



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**“ ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA
(PCR) PARA LA DETECCIÓN DEL CIRCOVIRUS
PORCINO TIPO 2 EN TEJIDOS CONGELADOS ”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A:
V A L E R I A V A R G A S C E R Ó N**

ASESORA: DRA. PATRICIA BEATRIZ GARCÍA REYNA

COASESORA: DRA. LUCÍA ANGÉLICA GARCÍA CAMACHO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MÉX. 2006



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.

DEDICATORIAS

A MI PAPA.

Por que eres una combinación rara entre razón y sentimiento, nos exiges al mismo tiempo que sabemos que nos amas con todas tus fuerzas. Nos acompañas, das seguridad y ofreces una mano firme pero al mismo tiempo tenemos una sonrisa llena de ternura; aplaudes mis logros, me enseñaste a diferenciar entre lo bueno y lo no tan bueno, fuiste la autoridad que ponías límites y ahora eres el mejor consejero y amigo que tengo. Haz sido un hombre con corazón que nos haz señalado el horizonte con optimismo y confianza.

Por ti y para ti con todo mi Amor.

A MI MAMÁ.

Por que me quisiste antes de conocerme, por lo que tuviste que afrontar para lograr que mi vida empezara; por pensar siempre doble, en nosotros y en ti, por abrirme tus brazos cuando necesito un abrazo y por que tu corazón sabe comprender cuando necesito una amiga, tus ojos sensibles se endurecen cuando necesito una lección además de tu fuerza y amor que me han dirigido por la vida dándome las alas que necesito para poder volar. Por que tu amor nunca contempló lo imposible.

Te Amo.

A MONY Y BETO.

Aun que los dos son tan diferentes, junto con mis papás forman la parte mas importante de mi ser, mi corazón. Gracias por que con ustedes se que nunca me tengo que esconder, que puedo ser exactamente la que soy. Ustedes mejoran mi felicidad y disminuyen mis tristezas, duplican mis alegrías y dividen mis problemas, compartimos nuestras debilidades, nuestros pensamientos mas serios y nuestras bromas mas tontas. Por creer en mi incluso cuando yo he dejado de hacerlo; simplemente por EXISTIR!!!

Los Amo.

A CLARA, MAGO, OSCAR, MARY, PILI, JESÚS Y KARLA.

Por ser los hermanos que dios no me dio, compartir nuestras vidas, estar conmigo cuando los necesito, por su amor, honestidad y fe que siempre ponen en mi. Por solo esperar que sea yo y alegrarse por ello, por estar conmigo en los momentos más importantes de mi vida. Con todo mi corazón.

A LETI.

Solo por la primera vez que apretaste mi dedo con tu puño suave y pequeñito, pues me atrapaste para siempre.

A JUTITH VARGAS.

*Por hacerme un ser de fortaleza que busca superarse, tomar retos y alcanzar metas.
Con todo mi Amor.*

A MI ABUELITA MAGO YA TODA LA FAMILIA VARGAS.

Por que siempre han estado conmigo, por que mis éxitos están en la enseñanza moral e intelectual que recibí de ustedes. Por compartir sus ilusiones, pensamientos, vida, fe y Amor.

A MARICARMEN, CAMILO, IVAN Y JUDITH.

Por todo el apoyo y tiempo que me brindaron, por compartir su vida. Siempre tuvieron un momento para escucharme y ayudarme. Gracias por todo su cariño.

A MI ABUELITA CARMEN YA LA FAMILIA CERÓN

Por que me han enseñado el valor de la unidad familiar, fomentan creencias y costumbres. Sencillamente por todo el Amor.

A GUSTAVO HUERTA y KARINA ENRÍQUEZ

Por ser seres especiales y de luz, por dejarme compartir estos años llenos de grandiosas e incontables aventuras; por estar cuando los necesito, aun que quisieran estar en otra parte, por llegar cuando todos los demás se van y quedarse cuando todos los demás desaparecen, por que me conocen tal como soy me acompañan en mis logros y mis fracasos, celebran mis alegrías y comparten mi dolor.

Ambos estarán en mi corazón aun si estuvieran del otro lado del mundo.

Y Para recordar a los que ya no estamos juntos y por los que si lo estamos, por todos los momentos buenos y malos que nos tocó vivir, por las risas, el llanto... Ya todos con los que he pasando momentos geniales... gracias por estar.. y por ser... Gracias por compartir mi vida con un momento de la suya a Fernando García, , Karina Sánchez, Daniel Araiza, David Tavera Alonso Silva, Guadalupe Ugalde Samuel Santoyo, Antonio Vargas, , Alejandro Palacios, Jaime , Oscar Arellano, Víctor Flores.

Gracias por enseñarme que La amistad es el ingrediente más importante en la receta de la vida

A MIS MAESTROS

Por que se que el educar es un arte difícil y delicado con un poco de ciencia, mucho amor y mucha paciencia. Así en el camino de mi vida solo basto una persona correcta como una idea correcta para cambiar mi vida para siempre.

A ustedes con todo mi cariño y admiración.

A MI ASESORA DRA. PATRICIA BEATRIZ GARCIA REYNA

Por la oportunidad de desarrollarme a tu lado, ser la primera en creer en mi y no dudar, por la fe y confianza, por enseñarme a alcanzar cosas que quería alcanzar, por enseñarme a confiar en lo que puedo hacer, abrir horizontes, caminos y metas. Y algo muy importante por ser amiga y confidente, enseñarme que los sueños son esperanzas y que con trabajo perseverancia y dedicación pueden convertirse en realidad. Con todo mi cariño y agradecimiento.

A MI COASESORA DRA. LUCIA GARCIA CAMACHO.

Porque me enseñó que los sueños y la perseverancia son una arma poderosa. Por todas las alegrías que hemos pasado, por saber escuchar, sufrir con nosotros y aconsejarnos. Por el poder contar con usted.

A LA DRA. ANDREA RODRÍGUEZ ROPÓN.

Por enseñarme que el verdadero éxito en la vida es rétr mucho y muchas veces, gozar del cariño de tus amigos, ganar el respeto de personas inteligentes, ganar el reconocimiento de personas calificadas, saber apreciar la belleza interna, buscar lo mejor en los demás, simplemente por dejar el mundo un poquito mejor de como lo encontró. Mil gracias con mucho cariño y respeto.

AL DR. VICTOR QUINTERO RAMÍREZ.

*Gracias por enseñarme a preguntar si lo que hago hoy me acerca al lugar en el que quiero estar mañana.
Por enseñarme que los triunfos nacen cuando estamos dispuestos a aprender a practicar y a no rendirnos
nunca. Por toda la confianza que ha depositado en mí, por su apoyo y ayuda incondicional.*

VALERIA VARGAS CERÓN

AGRADECIMIENTOS

AL CINVESTAV.

Por el apoyo y ayuda brindada a esta investigación.

AL CENASA.

Por los conocimientos y su valioso apoyo brindado para la realización de esta investigación.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Y EN ESPECIAL A LA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

*Por tener el orgullo de pertenecer a la Máxima Casa de Estudios y poner a mi
disposición todos los conocimientos y personas que llegaron a ser muy importantes en mi
vida como profesionista y como ser humano.*

POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU.

VALERIA VARGAS CERÓN

INDICE

I. OBJETIVO

II. INTRODUCCIÓN

1. CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2 (PCV-2).
2. CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS.
3. SÍNDROME MULTISISTÉMICO Y DE ADELGAZAMIENTO POS- DESTETE.
 - 3.1 Patogenia.
 - 3.2 Transmisión.
 - 3.3 Tratamiento y control.
4. OTROS SÍNDROMES ASOCIADOS AL PCV-2.
 - 4.1 Síndrome de dermatitis y nefropatía porcina (PDNS).
 - 4.2 Falla reproductiva asociada a PCV-2.
 - 4.3 Complejo respiratorio porcino (CRP).
 - 4.4 Enteritis granulomatosa.
 - 4.5 Epidermitis exudativa.
 - 4.6 Linfadenitis necrotizante.
 - 4.7 Tremor congénito.
5. DIAGNÓSTICO DE PCV-2.
 - 5.1 Biología molecular para el diagnóstico.
 - 5.2 Extracción y purificación de ácido desoxirribonucleico (ADN).
 - 5.3 Reacción en cadena de la polimerasa.
 - 5.4 Factores que modifican las condiciones de amplificación.
 - 5.4.1 Iniciadores (“primers”).
 - 5.4.2 Temperatura de fusión (Tm) .
 - 5.4.3 Especificidad.

- 5.4.4 Complementariedad en la secuencia de los “iniciadores”.
- 5.4.5 Contenido en G/C y extensiones de polipirimidinas (T, C) o polipurinas (A, G) .
- 5.4.6 Nucleótidos.
- 5.4.7 Polimerasa termoestable.
- 5.4.8 Magnesio.
- 5.5 Visualización de los productos de la PCR.
 - 5.5.1 Electroforesis en geles de agarosa.

III. MATERIAL Y METODOS

- 6. Selección de Muestras.
 - 6.1 Testigos positivos y negativos.
- 7. Extracción de ADN.
 - 7.1 Muestras congeladas.
 - 7.2 Procedimiento para bloques de parafina.
 - 7.3 Cuantificación de ADN.
- 8. Iniciadores.
- 9. Amplificación (PCR).
- 10. Evaluación electroforética .

IV. RESULTADOS

V. DISCUSIÓN

VI. CONCLUSION

VII. BIBLIOGRAFÍA

INDICE DE TABLAS

TABLA 1 Condiciones de amplificación.

TABLA 2 Programa PCR.

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 Microfotografía electrónica del circovirus porcino tipo 2.

FIGURA 2 Secuencia genómica viral PCV-1.

FIGURA 3 Esquema de genoma del PCV-2.

FIGURA 4 Evaluación de la concentración de $MgCl_2$.

FIGURA 5 Evaluación de la concentración de iniciadores.

FIGURA 6 Evaluación de muestras de ADN.

FIGURA 7 Evaluación de la concentración de enzima Taq polimerasa.

FIGURA 8 Amplificación por PCR de la extracción de ADN de 3 muestras de linfonodos incluidos en parafina.

FIGURA 9 Amplificación por PCR para PCV-2.

LISTA DE ABREVIATURAS

A: Adenina.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

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

C: Citosina.

c: Concentración del “primer”.

CaCV: Canary circovirus, circovirus del canario.

cbp: Cuanto baste para.

CAV: Chicken anemia virus, virus de la anemia del pollo.

CRP: Complejo respiratorio porcino.

DEPC: Dietilpirocarbonato.

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid, ácido etilendiamino tetraácetico

ELISA: Enzyme Liked Immunosorbent Assay, Análisis de la enzima ligada a un inmunoabsorbente inerte.

FPC: Fiebre porcina clásica.

G: Guanina.

GCV: Goose circovirus, circovirus del ganso.

GuCV: Gull circovirus, circovirus de la gaviota.

H: Entalpía.

HIS: Hibridación *in situ*.

IIF: Inmunofluorescencia indirecta.

IHQ: Inmunohistoquímica.

IPMA: Inmunoperoxidasa en monocapa.

KDa: Kilo daltons.

M: Moles.

m: Masa.

MgCl₂: Cloruro de magnesio.

ml: Mililitros.

mg: Miligramos.

mM: Milimolar.

μl: Microlitros.

μm: Micrómetro.

nm: Nanómetro.

nt: Nucleótidos.

ORF: Open reading framers, fragmentos de lectura abierta.

PCR: Polymerase chain reaction, reacción en cadena de la polimerasa.

PCV: Porcine circovirus, circovirus porcino.

PCV-1: Porcine circovirus type 1, circovirus porcino tipo 1.

PCV-2: Porcine circovirus type 2, circovirus porcino tipo 2.

PDNS: Síndrome de dermatitis y nefropatía porcina.

pH: Potencial de hidrogeniones.

PiCV: Pigeon circovirus, circovirus de la paloma.

PK-15: Porcine kidney-15, línea celular de riñón de cerdo.

PMWS: Postweaning multisystemic wasting syndrome, Síndrome multisistémico y de adelgazamiento postdestete.

PPV: Parvovirus porcino.

PRRS: Síndrome respiratorio reproductivo porcino.

q: Carga.

rpm: Revoluciones por minuto.

R: Constante molar.

S: Entropía.

SDS: Sodium dodecyl sulfate, Duodecil sulfato de sodio.

T: Timina.

Taq : *Thermus aquaticus*.

Tm: Temperatura de fusión.

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase[TdT]-mediated dUTP Nick End Labeling.

U: Unidades.



I. OBJETIVO

- Estandarizar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa a partir de muestras de tejidos congelados de cerdos infectados con PCV-2.

II. INTRODUCCION



1. CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2 (PCV-2)

El PCV-2 es un virus que fue aislado por primera vez en 1998, afecta a la producción porcina alrededor de todo el mundo. Este virus se asocia como agente causal del síndrome multisistémico y de adelgazamiento pos-destete (Postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) y desde ese entonces se ha relacionado con otros síndromes presentes en el cerdo (Ellis *et al.*, 1998).

2. CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS

El PCV-2 es un miembro de la familia *Circoviridae* del género *Circovirus*. En el género *Circovirus* se incluyen al circovirus porcino tipo 1 (PCV-1) que se ha descrito como un contaminante no citopático apatógeno para el cerdo y al PCV-2 el cual es antigénica y genómicamente distinto al anterior y que ha demostrado ser patógeno en esta especie (Bassami *et al.*, 1998; Niagro *et al.*, 1998).

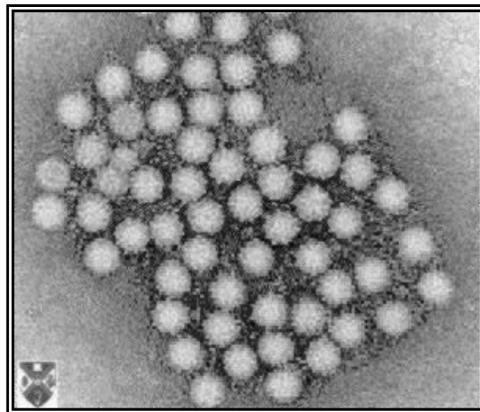


Fig. 1 Microfotografía electrónica del circovirus porcino tipo 2
Tomada de www.syva.es

Dentro del género *Circovirus* también se encuentran: el virus de la enfermedad del pico y de las plumas de los psitácidos (BFDV) (Bassami *et al.*, 1998), el circovirus de la paloma (PiCV o CoCV) (Woods *et al.*, 1993; Mankertz *et al.*, 2000), el circovirus del ganso (GCV) (Todd *et al.*, 2001), el circovirus del canario (CaCV) (Phenix *et al.*, 2001) y el circovirus de la gaviota (GuCV) (Jestin *et al.*, 2001).

El PCV-2 posee un virión de ADN rodeado por una proteína viral simple la cual da lugar a una molécula circular de cadena sencilla de aproximadamente 1800 bases (Tischer *et al.*, 1974; Meehan *et al.*, 1997; Hamel *et al.*, 1998; Fenaux *et al.*, 2000; Chae, 2005). Los *Circovirus* porcinos son estables en el medio ambiente y resisten temperaturas de 60° C hasta por 30 minutos y a la inactivación a pH entre 3-9 (Segalés *et al.*, 2000).

El genoma del *Circovirus* se caracteriza por tener regiones dentro de su secuencia que codifican para determinadas proteínas virales. Estas regiones codificables se denominan marcos de lectura abiertos (open reading frames: ORFs). Por otro lado la secuencia puede tener regiones que no codifican para proteínas pero sin embargo regulan la transcripción y la replicación del virus (Fig. 1) (Hamel *et al.*, 1988). Para el PCV-2 se han descrito hasta 11 ORFs potenciales. La forma replicativa del PCV-2 contiene varios ORFs con el potencial para codificar proteínas mayores de 5 kDa. Los dos principales serían el ORF1 que codifica 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 más importante (Mankertz *et al.*, 2000).

3. SÍNDROME MULTISISTÉMICO Y DE ADELGAZAMIENTO POS-DESTETE

El síndrome multisistémico y de adelgazamiento pos-destete (PMWS) se describió por primera vez en Canadá en 1991 (Allan *et al.*, 2000; Segalés *et al.*,

2002) y desde entonces se ha extendido a la mayor parte del mundo en donde la producción porcina es una actividad económica importante (Allan y Ellis, 2000).

Entre los países afectados destacan Canadá, Estados Unidos de América, Alemania, Francia, España, Italia, Gran Bretaña, Dinamarca, Suecia, Bélgica, Holanda, Taiwán, Corea del Sur y Japón (Segalés *et al.*, 2002). El PMWS se describió principalmente como una infección subclínica (Allan *et al.*, 2000; Segalés *et al.*, 2002) en la actualidad se considera al circovirus porcino tipo 2 (PCV-2) como el agente causal del PMWS al ser detectado consistentemente en lesiones características de la enfermedad (Choi *et al.*, 1999; Rosell *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2000; Kennedy *et al.*, 2000; Saoulidis *et al.*, 2002; Segalés *et al.*, 2002). En México los primeros signos clínicos de PMWS se observan en algunas granjas del Estado de México y se reportan oficialmente asociados a la presencia del PCV-2 (Trujano *et al.*, 2001).

El PMWS clínicamente afecta la condición corporal en los cerdos principalmente en animales después del destete y durante la engorda (Harding, 1996). Los signos clínicos que se observan con mayor frecuencia son: pérdida de peso, adelgazamiento, palidez corporal, alteraciones respiratorias, aumento de tamaño de los linfonodos (en especial los mandibulares e inguinales) y en algunos casos ictericia, y diarrea. (Harms *et al.*, 2001; Darwich *et al.*, 2004). Las manifestaciones de la infección por PCV-2 son generalmente de tipo subclínico. Experimentalmente la infección con PCV-2 origina cuadros clínicos inespecíficos y no siempre evidentes (Allan *et al.*, 2000)

Esta enfermedad se inicia unas 2-3 semanas después del destete en cerdos entre 8 -13 semanas de edad (Harding y Clark, 1997; Madec *et al.*, 2000). La morbilidad varía entre 5 y 10% y la mortalidad es variable la cual oscila entre el 4-20% (Segalés *et al.*, 2000b).

Se considera que la vía aerógena es la ruta mas probable de transmisión natural de PCV-2 entre cerdos. En estudios experimentales se ha detectado al PCV-2 en heces entre 4 y 24 días post infección (p.i.) (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 estas puedan ser

las vías de excreción del virus (Krakowka *et al.*, 2000; Resendes *et al.*, 2001; Sibila *et al.*, 2001b).

Las lesiones a la necropsia más frecuentes son neumonía intersticial y linfadenopatía generalizada, principalmente en los linfonodos inguinales, otras lesiones que se observan con menor frecuencia son, hepatitis, nefritis y pancreatitis no supurativas (Harding, 1996; Clark, 1997; Harding y Clark, 1997; Harding, 1998; Rosell *et al.*, 1999).

Las lesiones microscópicas características son: depleción linfocitaria, infiltración de células histiocíticas, presencia de células gigantes multinucleadas (Rosell *et al.*, 1999) y necrosis coagulativa multifocal en diversos tejidos (Segalés *et al.*, 2000c).

3.1 Patogenia

La patogenia de la circovirus porcina no es del todo bien conocida. En condiciones naturales la entrada del virus se produce por vía oronasal y experimentalmente se consiguió infectar cerdos por vía parenteral y oral (Segalés *et al.*, 2000). En cuanto al mecanismo patógeno, el PCV-2 se localiza principalmente en las células de la línea monocito/macrófago, así como en otras células presentadoras de antígeno (Clark, 1999; Rosell *et al.*, 1999; Kenendy *et al.*, 2000). El PCV-2 se suele encontrar habitualmente en el citoplasma y más raramente en el núcleo de macrófagos, células dendríticas y células gigantes multinucleadas de los tejidos linfoides de cerdos afectados de circovirus porcina (Clark, 1997; Rosell *et al.*, 1999; Kennedy *et al.*, 2000; Krakowka *et al.*, 2000). El virus se detecta en macrófagos de otras localizaciones del organismo como macrofagocitos hepáticos estrellados, macrófagos pulmonares alveolares o intersticiales y macrófagos en infiltrados inflamatorios de múltiples órganos. La replicación del virus tiene lugar en el núcleo de las células infectadas y es



característica el hallazgo de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos (Rosell *et al.*, 1999; Kennedy *et al.*, 2000; Krakowka *et al.*, 2000). Adicionalmente, el tejido linfoide presenta una marcada depleción linfocitaria. El mecanismo por el cual se

genera una depleción linfocitaria en casos de circovirus porcino tampoco se ha establecido. Se ha sugerido que esta depleción se podría generar por una vía indirecta en la cual están involucrados diferentes procesos como la apoptosis, el desequilibrio de citocinas y/o la alteración en la migración de linfocitos. Esta hipótesis se basa en el hecho de que un bajo número de linfocitos se encuentran infectados con PCV-2 mientras que un número relativamente elevado de estas células exhiben apoptosis con base a los hallazgos de la técnica de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase[TdT]-mediated dUTP Nick End Labeling) y de su visualización en microscopía electrónica de transmisión a partir de tejidos de cerdos con infección natural por PCV-2 (Shibahara *et al.*, 2000). No obstante, estos datos no han sido corroborados en estudios experimentales de infección por PCV-2 en cerdos gnotobióticos en los cuales aparentemente la apoptosis no jugaba un papel relevante en los linfocitos (Krakowka *et al.*, 2002).

Desde un punto de vista clínico se da una marcada correlación entre severidad de la sintomatología clínica, intensidad de las lesiones microscópicas en órganos linfoides y cantidad de PCV-2 en ellas (Krakowka *et al.*, 2001; Quintana *et al.*, 2001; Rovira *et al.*, 2002). 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.*, 2002).

Desde el inicio de la infección por PCV-2, este es eliminado a través de heces, orina y secreciones nasales, durante meses. También se ha detectado en semen de verracos aparentemente sanos, no se han realizado estudios que confirmen su transmisión por esta vía, aun que debe de tomarse en cuenta la

transmisión del virus debido a las practicas habituales de inseminación artificial. La presencia de PCV-2 en cavidad nasal es un hecho muy frecuente en cerdos sanos, con o sin viremia a juzgar por los resultados de técnicas de PCR sobre hisopos nasales (Segalés, 2002).

3.2 Transmisión

El movimiento de animales entre explotaciones es con toda probabilidad la causa más importante de entrada del virus. Puede ser transportado de forma mecánica a través de camiones, ropa, calzado, material y equipamiento, e incluso también probablemente por roedores y pájaros. Una vez presente en una explotación, la transmisión más probable es por contacto directo entre cerdos enfermos y sanos. La transmisión se ve favorecida en explotaciones con alta densidad de cerdos por naves, en producción continua y con prácticas de manejo donde no se realiza un sistema: "todo dentro - todo fuera". (Segalés *et al.*, 2002; Sánchez-Vizcaíno, 2003)

3.3 Tratamiento y control

Es difícil tratar esta enfermedad ya que los diferentes factores de riesgo no son siempre los mismos en cada granja, debiendo determinar cuales son los prioritarios para cada una y corregirlos de forma conjunta. Lo importante es reconocer los factores de riesgo tanto a nivel de manejo como ambientales, nutricionales y de bioseguridad (donde se recomienda únicamente los tratamientos terapéuticos para el control de las infecciones recurrentes y bacterianas secundarias que previamente se deben identificar).

Actualmente no existen vacunas ni tratamientos específicos para la circovirosis. Estudios epidemiológicos han sugerido que la aparición de distintas infecciones es determinante en la presentación de esta enfermedad (Madec *et al.*, 2000; Royer *et al.*, 2001). Estudios realizados por diversos autores (Harding y Clark, 1997; Madec *et al.*, 2000) han concluido que las medidas zootécnicas y de

bioseguridad son importantes para el control de PMWS y minimizan el impacto del PMWS en las granjas afectadas (Guilmoto y Wessel-Rober, 2000). Estas medidas sugeridas son:

- Evitar mezcla de animales de diferentes grupos.
- Separar los animales enfermos de los sanos.
- Controlar la presencia de otras enfermedades.

- Ventilación adecuada.
- Controlar el flujo de personas dentro de la granja.
- Reducir la densidad de animales por grupo.
- Vaciado sanitario.
- Todo dentro todo fuera.

La realización de estudios *in vitro* para evaluar la sensibilidad de PCV-2 a la inactivación de desinfectantes, demuestra que el virus es resistente al etanol, productos yodados, formaldehídos y compuestos de clorhexidina. También se observó que el PCV-2 es sensible a los compuestos fenólicos, cuaternarios de amonio, hidróxido de sodio, hipoclorito de sodio y un compuesto de peroximonosulfato y cloruro de sodio. La reducción de la carga vírica en el ambiente podría reducir o eliminar la transmisión del virus entre grupos de animales por lo que los protocolos de desinfección junto con las medidas de manejo y bioseguridad arriba señaladas podrían ser útiles para la prevención y el control del virus (Royer *et al.*, 2001).

4. OTROS SÍNDROMES ASOCIADOS AL PCV-2

4.1 Síndrome de dermatitis y nefropatía porcina (PDNS)

El PDNS se describió por primera vez en el Reino Unido en 1993 (Smith *et al.*, 1993). Este síndrome mortal afecta a cerdos principalmente entre 1.5-4 meses de edad aunque también se ha descrito en cerdos de finalización (Smith *et al.*, 1993; Thibault *et al.*, 1998). El PDNS presenta característicamente una vasculitis

sistémica con un tropismo marcado en la piel y los riñones aunque probablemente también otros órganos puedan ser afectados (Duran *et al.*, 1997; Thibault *et al.*, 1998; Choi y Chae, 2001). Macroscópicamente las lesiones de la piel consisten en máculas redondas, irregulares, púrpuras y pápulas que se coalescen fuera del perineo y distal a los miembros en forma de parches irregulares. Las lesiones en la piel se notan cerca de los cuartos posteriores miembros y abdomen pero con mayor progreso involucran al tórax, flancos y orejas. Los riñones están agrandados con la corteza renal pálida y con hemorragias petequiales de aproximadamente 2-4 mm de diámetro. Los linfonodos renales e inguinales usualmente se encuentran agrandados y rojos (Ramos-Vara *et al.*, 1997).

Microscópicamente las lesiones consisten en vasculitis necrotizante severa que afecta la dermis, presencia de neutrófilos con fragmentos nucleares, necrosis y ulceración de la epidermis y glomerulonefritis fibrinonecrotizante (Smith *et al.*, 1993; Duran *et al.*, 1997; Thibault *et al.*, 1998; Choi y Chae, 2001). En linfonodos se observa depleción linfoide y presencia de células gigantes multinucleadas (sincitios) en la corteza y paracorteza. Las lesiones microscópicas de PDNS con la recurrente detección de inmunoglobulinas y factores del complemento así como daño a vasos sanguíneos y glomérulos renales es sugestivo de una hipersensibilidad de tipo III y que puede ser el mecanismo patogénico posible de PDNS (Rosell *et al.*, 2000).

4.2 Falla reproductiva asociada a PCV-2

Recientemente el PCV-2 se ha adicionado a la lista de virus que causan infección transplacentaria. El primer reporte se presentó en Canadá donde se aisló el PCV-2 de cerdos abortados (West *et al.*, 1999; Pensaert *et al.*, 2004). Esta falla reproductiva se caracteriza por abortos a término, nacidos muertos cercanos a término ó a cerdos prematuros, abortos a media gestación, momificación y muerte embrionaria (Kim *et al.*, 2004). La presencia del PCV-2 se asoció directamente a una miocarditis degenerativa con un infiltrado de linfocitos y macrófagos además de fibrosis (West *et al.*, 1999), la cual se considera la lesión más significativa. En

pulmón se ha observado neumonía con infiltración de células mononucleares en espacios alveolares (Ladekjar-Mikkelsen *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004) y congestión hepática crónica (O'Connor *et al.*, 2001; Ellis *et al.*, 2004). La severidad de las lesiones depende de la edad del feto al momento de la infección, esto se debe a que el virus replica en las células (principalmente macrófagos) del hospedero donde existe una gran actividad mitótica (Sánchez *et al.*, 2003; Pensaert *et al.*, 2004).

La presencia de PCV-2 en semen de verracos se ha demostrado utilizando la prueba de PCR en fluido seminal y fracciones de células no espermáticas (Kim *et al.*, 2001, 2003c; Larochele *et al.*, 2000). Esto sugiere que el semen puede ser un vehículo significativo para la transmisión de PCV-2 (Kim *et al.*, 2001).

4.3 Complejo respiratorio porcino (CRP)

Este es un serio problema de salud en cerdos de 16 - 22 meses que se caracteriza por crecimiento lento, letargo, anorexia, fiebre, tos, disnea y resistencia a la terapia antibiótica (Halbur, 1998; Thacker, 2001). La neumonía en cerdos con Complejo Respiratorio Porcino (CRP) es una combinación de agentes virales y bacterianos tales como el PCV-2, PRRS, Influenza porcina, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *A. pleuroneumoniae* o *Pasteurella multocida*, (Halbur, 1998; Thacker, 2001). La identificación de PCV-2 en la neumonía proliferativa necrotizante ha hecho que algunos autores sugieran que el PCV-2 podría predisponer al CRP (Ellis *et al.*, 1999a).

Las lesiones al microscopio para PCV-2 asociadas a CRP son neumonía broncointersticial multifocal con fibrosis peribronquial y peribronquiolar. De moderada a marcada fibrosis multifocal peribronquial y peribronquiolar presentes en el espacio intersticial de la lámina propia del pulmón, el septo alveolar marcadamente engrosado por infiltración de macrófagos y en menor número de linfocitos y células plasmáticas. La mayor parte del septo alveolar se encuentra hipertrófico con neumocitos tipo II y espacios alveolares que contienen restos

necróticos. Los signos de hibridación positiva para PCV-2 son detectados en los macrófagos intersticiales (Kim *et al.*, 2003b).

Se consideran cuatro criterios básicos para el diagnóstico de PCV-2 asociado a CRP:

1. La presencia de signos respiratorios (disnea prolongada y resistencia a la antibiótico terapia).
2. La presencia de lesiones pulmonares microscópicas características.
3. La detección de PCV-2 en aquellas lesiones.
4. La ausencia de lesiones características microscópicas del PMWS en los tejidos linfoides.

4.4 Enteritis granulomatosa

La enteritis granulomatosa es otra manifestación clínica de la infección por PCV-2. La enfermedad se presenta en cerdos entre 40-70 días edad. Los signos clínicos son: diarrea de color amarillento que puede progresar a negro, retardo del crecimiento y terapia antibiótica inefectiva. La más consistente y predominante característica histopatológica observada en esos casos es la inflamación granulomatosa y la depleción linfoide en nódulos linfoides del intestino grueso y delgado. La inflamación granulomatosa se caracteriza por infiltración de células epiteloides y células gigantes multinucleadas. Otra característica histopatológica típica es la presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos como múltiples racimos basófilos observados en el citoplasma de células histiocíticas y células gigantes multinucleadas. El diagnóstico de PCV-2 asociado con enteritis granulomatosa es realizado en base a tres criterios:

1. La presencia de diarrea
2. La presencia de lesiones características microscópicas en los nódulos linfoides del intestino delgado, pero no en los nodos linfoides.
3. Presencia de PCV-2 dentro de esas lesiones.

4.5 Epidermitis exudativa

La epidermitis exudativa es una enfermedad aguda y progresiva, la cual puede ser fatal por pioderma superficial. El *Staphylococcus hyicus* es el agente causal de la epidermitis exudativa pero son necesarios factores predisponentes para la aparición de la enfermedad (Aarestrup y Wegener, 1997; Andersen *et al.*, 1993 Tanabe *et al.*, 1996). La piel de los cerdos afectados es cubierta con un exudado odorífero de suero y cebo proporcionando una apariencia sucia y grasosa (Johnes, 1956; Mebus *et al.*, 1968). La enfermedad afecta cerdos entre 5 - 35 días de edad, algunos casos ocurren en cerdos más grandes. La morbilidad varía del 10% al 100% y la mortalidad del 5% al 90% con un promedio del 25% (Kim y Chae, 2004).

Los resultados de la supervivencia indican que el PCV-2 y el Parvovirus porcino (PPV) son altamente prevalentes en cerdos con epidermitis exudativa (Kim y Chae, 2004). Otro argumento puede ser que la epidermitis exudativa pueda ser concomitante con PCV-2 y PPV por que ambos virus son altamente prevalentes en las poblaciones de cerdos, así mismo no se han encontrado PMWS en ninguno de los cerdos estudiados; aquellos con epidermitis exudativa mostraron un alto número de PCV-2 y PPV en células infectadas en las lesiones de la piel, pero un bajo número de células positivas a PCV-2 en el tejido linfoide. PCV-2 y PPV se han manifestado como cofactores en la reproducción experimental de epidermitis exudativa (Whitaker *et al.*, 1990).

4.6 Linfadenitis necrotizante

Esta es una nueva manifestación clínica de infección por PCV-2. A la necropsia, se encuentran principalmente los linfonodos inguinales homogéneamente blancos con una superficie lisa. Las lesiones microscópicas predominantes de los linfonodos son necrosis folicular principalmente en el centro de estos, focos necróticos de una a diez células mostrando picnosis y cariorrhexis son comúnmente encontradas en el centro de los folículos y en menor

concentración alrededor de los tejidos linforeticulares. La inflamación granulomatosa y la presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos son características histopatológicas del PMWS pero no son vistas en los nodos linfoides. Los cuerpos apoptóticos de varios tamaños se muestran al hacer la prueba de TUNEL. El ADN de PCV-2 y el antígeno se detectan consistentemente en las células necróticas por Hibridación *in situ* (HIS) e Inmunohistoquímica (IHQ). Las células apoptóticas son más abundantes que las células afectadas por PCV-2 en todas las secciones de los linfonodos (Chae, 2005). No puede ser una regla que el PCV-2 este incidentalmente presente en lesiones necrotizantes de linfonodos. Los antígenos de PCV-2 se presentan en las lesiones necróticas sugiriendo que el antígeno de PCV-2 está asociado con la linfadenitis necrotizante (Chae, 2005).

4.7 Tremor congénito

El tremor congénito en los cerdos esta asociado con la desmielinización del cerebro y la corteza de la medula espinal. Casos de tremor congénito con lesiones histológicas visibles son clasificadas como de tipo A, y donde las lesiones no son aparentes se refiere como el tipo B (Done y Harding, 1967). Posibles causas incluyen Fiebre porcina clásica (FPC) (tipo A1), virus de la pseudorabia (Aujeszky) o infecciones virales desconocidas (tipo A2), ligadas al sexo (tipo A3) o autosómicas (tipo A4), por genes recesivos e intoxicaciones por triclorfón (tipo A5). El tipo A2 es la forma más común del tremor congénito, generalmente se resuelve a las 4 semanas de edad. La mortalidad en los cerdos afectados puede ser mayor a 50%. La asociación de PCV-2 con el tremor congénito es controversial. Hians y Luker (1994) fueron los primeros en reportar una asociación potencial y posteriormente la observación de ácidos nucleicos y antígenos de PCV-2 en el cerebro y médula espinal de los cerdos afectados utilizando HIS, la fluorescencia directa y la PCR (Stevenson *et al.*, 2001). Así mismo un estudio reciente no apoya la hipótesis de que PCV-1 y PCV-2 están relacionados con el temor congénito,



siendo necesarios futuros estudios para resolver la situación (Kennedy *et al.*, 2003).

5. DIAGNÓSTICO DE PCV-2

Para el diagnóstico de PMWS se deben de considerar los siguientes criterios:

- 1) La presencia de un cuadro clínico compatible con PMWS.
- 2) La presencia de las lesiones histopatológicas características mencionadas previamente sobre todo las del tejido linfoide.
- 3) La detección del PCV-2 junto a las lesiones sobre los tejidos de los cerdos afectados.

En todos los casos de PMWS el PCV-2 se presenta en una cantidad variable al menos en un tejido, siempre estrechamente asociada con las lesiones microscópicas características, de las cuales se consideran dos principalmente, la lesión granulomatosa y la presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos globulares.

Los nódulos linfoides mandibulares e inguinales se consideran las muestras clave para establecer el diagnóstico de PMWS. Sin embargo para la evaluación adecuada de un caso de infección por PCV-2 y otras infecciones concomitantes es necesario realizar la revisión de nódulos linfoides en general sumados a tonsila palatina, bazo, intestino, pulmones, hígado y riñón. Se debe de considerar en la mayoría de los casos el realizar la necropsia del animal afectado mejorará el diagnóstico global (C. Chae, 2004)

Las lesiones histológicas asociadas al PCV-2 se deben de correlacionar a la detección de antígenos o ADN viral. Para este fin se han desarrollado diversos métodos de detección en donde la utilización de la hibridación in situ (HIS) y la inmunohistoquímica (IHQ) son las técnicas más rutinarias. El antígeno o los ácidos nucleicos del PCV-2 en cerdos afectados por PMWS se encuentran frecuentemente en el citoplasma de los histiocitos, células gigantes multinucleadas (también llamadas sincitios) y otras líneas de monocitos/macrófagos tales como macrófagos alveolares, macrófagocitos hepáticos y células dendríticas foliculares

(C. Chae, 2004; C. Chae, 2005). Esporádicamente es posible detectar proteína o ácidos nucleicos virales en el citoplasma del epitelio respiratorio, renal, endotelio vascular, linfocitos, acines pancreáticos y núcleos de líneas de monocitos/macrófagos, células musculares lisas, hepatocitos y enterocitos.

Existe una fuerte correlación entre la cantidad de antígeno o ácidos nucleicos del PCV-2 y la severidad de las lesiones linfoides microscópicas. Sin embargo, es posible encontrar ácidos nucleicos o antígenos de PCV-2 en tejidos de cerdos clínicamente saludables, en estos casos la cantidad de virus y la intensidad de las lesiones histopatológicas son muy bajas. Los resultados positivos en cerdos clínicamente sanos o cerdos enfermos sin PMWS deben ser interpretados con precaución debido a que la infección subclínica de PCV-2 con viremia comúnmente ocurre en la mayoría de las granjas, aunado a esto, los cerdos infectados recientemente o cerdos en una fase de convalecencia de PMWS pueden no presentar las lesiones microscópicas típicas o ser de baja intensidad. En este caso el ácido nucleico o el antígeno del PCV-2 en el tejido linfoide puede detectarse en cantidades muy bajas. Estos hallazgos tienen una implicación importante durante la selección del animal adecuado para propósitos diagnósticos (C. Chae, 2004).

Una de las técnicas más utilizadas para la detección de ácidos nucleicos del PCV-2 es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que ha demostrado ser una de las técnicas más sensibles.

Se debe de considerar que el PCV-2 puede estar presente en granjas con o sin signología de PMWS, por lo tanto, la utilización de la PCR para el diagnóstico de este síndrome no es suficiente. Por otro lado, la utilización de PCR cuantitativo puede ayudar en el diagnóstico de la enfermedad en vivo donde la cantidad de PCV-2 es muy alta en cerdos con PMWS, comparados con cerdos infectados subclínicamente.

La PCR se utiliza como técnica para probar rutas potenciales de excreción viral. El PCV-2 se ha detectado al menos en secreciones nasales, oculares, bronquiales y tonsilares así como en orina, semen y heces. En algunos estudios

se sugiere que el alto número de rutas de excreción aumenta la probabilidad de que los cerdos manifiesten PMWS.

Como se ha mencionado para el diagnóstico de PCV-2 se requieren de técnicas que permiten la detección del virus en asociación con las lesiones histológicas. En este sentido se han empleado técnicas tales como la HIQ o la HIS. Recordemos que la detección de PCV-2 no implica que exista PMWS. La HIQ y HIS permiten la localización del PCV-2 en células o tejidos infectados, de esta manera estos métodos proporcionan del detalle celular y la arquitectura de las lesiones histológicas comparadas con la presencia del virus. Cabe mencionar que también la detección se puede realizar mediante el aislamiento viral, sin embargo, esta práctica se realiza básicamente con fines de investigación.

Existen otros métodos para el monitoreo del PCV-2 en una granja. Entre estos, se utilizan las técnicas serológicas para la detección de anticuerpos contra PCV-2, de las cuales se reportan a la inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA), inmunofluorescencia indirecta (IIF) y diversas variantes de ELISA. Se debe de considerar que el PCV-2 es ubicuo y que los patrones de seroconversión son relativamente similares entre granjas afectadas y no afectadas con PMWS, esto hace cuestionable la utilización de la serología para el diagnóstico de la enfermedad y por otro lado en su mayoría son técnicas no utilizadas comercialmente (Darwich *et al.*, 2004).

5.1 Biología molecular para el diagnóstico

El campo de la biología molecular proporciona herramientas de laboratorio de gran utilidad para el diagnóstico de enfermedades virales. Dentro de estas destaca la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la cual proporciona una alta sensibilidad y especificidad así como rapidez en la detección de ácidos nucleicos virales. Para dicho efecto, la toma y conservación de tejidos sospechosos así como la correcta manipulación de los ácidos nucleicos virales dentro del laboratorio es crucial para la detección del genoma viral (Catases *et al.*, 1997).

5.2 Extracción y purificación de ácido desoxirribonucleico (ADN)

Para la detección del virus, la extracción de ADN debe tener las siguientes características:

- romper a las células y liberar al ADN
- remover o desactivar a las enzimas que degradan al ADN
- separar al ADN de las proteínas y de otras moléculas contaminantes.

Para llevar acabo estos procedimientos generalmente se utiliza calor y un detergente como Tween 20 o SDS para desactivar a las enzimas que degradan al ADN y romper las células. También se utilizan enzimas para digerir las proteínas, las más comúnmente empleadas son proteinasa K y la Tripsina. También se utiliza la precipitación con alcohol-isoamílico y cloroformo para separar al ADN de los otros contaminantes.

5.3 Reacción en cadena de la polimerasa.

La PCR es un proceso biológico molecular descrito por primera vez en 1985 (Saiki *et al.*, 1985) que consiste en la amplificación *in vitro* de ADN. Con este proceso la insuficiente cantidad de ADN ya no es un problema en los procedimientos de Biología Molecular ni en los procedimientos de diagnóstico basados en la detección de ADN. La técnica se basa en la replicación del ADN realizada por ADN polimerasas. Estas enzimas realizan la síntesis de una cadena complementaria de ADN en el sentido 5'- 3' usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región de doble cadena se usan los denominados "iniciadores" ó "primers". Los cuales son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3' del fragmento de ADN que se desea amplificar en

una serie aproximada de 25-35 ciclos. Partiendo de este principio, la reacción en Cadena de la Polimerasa se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas:

1ª Temperatura de desnaturalización: Mediante una temperatura alta, el ADN se separa en dos hebras. La renaturalización se producirá cuando la temperatura disminuya.

2ª Temperatura de alineación: En esta fase se lleva a cabo la hibridación de los “iniciadores” a la zona 3’ con las secuencias de ADN complementarias de cada una de las hebras del fragmento que deseemos amplificar

3ª Temperatura de extensión: De la hibridación descrita anteriormente se procede a la síntesis de ADN a partir de la muestra por medio de una ADN polimerasa termoestable

5.4 Factores que modifican las condiciones de amplificación:

5.4.1 Iniciadores (“primers”)

El diseño de los “iniciadores” es muy importante pues la falla de estos nos puede llevar a una nula amplificación del producto debido a amplificación no específica o a la formación de dímeros de “iniciadores” que puedan competir con la amplificación del producto deseado.

Las variables más importantes y específicas para tener en cuenta en un buen diseño de “iniciadores” son: el tamaño de los “iniciadores” el cual influye en la especificidad, en la temperatura de fusión y en el tiempo necesario para la hibridación de los “iniciadores” a su secuencia complementaria. Los “iniciadores” de 18 a 24 bases son muy específicos de secuencia, siempre que la temperatura de hibridación sea óptima.

La relación entre temperatura de hibridación y temperatura de fusión es muy importante en la PCR. Como regla general la temperatura de hibridación debe ser 5 - 8° C más baja que la de fusión. Por tanto, si queremos un “primer” con una

temperatura de hibridación de al menos 50°C, correspondería a un “primer” con una temperatura de fusión de ($T_m \sim 55-58^\circ\text{C}$). A menudo, la temperatura de hibridación así determinada no es óptima y es necesario determinarla empíricamente. Se puede hacer fácilmente con un termociclador con gradiente.

5.4.2 Temperatura de fusión (T_m)

Es importante tener en cuenta que en una reacción de PCR hay dos “iniciadores” los cuales al diseñarse se deben de tener en cuenta, de manera que tengan temperaturas de fusión similares. Si los “iniciadores” no tienen T_m parecidas, la amplificación será menos eficiente o incluso puede no funcionar ya que el “primer” con la T_m más alta hibridará mal o inespecíficamente a bajas temperaturas mientras que el “primer” con la T_m más baja puede que no funcione a temperaturas más altas.

Las temperaturas de fusión de los “iniciadores” se calculan de una manera muy exacta con cálculos termodinámicos usando la siguiente fórmula:

$$T_{m\text{“primer”}} = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \ln (c/4)} - 273.15^\circ\text{C} + 16.6 \log_{10} [K]$$

donde H es la entalpía y S la entropía para la formación de la hélice, R es la constante molar y c es la concentración del “primer”. Pero lo más sencillo es usar cualquiera de los paquetes de software para el diseño de “iniciadores” del mercado. Por suerte, una buena aproximación (generalmente válida para “iniciadores” en el rango de 18–24 bases) a la T_m se puede calcular con la fórmula de Wallace:

$$T_m = 2(A+T) + (G+C)$$

Además hay que tener cuidado de que la T_m del producto sea lo suficientemente baja para asegurar que esté totalmente desnaturalizada a 92°C.



Este parámetro ayudará a asegurar una PCR más eficiente, pero no siempre es necesario para amplificar por PCR. En general, productos entre 100–600 pares de

bases se amplifican eficientemente en muchas reacciones de PCR. En caso de duda, la T_m del producto puede calcularse con la fórmula:

$$T_m = 81.5 + 16.6 \log_{10}[K+] + 0.41 (\%G+C) - 675/\text{tamaño}.$$

Bajo condiciones estándar de PCR de 50 mM KCL, se reduce a:

$$T_m = 59.9 + 0.41 (\%G+C) - 675/\text{tamaño}$$

5.4.3 Especificidad

La especificidad de los “iniciadores” depende de su tamaño. Es evidente que hay más combinaciones de “iniciadores” de 24 bases que de 15 bases. Con todo, debemos elegir “iniciadores” que tengan una secuencia única en el molde de DNA que queremos amplificar. Como la Taq Polimerasa es activa en un amplio rango de temperaturas, puede extender los “iniciadores” a temperaturas bajas de hibridación. Si la temperatura es demasiado baja, puede suceder una hibridación no específica que será extendida por la polimerasa con que haya una pequeña homología en el extremo 3’ de los “iniciadores”. En general, una temperatura de fusión de 55°C a 72°C es la más adecuada.

5.4.4 Complementariedad en la secuencia de los “iniciadores”

Es muy importante que los “iniciadores” no tengan homología intra-”primer” en más de 3 pares de bases. Si un “iniciador” tiene una región de auto-homología, se pueden formar estructuras parcialmente de doble cadena que interferirán con la hibridación al molde.

Otro peligro es la homología entre los dos “iniciadores”. Homología parcial en las regiones medias de dos “iniciadores” puede interferir con la hibridación. Si la homología ocurriese en el extremo 3' de cada “primer”, se dará la formación de dímeros de “primer” que impedirán la formación del producto por competición.

5.4.5 Contenido en G/C y extensiones de polipirimidinas (T, C) o polipurinas (A, G)

La composición de bases de los “iniciadores” debería ser del 45% al 55% en GC. La secuencia del “primer” debería elegirse de manera que no contenga zonas de poliG o poliC que puedan llevar a hibridación no específica. Hay que evitar también las zonas ricas en poli A y poli T ya que es por donde puede deshbridarse el complejo molde–”primer”, lo que llevaría a una menor eficiencia de amplificación. También hay que evitar secuencias ricas en polipirimidinas (T, C) y polipurinas (A, G). Idealmente el “primer” deberá tener una mezcla casi al azar de nucleótidos, un contenido en GC del 50% y ~ 20 bases (la Tm estaría en el rango de 56°C – 62°C).

5.4.6 Nucleótidos

La concentración de nucleótidos (dNTP) utilizada en la PCR varía entre 20 y 200 µM y deben estar equilibrados entre ellos. Hay estrategias que utilizan dNTP marcados radiactivamente que serán incorporados en el transcurso de la PCR y que favorecerán la detección del producto final.

5.4.7 Polimerasa termoestable

La más empleada es la *Thermus aquaticus* (Taq), bacteria termofílica que habita en fuentes termales a una temperatura de entre 70°C y 80°C. Se obtiene en forma de proteína recombinante expresada en *E. Coli*. Presenta una actividad

máxima entre los 72°C y 80°C que corresponde a la temperatura de la fase de extensión o síntesis de ADN que es de 72°C. Las cantidades óptimas de la enzima están comprendidas entre 1 y 2.5 unidades para un volumen final de incubación de 50 U/ml. Una cantidad excesiva puede conducir a la amplificación de productos no específicos.

5.4.8 Magnesio

El $MgCl_2$ (cloruro de magnesio) es un factor crítico indispensable en la PCR. Influye sobre la hibridación de los “iniciadores”, sobre la especificidad del producto de amplificación y sobre la actividad y la fidelidad de la Taq polimerasa. La concentración final de $MgCl_2$ se determina empíricamente y suele situarse entre 1 y 4 mM. La PCR no funciona sin suficientes iones de magnesio, pero una cantidad excesiva puede ser el origen de productos amplificados inespecíficos (Catases *et al.*, 1997).

5.5 Visualización de los productos de la PCR

5.5.1 Electroforesis en geles de agarosa

Las moléculas con carga eléctrica que se presentan en una solución acuosa sometida a un campo eléctrico se atraen hacia el polo opuesto a su carga neta, un proceso conocido como electroforesis.

La electroforesis se utiliza en el laboratorio para separar macromoléculas en solución, en forma analítica (es decir, sólo para verlas) o preparativa (para purificarlas). Los ácidos nucleicos tienen un fosfato cargado negativamente por nucleótido. Como el peso molecular de los cuatro nucleótidos es similar, la relación q/m (carga/masa) es independiente de la secuencia y el tamaño de la molécula. Por lo tanto la aceleración impuesta por la fuerza eléctrica es igual para cualquier molécula de ácido nucleico. La única diferencia en velocidad de



migración estará dada por diferencias en la fuerza de rozamiento, o sea de su forma y de su tamaño, entonces las distintas moléculas tendrán una velocidad que sólo dependerá de su tamaño, es decir, de su longitud en pares de bases. Durante la electroforesis, las moléculas se separarían unas de otras por difusión, impidiendo el análisis. Para lograr una separación eficiente, se utiliza un medio soporte que aumente considerablemente la fricción recibida por las macromoléculas y reduzca la difusión a un mínimo. Este medio suele ser una red molecular de algún polímero orgánico, conocida como gel, por su consistencia gelatinosa. La agarosa tiene una consistencia similar a la de la gelatina cuando se utiliza para este propósito un derivado del agar-agar, un polisacárido extraído de un alga que forma al disolverlo, una red estabilizada por interacciones no covalentes. Las mezclas de ADN de distinto tamaño migran a través del gel durante un cierto tiempo y se obtiene una separación. La agarosa está compuesta de cadenas de azúcares y las bandas de ADN de diferentes tamaños se detectan utilizando un tinte que se le añade al gel que generalmente es Bromuro de etidio, el cual permite la observación de las moléculas de ADN a través de la radiación ultravioleta.



II. MATERIAL Y METODOS

6. SELECCIÓN DE MUESTRAS

Durante la estandarización de la técnica de PCR para la identificación del PCV-2, se utilizaron muestras de tejido linfoide (linfonodo, bazo y tonsila) provenientes de casos clínicos de PMWS. Las muestras de tejido linfoide se conservaron en congelación a -20° C hasta su uso y se fijaron en formol al 10% y se incluyeron en parafina con el fin de realizar la extracción de ADN viral. Adicionalmente, las muestras incluidas en parafina fueron cortadas y teñidas con HE (hematoxilina-eosina) para histopatología con el fin de corroborar la presencia de lesiones características asociadas a PCV-2.

6.1 Testigos positivos y negativos

Testigos positivos de bloques de parafina. Linfonodos incluidos en parafina provenientes de un caso de PDNS se evaluaron como positivos al PCV-2 mediante la técnica de Hibridación *in situ* (Realizado por: Dr. Joaquim Segalés, Universidad de Barcelona, España) y se utilizaron como testigos para este trabajo.

Testigos negativos de bloques de parafina. Se utilizaron bloques histológicos provenientes de animales clínicamente sanos utilizados para pruebas biológicas del virus de la Fiebre Porcina Clásica (CENASA, Tecamac, Edo. de México). Dichas muestras se evaluaron histológicamente también para determinar la ausencia de lesiones histológicas compatibles con PMWS.

Testigos positivos de muestras congeladas. Se utilizaron muestras de tejidos linfoides positivas a PCV-2 por Hibridación *in situ* (Realizada por: Dra. Lucía García Camacho, FESC-Cuautitlán, UNAM) provenientes de cerdos con diagnóstico clínico e histológico de PMWS.

Testigos negativos de muestras congeladas. Se utilizó el tejido linfoide de animales clínicamente sanos y corroborando a la histología la ausencia de lesiones compatibles con circovirus porcino.

7. EXTRACCIÓN DE ADN

7.1 Muestras congeladas

Para la extracción de ADN de las muestras congeladas se utilizaron aproximadamente 0.5 cm³ de tejido y se colocaron en un mortero de porcelana estéril. El tejido se cortó en pedazos lo más pequeños posibles con una navaja de bisturí. Se agregaron 6 ml del amortiguador de digestión (10mM TRIS [pH 8.5], 1mM EDTA, 0.5% SDS) y la muestra se maceró a 4°C dentro de una campana de flujo laminar. El macerado se colocó en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml y se centrifugó a 3 500 rpm durante 10 minutos en una microcentrífuga HARMLE LabotTechnik mod. Z160M. El sobrenadante se colocó en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml estériles, se agregaron 5µl de "Proteínasa K" (20 mg/ml, GIBCO) y se incubaron en baño María a 56°C durante tres horas. Para inactivar la proteínasa K se incubó el tubo a 100°C por 5 minutos. Se agregaron 800 µl de alcohol-isoamílico-cloroformo (1:24), se agitó el tubo durante 10 segundos. y la muestra se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 minutos a 4° C. El sobrenadante se transfirió a otro tubo (evitando tomar la interfase), se agregaron 350 µl de isopropanol agitando para homogenizar, se almacenó a -20° C durante 3 horas ó toda la noche y posteriormente se centrifugó a 12 000 rpm durante 10 minutos a 4° C. El isopropanol se desechó y el botón de ADN se lavó tres veces con 500 µl de etanol al 70 %, centrifugando a 12 000 rpm durante 3 minutos a 4° C. Se retiró todo el etanol del tercer lavado sin tocar el botón de la muestra de ADN y este se secó en una incubadora a 37°C durante toda la noche (Sambrook *et al.*, 1989).

El ADN se resuspendió en 35µl de agua milli-Q tratada con Dietilpirocarbonato (H₂O-DEPC) y se congeló a -20° C hasta su uso

7.2 Procedimiento para bloques de parafina

Del tejido linfoide incluido en parafina, se utilizaron cortes de 20 μm y se colocaron en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml. Para disolver la parafina, se agregó 1 ml de Xileno al tubo, el cual se mantuvo en agitación suave durante 5 minutos y posteriormente se centrifugó a 12 000 rpm, 5 minutos a temperatura ambiente, decantando el sobrenadante para repetir el procedimiento durante 3 veces. Se agregó 1 ml de etanol absoluto a la muestra permitiendo reposar por 5 minutos, se centrifugó a 12 000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente y se decantó para agregar 1 ml de etanol al 70%. El tubo se agitó suavemente, se centrifugó a 12 000 rpm por 3 minutos a 20° C, se retiró el sobrenadante hasta el límite más cercano con el tejido y se secó en una incubadora a 37° C durante 3 horas.

Se adicionaron 5 μl de Proteinasa K en 500 μl de amortiguador de digestión (10mM TRIS [pH 8.5], 1mM EDTA, 0.5% SDS) y se incubó en baño María a 56° C por 3 horas (Sambrook *et al.*, 1989).

Nota. Los pasos siguientes para la extracción del ADN se realizaron como se menciona anteriormente en el procedimiento de separación de ADN para tejidos congelados.

7.3 Cuantificación de ADN

Después de la extracción de ADN, la cuantificación del mismo se realizó por espectrofotometría utilizando el equipo Eppendorf, Biophotometer V mod. 6131-23077. Para este fin, se prepararon diluciones 1:100 de la muestra del ADN problema utilizando agua destilada.

8. INICIADORES

Para la designación de iniciadores en este trabajo se evaluó la secuencia sentido del virus PCV-1 con número de acceso al GenBank Y09921 (Mankertz *et al.*, 1997). El primer sentido 5'-GATGTTTCCAAGATGGCTGCG -3' para la amplificación del PCV-2 se seleccionó de la base 671-691 y el primer antisentido 5'-GAAAGGAACCGACCAGCAGAAT-3' se tomó de la base 1067-1088 (Fig. 2). Cada uno de 21 y 22 bases respectivamente, los cuales al utilizarse durante la amplificación derivan un inserto de 417 bases. El fragmento amplificado se encuentra enclavado en el ORF2 que como se mencionó anteriormente, codifica para una proteína estructural de la cápside de 27.8 kDa que se considera la más importante antigénicamente

```

1      cttttttggtt atcacatcgt aatggttttt atttttattt atttagaggg tcttttagga
61     taaattctct gaattgtaca taaatagtcg gccttaccac ataattttgg gctgtggctg
121    cattttggag cgcatagcgc aggctgtgt  gctcgacatt ggtgtgggta tttaaagga
181    gccacagctg gtttctttta ttatttgggt  ggaaccattc aattgtttgg tccagctcag
241    gtttgggggt gaagtacctg gagtggtagg  taaagggctg ccttatgggt tggcgggagg
301    agtagttaat ataggggtca taggccaagt  tgggtggagg ggttacaaag ttggcatcca
361    agataacaac agtggacca  acacctcttt cattagaggt gatggggctc ctggggtaaa
421    attcatatth agcctttcta atacggtagt  attggaaaag taggggtagg gggttggtgc
481    cgcctgaggg ggggaggaac tggccgatgt  tgaatctgag gtggtaaca tgccaagatg
541    gctgcgagta tcctcctttt atggtgatta  caaattcttt agaaaggcgg caattgaaga
601    taccgcctct tcggcgcct  ctgtaacggt ttctgaaggc ggggtgtgcc aaatatggtc
661    ttctccggag gatgtttcca agatggctgc gggggcgggt ccttctctcg cggtaacgcc ← A
721    tccttgcca  cgtcatccta taaaagtga  agaagtgcgc tgctgtagta ttaccagcgc
781    acttcggcag cggcagcacc tcggcagcgt  cagtgaaaat gccaaagcaag aaaagcggcc
841    cgcaaccca  taagaggtgg gtgttcacc  ttaataatcc ttccgaggag gagaaaaaca
901    aaatacggga gcttccaatc tccttttttg  attatthtgt ttgcggagag gaaggtttgg
961    aagaggttag aactgctcac ctccaggggt  ttgctaattt tgctaagaag cagactttta
1021   acaagtgtaa gtggtattht ggtgcccgct  gccacatcga gaaagcgaaa ggaaccgacc ← B
1081   agcagaataa agaatactgc agtaaagaag gccacatact  tatcgagtgt ggagctccgc
1141   ggaaccaggg gaagcgcagc gacctgtcta  ctgctgtgag tacccttttg gagacggggt
1201   ctttggtgac tgtagccgag cagtccctg  taacgtatgt gagaaatttc cgcggtctgg
1261   ctgaacttht gaaagtgagc ggaagatgc  agcagcgtga ttggaagaca gctgtacacg
1321   tcatagtggg cccgcccgg  tgtgggaaga gccagtgggc ccgtaattht gctgagccta
1381   gcgacaccta ctggaagcct agtagaaata  agtggtgggg ttgatatcat ggagaagaag
1441   ttgttgtht  ggatgatht  tatggctggt taccttggga tgatctactg agactgtgtg
1501   accggtatcc attgactgta gagactaaag  gcggtactgt tccttttttg gctcgcagta
1561   ttttgattac cagcaatcag gccccagc  aatggtactc ctcaactgct gtcccagctg
1621   tagaagctct ctatcgagg  attactactt tgcaattht  gaagactgct ggagaacaat
1681   caacggagg  acccgaagc  cgatttgaag cagtggacc  accctgtgcc cttttcccat

1741ataaaataaa ttactgagt

```

Fig 2. Secuencia genómica viral completa en sentido 5' – 3' del virus PCV-1 número de acceso al GenBank Y09921 (Mankertz *et al.*, 1997). El “primer” sentido (A) para la amplificación



del PCV-2 se seleccionó de la base 671-691 (21 bases), el "primer" antisentido (B) se tomó de la base 1067-1088 (22 bases).

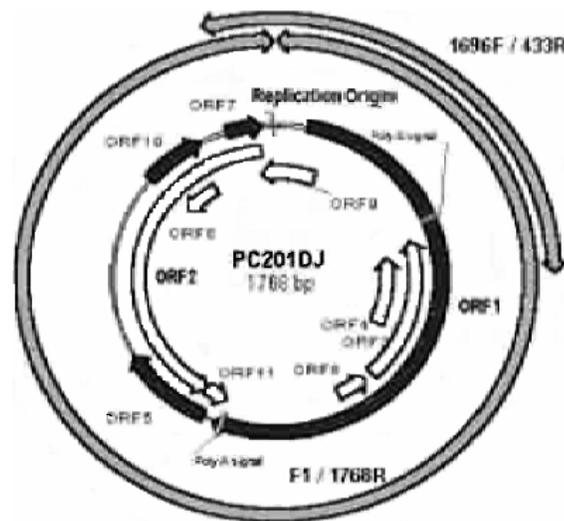


Fig. 3. Esquema de genoma del PCV-2. Se aprecian los diferentes marcos de lectura (ORF) dentro del genoma. Del lado izquierdo de la secuencia se aprecia el ORF2 de donde se seleccionaron los primer para la amplificación del PCV-2 (Tomado de Jin y Young, 2002).

9. AMPLIFICACIÓN (PCR)

En la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizaron los iniciadores sentido 5'-GATGTTTCCAAGATGGCTGCG-3' y antisentido 5'-GAAAGGAACCGACCAGCAGAAT-3' que amplifican un fragmento de 417 bases. La PCR se desarrolló a un volumen de 30 μ l, utilizando desde 1.25 Unidades (U) de Taq polimerasa hasta ajustar a 0.6 (5U/ μ l-Promega cat. M166B), 3 μ l de amortiguador de reacción de PCR (10X-Promega cat. M190G), 1 μ l de Cloruro de Magnesio (25 mM-Promega cat. A351H), 200 mM de una mezcla de DNTP s (dATP 10mM, dCTP 10mM, dGTP 10mM y dTTP 10mM- Applied Biosystem Gene Amp ® DNA PCR) y 0.25 μ l de cada iniciador (20 OD) (Tabla 1). Las condiciones de amplificación se ajustaron a una temperatura de pre-desnaturalización de 95°C y posteriormente 35 ciclos con una desnaturalización de 95°C, 30 segundos, alineación de 58°C por 1 minuto, extensión de 72°C por 1.30 minutos y al finalizar los 35 ciclos una extensión larga a 72°C para almacenar a 4°C (Rossell *et al.*, 2000) (Tabla 2). Se utilizaron 2 μ g de muestra obtenido de cada extracción de ADN de las muestras. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Eppendorf mod. 5331(MasterCycler gradient)

REACTIVO	VOLUMEN
H ₂ O-DEPC	Se ajusta al volumen total
Amortiguador de reacción PCR (10X)	3.0 µl.
MgCl ₂ 25mM	1.0 µl.
DNTP's 10mM c/u	0.6 µl
Primer sentido	0.25 µl.
Primer antisentido	0.25 µl.
Taq Polimerasa 5U/µl.	0.6 µl.
ADN (templado)	2 µg.
VOLUMEN TOTAL	30 µl.

Tabla 1. Condiciones de amplificación seleccionadas para la reacción PCR. El volumen de muestra (ADN) se ajusta de acuerdo a la evaluación por espectrofotometría (según Rossell *et al.*, 2000).

TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS	REACCION
95° C	3 minutos	1	Pre-desnaturalización
95° C	30 segundos	35	Desnaturalización
58° C	1 minuto	35	Alineación
72° C	1.5 minutos	35	Extensión
72° C	5 minutos	1	Extensión final
4° C	∞		Conservación

Tabla 2. Programa de amplificación PCR para PCV-2.



Al terminar, la muestra se conservó a 4° C en el termociclador y posteriormente se congeló a -20° C hasta su uso.

10. EVALUACIÓN ELECTROFORÉTICA

Para la visualización de los productos amplificados por PCR se utilizaron geles de agarosa al 1.5%. Para ello, se pesó 1.5 g de agarosa ultra pura y se disolvió en 100 ml de TAE 1x (TAE 10X: Tris base 48.4g [400mM], Na EDTA 2H₂O 7.4g [20mM], Sodio 16.4g [200mM], Acetato anhidro, Glacial 17.0g [296mM], Ácido acético, Agua desionizada cuanto baste para (cbp) 1 litro, pH 7.8) ó TBE 1x (TBE 10X : Tris base 121.1g [1M], ácido bórico anhydro 61.8g [1M], Na₂ EDTA 2H₂O 7.4g [20mM], agua deionizada cbp 1litro pH final 8.3).

Una vez disuelta la agarosa, se le agregó 1 µl. de Bromuro de Etidio (0.625mg/ml Promega cat. H5041) y se homogenizó suavemente para vertir en la cámara de electroforesis (Apolo Instrumentation mod. 75.710). Una vez solidificada la agarosa se adicionó el amortiguador de corrimiento TBE 1X ó TAE 1X y el corrimiento se realizó utilizando una fuente de poder (Labnet, Internacional Inc. mod 300 plus) a 30 mili amperes por aproximadamente 30 minutos.

Para la observación del corrimiento electroforético se utilizó un transluminador (SYNGene mod. BTS20M) y para la documentación de las imágenes se utilizó el software (Biol-Imagin Systems Ultra-Violet versión 2.4.3) utilizando una cámara (Biol-Imagin Systems mod. 97-0105-01).



II. RESULTADOS

En este trabajo se estandarizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa a partir de muestras de tejidos congelados y embebidos en parafina provenientes de cerdos infectados con PCV-2 con el propósito de aplicar la técnica de PCR como prueba de diagnóstico para determinar la presencia de PCV-2 en tejidos congelados de cerdos con sospecha de circovirus.

Durante esta técnica se utilizaron iniciadores que permiten la amplificación de un fragmento de 417pb correspondiente a la secuencia del virus PCV-2. Durante la estandarización se utilizaron muestras de tejidos congelados y muestras de tejidos incluidos en parafina testigos positivos y negativos, así como muestras de campo con lesiones histológicas asociadas al PCV-2. Estas muestras se trataron para la extracción de ADN, según lo especifica el material y métodos y se utilizaron como templete para ajustar las condiciones de amplificación.

Se consideró durante la estandarización la cantidad de enzima Taq polimerasa mínima para desarrollar la prueba favorablemente, así como la cantidad de ADN de la muestra en el que se permitiera la observación constante de la banda de amplificación. Por otro lado se consideró como importante la cantidad de iniciadores y la cantidad de sales ($MgCl_2$) que se agregaron a la reacción. De tal manera que las cantidades y concentraciones establecidas se describen como sigue:

En el caso de las sales de $MgCl_2$ para la estandarización de la PCR se manejaron concentraciones de 3 a 1 μl hasta determinar la cantidad de 1 μl de $MgCl_2$ (25 mM) (Fig. 4). Durante el corrimiento de los productos de PCR en geles de agarosa se detectó que a mayor concentración de sales la amplificación se pierde y/o se observa un barrido en el corrimiento que impide la observación de las bandas amplificadas.

Los iniciadores utilizados en este trabajo se manejaron a las concentraciones de 0.5, 0.25, 0.20 y 0.15 μl , estableciendo una cantidad de 0.25 μl (20 OD) como óptima para la reacción de PCR (Fig. 5 y Fig. 6).

La concentración de la enzima Taq polimerasa determinada como la más recomendable en el presente trabajo fue de 0.5 μ l sin embargo al revisar protocolos adicionales de PCR comparando la concentración de 2.5U contra 3U se encontró que la visualización de las bandas mejoraban considerablemente (dato no mostrado) por lo que se determinó esta última concentración como la óptima (Fig. 7).

En el caso del ADN que se utilizó como muestra para la amplificación por PCR se determinó que la cantidad recomendada para amplificación sería de 2 μ g. La utilización de cantidades mayores de la muestra de ADN determinaron en la mayoría de los casos gran número de bandas parásitas no diferenciables con la banda de amplificación de 417 pb esperada para PCV-2.

Al considerar finalizada la estandarización de las condiciones de amplificación para la PCR, se utilizó el ADN extraído de los testigos positivos (ADN extraído de muestras embebidas en parafina y ADN proveniente de una muestra congelada) y testigos negativos y se sometieron a una amplificación (según referencia en material y métodos) utilizando como prueba dos muestras de campo provenientes de casos clínicos de PMWS en el que se corroboraron las lesiones histológicas características del PCV2 (Fig. 9).

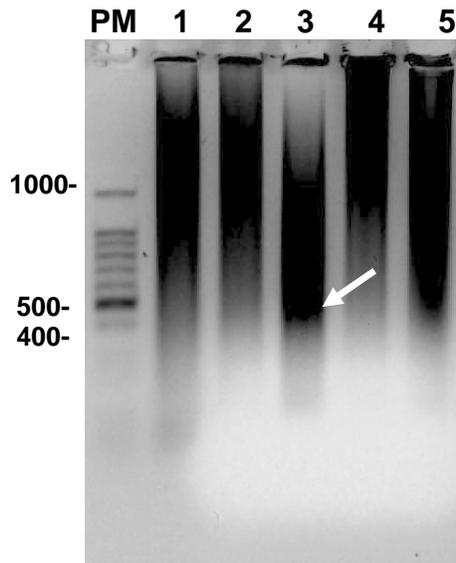


Fig. 4. Evaluación de la concentración de $MgCl_2$. Se utilizaron muestras de ADN positivas a PCV-2 amplificadas con 3 μl de $MgCl_2$ (25mM). El exceso de magnesio se evidencia en los carriles 1 a 5 por el barrido de ADN que se observa en la parte alta de los carriles. La observación de los productos amplificados se pierde en condiciones de sales aumentadas. El carril 3 muestra una banda de amplificación (flecha) de aproximadamente 400bp al final del barrido. El peso molecular (PM) utilizado como referencia es un marcador que contiene fragmentos con diferencia de 100 pares de bases (pb).

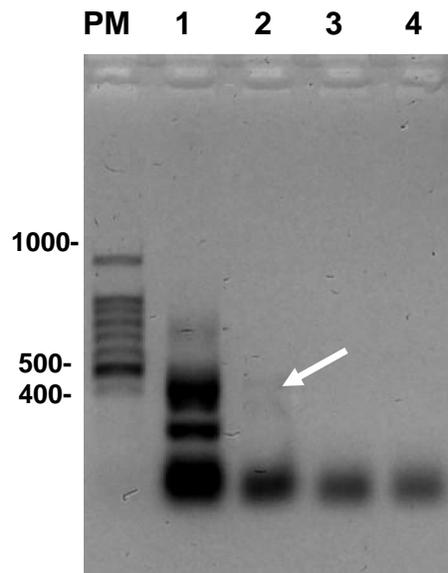


Fig. 5. Amplificación por PCR de ADN de muestras positivas a PCV-2 para la evaluación de la concentración de iniciadores a 0.5, 0.25, 0.20 y 0.15 μl (7.5 ng/ml c/u) (carriles 1, 2, 3 y 4 respectivamente). La concentración de 0.25 μl (carril 2, flecha) se seleccionó para futuras amplificaciones. El peso molecular (PM) utilizado es un marcador de 100 pares de bases (pb).

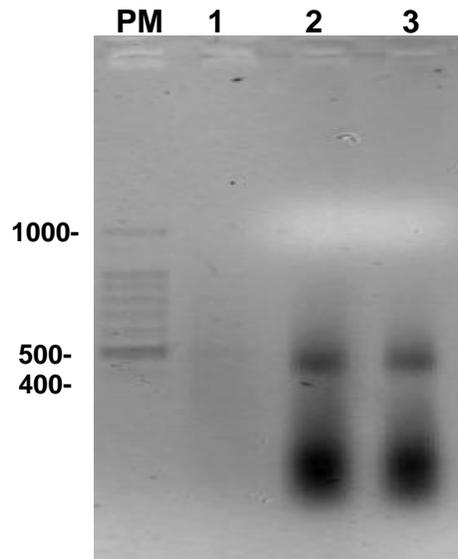


Fig. 6. Amplificación por PCR del ADN de muestras positivas a PCV-2 para evaluar la concentración de 0.25 μ l en dos diferentes muestras. El carril 2 y 3 muestran amplificación positiva. El peso molecular (PM) utilizado es un marcador de 100 pares de bases (pb).

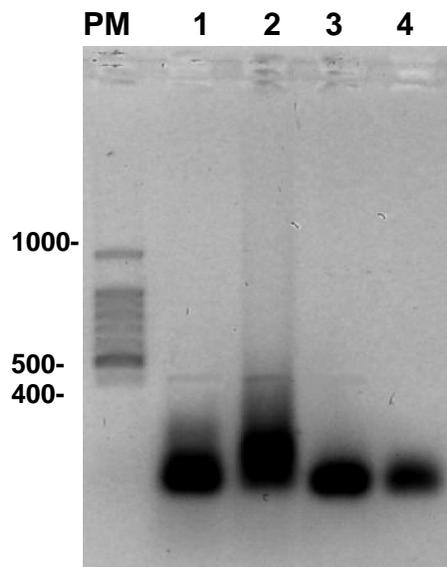


Fig. 7. Amplificación por PCR del ADN positivo a PCV-2 para evaluar la enzima Taq polimerasa (5 U/ μ l) utilizando diferentes cantidades de la misma 1 μ l, 0.5 μ l, 0.25 μ l y 0.12 μ l (carril 1, 2, 3 y 4 respectivamente). Se utilizaron como constante 2 μ g de muestra. La mejor amplificación se observa a 0.5 μ l (carril 3, flecha). El barrido por debajo de los productos amplificados corresponde a exceso de iniciadores. El peso molecular (PM) es un marcador de 100 pares de bases (pb).

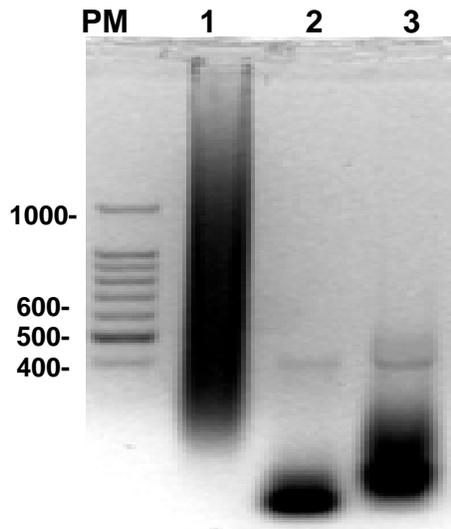


Fig. 8. Amplificación por PCR de la extracción de ADN de 3 muestras de linfonodos incluidos en parafina con lesión histopatológica coincidente con PCV-2. En el primer carril muestra el marcador de peso molecular (PM) que es un marcador de 100 pares de bases (pb). El carril 1, es una muestra desnaturalizada durante el proceso de extracción de ADN. El carril 2 y 3 muestran un producto de aproximadamente 400 pb que corresponde a el tamaño de fragmento esperado dentro de la amplificación. El barrido por debajo de los productos 2 y 3 amplificados corresponde a exceso de iniciadores a diferentes concentraciones.

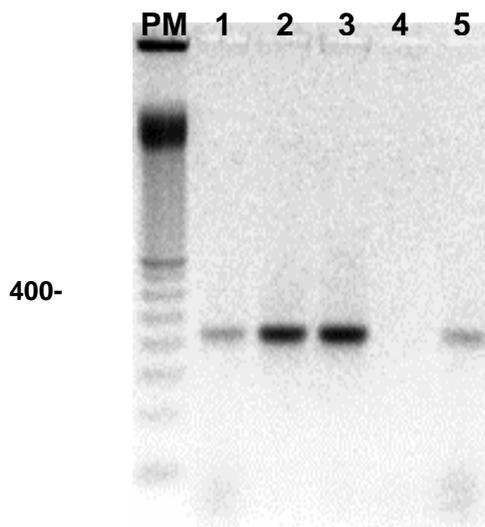


Fig. 9. Electroforesis de los productos de amplificación por PCR para PCV-2. El primer carril muestra el marcador de PM (100pb), el carril 1 corresponde a una muestra de campo (caso clínico PCV-2). Los carriles 2 y 3 son dos testigos positivos (caso positivo a PCV-2 detectado por H. in situ en España y caso clínico positivo a PCV-2 con PDNS detectado en México respectivamente). El carril 4 es un testigo negativo de tejido de cerdo. El carril 5 muestra la amplificación positiva de un caso de campo.

III. DISCUSIÓN

En el diagnóstico de PCV-2 se requieren de técnicas que permiten la detección del virus en asociación con el cuadro clínico y las lesiones histológicas características producidas en los casos de circovirus porcino. Una de las técnicas más utilizadas para la detección de ácidos nucleicos del PCV-2 es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que ha demostrado ser una de las técnicas más sensibles.

Algunos autores han desarrollado técnicas de detección del PCV-2 como son la inmunofluorescencia indirecta y el aislamiento viral (Allan, G., y Ellis, J., 2000), la hibridación *in situ*, la inmunohistoquímica y la PCR, en las cuales existen múltiples estudios de comparación entre la detección de PCV-2 y su correlación con la enfermedad clínica y presencia de lesiones en distintos órganos. (Choi, C. y Chae, C., 1999; Choi, C. et al., 2000; Rosell, C., et al., 1999; Larochelle, R., et al., 2000; Segalés, J., et al., 2002). La PCR, en diversas investigaciones se ha implementado también como prueba base para probar rutas potenciales de excreción viral. (Casamiglia, M., et al., 2002; Hamel, A., 2000; Krakowka, S., 2000).

En México los casos de circovirus porcino son detectados cada día con más frecuencia y no existen laboratorios de referencia que cuenten con un diagnóstico rápido y específico de la enfermedad. En este trabajo se planteó como objetivo estandarizar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa a partir de muestras de tejidos congelados de cerdos infectados con PCV-2 y aplicar la técnica como prueba de diagnóstico para determinar la presencia de PCV-2 en tejidos congelados de cerdos sospechosos a esta enfermedad.

La PCR es un método *in vitro* de gran sensibilidad, una amplia especificidad, versatilidad y sencillez que permite sintetizar enzimáticamente secuencias definidas de ADN en forma selectiva y rápida a partir de mínimas cantidades del agente viral. La PCR tiene la capacidad de obtener ADN de muestras procesadas



mediante diversas técnicas (embebidas en parafina, fijadas en formol, congelados etc..) de donde se ha obtenido ADN viable de muestras hasta con ocho meses de procesado el tejido como lo menciona Kiatipattanasakul-banlunara, W., et al., 2002 o Kim y Chae , 2001, 2003

Durante la extracción de ADN de muestras congeladas comparada con la extracción de muestras fijadas en formalina y embebidas en parafina, se observó que el ADN almacenado a -20°C de las muestras congeladas tuvo una mayor viabilidad y mejor respuesta a la amplificación que el de muestras embebidas en parafina.

La cantidad de templado utilizado en este trabajo se estandarizó a $2\mu\text{g}$ para evitar la aparición de bandas parasitas. Aunque autores como Kiatipattanasakul-banlunara, W., et al., 2002, maneja la cantidad de $3\mu\text{g}$. Otros protocolos comerciales de extracción de ADN para PCR (Promega) utilizan $0.01\mu\text{g}$ de templado siempre y cuando el templado fuera puro, en este trabajo consideramos que la extracción de ADN tiene componentes de los tejidos del cerdo.

Kim, J., et al., en el 2001 utilizaron 1.25mM de MgCl_2 para poder incrementar el nivel de amplificación y ayudar a la enzima Taq. Por otro lado, Wang, Ch., en el 2003 utilizó 1.5mM en una mezcla de un kit comercial. En nuestro estudio utilizamos $1.0\mu\text{l}$ a una concentración de 25Mm de MgCl_2 ya que con esta concentración las sales no interferían con la visualización de las bandas amplificadas.

La concentración óptimas de *Taq polimerasa* utilizadas en la estandarización de esta prueba fueron de 3.0U . La actividad de este enzima se ve influenciada por la concentración de dNTPs, de Mg^{2+} y de algunos iones monovalentes de manera que concentraciones elevadas de los mismos inhiben dicha actividad por lo tanto el cambio de estos reactivos y concentraciones por su parte dan lugar a un ajuste de Taq para una buena reacción y cantidades como 2.5U de Taq utilizadas en el



protocolo de Kim, J., et al., 2001, 2003, no fueron convenientes para este trabajo. Datos relacionados con la influencia de ciertos reactivos que se emplean antes de la amplificación y que alteran la actividad de la Taq por ejemplo concentraciones 1M de urea estimulan la actividad, el SDS a bajas concentraciones que la inhibe al igual que concentraciones mayores del 10% de etanol (Entrala, C. 2002).

Las condiciones de amplificación de la PCR es un punto importante dentro de la PCR ya que depende del juego de temperaturas principalmente de desnaturalización, alineación y extensión, de este modo, en este trabajo se utilizaron variaciones de temperatura entre dos protocolos diferentes de amplificación. En este sentido, se ajustaron las condiciones de amplificación de el protocolo siguiente: pre-desnaturalización de 95° C por 3 minutos, desnaturalización de 95° C por 3 segundos, alineación de 58° C por 1 minutos, extensión 72° C por 90 segundos y una extensión final 72° C por 5 minutos utilizadas (M. C. Romel Hernández Bello -CINVESTAV) y las utilizadas en el protocolo de Rossell *et al.*, en el 2000. Cabe señalar que se conservó la misma temperatura de alineación, sin embargo el protocolo de Rossell *et al.*, 2000 dió mejores resultados a la observación clara de las bandas.

II. CONCLUSION

El análisis por PCR es una herramienta que permite la detección del virus PCV-2 y es una herramienta útil que aumenta la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la Circovirus siempre y cuando se correlacione adecuadamente con una evaluación clínica de la enfermedad y la presencia de las lesiones histológicas características en los tejidos linfoides afectados.

Analizando los datos obtenidos dentro del presente trabajo se concluye que las condiciones óptimas para poder efectuar con eficacia la técnica de PCR es un programa de amplificación que consta de 35 ciclos dentro de los cuales la desnaturalización fue a una temperatura de 95°C por 30 segundos, la alineación fue a una temperatura de 58°C por 1 minuto y la extensión a 72°C por 5 minutos.

Para optimizar las condiciones de amplificación dentro de la reacción se optó por un volumen total de 30µl, de los cuales 3.0µl fueron de Amortiguador de reacción PCR, 1.0µl de MgCl₂ (25 mM), 0.6µl de DNTP's (10mM c/u), 0.25µl de cada iniciador, 0.6µl de la enzima Taq polimerasa (5U/µl), 2µg de templado y H₂O-DEPC cbp 30µl.

V . BIBLIOGRAFÍA

1. **Allan, G. M., and Ellis J. A. 2000.** Porcine circoviruses: a review. J. Vet. Diag. Inv. 12,3-14.
2. **Allan, G.M., MacNeilly, F., Kennedy, S., Meehan, B., Ellis, J., Krakowka, S. 2000.** Immunostimulation, PCV-2 and PMWS. Vet. Rec. 147, 170-171.
3. **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, 467.
4. **Andersen, L. O., Wegener, H. C., Bille-Hansen, V. 1993.** *Staphylococcus hyicus* - skin reactions in piglets caused by crude extracellular products and by partially purified exfoliative toxin. Microbol. Pat. 15, 217-225.
5. **Arestrup, F. M., Wegener, H. C. 1997.** Association between production of fibrinolysin and virulence of *Staphylococcus hyicus* in relation to exudative dermatitis in pigs. Acta Veterinaria Scandinavica 38, 295-297.
6. **Bassami, M. R., Berryman, D., Wilcox, G. E., Raidal, S. R. 1998.** Psittacine Beak and Feather Disease Virus Nucleotide Sequence Analysis and its Relationship to Porcine Circovirus, Plant Circoviruses and Chicken Anemia Virus. Viro. 249, 453 - 459.
7. **Catases, L.I., Matías - Guiu, X. 1997.** Técnicas moleculares para la obtención de ADN y reacción en cadena de la polimerasa. Vol.30, N°2.
8. **Chae, C. 2004.** Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. Vet. J. 169, 326-336.
9. **Chae, C. 2005.** A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and disease. The Vet. J. 169, 326-336.
10. **Choi, C. and Chae, C. 1999.** In situ Hybridization for the Detection of Porcine Circovirus in Pigs with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome. J. Comp. Path. 121, 265-270.
11. **Choi, C. and Chae, C. 2000.** Distribution of Porcine Parvovirus in Porcine Circovirus 2-infected Pigs with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome as shown by In-situ Hybridization. J. Comp. Path. 123, 302-305.
12. **Choi, C., Chae, C. 2001.** Colocalisation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2 in porcine dermatitis and nephropathy syndrome by double-labeling technique. Vet. Pat. 38,436-441.
13. **Clark, E. G. 1997.** Post-Weaning Multisystemic Wasting Syndrome. Proc. Am. Assoc. Swine Pract. 28., 499-501.
14. **Darwich, L., Segalés, J., Domingo, M. D., Matéu E. 2000.** Changes CD4+, CD8+ and immunoglobulin M-positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age-matched uninfected wasted and healthy pigs correlate with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues. Clin. Diag. Lab. Imm . 9, 236-242.
15. **Darwich, L., Segalés, J., Mateu, E. 2004.** Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: an immune riddle. Arch Virol. 149, 857-874.
16. **Done, J.T., Harding, J. D. J. 1967.** Kongenitaler tremor der schweine (zitterkrankheit der ferkel): veränderungen und ursachen. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 74, 333-334.
17. **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, 241-245.
18. **Ellis, J., Clark, E., Haines, D., West, K., Krakowka, S., Kennedy, S., Alla, G.M. 2004.** Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. Vet. Microbiol. 98, 159-163.
19. **Ellis, J., Hassard, L., Clark, E., Harding, J., Allan, G., Wilson, P., Strokappe, J., Martin, K., McNeilly, F., Meehan, B., Tood, D., Haines, D. 1998.** Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. Vet. J. 39,44-51.

20. **Ellis, J., Krakowka, S., Lairmore, M., Haines, D., Bratanich, A., Clark, E., Allan, G., Conoby, C., Hassard, L., Meehan, B., Martin, K., Hardin, J., Kennedy, S. and MacNeilly, F. 1999.** Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets J. Vet. Diagn. Invest. 11, 3-14.
21. **Entrala, C., 2002.** Técnicas de análisis del ADN en genética forense. Laboratorio de ADN forense, Depto. de Medicina Legal Universidad de Granada, España
22. **Fenaux, M., Halbur, P. G., Gil, M., Toth, T. E., Meng, X. J., 2000.** Genetic characterization of type 2 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, 2494-2503.
23. **Guilmoto, H. and Wessel-Robert, S.** Control of PMWS in Brittany : a Mainly zootechnical approach. In: PMWS: a new emerging disease of swine. Maternal Symposium, Melbourne, Australia, p. 45-55.
24. **Halbur, P. G. 1998.** Porcine respiratory disease. Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress 15, 1-10.
25. **Hamel, A. L., Lin, L. L., Nayar, G. P. S., 1998.** Nucleotide sequence of porcine circovirus associate with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. J. Virol. 72, 5262-5267.
26. **Harding, J. C. 1996.** Postweaning multisystemic wasting syndrome: preliminary epidemiology and clinical findings. Proceedings of the Western Canadian Association of swine Practitioners. p. 21.
27. **Harding, J. C., Clark, E. G. 1997.** Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Swine Health and Production 5, 201-203.
28. **Harms, P. A., Sorden, S. D., Halbur, P. G., Bolin, S. R., Lager, K. M., Morozov, I., Paul, P. S. 2001.** Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet. Pat. 38, 528-539.
29. **Jestin, A., Mahé, D., Blanchard, P. and de Boisseson, C. 2001.** Porcine circoviruses. Proceedings of the ssDNA Viruses of Plants, Birds, Pigs and Primates: porcine postweaning multisystemic wasting syndrome. European Society of Veterinary Virology. P. 132.
30. **Jones, L. D. 1956.** Exudative epidermitis of pigs. American Journal of Veterinary Research 17, 179-193.
31. **Kennedy, S., Moffett, D., MacNeilly, F., Meehan, B., Ellis, J., Krakowka, S. and Allan, G.M. 2000.** J. Comp. Pathol. 122, 9-24.
32. **Kennedy, S., Segalés, J., Rovira, A., Scholes, S., Domingo, M., Moffett, D., Meehan, B., O'Neill, R., McNeilly, F., Allan, G. 2003.** Absence of evidence of porcine circovirus infection in piglets with congenital tremors. J. Vet. Diagn. Inv. 15, 151-156.
33. **Kiatipattanasakul-banlunara, W., Tantilertcharoen, R., Suzuki, K., Albarenque, S. M., Thanawongnuwech, R., Nakayama, H., Doi, K. 2002** Detection of Porcine Circovirus 2 (PCV-2) DNA by Nested PCR from Formalin-Fixed Tissues of Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) Pigs in Thailand. J. Vet. Med. Sci. 64(5): 449-452
34. **Kim, J., Choi, C., Han, D., Chae, C. 2001.** Simultaneous detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome by multiplex PCR. Vet. Rec. 149, 304-305.
35. **Kim, J., Young, S. 2002.** Genetic Characterization of circovirus type -2 field isolates from PMWS pigs Immunopathology Laboratory, College of Veterinary Medicine ; Konkuk University, Seoul, 143-701, J. Vet. Sci. 3(1), 31-39.
36. **Kim, J., Chae, C. 2004.** Concurrent presence of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in retrospective cases of exudative epidermitis in pigs. Vet. J. 167, 104-106.

37. **Kim, J., Han, D. U., Choi, C., Chae, C., 2003c.** Simultaneous detection and differentiation between porcine circovirus and porcine parvovirus in boar semen by multiplex seminested polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Medical Science* 65, 741-744.
38. **Krakowka, S., Ellis, J. A., Meehan, B., Kennedy, S., McNeilly, F., Allan, G., 2000.** Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in genotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Vet. Pat.* 37, 254-263.
39. **Ladekjaer - Mikkelsen, A. S., Nielsen, J., Storgaard, T., Botner, A., Allan, G. and MacNeilly, F. 2001.** Transplacental infection with PCV-2 associated with reproductive failure in a gilt. *Vet. Rec.* 148, 759-760.
40. **Larochelle, R., Bielanski, A., Muller, P., Magar, R., 2000.** PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. *J. Clin. Microbiol.* 38, 4629-4632.
41. **Madec, F., Eveno, E., Morvan, P., Hamon, P., Blanchard, P., Cariolet, R., Amenna, N., Morvan, H., Truong, C., Mahé, D., Albina, E., Jestin, A. 2000.** Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. *Livest. Prod. Sci.* 63, 223-233.
42. **Mankertz, A., Domingo, M., Folch, J. M., LeCann, P., Jestin, A., Segalés, J., Chmielewicz, B., Plana-Duran, J., Soike, D. 2000.** Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Research* 66, 65 - 77.
43. **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.
44. **Mebus, C. A., Underdahl, N. R., Twiehaus, M. J., 1968.** Exudative epidermitis. *Pathogenesis and Pathology. Pat. Vet.* 5, 146 - 163.
45. **Meehan, B. M., L. Creelan, M. S. McNulty, and D. Todd. 1997.** Sequence of Porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. *J. Gen. Virol.* 18, 221- 227.
46. **Niagro, F. D., Forsthoefel, A. N., Lawther, R. P., Kamalanathan, L., Ritchie, B. W., Latimer, K. S. and Lukert, P. D. 1998.** Break and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. *Arch. Virol.* 143, 1723 - 1744.
47. **O'Connor, B., Gauvreau, H., West, K.H., Bogdan, J., Ayroud, M., Clark, E.G., Konoby, C., Allan, G.M. Ellis, J.A. 2001.** Multiple porcine circovirus -2 associated abortions and reproductive failure in a multisystemic swine production unit. *Can. Vet J.* 42, 551 - 553.
48. **Pensaert, B., Sanchez, E., Ladekjaer-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. *Vet. Microbiol.* 98, 175 - 183.
49. **Quintana, J., Segalés, J., Rosell, C., Casamiglia, M., Rodríguez-Arriola, G. M., Chianini, F., Floch, J. M., Maldonado,**
50. **Canal, M., Plana-Duran J. and Domingo, M. 2001.** Clinical and pathological observations of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet. Rec.* 149, 357-361.
51. **Ramos-Vara, J., Durán, O., Render, J., Craft, D. 1997.** Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in the USA. *Vet. Rec.* 141, 479 - 480.
52. **Resendes, A. R., Balasch, M., Calsamiglia, M., Segalés J., Sibila, M., Mankertz, A., Plana-Duran J. and Domingo, M. 2001.** Experimental co-inoculation of porcine circovirus type 2 (PCV-2) and a 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. P. 134.
53. **Rosell, C., Segalés, J., Plana-Durán, J., Balasch, M., Rodríguez-Arriola, G.M., Kennedy, S., Allan, G.M., McNeilly, F., Latimer, K.S., Domingo, M. 1999.** Pathological, Immunohistochemical, and In-situ Hybridization Studies of Natural Cases of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in Pigs. 120, 59 - 78.

54. **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 síndrome. *Vet. Rec.* 146, 40 – 43
55. **Rovira, A., Balasch, M., Segalés, J., García, L., Plana-Durán, J., Rosell, C., Ellerbrok, H., Mankertz, A. and Domingo, M. 2002.** Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J. Viro.* 76, 3232-3239.
56. **Royer R. L., Nawagitgul P., Halbur P. G. and Paul P. S. 2001.** Susceptibility of Porcine circovirus Type 2 to commercial and laboratory disinfectants. *Journal Swine Health and Production.* 9, 281 - 284.
57. **Sambrook, J., Frittsch, E. F & Maniatis, T. 1989.** *Molecular Cloning a Laboratory Manual* 2nd edn. New York, Cold Sprig Harbor Labor Press.
58. **Sanchez, R. E. Jr., Meerts, P., Nauwynck, H. J. and Pensaert, M. B. 2003.** *Vet Microbiol.* 96, 15 – 25
59. **Saoulidis, K., Kyriakis, S. C., Kennedy, S., Lekkas, S., Miliotis, Ch. C., Allan, G.M., Balkamos, G. C., and Papoutsis, P. A. 2002.** First report of Post-Weaning Multisystemic Wasting Síndrome and Porcine Dermatitis and Nephropathy Síndrome in Pigs in Greece. *J. Vet. Med.* 49, 202 - 205.
60. **Sánchez-Vizcaíno, J.M. Ed. 2003.** *Curso digital de enfermedades infecciosas porcinas.*
61. **Segalés J. and Domingo M. 2002.** Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Vet. Quarterly* 24(3), 109 - 124.
62. **Segalés J., Pastor J., Cuenca R. and Domingo M. 2000.** Haematological parameters in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. *Veterinary Record* 146, 675 - 676.
63. **Segalés J., Rosell C., Rodríguez-Arriola G. and Domingo M. 2000.** Patología de la circovirosis porcina. *Porci* 56, 41 - 54.
64. **Shibahara, T., Sato, K., Ishikawa, Y., Kadota, K. 2000.** Porcine Circovirus induces B cell depletion in pigs with wasting disease syndrome. *Journal of Veterinary Medical Science* 62, 1125 – 1131.
65. **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. Virol. PMWS.* 96.
66. **Smith, W., Thomson, J., Done, S. 1993.** Dermatitis/nephro syndrome of pigs. *Veterinary Record* 132, 47.
67. **Stevenson, G. W., Kiupel, M., Mittal, S. K., Choi, J., Latimer, K. S., Kanitz, C. L. 2001.** Tissues distribution and genetic typing of porcine circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tremors. *J. Vet. Diag. Inv.* 17, 57 – 62.
68. **Thacker, E. L., 2001.** Porcine respiratory disease complex – what is it and why does it remain a problem?. *Pig J.* 48,66-70.
69. **Thanabe, T., Sato, H., Watanabe, K., Hirano, M., Hirose, K., Kurokaw, S., Nakano, K., Saito, H., Maehara, N., 1996.** Correlation between occurrence of exudative epidemitis and exfoliative toxin-producing ability of *Staphylococcus hyicus*. *Vet. Microbiol.* 48, 9 -17.
70. **Thibault, S., Drolet, R., Germain, M., D'allaire, Iarochelle, R., Magar, R. 1998.** Cutaneous and systemic necrozing vasculitis in swine. *Vet. Pat.* 35,108.
71. **Tischer, I., Rasch, R., Tochtermann, G. 1974.** Characterization of papovavirus- and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg Ser A* 226, 153–167.
72. **Todd, D., Weston J. H., Soike, D. and Smyth, J. A. 2001.** Genome secuencia detrmnations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. *Virology* 286, 345 – 362.
73. **Trujano, M., Iglesias, G., Segalés, J., Palacios, J. M. 2001.** PCV-2 from emaciated pigs in México. *Vet. Rec.* Jun 23, 148(25) 792.

-
74. **Wallace, R.B., Shaffer, J., Murphy, R.F., Bonner, J., Hirose, T., Itakura, K. 1979.** Nucleic Acids Res. 6, 3543 .
 75. **West, K. H., Bystrom, J. M., Wonjnarowicz, C., Shantz, N., Jacobson, M. Allan, G. M., Haines, D. M., Clark, E. G., Krakowwka, D., McNeilly, F., Konoby, C., Martin, K., Ellis, J.A. 1999.** Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus-2. J. Vet. Diagn. Invest. 11, 530 - 532.
 76. **Whattrang, E., McNeilly, F., Allan, G. M., Greko, C., Fossum, C., Wallgren, P., 2002.** Exudative epidermitis and porcine circovirus-2 infection in a Swedish SPF-herd. Vet. Microbiol.86, 281 - 293.
 77. **Whitaker, H. K., Neu, S. M., Pace, L. W. 1990.** Parvovirus infection in pigs with exudative skin disease. J. Vet. Diagn.Invest. 2, 244 - 246.
 78. **Wood, L. W., Latimer, K. S., Barr, B. C., et al. 1993.** Circovirus-like infection in a pigeon. J. Vet. Diagn. Invest. 5, 609 -612.