargo, hasta el momento no existen estudios que comparen el valor diagnóstico de la HP frente a técnicas de detección de PCV2 en secciones de tejidos ni mucho menos que exploren la eficiencia de la HP como prueba de tamizaje de los casos compatibles con circovirus porcino y establezcan los criterios microscópicos de diagnóstico más relevantes que disminuyan la proporción de diagnósticos falsos.

Por tal motivo, en el presente trabajo se utilizó a la HIS como estándar de oro para confirmar la presencia y participación del PCV2 en los tejidos afectados y compararla con los resultados obtenidos por HP. Adicionalmente, se eligió esta prueba debido a que proporciona un detalle celular y arquitectura histológica más definidos (Chae, 2004). De este modo se cubrieron los tres requisitos para el diagnóstico de circovirus porcino (i) Manifestaciones clínicas clásicas

(ii) presencia de lesiones microscópicas características, y (iii) la presencia de PCV2 dentro de las lesiones (Choi and Chae, 1999; Choi et al., 2000; Kim and Chae, 2001b).

La alta sensibilidad, los altos valores predictivos tanto positivo como negativo y los bajos índices de falsos positivos y negativos nos indican que la evaluación microscópica constituye una excelente prueba de tamizaje para la realización de una posterior detección del PCV2 por HIS. Sin embargo, la especificidad obtenida revela que a pesar de que las lesiones son altamente sugestivas de circovirus, existe la posibilidad de que lesiones similares sean ocasionadas por otro agente patógeno que genere una respuesta granulomatosa y enfatiza la necesidad de demostrar la presencia del PCV2 como prueba confirmatoria.

Los resultados obtenidos revelan que las señales de hibridación de PMWS y PDNS muestran una distribución similar a las descritas en la literatura (Rosell *et al.* 1999; Choi *et al.* 2000; Segalés *et al.* 2002). La distribución de la detección del PCV2 es más difusa en PMWS que en PDNS y se menciona que está relacionado con que la enfermedad de PMWS es más aguda dando por resultado lesiones más marcadas sugiriendo una mayor presencia del virus en los tejidos. En los casos de PDNS, la reacción sistémica de hipersensibilidad tipo III asociada a la presencia de depósitos de inmunoglobulina y de factores de complemento en el bazo y glomérulo que desencadena la patología característica sugiere que no son necesarias grandes cargas virales para el desarrollo de la enfermedad (Higgins, 1993, Helie, *et al.* 1995, Sierra, *et al.* 1997). De este modo la distribución del virus y por lo tanto de las señales de hibridación es más discreta y multifocal.

Con respecto a los patrones de HIS, los resultados obtenidos están en congruencia con lo reportado en estudios previos y confirman que la distribución del virus presenta una alta correlación con el grado de severidad de las lesiones producidas por PCV2.

Debido a que el diagnóstico de los síndromes asociados a circovirus porcino debe incluir la presencia de signos clínicos compatibles y el diagnóstico de lesiones microscópicas características con la detección del PCV2 en las mismas es importante realizar una eficiente evaluación HP con el fin de reducir lo más posible la proporción de resultados falsos positivos.

CONCLUSIÓN

- Las lesiones microscópicas de circovirus porcino en los tejidos linfoides evaluados corresponden a las citadas por la bibliografía.
- Las lesiones en nodos linfáticos fueron más consistentes y representativas de la infección por PCV2 al presentar un mayor grado de severidad. Por lo tanto debe considerarse como la muestra de tejido linfóide de elección para el diagnóstico confirmativo de PCV2.
- Los sincitios celulares son el mejor criterio microscópico para confirmar o descartar circovirus porcino.
- La implementación del protocolo de HIS detectó de manera eficaz la presencia de PCV2
- El grado de severidad de las lesiones histopatológicas fue mayor en los casos de PMWS que en los de PDNS y es directamente proporcional a la distribución del PCV2 en los tejidos produciendo patrones de HIS característicos.
- La HP es una excelente prueba de tamizaje en el diagnóstico de circovirus porcino ya que presenta una alta sensibilidad y un elevado valor predictivo acompañado por un bajo índice de falsos positivos. Sin embargo, la especificidad es moderada y resalta la importancia de realizar un diagnóstico confirmatorio por HIS.

BIBLIOGRAFIA

1. Allan G.M. and Ellis J. A. 2000. Porcine circoviruses: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12.
2. Allan, G.M., Meehan, B., Todd, D., Kennedy, S., Ellis, I., Clark, F.G., Harding, J., España, E., Botner, A., Charreyre, C. 1998. Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndrome. *Vet. Rec.* 142.
3. Bassami, M. R., Rerryman, d., Wilcox, G. E., Radial, S. R., 1998. Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to *Porcine circovirus*, plant circoviruses, and chicken anemia virus. *Virology* 249 (2).
4. Boehringer Mannheim. 1996. General Introduction to *In situ* Hybridization. In: Nonradioactive *In situ* Hybridization Application Manual. Second Edition. Boehringer Mannheim. Germany.
5. Brown, C. 1998. *In situ* Hybridization with Riboprobes: An overview for Veterinary Pathologists. *Vet. Patol.* 35.
6. Chae, C. 2004. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of etiology, diagnosis and pathology. *Vet. J.* 169.
7. Choi, C. and Chae, C. 1999. In situ Hybridization for the Detection of Porcine Circovirus in Pigs with Postweaning Multisystemic wasting syndrome. *J. Com. Path.* 121.
8. Choi, C. and Chae, C. 2000. Distribution of Porcine Parvovirus in Porcine Circovirus 2 infected Pigs with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome as show by In-situ Hybridization. *J. Com. Paht.* 123.
9. Darwich, L., Segalés, J., Domingo, M. D., Matéu, E. 2000. Changes CD4+, CD8+ and immunoglobulin M-positive peripheral blood mononuclear cells pf postweaning multisystemic wasting syndrome caused by porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues. *Clin. Diag. Lab. Imm.* 9: 236-242.
10. Darwich, L., Segalés, J., Mateu, E. 2004. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: en immune riddle. *Arch Virol.* 149, 857-874.
11. Duran, C. O., Ramos-Vara, J.A., Render, J.A, 1997. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome: a new condition to include in the differential diagnosis list for skin discoloration in swine. *Swine Health and Production* 5.
12. Ellis, J., L. Hassard, E. Clark, J. Harding, G. Allan, P. Wilson, J. Strokappe, K. Martin, F. McNeilly, B. Meehan, D. Todd, and D. Haines. 1998. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic is wasting syndrome. *Can. Vet. J.* 39.
13. Fenaux, M.P.G. Halbur, M. Gill, T.E. Toth, and X. J. Meng. 2000. Genetic characterization of type2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2. *J. Clin. Microbiol.* 38.
14. García-Reyna, P.B., Segalés J., García C.L., Quintero R.V. 2003. Reporte de un caso de síndrome de nefropatia y dermatitis porcina asociado al circovirus porcino tipo 2 en una granja del estado de México. *Memorias del XXXVIII Congreso Nacional AMVEC, Guadalajara, Jal.*
15. García-Reyna P.B. Rodríguez R.A., Vargas, C.V., Mercado, P.M., Batalla C.D., Quintero R.V., García C.L.A., 2004a. Reporte de una caso de infección por circovirus porcino tipo 2 en cerdos recién nacidos procedentes del estado de México. *Memorias de XXXIX Congreso Nacional AMVEC, Mazatlán, Sinaloa.*

16. García-Reyna P.B. Rodríguez R.A., Vargas, C.V., Mercado, P.M., Batalla C.D., Quintero R.V., García C.L.A., 2004b. Estandarización de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico de circovirus porcino tipo 2. Memorias de XXXIX Congreso Nacional AMVEC, Mazatlán Sinaloa.
17. García-Reyna P.B. Rodríguez R.A., Vargas, C.V., Mercado, P.M., Batalla C.D., Quintero R.V., García C.L.A., 2004c. Reporte de un caso de circovirus porcino tipo 2 en cerdos recién nacidos procedentes del estado de México. Memorias del XIX Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, Buenos Aires, Argentina.
18. Hamel AL, Lin LL, Nayar GP. 1998. Nucleotide sequence of *Porcine circovirus* associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J. Virol* 72 (6).
19. Harding, J.C. 1996. Postweaning multisystemic wasting syndrome: preliminary epidemiology and clinical findings. *Proceedings of the Western Canadian Association of Swine Practitioners.*
20. Helie, P., Drolet, R., Germain, M., Bourgault, A. 1995. Systemic necrotising vasculitis and glomerulonephritis in grower pigs in southwestern Quebec. *Canadian Veterinary Journal* 36.
21. Herrington, C.S. and McGee, J.O'D. 1992. Principles and basic methodology of DNA/RNA detection by *in situ* hybridization. In: *Diagnostic Molecular Pathology. A Practical Approach Series.* IRL Press/Oxford University Press. USA. 35, 69-102.
22. Higgins, R. 1993. Glomerulo-nephropathy syndrome. *Pig Veterinary Journal* 31.
23. Huerta Juárez Gustavo Adolfo. Estandarización de una técnica de Hibridación *in situ* para Circovirus tipo 2. Tesis de licenciatura. UNAM. FES Cuautitlan.
24. Kato, A., Fujino, M., Nakamura, T., Ishihama, A., Otaki, Y., 1995. Gene organization of chicken anemia virus. *Virology* 209 (2).
25. Kim J, Choi C, Han DU, Chae C. Simultaneous detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome by multiplex PCR. *Vet Rec* 2001;149.
26. Kim, J., Jung, K., Chae, C., 2004. Prevalence and detection of porcine circovirus 2 in aborted fetuses and stillborn piglets. *Veterinary Record*, in press.
27. Komminoth, P., and Long, A.A. 1995. *In situ* Polymerase Chain Reaction—Methodology, applications and nonspecific pathways. In: *PCR Applications Manual.* Manheim, Germany: Boehringer Mannheim.
28. Krakowka S, Ellis JA, Meehan B, Kennedy S, McNeilly F, Allan G. 2000. Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of Postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Vet. Pathol.* 37: 254-263.
29. Josedhson, G., Charbonneau, G., 2001. Case report of reproductive problems in a new startup operation. *Journal of Swine Health and Production* 9, 258-259.
30. Johnson, C.S., Joo, H.S., Direksin, K., Yoon, K.-J., Choi, Y.K., 2002. Experimental in utero inoculation of late-term swine fetuses with porcine circovirus type 2. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 14, 507-512.
31. Ladekjaer-Mikkelsen, A.-S., Nielsen, J., Storgaard, T., Botner, A., Allan, G., McNeilly, F., 2001. Transplacental infections with PCV-2 associated with reproductive failure in a gilt. *Veterinary Record* 148, 759-760.

32. Mankertz, A., Domingo, M., Folch, J., LeCann, P., Jestin, A., Segalés, J., Chmielewics, B., Plana-Duran, J., Soike, D. 2000. Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Research* 66: 65-77.
33. Mankertz, A., Persson, F., Mankertz, J., Blaess, G., Buhk, H. 1997. Mapping and Characterisation of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *J. Virol.* 71: 2562-2566.
34. McNulty, M., Dale, J., Lukert, P., Mankertz, A., Randles, J., Todd, D. 2000. Circoviridae. In: van Regenmortel, C.M.F.M. II. V., Bishop, D. H. L., Carstens, E.B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R., Wickner, R. B. (Eds.), *Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Academic Press, San Diego: 299-2287.
35. Meehan BM., Creelan JL., McNulty MS, Todd D. 1997. Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. *J. Gen Virol* 78: 221-227.
36. Morrilla, G. A., Carvajal. V. M., la fiebre porcina clásica endémica en México. *Ciencia Veterinaria.* 9-2003-4.
37. Nielsen, J., Ladekjaer Hansen, A-S., Bille-Hansen, V., Lohse, I., Botner, A. 2004. PCV2-Associated disease following intrauterine infection. *Proceedings of the 18th IPVS Congress, Hamburg, Germany, Volume I:14*
38. O'Connor, B., Grauvreau, H., West, K., Bordan, J., Ayround, M., Clark, E.G., Konoby, C., Allan, G., Ellis, J.A., 2001. Multiple porcine circovirus 2-associated abortion and reproductive failure in a multisite swine production unit. *Canadian Veterinary Journal* 42, 551-553.
39. Pensaert, B., Sanchez, E., Ladehjaer-Mikkelsen, A., Allan, G. M., Nauwynck, J. 2004. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. *Veterinary Microbiology.* 98: 175-183.
40. Pestaner, J.P., Bibbo, M., Bobroski, L., Seshamma, T., Bagasra, O. 1994. Potential of the in situ Polymerase Chain Reaction in Diagnostic Cytology. *Acta Cytologica* 38: 676-680.
41. Phenix, K. V., Weston, J. H., Ypelaar, I., Lavazza, A., Smyth, J. A., Todd, D., Wilcox, G. E., Raidal, S. R., 2001. Nucleotide sequence analysis of a novel circovirus of canaries and its relationship to other members of the genus *Circovirus* of the family Circoviridae. *J. Gen. Virol.* 82: 2805-2809.
42. Quintana, J., Segalés, J., Rosell, C., Casamiglia, M., Rodríguez-Arriola, G. M., Chianini, F., Floch, j. M., Maldonado. 2001.
43. Ramos-Vara, J., Durán, O., Render, J., Craft, D. 1997. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in the USA. *Veterinary Record.* 141: 479-480.
44. Resendes, A. R., Balasch, M., Calsamiglia, M., Segalés J., Sibila, M., Mankertz, A., Plana-Duran J. And Domingo, M. 2001a. Experimental co-inoculation of porcine circovirus type 2 (PCV-2) and vaccine adjuvant in conventional pigs. *Proceedings of the ssDNA Viruses of Plants, Birds, Pigs and primates: porcine postweaning multisystemic wasting syndrome.* European society of Veterinary Virology: 134.
45. Rosell, C., Segalés, J., Plana-Durán, J., Balasch, M., Rodríguez-Arriola, G.M., Kennedy, S., Allan, G.M., McNeilly, F., Latimer, K.S. and Domingo, M. 1999. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *Journal of comparative pathology.* 120: 59-78.
46. Rosell, C., Segalés, J., Ramos-Vara, J.A., Folch, J.M., Rodríguez-Arriola, G.M., Durán, C.O., Balasch, M., Plana-Durán, J., Domingo, M. 2000. Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Vet. Rec.* 146: 40-43.

47. Sanchez, R.E., Nauwynck, H.J., McNeilly, F., Allan, G.M., Pensaert, M.B., 2001. Porcine circovirus 2 infection in swine fetuses inoculated at different stages of gestation. *Veterinary Microbiology* 83, 169-176.
48. Saoulidis, K., Kyriakis, S.C., Kennedy, S., Lekkas, S., Miliotis, Ch. C., Allan, G.M., Balkamos, G.C., and Papoutsis. 2002. First report of Post-Weaning Multisystemic Wasting Síndrome and Porcine Dermatitis and Nephropathy Síndrome in Pigs in Greece. *J. Vet. Med.* 4: 202-205.
49. Segalés J., Piella, J., Domingo, M. 1998. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Spain. *Veterinary Record.* 142: 483-486.
50. Segalés J., Rosell C., Rodríguez-Arrijoja G. And Domingo M. 2000. Patología de la circovirosis porcina. *Porci* 56: 41-54.
51. Segalés J., Pastor J., Cuenca R. And Domingo M. 2000. Haematological parameters in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. *Veterinary Record.* 146: 675-676.
52. Segalés J. and Domingo M. 2002. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Vet. Quartely.* 24: 109-124.
53. Sibila, M., Calsamiglia, M., Segalés, J., Jestin, A., Domingo, M. 2001. Detection of porcine circovirus type 2 genome in nasal swabs and serum samples from naturally infected pigs using polymerase chain reaction. *Proc. Eur. Soc. Vet. Vir. PMWS:* 96.
54. Sierra, M., De las Mulas, J., Molenbeek, R., Quezada, M. 1997. Porcine immune complex glomerulonephritis dermatitis síndrome. *European Journal of veterinary pathology.* 3: 63-70.
55. Smith, W.J., Thomson, J.R., Done, S., 1993. Dermatitis/nephropathy syndrome of pigs. *Veterinary Record* 132, 47
56. Solignac, T. 1997. Syndrome dermatite-néphropathie Quelques observations cliniques chez le porcelet. *Seminaire Veterinaire* 841.
57. Thacker, E.L., 2001. Porcine respiratory disease complex- what is it and why does it remain a problem? *The Pig Journal* 48, 66-70.
58. Thibault, S., Drolet, R., Germain, M.C., D'Allaire, S., Larochelle, R., Magar, R., 1998. Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine, *Veterinary Pathology* 35, 108-116.
59. Tischer, I., Rasch, R. and Tochtermann, G. 1974. Characterization of papovavirus- and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl. Bakteriologie* 72: 106-110.
60. Tischer I, H. Gelderblom, W. Vettermann, and M. A. Koch. 1982. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* 295: 64-66.
61. Trujano, M., Iglesias, G., Segalés J., Palacios J.M., 2001. PCV-2 from emaciated pigs in México. *Vet. Rec.* Jun 23, 148 (25) 792.
62. Todd, D, Weston, J. H., Soike, D., Smyth, J. A., 2001. Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. *Virology* 286 (2): 354-362.
63. Van Halderen, A., Baker, S., Wessels, J. 1995. Dermatitis/nephropathy syndrome pigs. *Veterinary Record* 132: 199.

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