

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.

DETECCIÓN MEDIANTE PCR MÚLTIPLE DE PPV, PCV2Y
Mycoplasma hyopneumoniae EN PULMONES DE CERDOS CON
LESIONES NEUMÓNICAS

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

OSCAR MONTIEL VELÁZQUEZ

Asesor

Alfredo Sahagún Ruiz

MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

Esta es una de las partes que más me gusta leer de cada libro, de cada disco, de cada obra... ahora es mi turno de escribirla, y como saben, no soy de muchas palabras. Pero ya que es de bien nacidos ser agradecidos... y es extremadamente difícil decidir a quién dedicar algo; puedes intentar agradecerérselo a muchas personas, con lo que corres el riesgo de olvidar a ese amigo rencoroso que se molestará y te lo recordará el resto de tu vida. Pero yo soy arriesgado y tengo una página por delante para rellenar.

A mis padres; ya que les debo la vida y unas cuantas cosas más y sabiendo que no existiría una forma de agradecer todos los sacrificios y esfuerzos que hicieron para mí; quiero que sientan que el objetivo logrado también es suyo y que la fuerza que me ayudara a conseguirlo fue su apoyo.

A mi Mamá Toña, todo lo que soy se lo debo a ella. Atribuyo todos mis éxitos en esta vida a la enseñanza moral, intelectual y algunas veces física (jeje) que recibí de ella.

A mi Papá quien al principio de mi vida era un ser que a veces se aparecía para aplaudir mis últimos logros. Cuando me iba haciendo mayor, era una figura que me enseñaba la diferencia entre el mal y el bien. Durante mi adolescencia era la autoridad que ponía límites a mis deseos. Ahora que soy adulto, es el mejor consejero y amigo que tengo.

A mi Mamá Vicky, por ser siempre mi gran apoyo y mí otra mamá. Por aguantarme y comprender todos y cada uno de mis caprichos. Gracias Mamá.

A mis Hermanos, aunque yo no estoy, se que ellos van a estar ahí siempre, (a veces peleando pero... es que somos hermanos); por ser ustedes el pilar en el cual me apoyo cuando estoy a punto de fracasar.

A Jazmín por estar cerca de mi, compartiendo las experiencias mas importantes de mi carrera y porque gracias a su apoyo he llegado a realizar una de mis grandes metas.

Especialmente para Alejandro, porque eres de esa clase de persona que todo lo comprende. Porque sabes escuchar y brindar ayuda cuando es necesario... porque te has ganado el cariño, admiración y respeto de todo el que te conoce; aunque lo mas importante es... simplemente decirte: GRACIAS POR SER MI HERMANO... TE QUIERO MUCHO (aunque no se note tanto).

A Mónica, por permitirme conocer e integrarme a tu gran familia. Gracias por apoyarme y confiar en mí. No sé si ya te dije lo feliz que me hace nuestra unión, la seguridad que me das al estar a mi lado, día tras día, y el saber que estaremos juntos año tras año.

A mis amigos Raúl, David, Mario, Olao, Sonia, Lorena, porque me conocen tal como soy, me acompañan en mis logros y fracasos, celebran las alegrías, comparten el dolor y jamás me juzgan por mis errores. De verdad muchas gracias!!!!

A mis tías Flor, Albina, y la maestra Gloria Irma, porque siempre están al tanto de mi familia y de mí.

Y por último, pero principalmente, a mis Abuelos, quienes aun siento entre nosotros, por contagiarme su amor y respeto por vida, la naturaleza y los animales.

Gracias a todos!!!!

AGRADECIMIENTOS

*Saber no es suficiente; tenemos que aplicarlo.
Tener voluntad no es suficiente: tenemos que implementarla.*
(Goethe)

Al Dr. Humberto Ramírez, solo usted sabe lo valiosísima que fue su ayuda para la realización de este trabajo, y por brindarme su amistad.

Al Dr. Marco A. Herradora Lozano del DPAC-FMVZ, por su colaboración en el trabajo estadístico de este trabajo.

A la MVZ Lorena Reyes Guerra, por su colaboración en el trabajo de bacteriología.

A mis amigos de la Facultad y principalmente a los del grupo 09, por permitirme conocerlos y ser parte de su vida. Por ayudarme y estar conmigo a lo largo de la carrera... y aun después.

Al departamento de Microbiología: Andira, Chucho, Ceci, Caro, Rosalba, Rebeca, Lupita, Rosalba, Alejandro de la Peña, y a todos y cada uno de los que forman parte de el.

A los miembros del Jurado

A la Universidad

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Inmunología Molecular del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Financiado por PAPIIT UNAM:

→ IN 213302 y

→ IN 219006

Investigador Responsable: Alfredo Sahagún Ruiz.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
~ Parvovirus Porcino	4
~ Circovirus Porcino	5
~ <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	6
JUSTIFICACIÓN	8
HIPÓTESIS	9
OBJETIVO	10
MATERIAL Y MÉTODOS	11
~ Extracción de ADN	11
~ Iniciadores	11
~ Reacción de la PCR	13
RESULTADOS	14
DISCUSIÓN	23
CONCLUSIONES	25
LITERATURA CITADA	27
APÉNDICE	36
~ Método de CTAB-fenol-cloroformo	36
~ Soluciones utilizadas	37

RESUMEN

OSCAR MONTIEL VELÁZQUEZ. Detección mediante PCR múltiple de PPV, PCV2 y *Mycoplasma hyopneumoniae* en pulmones de cerdos con lesiones neumónicas. (Bajo la dirección del MVZ, PhD Alfredo Sahagún Ruiz)

Las enfermedades respiratorias son uno de los problemas más importantes de la industria porcina mundial. El Complejo Respiratorio Porcino (CRP) se presenta en las etapas de desarrollo y finalización. Las pruebas diagnósticas para detección de patógenos individuales son costosas, no siempre son rápidas y eficientes; y en el caso del CRP no son suficientes debido a que hay más de un agente involucrado. El objetivo de este estudio fue diseñar una PCR múltiple para detectar ADN de Parvovirus porcino (PPV), Circovirus Porcino tipo II (PCV2) y *Mycoplasma hyopneumoniae* (*Mhp*); y determinar las asociaciones de patógenos más frecuentes en el CRP a partir de muestras de pulmones neumónicos. Se realizó el muestreo, en el rastro Tipo Inspección Federal "Abastos Cuautitlán", Cuautitlán Izcalli, Estado de México, de 102 pulmones de cerdo con lesiones sugerentes a neumonía. El ADN se extrajo a partir de 5g tejido por el método de CTAB-fenol-cloroformo. El patógeno detectado más frecuentemente fue PPV (65.7%), seguido de PCV2 (22.5%) y *Mhp* (21.6%). Mientras que por bacteriología *Pasteurella multocida* se encontró en 28.43% y *Arcanobacterium pyogenes* en 5.88%. PPV fue el patógeno que se encontró con mayor frecuencia como agente único en 20/102 muestras, y como asociado en 47/102; en contraste *Mhp* nunca se encontró como agente único y ocupó el segundo lugar como asociado en 22/102; PCV2 se encontró como agente único en solo 2/102, pero como asociado en 21/102. Las asociaciones entre patógenos fueron detectadas en 49 muestras, mientras que infecciones por un solo agente fueron detectadas en 35 muestras; lo cual indica que en los problemas neumónicos del cerdo es más frecuente que estén involucrados más de un patógeno. La PCR múltiple fue tan efectiva como la PCR simple para la detección de PPV, PCV2 y *Mhp*; considerando el tiempo y costos la PCR múltiple es más económica y rápida que la PCR simple.

ABSTRACT

OSCAR MONTIEL VELÁZQUEZ. Multiplex PCR for detection of PPV, PCV2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine lungs with pneumonic lesions. (Directed by MVZ, PhD Alfredo Sahagún Ruiz).

Respiratory diseases are one of the most important problems for the swine industry worldwide. The Porcine Respiratory Complex (PRC) occurs at development and finishing. The diagnostic tests for detection of individual pathogens are expensive, not always rapid and efficient, and in the case of PRC, are not sufficient because there is more than one agent involved. The objective of this study was to design a multiplex PCR to detect DNA of Porcine Parvovirus (PPV), Porcine Circovirus type II (PCV2) and *Mycoplasma hyopneumoniae* (*Mhp*) from pig pneumonic lung samples and to determinate the most often pathogen associations involved in PRC. One hundred two lungs samples with pneumonic lesions were obtained from the slaughter house Federal Inspection Type "Abastos Cuautitlán", Cuautitlán Izcalli, Estado de Mexico. DNA was extracted from 5 g of tissue by CTAB-fenol-cloroformo. The pathogen most often detected was PPV (65.7%), follow by PCV2 (22.5%), and *Mhp* (21.6%); while by bacteriology *Pasteurella multocida* was found in 28.43%, and *Arcanobacterium pyogenes* in 5.88%. PPV was the more often pathogen found as a single agent in 20/102 samples, and as associated agent in 47/102. In contrast *Mhp* never was found as single agent, and as associated agent was found in 22/102; PCV2 was found as a single agent in only 2/102 samples, but as associated in 21/102 samples. The associations between pathogens were found in 49 samples while single infections were only found in 35 samples. This indicates that in swine pneumonic disease is most often involved more than one pathogen. Multiplex PCR was as effective as single PCR for detection of PPV, PCV2 and *Mhp*; considering time and cost multiplex PCR is more economic and rapid than single PCR.

INTRODUCCIÓN

La producción porcina ha cambiado drásticamente en los últimos 30 años. Las condiciones de producción intensiva, el mejoramiento genético y la nutrición han permitido que los cerdos se envíen al mercado a los cinco meses de edad. Es por esto que la frecuencia de las enfermedades respiratorias del cerdo ha aumentado considerablemente, inclusive se ha propiciado la presentación de enfermedades emergentes y re-emergentes, que repercuten de manera sustancial en la salud y la producción porcina. Tal es el caso del Complejo Respiratorio Porcino (CRP), que es considerado como uno de los principales problemas de salud que afectan a las Unidades de Producción porcina (UP) en el mundo. Su impacto económico es elevado pues compromete la rentabilidad de la carne de cerdo, por lo tanto, este complejo se ha convertido en uno de los blancos de investigación en la ciencia porcina. En condiciones de campo no es fácil entender la epidemiología del CRP y de sus componentes, por lo que es necesaria más información experimental y epidemiológica acerca de las interacciones de los agentes primarios y secundarios (1, 2, 3, 4).

El CRP involucra diversos factores como son agentes infecciosos, medio ambiente y el manejo de la producción. Entre los agentes virales involucrados, se encuentran el virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio del cerdo (PRRS), el virus de la Influenza porcina (SIV), el virus de la enfermedad de Aujeszky o Pseudorabia (PRV), recientemente el Circovirus porcino tipo II (PCV2), Parvovirus porcino en algunos casos (PPV) y además en México el virus del Ojo Azul o Rubulavirus Porcino (EOA) (4, 5, 6, 7, 8, 9). Los agentes bacterianos primarios involucrados son *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica* y *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Choleraesuis. Los agentes bacterianos secundarios son *Pasteurella multocida*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis* y *Actinobacillus suis*.

Cada vez es más frecuente la asociación del PCV2 y PPV con problemas respiratorios (10, 11, 12, 13). En el año 2000, PRRS, PCV2, *Mhp*, SIV y PPV estuvieron presentes en el 42%, 22%, 22%, 19% y 5%, respectivamente, de los casos de CRP remitidos al Laboratorio de Diagnóstico de la Iowa State University (ISU-VDL) (13).

Las interacciones entre patógenos respiratorios primarios y secundarios hacen difícil la resolución del problema clínico en forma eficiente y duradera. Por tanto, el control de enfermedades depende de la identificación de los patógenos involucrados, siendo necesario un método de diagnóstico rápido, sensible y específico. Sin embargo, no siempre se dispone de las pruebas específicas para el diagnóstico, sobre todo para la detección de la enfermedad en los estados subclínicos o en animales portadores (2, 14, 15, 16, 17, 18, 19).

Parvovirus Porcino

La parvovirus porcina es una enfermedad viral de distribución mundial comúnmente asociada a problemas reproductivos; es causada por un virus de la familia Parvoviridae, mide 18-26 nm, contiene una sola cadena de ADN, es de simetría icosaédrica y no presenta envoltura. Entre sus características antigénicas presenta tres proteínas estructurales denominadas VP1, VP2 y VP3; la VP2 tiene propiedades hemoaglutinantes, principalmente de glóbulos rojos de cobayo, rata, pollo, gato y del grupo "O" humano. Es muy resistente al éter, cloroformo, sustancias ácidas, calor y puede permanecer activo en el ambiente hasta por 14 semanas. Se inactiva con formol, betapropiolactona, hidroxilamina, agentes oxidantes y radiaciones UV (5, 20, 21, 22).

Los problemas reproductivos se caracterizan por la presencia de abortos, camadas pequeñas, mortinatos y lechones débiles. La infección del PVP ocurre de forma horizontal y vertical, las hembras susceptibles lo adquieren principalmente por vía

oronasal, venérea, transplacentaria e intrauterina. Las cerdas no gestantes no presentan signos clínicos evidentes (23, 24). En México PPV es ubicuo en la mayoría de las granjas porcinas. La enfermedad se presenta cuando los anticuerpos maternos a PPV disminuyen en los cerdos destetados. En las hembras los signos clínicos se presentan más en las de primero y segundo parto (25, 26). La coinfección por PCV2 y PPV ha sido demostrada en un número significativo de casos de síndrome de adelgazamiento pos-destete en Corea y Canadá. La coinfección entre PCV2 y PPV induce lesiones y signos clínicos más severos, ambos virus han sido detectados a partir de pulmones de animales con CRP (9, 27).

Circovirus Porcino

El circovirus porcino (PCV) se encuentra ampliamente difundido a nivel mundial. Se han caracterizado dos tipos distintos: el Circovirus Porcino tipo I (PCV1) descrito como un contaminante de la línea celular de riñón porcino y el cual es apatógeno para el cerdo; y Circovirus Porcino tipo II (PCV2), reportado en Canadá, los Estados Unidos, muchos países de Europa y algunos países de Asia. PCV2 está asociado a cuadros patológicos como el síndrome de adelgazamiento post destete (PMWS), temblores congénitos, lesiones en fetos abortados, lechones nacidos muertos y lechones débiles. La asociación de PCV2 al CRP induce una enfermedad clínica respiratoria prolongada e inusualmente grave, neumonía intersticial granulomatosa con bronquiolitis y fibrosis bronquiolar (27). El PMWS y el CRP asociados a PCV2 causan grandes pérdidas económicas en la industria porcina mundial. La mayoría de las UP son serológicamente positivas al PCV2 con infección subclínica (28, 29, 30, 31). Experimentalmente, la doble infección de cerdos con PCV2 y PPV agrava los signos clínicos y lesiones de PMWS, (32) mientras que la inoculación solo con PCV2 produce leves lesiones

histológicas (10, 33, 34, 35). La primera descripción en México fue hecha en 2001 y en 2006 se tuvo el primer aislamiento (36, 37, 38, 39).

Los circovirus porcinos deben su nombre al hecho de que su genoma es circular y está unido de forma covalente en sus extremos. Pertenecen a la familia Circoviridae, género Circovirus. Es un virus sin envoltura, esférico, de simetría icosaédrica, y de tamaño pequeño, 17 nm, lo que los convierte en los virus de vertebrados más pequeños que se conocen. Posee una molécula de ADN circular simple de 1.7 kb. Es estable al medio ambiente y puede ser transportado de forma mecánica; es muy resistente a la inactivación por detergentes y desinfectantes usuales. En algunos casos, la enfermedad se puede presentar en UP con buenas medidas de bioseguridad. El virus ha sido aislado o detectado en tonsilas, timo, bazo, hígado, riñón, nódulos linfáticos, mucosa nasal, pulmón, intestino delgado, médula ósea, encéfalo y testículo (5, 29, 40-44).

El diagnóstico de laboratorio de PMWS y la neumonía asociada a PCV2 es difícil, se lleva a cabo principalmente por el aislamiento viral en células susceptibles, técnicas de detección de antígenos (inmunohistoquímica e inmunoperoxidasa) o ácidos nucleicos virales (Hibridación *in situ* y PCR) y por la detección de anticuerpos específicos (ELISA) (20, 43-46).

Mycoplasma hyopneumoniae

La Neumonía Enzoótica (NE), causada por *Mycoplasma hyopneumoniae* (*Mhp*), es una enfermedad crónica con alta morbilidad y baja mortalidad; afecta a los cerdos en etapa de crecimiento y engorda; y presenta alta prevalencia a nivel mundial. Este microorganismo pertenece a la clase Mollicutes; carece de pared celular, es pleomórfico, mide 0.2 μm de diámetro y está rodeado por una membrana citoplasmática de 10 nm de grosor (4, 5).

Es un microorganismo de difícil aislamiento, su cultivo se realiza en medios complejos (medio de Friis) a los que se recomienda la adición de un antisuero contra *Mycoplasma hyorhinis* ya que frecuentemente se encuentra en el tracto respiratorio del cerdo y debido a que es de desarrollo rápido compete con *Mhp* (47, 48). Las colonias, en medio sólido, se hacen visibles hacia los 2 días de incubación y alcanzan un tamaño de 0.5-1 mm de diámetro entre los 4 y 7 días. Estas colonias son difíciles de observar a simple vista y están desprovistas de protuberancia central (4, 5).

El *Mhp* resiste la liofilización y temperaturas de -180° C. Puede sobrevivir durante mucho tiempo en medio líquido de Friis. No sobrevive a la desecación más allá de una semana. Sobrevive bien en el agua de lluvia (47, 49–52).

Los primeros signos de la NE en infecciones agudas son anorexia e hipertermia. En algunos casos la tos es el único signo apreciable en las primeras fases de la enfermedad. La intensidad de estos signos se exagera por condiciones de estrés o por infecciones secundarias que pueden conducir a la muerte de los animales afectados. El diagnóstico clínico es muy importante para detectar la NE, este se realiza en base a sintomatología de los cerdos en grupo, o bien por la observación de lesiones a la necropsia (12, 13, 53-67). Recientemente Krakowka *et al.*, 2007 (68) han reportado que *Mhp* es un factor importante en la infección por PCV2 en el CRP y en el PMWS. La NE puede complicarse por la presencia de otros agentes como *P. multocida*, *B. bronchiseptica*, *H. parasuis* y virus como PRRS, PRV, PCV2 y PPV. Por lo que es necesario utilizar técnicas de laboratorio especializadas para el diagnóstico que permitan la detección de estos agentes (12, 53, 56, 57).

JUSTIFICACIÓN

Los agentes virales y bacterianos que afectan el sistema respiratorio del cerdo son de los principales factores que impactan en la industria porcina, pues bajo las condiciones de producción intensiva de los cerdos, es común que estos sean infectados simultáneamente con dos o más patógenos. Un diagnóstico definitivo de infecciones múltiples es a menudo difícil, ya que los signos clínicos pueden ser variables. Las pruebas diagnósticas específicas de virus individuales son costosas y no siempre nos dan los resultados de una forma rápida. Un nuevo método, la PCR múltiple, se ha utilizado para identificar y distinguir simultáneamente múltiples patógenos en una sola muestra (69-71). En éste estudio se propone el diseño y estandarización de una PCR múltiple para la detección de ADN de PPV, PCV2 y *Mhp* a partir de muestras de pulmón de cerdos sacrificados en rastro; así como valorar las posibles asociaciones de agentes en CRP.

HIPÓTESIS

- Las infecciones respiratorias múltiples del cerdo serán más frecuentes que las causadas por un solo patógeno
- La PCR múltiple será tan eficiente en la detección de ADN de los patógenos pulmonares del cerdo como la PCR simple

OBJETIVOS

- Diseñar una PCR múltiple para la detección de PPV, PCV2 y *Mhp*
- Estandarizar la técnica de extracción de ADN de tejido pulmonar de cerdo
- Detectar por la PCR ADN de PPV, PCV2 y *Mhp* a partir de pulmones de cerdo con lesiones neumónicas
- Detectar las asociaciones más frecuentes de patógenos en pulmones de cerdo con lesiones neumónicas

MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron y colectaron 102 muestras de pulmones de cerdos con lesiones sugerentes a enfermedad respiratoria sacrificados en el rastro Tipo Inspección Federal (TIF) "Abastos Cuautitlán" ubicado en el municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México; provenientes de los estado de Jalisco y Veracruz. Las muestras fueron tomadas de los lóbulos craneal y medio, de pulmones con lesiones neumónicas; se identificaron en orden progresivo y se transportaron en refrigeración al Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, donde se les procesó para extracción de ADN por el método de CTAB-fenol-cloroformo (72). En un estudio paralelo las mismas muestras fueron trabajadas por bacteriología¹.

Extracción de ADN

Se maceraron 5g de la muestra de pulmón, el macerado se congeló y descongeló tres veces en nitrógeno líquido, se centrifugó a 2630 xg durante 10 min (70). Se recuperó el sobrenadante y se filtró a través de una membrana² de 0.45 µm, posteriormente se realizó la extracción de ADN por el método de CTAB/fenol/cloroformo (72) (Ver Apéndice).

Iniciadores

Se diseñaron *de novo* 3 juegos de iniciadores, uno por cada agente (PPV AY390557.1, PCV2 AF027217.1 y *Mhp* AY957500.1), a partir de secuencias de genes completos reportados en *GenBank*; estos iniciadores fueron elegidos tomando en cuenta el tamaño de los productos de la PCR, un valor de G/C de 41 al 48%, excepto en el PPV (PPVNS1-R (71%));

¹Comunicación Personal MVZ Lorena Reyes Guerra (tesis de Maestría) 2007.

² Millipore®

una TM de 62 °C para todos los iniciadores, una longitud entre 18 a 23 pares de bases (pb), que la base inicial y final fuera G/C (excepto en el PPV (PPV.NS1-F)):

- Parvovirus Porcino: iniciadores a partir de la proteína no estructural NS1 que amplifican un producto de la PCR de 221 pb.
 - ~ **PPV.NS1-F 5' TACCAAGCAACAATGGCTAGC 3'** TM= 62°C
 - ~ **PPV.NS1-R 5'GTTGGCTCGCTCCACGGC 3'** TM= 62°C
- Circovirus Porcino tipo II: iniciadores a partir del gen de la replicasa que amplifican un producto de la PCR de 427 pb.
 - ~ **CVP-F 5' CTGATTACCAGCAATCAGACC 3'** TM= 62°C
 - ~ **CVP-R 5' CCACTATTGATTACTTCCAACC 3'** TM=62°C
- *Mycoplasma hyopneumoniae*: iniciadores a partir del gen parálogo de la adhesina p97 que amplifican un producto de la PCR de 760 pb
 - ~ **Mhp-F 5' GTCTAACTGTCCGACTTAGCA 3'** TM= 62°C
 - ~ **Mhp-R 5' GCCTGTGATTTGCGAAGACTA 3'** TM= 62°C

Adicionalmente, se utilizaron iniciadores diseñados *de novo* para PRV (PRVgE, AY170318.1) los cuales amplifican un producto de la PCR de 515 pb.

- ~ **PRVgE-F 5' GCGGTGCCTGCTGTACTAC 3'** TM= 62°C
- ~ **PRVgE-R 5' CGACGACGCACGTCATCAC 3'** TM= 62°C

Igualmente fueron utilizados los iniciadores para *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) y *Haemophilus parasuis* (HPS) descritos previamente, los cuales amplifican un producto de la PCR de 422 pb y 821 pb respectivamente (73, 74).

- ~ **APPL-F 5' TGGCACTGACGGTGATGA 3'** TM= 56°C
- ~ **APPL-R 5' GGCCATCGACTCAACCAT 3'** TM= 56°C
- ~ **HPS-F 5' GTGATGAGGAAGGGTGGTGT 3'** TM= 62°C
- ~ **HPS-R 5' GGCTTCGTCACCCTCTGT 3'** TM= 58°C

Reacción de la PCR

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen de 20 μl de una mezcla de 75 mM Tris-HCl pH 8.8, 20 mM $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 0.01% Tween 20, 1.5 mM MgCl_2 , 50 mM de KCl, 200 μM de una mezcla de dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 7.5% de dimetil sulfóxido (DMSO) 0.25 unidades de Taq polimerasa³, 5 pmol de cada par de iniciadores, y 100 ng/ μl de ADN de muestra sospechosa para cada reacción simple. La reacción de PCR múltiple fue llevada a cabo mezclando los tres pares de iniciadores para PPV, PCV2 y *Mhp* junto con las soluciones mencionadas en la PCR simple, ajustando el volumen final con H_2O MilliQ para obtener 20 μl por reacción (69).

Todas las reacciones de PCR de los experimentos de este trabajo incluyeron un testigo negativo conteniendo todos los elementos de la reacción excepto ADN, así como un testigo positivo⁴, el cual contenía los mismos elementos de la reacción además de 1 μL (100 ng/ μl) de ADN del patógeno a detectar (69, 70, 71). Las condiciones de la PCR simple y múltiple consistieron en un ciclo de desnaturalización inicial a 95° C por 4 min; seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94° C por 1 min, alineación a 57° C por 1 min y extensión a 72° C por 1 min 30 seg; y por último un ciclo de extensión final a 72° C por 10 min. La reacción de amplificación se desarrollo en un termociclador⁵. Los productos de la PCR fueron separados por electroforesis a 100 voltios en un gel de agarosa⁶ al 1%, teñidos con una solución de bromuro de etidio al 0.1%⁷ y posteriormente evaluados en un transiluminador⁸ de luz ultravioleta y digitalizados en un fotodocumentador⁹.

Análisis estadístico

Las frecuencias de detección de agentes fueron analizadas por las pruebas de Wilcoxon, Spearman y Chi cuadrada.

³ Roche®

⁴ PPV y PCV2, proporcionados por el Dr. Humberto Ramirez; *Mhp* cepa J, Canada.

⁵ Mastercycler Gradient Eppendorf®.

⁶ ONBIO # Cat. AG-100

⁷ Research Organics # Cat. 3016E

⁸ Ultra-Violet Products, inc ®

⁹ Kodak ®, Gel logic 200 Imaging System

RESULTADOS

Se estandarizó la PCR simple para la detección de ADN de PPV, PCV2 y *Mhp*; cuyas bandas corresponden, en orden ascendente, a 221 pb para PPV, a 427 pb para PCV2, y finalmente a 760 pb para *Mhp* (Figura 1).

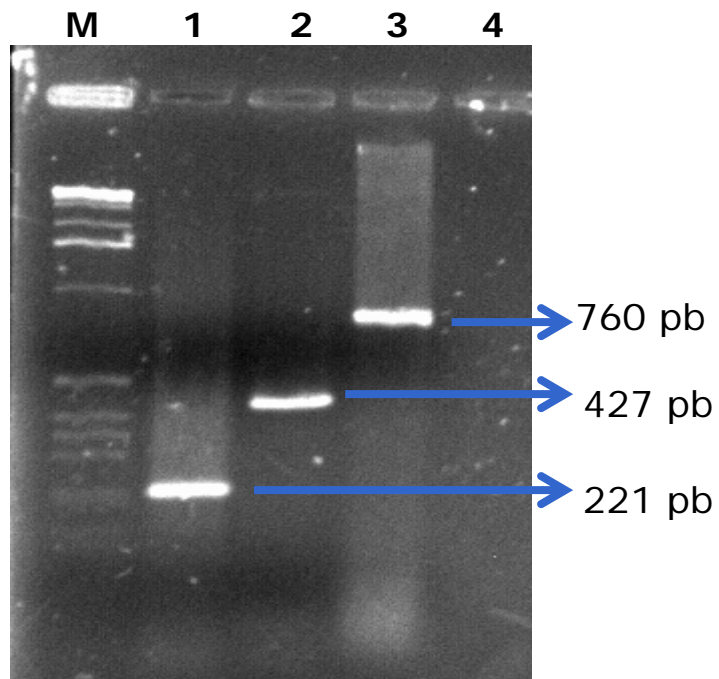


Figura 1. Amplificación por la PCR simple de PPV, PCV2 y *Mhp*
Carril: M= 1 kb ladder, 1= PPV, 2= PCV2, 3= *Mhp*, 4= C(-)

Se realizó la estandarización de la PCR múltiple para detección de ADN de PPV, PCV2 y *Mhp* (Figura 2).

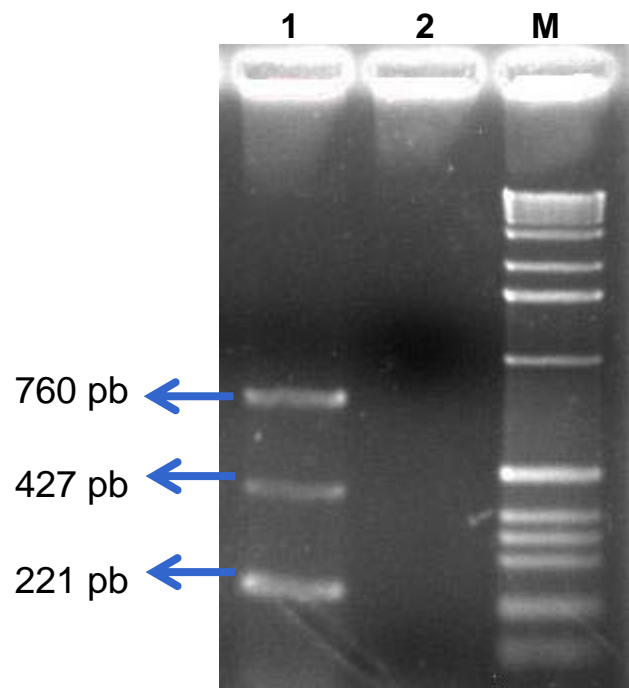


Figura 2. Amplificación por la PCR múltiple de PPV, PCV2 y *Mhp*
Carril: 1= PCR múltiple de PPV 221 pb, PCV2 427 pb y *Mhp* 760 pb, 2= C (-), M= 1 Kb Ladder

Los resultados obtenidos por la PCR simple y por bacteriología¹ nos muestran el número de pulmones que fueron positivos a PPV, PCV2 y *Mhp*, *P. multocida* y *A. pyogenes*. El agente detectado más frecuentemente por la PCR simple fue PPV con 67/102 muestras ($P < 0.0001$), seguido de PCV2 con 23/102, *Mhp* con 22/102 y por último PRV, APP y HPS, cada uno con 0/102; mientras que por bacteriología el más frecuente fue *P. multocida* con 29/102 y el menos frecuente *A. pyogenes* con 6/102 ($p < 0.0001$) (Cuadro 1, 2 y Figura 3).

Cuadro 1							n= 102
Patógenos pulmonares detectados por PCR							
PPV*	PCV2	<i>Mhp</i>	PRV	APP	HPS	Muestras positivas	%
+						67	65.68
	+					23	22.54
		+				22	21.56
			+			0	0
				+		0	0
					+	0	0

* $p < 0.0001$

Cuadro 2			n= 102
Patógenos pulmonares detectados previamente por bacteriología ¹			
<i>P. multocida</i>	<i>A. pyogenes</i> *	Muestras positivas	%
+		29	65.68
	+	6	28.43

* $p < 0.0001$

¹Comunicación Personal MVZ Lorena Reyes Guerra (tesis de Maestría) 2007.

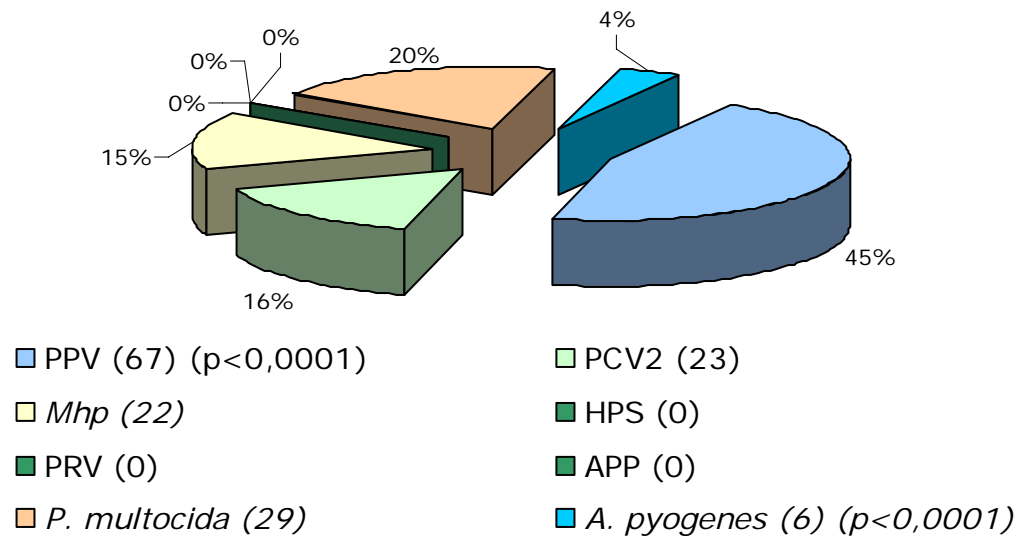


Figura 3: Total de patógenos detectados por PCR y Bacteriología

De los agentes que fueron detectados produciendo infección única, el PPV fue el principal con 20 muestras positivas, seguido de *P. multocida* con 11 muestras, PCV2 y *A. pyogenes* con 2 muestras, mientras que *Mhp* no se encontró como agente único (Cuadro 3 y Figura 4).

Cuadro 3						n= 102
Patógenos pulmonares detectados como agentes únicos						
PPV*	PCV2*	<i>Mhp</i> *	<i>P. multocida</i> **	<i>A. pyogenes</i> **	Muestras positivas	%
+					20	19.60
			+		11	10.78
	+				2	1.96
				+	2	1.96
		+			0	0

* PCR, ** Bacteriología¹

¹Comunicación Personal MVZ Lorena Reyes Guerra (tesis de Maestría) 2007.

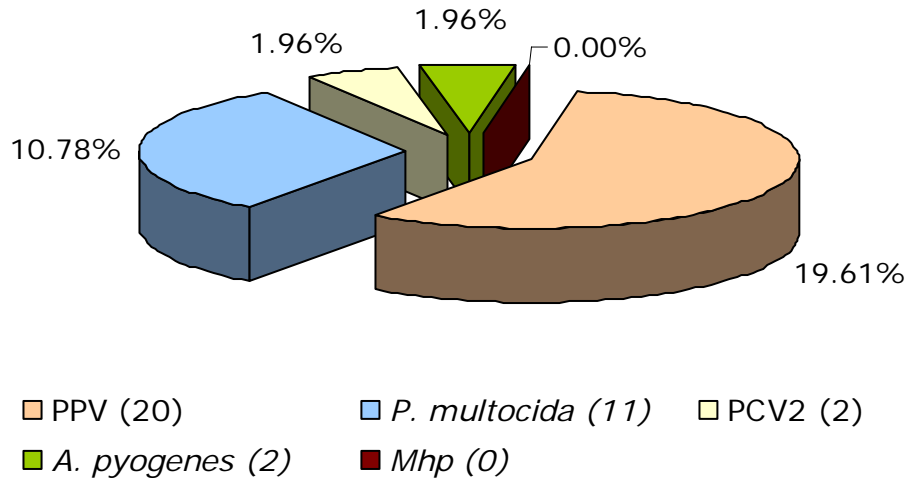


Figura 4: Patógenos pulmonares detectados como agentes únicos

En contraste, se encontraron varias asociaciones entre patógenos, es decir cuando dos o más agentes fueron detectados en una sola muestra; PPV fue el patógeno que con mayor frecuencia se encontró asociado a otros agentes en 47 muestras ($p < 0.0001$). El segundo patógeno que se encontró más frecuentemente asociado fue *Mhp* en 22 muestras; seguido de PCV2 en 21 muestras; *P. multocida* en 18 y finalmente *A. pyogenes* en 4 muestras ($p < 0.0001$). La asociación más frecuente fue entre PPV y PCV2 en 20 muestras, en 2 de estas se detectó además *P. multocida*, mientras que en 6 de las 20 además se detectó *Mhp* (estas últimas se utilizaron para la PCR múltiple), y en 1 de estas 6 se detectó además *P. multocida* (Cuadro 4, y Figura 5). Se encontró una correlación positiva por la prueba de Spearman para las asociaciones entre PPV con *Mhp* de 0.2786 ($p < 0.0046$), seguido de PPV con PCV2 0.2417 ($p < 0.0144$), PCV2 con *Mhp* 0.1163 y *Mhp* con *P. multocida* 0.0394; mientras que el resto de las asociaciones mostraron una correlación negativa (Cuadro 5).

Cuadro 4						n= 102
Patógenos pulmonares detectados en infección mixta						
PPV*	PCV2*	Mhp*	<i>P. multocida</i> **	<i>A. pyogenes</i> **	Muestras positivas	%
+	+				12	11.76
+			+		9	8.82
+		+			9	8.82
+	+	+			5***	4.90
+		+	+		5	4.90
+				+	4	3.92
+	+		+		2	1.96
+	+	+	+		1***	0.98
	+	+			1	0.98
		+	+		1	0.98

* PCR, ** Bacteriología¹, *** utilizadas para la PCR múltiple

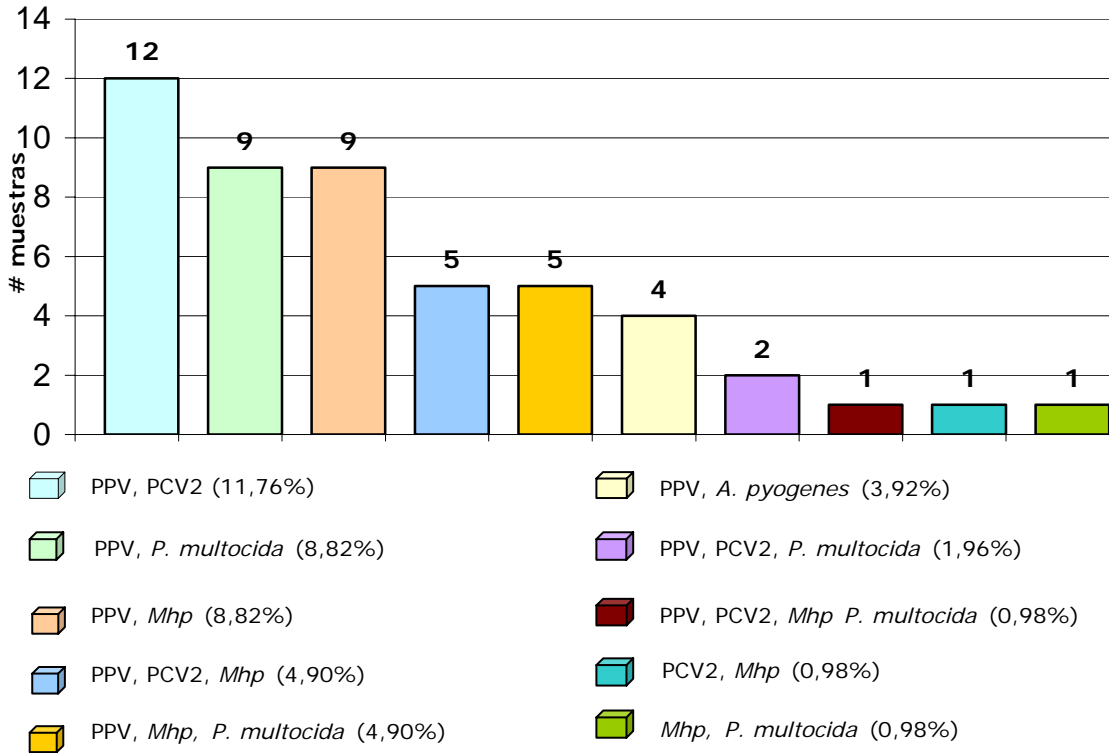


Figura 5: Patógenos pulmonares detectados en infección mixta

¹Comunicación Personal MVZ Lorena Reyes Guerra (tesis de Maestría) 2007.

Las 6 muestras donde fueron detectados PPV, PCV2 y *Mhp* de forma conjunta por la PCR simple fueron utilizadas para la PCR múltiple (Figura 6).

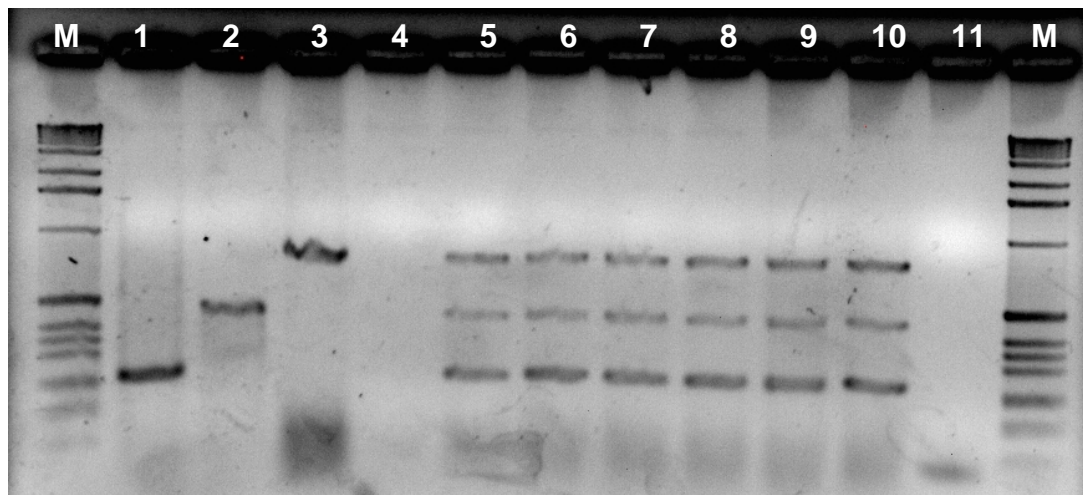


Figura 6: Amplificación por la PCR múltiple de PPV, PCV2 y *Mhp*
Carril M = 1 kb ladder, 1= PPV, 2= PCV2, 3= *Mhp*, 4 y 11= C (-),
5-10= muestras positivas a PPV PCV2 y *Mhp*

Cuadro 5 n= 79		
Asociaciones de Patógenos Pulmonares		
Agentes	Muestras	%
PPV/ <i>Mhp</i> [□]	20	26.6
PPV/PCV2 ^{□□}	20	25.3
PPV/ <i>P. multocida</i>	17	21.5
PCV2/ <i>Mhp</i>	7	8.8
<i>Mhp/P. multocida</i>	7	8.8
PPV/ <i>A. pyogenes</i>	4	5.1
PCV2/ <i>P. multocida</i>	3	3.8
PCV2/ <i>A. pyogenes</i>	0	0
<i>Mhp/A. pyogenes</i>	0	0
<i>P. multocida/A. pyogenes</i>	0	0

□ (p<0.0046), □□(p<0.0144)

Cuadro 6		
Comparación entre PCR simple y PCR múltiple para 3 agentes		
	PCR simple	PCR múltiple
Tiempo	9 h	3 h
Costo promedio	\$600.00	\$200.00

Considerando el número de agentes detectados por muestra, encontramos que fue mas común detectar 2 agentes involucrados en la infección pulmonar en 36 muestras, seguido de un solo agente en 35 muestras, 3 agentes se encontraron en 12 muestras y finalmente el número máximo de agentes detectados por muestra fue de 4 una de ellas. Dieciocho muestras resultaron negativas (Cuadro 7 y Figura 7).

Cuadro 7			n= 102
Número patógenos detectados por muestra			
	Patógenos	Muestra	%
	0	18	17.65
	1	35	34.31
	2	36	35.29
	3	12	11.77
	4	1	0.98
Total		102	100

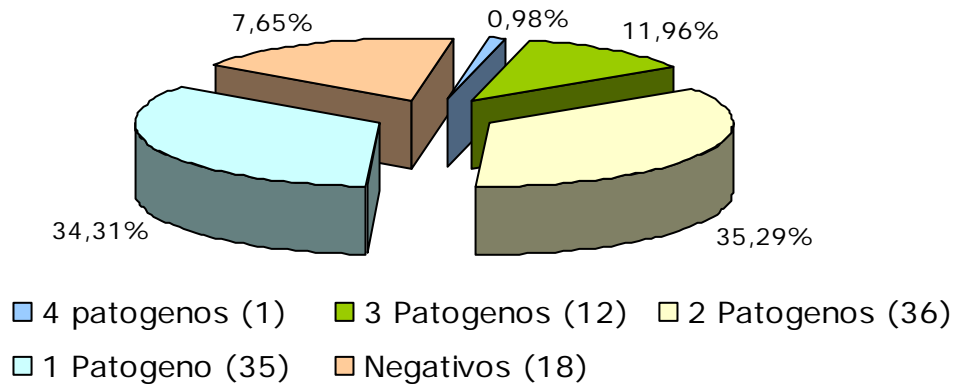
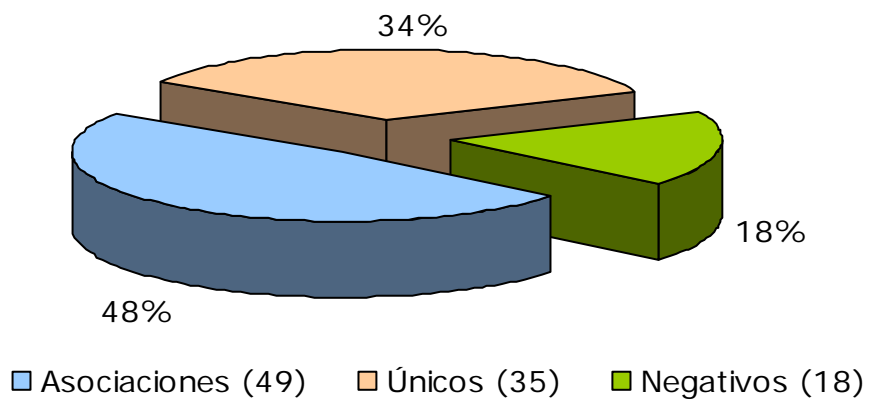


Figura 7: Número de patógenos detectados por muestra

Asociaciones

El CRP es provocado por diferentes agentes bacterianos y virales; en este estudio, las asociaciones entre patógenos se encontraron en 49 muestras; mientras que el número de casos donde se encontró un solo agente fue de 35 muestras (Figura 8), lo que confirma que en los problemas neumónicos del cerdo regularmente están relacionados dos o mas patógenos. Las interacciones observadas en este estudio, han sido reportadas en el CRP (18, 45, 46, 69, 70).



Gráfica 8: Patógenos asociados VS únicos

DISCUSIÓN

En este estudio, el ensayo de la PCR simple y múltiple demostró ser capaz de detectar y diferenciar de forma rápida los tres agentes patógenos aquí considerados (PPV, PCV2 y *Mhp*), a partir de muestras de tejido pulmonar. Al considerar la misma TM en el diseño de los iniciadores facilitó que estos pudieran ser utilizados en una misma reacción de amplificación por la PCR múltiple. Esto último coincide con Huang *et al.*, 2004 (69), quien señala que el diseño de cada par de iniciadores es crucial para tener éxito en la amplificación por la PCR simple, pero aun más en la PCR múltiple.

Recientemente, Allan *et al.* (9, 34), Kim *et al.* (27) y Kennedy *et al.* (33) demostraron que la interacción entre PCV2 y otros patógenos respiratorios y reproductivos como el PPV puede ser importante para la presentación del CRP y del PMWS. Lo que coincide con nuestros resultados, en donde PPV se encontró asociado con otros agentes en 46.6% de pulmones con lesiones neumónicas. Sorden *et al.*, 2002 (10), reportaron un incremento en la cantidad de ácidos nucleicos o antígenos de PCV2 en pulmones de cerdos coinfectados experimentalmente con PRRS y PCV2 comparando con la infección con PCV2 sólo; de manera similar a observaciones de otros investigadores (75-83).

Sorden *et al.*, 2002 (10), reporta que la asociación más frecuente es PCV2 con PPV seguida de PCV2 con *Mhp*. Mientras que en nuestro estudio, encontramos que PPV con *Mhp* (21 muestras) fue la asociación más frecuente; seguida de PCV2 con PPV (20 muestras); PPV con *P. multocida* (17 muestras); PCV2 con *Mhp* (7 muestras), *Mhp* con *P. multocida* (7 muestras); PPV con *A. pyogenes* (4 muestras) y PCV2 con *P. multocida* (3 muestras).

Bolin *et al.*, 2001, señala que *Mhp* actúa como patógeno primario de la NE (81); sin embargo en nuestro trabajo se detectaron 21.6% de pulmones positivos a *Mhp* mediante PCR, pero en ninguna de las muestras se encontró a *Mhp* como agente único, siempre se le encontró relacionado con otro u otros agentes.

Se sabe que PPV es endémico en las UP y se puede encontrar en cerdos de destete sin causar enfermedad, aunque también ha sido asociado al PMWS (25, 27), sin embargo en nuestro estudio además de encontrarlo asociado a otros agentes respiratorios como PCV2, en 20 casos se le encontró como agente único (negativo por la PCR a PCV2, PRV, HPS, APP y *Mhp*, y a la bacteriología), en pulmones con lesiones neumónicas. La demostración hecha por Ellis *et al.*, (84), de las lesiones pulmonares asociadas con PPV y PCV2, sugiere que PPV tiene un papel importante en el CRP, y aunque PPV es un agente patógeno ubicuo dentro de las UP aun no esta claro si actúa de manera sinérgica, secundaria, o simplemente como patógeno oportunista. En nuestros resultados PPV fue aislado como agente único lo cual sugiere que es un patógeno primario en enfermedad respiratoria y además se le encuentra asociado en las afecciones por CRP; estos hallazgos evidencian la necesidad de esclarecer la participación de PPV en el CRP; con el fin de considerarlo en el diagnóstico e implementar medidas de control del CRP.

Las evidencias obtenidas en este estudio, junto con las investigaciones citadas; apoyan fuertemente la hipótesis de la importancia del papel de PPV y PCV2 en el CRP. Por lo que es recomendable que en el diagnóstico de casos de CRP se incluyan pruebas diagnósticas de PCV2 y PPV.

CONCLUSIONES

La PCR múltiple fue tan efectiva como la PCR simple para la detección de los patógenos estudiados; pero la PCR múltiple podría disminuir hasta en un tercio el tiempo y los costos de la PCR simple.

PPV

El PPV es el agente que se presenta con mayor frecuencia, ya que se detectó en el 65.7% de las muestras. Debido a que las muestras fueron obtenidas del rastro concluimos que existe circulación de PPV en animales en finalización, esto quiere decir que el virus no esta controlado y podría ser el causante, no solo de problemas reproductivos, si no también de problemas respiratorios, ya que no solo se le detecto asociado con otros agentes, si no también como agente único en lesiones neumónicas.

PCV2

Se detectaron 22.5% de reacciones positivas a PCV2 por PCR. Hasta el momento de escribir este trabajo se encontraron 62 archivos con el genoma completo de PCV2 de diferentes países reportados en el *GenBank*; lo que evidencia a PCV2 como un virus de distribución mundial ya que se presenta en Canadá, los Estados Unidos, muchos países de Europa y algunos países de Asia.

Mhp

Se detectaron 21.6% de pulmones positivos a *Mhp* mediante PCR, y en ninguna de las muestras se encontró a *Mhp* como agente único, siempre se le encontró relacionado con otro u otros agentes. Lo cual refleja su papel como agente predisponente a la colonización secundaria del tracto respiratorio por otros agentes.

La dificultad para el aislamiento de *Mhp*, tiempo y costo, hace a la PCR ideal para su diagnóstico

Asociaciones

En los problemas neumónicos del cerdo regularmente están relacionados dos o más patógenos y no todos estos patógenos están clasificados como del tipo respiratorio. Los resultados de este estudio confirman la asociación constante entre PPV, PCV2, *Mhp*, *P. multocida* y *A. pyogenes* como factor importante en el desarrollo del CRP. Las asociaciones de PPV con *Mhp* y de PPV con PCV2 fueron más significativas.

LITERATURA CITADA

1. Plonait H, Bickhardt R. Manual de las enfermedades del cerdo. Zaragoza, España: Editorial Acribia, 2001.
2. Fuentes M. Enfermedades respiratorias del ganado porcino (II). Síntesis Porcina 1990;1:56-58.
3. López JR. Enfermedades respiratorias del ganado porcino. Síntesis Porcina 1987;8: 52-57.
4. Sánchez-Vizcaíno J.M. Curso de Introducción a la Inmunología Porcina. Segunda edición. Available from: URL: <http://www.sanidadanimal.info/curso/index.htm>
5. Straw BE, Disease of swine. 8th Edition. Ames, Iowa EUA: Iowa State University, 1993.
6. Ramírez NR. Enfermedades de los cerdos. 2da reimpresión, México: Editorial Diana, 1982.
7. García RO, Lobo MG. Enfermedades de los cerdos. 2da reimpresión, México: Editorial trillas, 2003.
8. Blood DC. Medicina Veterinaria Vol. II 7ª edición. México: Editorial Interamericana McGraw-Hill, 1992.
9. Allan M, Kennedy S, McNeilly F. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. J Comp Pathol 1999;121:1-11.
10. Sorden S, Halbur P. The role of circovirus in PMWS and PRDC: Advances in understanding pathogenesis and control. In: Proceedings of Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians 2002;33:265-268.
11. Halbur P. Update on PRRSV in grow-finish. In: Proceedings of the Swine Disease Conference for Swine Practitioners 2000;8:113-123.

12. Harms P, Sorden S, Halbur P. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Pathol* 2001;38:528-539.
13. Harms P, Sorden S, Halbur P. Role of maternal immunity to PCV2 and PRRSV co-infection in the pathogenesis of PMWS. In: Proceedings of Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians 2002;33:307-312.
14. Blood DC. *Medicina Veterinaria Vol. I 7ª edición*. México: Editorial Interamericana McGraw-Hill, 1992.
15. Mogollon J, Rincón M. Importancia del diagnóstico frente a las enfermedades emergentes. Memorias del XLII Congreso Nacional AMVEC, 2007. Julio 25-28. Juriquilla (Querétaro) México. México (DF) Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, A.C. 2007 p. 141-150.
16. Trevizo R. Efecto económico del complejo respiratorio porcino. Actualización en el CRP. Memorias en CD, AMVEC-BAYER, 2007. Julio 26. Juriquilla (Querétaro) México. México (DF) Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, A.C. 2007.
17. Maqueda J. Complejo respiratorio porcino C.R.P. El control de uno de sus principales protagonistas: *Mycoplasma hyopneumoniae*. Actualización en el CRP. Memorias en CD, AMVEC-BAYER, 2007. Julio 26. Juriquilla (Querétaro) México. México (DF) Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, A.C. 2007.
18. Fano, E. Epidemiología e inmunidad de hato del PRDC (*Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Influenza Porcina. Memorias del XLII Congreso Nacional AMVEC, 2007. Julio 25-28. Juriquilla (Querétaro) México. México (DF) Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, A.C. 2007 p. 73-78.
19. McKillen J, Hjertner B, Millar A, McNeilly F, Belák S, Adair B, Allan G. Molecular beacon real-time PCR detection of swine viruses. *J Virol Meth* 2007;140:155-165.
20. Rico S, Molina S, Pavón F. Detección y aislamiento del Parvovirus porcino en Medellín, Colombia. *Rev Col Cienc Pec* 2003;16:40-45.

21. Belák S, Rivera E, Ballagi-Pordány A, Hanzhong W, Widén F, Soós T. Detection of challenge virus in fetal tissues by nested PCR as a test of the potency of a porcine parvovirus vaccine. *Vet Res Comm* 1998;22:139-146.
22. Wilhelm S, Zimmermann P, Selbitz H, Truyen U. Real-time PCR protocol for the detection of porcine parvovirus in field samples. *J Virol Meth* 2006;134:257–260.
23. Ranz A, Manclús J, Diaz-Aroca E, Casal J. Porcine Parvovirus: DNA sequence and genome organization. *J Gen Virol* 1989;70:2541-2553.
24. Qing L, Lv J, Li H, Tan Y, Hao H, Chen Z, Zhao J, Chen H. The recombinant nonstructural polyprotein NS1 of porcine parvovirus (PPV) as diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated pigs. *Vet Res Comm* 2006;30:175-190.
25. Morilla GA. Manual para el control de las enfermedades de los cerdos. 2da edición. México: Editorial Manual Moderno, 2006.
26. Ellis J, Krakowka S, Lairmore M, Haines D, Bratanich A, Clark E, Allan G, Konoby C, Hassard L, Meehan B, Martin K, Harding J, Kennedy S, McNeilly F. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *J Vet Diagn Invest* 1999;11:3–14.
27. Kim J, Chung H-K, Chae C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *Vet J* 2003;166:251–256.
28. Segales J. Circovirosis porcina... Más de 10 años después. Memorias del XLII Congreso Nacional AMVEC, 2007. Julio 25-28. Juriquilla (Querétaro) México. México (DF) Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, A.C. 2007 p. 67-71.
29. Ouardani M, Wilson L, Jette R, Montpetit C, Dea S. Multiplex PCR for detection and typing of porcine circoviruses. *J Clin Microbiol* 1999;37:3917-3924.
30. Larochelle R, Antaya M, Morin M, Magar R. Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. *J Virol Meth* 1999;80:69-75.

31. Morozov I, Sirinarumitr T, Sorden S, Halbur P, Morgan M, Yoon K, Paul P. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol* 1998;36:2535-2541.
32. Ellis J, Hassard L, Clark E. Isolation of circovirus from lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can Vet J* 1998;39:44-51.
33. Kennedy S, Moffett D, McNeilly F. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone and or in combination with porcine parvovirus. *J of Comp Path* 2000;22:9-24.
34. Allan G, Ellis J. Porcine circovirus: a review. *J Vet Diagn Invest* 2000;2:3-14.
35. Crowther R. Comparison of the structures of three circoviruses: chicken anemia virus, porcine circovirus type 2, and beak and feather disease virus. *Journal of Virology*. 2003;77:13036-13041.
36. Trujano M, Iglesias SG, Segalés J, Palacios JM. PCV-2 from emaciated pigs in Mexico. *Vet Rec*. 2001;148:792.
37. Iglesias SG *et al*. First report of postweaning multisystemic wasting syndrome in Mexico *IPVS* 2002;17 p 13.
38. Garcia-Reyna. Reporte de un caso de Síndrome de nefropatía y dermatitis porcina asociado al Circovirus porcino tipo 2, en una granja del Estado de México. *Memorias del XXXVIII Congreso Nacional AMVEC*, 2003 p. 38.
39. Ramirez-Mendoza H, Quintero RV, Rosales EF, Hernandez LJ, Fort M, Segales J. First isolation and serology to PCV2 in Mexico. *Proceedings of the 19th IPVS Congress*, Copenhagen 2006.
40. Caprioli A, Mc Neilly F, Mc Nair I, Lagan-Tregaskis P, Ellis J, Krakowka S, McKillen J, Ostanello F, Allan G. PCR detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in blood, tonsillar and faecal swabs from experimentally infected pigs. *Rest Vet Sci* 2006;1:287-292.

41. Segales J, Calsamiglia M, Olvera A, Sibila M, Badiella L, Domingo M. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, traqueo-bronchial, urinary and fecal swabs of pig with and without postweaning multisystemic syndrome. *Vet Microb* 2005;11:223-229.
42. Yang J, Song D, Kim S, Lyoo K, Park B. Detection of porcine circovirus type 2 in feces of pigs with enteric disease by polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 2003;5:369-373.
43. Opriessing T, Yu S, Gallup M, Evans R, Fenaux M, Pallares F, Thacker L, Brockus C, Ackermann M, Thomas P, Meng X, Halbur P. Efect of the vaccination selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus. *Vet Pathol* 2003;40:521-529.
44. Larochelle R, Magar R, D'Allaire S. Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res* 2003;67:114-120.
45. Kim J, Han D, Choi C, Chae C. Simultaneous detection and differentiation between porcine circovirus and porcine parvovirus in boar semen by Multiplex seminested polymerase chain reaction. *J Vet Med Sci* 2003;65:741-744.
46. Kim J, Chae C. Multiplex nested PCR compared with in situ hybridization for the differentiatin of porcine circoviruses and porcine parvovirus from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res* 2003;63:133-137.
47. Friis NF. *Mycoplasma suipneumoniae* isolated in Denmark. *Act Vet Scand* 1969;10:295-297.
48. Flores SA. Estudio seroepidemiológico (transversal) de *M. hyopneumoniae* mediante la técnica de ELISA en una granja de ciclo completo en Zacatepec, Puebla [Tesis licenciatura] D.F. México UNAM-FMVZ. 1997.
49. Cruz STA. Identificación de *Mycoplasma hyopneumoniae* a partir de pulmones neumónicos de cerdo en México. [Tesis Licenciatura] México, UNAM-FES Cuautitlán. 1983.

50. Miranda MRE. Aislamiento y caracterización de micoplasmas asociados con la neumonía enzootica del cerdo. [Tesis Licenciatura] D.F. México, UNAM-FMVZ. 1986.
51. Whitford H, Rosenbusch R, Lauerman L. Mycoplasmosis in animals: Laboratory diagnosis. First Edition. Iowa, USA: Ames: Iowa State University, 1994.
52. Smith PF. The biology of micoplasmas. New York, USA: Academia Press, 1971.
53. Caron J, Ouardani M, Dea S. Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes. J Clin Microbiol 2000;38:1390-1396.
54. Chen Y, Wang S, Yang W, Chen Y, Lin H, Shiuan D. Expression and immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* heat shock protein antigen P42 by DNA vaccination. Infect Immun 2003;71:1155-1160.
55. Stärk K, Nicolet J, Frey J. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by Air Sampling with a Nested PCR Assay. App. and Env. Microbiol 1998;62:543-548.
56. Ruiz A, Galina L, Pijoan C. *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization of pigs sired by different boars. Can J Vet Res 2002;66:79-85.
57. Baumeister A, Runge M, Ganter M, Feenstra A, Delbeck F, Kirchhoff H. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchoalveolar lavage fluids of pigs by PCR. J Clin Microbiol 1998;36:1984-1988.
58. Adams C, Pitzer J, Minion C. In vivo Expression Analysis of the P97 and P102 Paralog Families of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Infec and Inm 2005;73:7784-7787.
59. Kwon D, Choi C, Chae C. Chronologic localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs. Vet Pathol 2002;39:584-587.
60. Blanchard B, Kobisch M, Bove JM, Saillard C. Polymerase Chain reaction for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in tracheobronchiolar washings from pigs. Molecular and Cellular Probes 1996;10:15-22.

61. Vicca J, Stakenborg T, Maes D, Butaye P, Peeters J, de Kruif A, Haesebrouck F. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Vet Microb* 2003;97:177-190.
62. Sorensen V, Ahrens P, Barfod K, Feenstra A, Feld N, Friis N. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: Duration of the disease and evaluation of four diagnostic assay. *Vet Microb* 1997;54:23-34.
63. Artiushin S, Stipkosvits L, Minion F. Development of polymerase chain reaction primers to detect *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Molecular and Cellular Probes* 1993 7:381-385.
64. Fano E, Pijoan C, Dee S. Dynamics and persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. *Can J of Vet Res* 2005;69:223-228.
65. Hsu T, Minion F. Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Infect Immun* 1998;66:4762-4766.
66. Subramaniam S, Frey J, Huang B, Djordjevic S, Kwang J. Immunoblot assay using recombinant antigens for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* antibodies. *Vet Microb* 2000;75:99-106.
67. Otagiri Y, Asai T, Okada M, Uto T, Yazawa S, Hirai H, Shibata I, Sato S. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lungs and nasal swab samples from pigs by nested PCR and culture methods. *J Vet Med Sci* 2005;67:801-805.
68. Krakowka S, Ellis J, McNeilly F, Waldner C, Rings M, Allan G. *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins and porcine circovirus type 2 (PCV2) infection: Induction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in the gnotobiotic swine model of PCV2-associated disease *Can Vet J* 2007;48:716–724.
69. Huang C, Hung J, Wu C, Chien M. Multiplex PCR for rapid detection of pseudorabies virus, porcine parvovirus and porcine circovirus. *Vet Microbiol* 2004;101:209-214.
70. Cao S, Chen H, Zhao J, Lü J, Xiao S, Jin M, Guo A, Wu B, He Q. Detection of porcine circovirus type 2, porcine parvovirus and porcine pseudorabies virus from

- pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome by Multiplex PCR. *Vet Res Comm* 2005;29:263-269.
71. Lee C, Moon H, Yang J, Park S, Song D, Kang B, Park B. Multiplex PCR for the simultaneous detection of pseudorabies virus, porcine cytomegalovirus and porcine circovirus in pigs. *J Virol Meth* 2007;139:39-43.
72. Ausubel FM. *Short Protocols in Molecular Biology*. Fourth Edition, NY, USA: Wiley John & Sons Inc, 1999.
73. Hernández PSG. Detección de ADN de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a partir de muestras de pulmón de cerdos. [Tesis Licenciatura] D.F. México, UNAM-FMVZ. 2005.
74. Reyes GL. Diagnóstico molecular de la enfermedad de Glässer. [Tesis Licenciatura] D.F. México, UNAM-FMVZ. 2005.
75. Allan G, McNeilly F, Ellis J. Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. *Arch Virol*. 2000;11:2421-2429.
76. Rovira A, Balasch M, Segales J. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J of Virol*. 2002;76:3232-3239.
77. Harms P. Post-weaning multisystemic wasting syndrome -case studies. In: *Proceedings of the Annual Swine Disease Conference for Swine Practitioners*. 1999;7:43-47.
78. Harms P, Sorden S, Rotto H. Hepatopathy associated with spontaneous type 2 porcine circovirus infection in caesarian derived/colostrum deprived pigs. In: *Proceedings of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*. 1999;42:4.
79. Krakowka S, Ellis J, Meehan B, Kennedy S, Mcneilly F, Allan G. Viral Wasting Syndrome of Swine: Experimental Reproduction of Postweaning Multisystemic

- Wasting Syndrome in Gnotobiotic Swine by Coinfection with Porcine Circovirus 2 and Porcine Parvovirus. *Vet Pathol.* 2000;37:254–263.
80. Clark, E.G. The pathology of post-weaning multisystemic wasting syndrome of pigs. In: *Proceedings of the West Can Assoc Swine Prac.* 1996;22–25.
81. Bolin S, Stoffregen W, Nayar G, Hamel A. Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrum-deprived piglets with type 2 porcine circovirus. *J Vet Diagn Invest* 2001;13:185-194.
82. Fenaux M, Halbur P, Haqshenas G. Cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus is infectious when injected directly into the liver and lymph nodes of pigs: Characterization of clinical disease, virus distribution and pathologic lesions. *J Of Virol* 2002;76:541-551.
83. Halbur P, Fenaux M, Haqshenas G. Reproduction of PMWS with an infectious molecular clone of PCV2. In: *Proceedings of the Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians* 2002;33:313-314.
84. Ellis J, Bratanich A, Clark E, Allan G, Meehan B, Haines D, *et al.* Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Vet Diagn Invest* 2000;12:21–27.

APÉNDICE

Extracción de ADN por el método de CTAB-fenol-cloroformo (57)

1. Tomar 567µl de sobrenadante de cultivo celular, colocar en un tubo de 1.5ml y adicionar 30µl de solución SDS al 10% y 1.5µl de Proteinasa K¹⁰ (40mg/ml), mezclar la solución suavemente en un homegenizador e incubar a 37°C./1 hora,
2. Adicionar 100µl de NaCl 5M y 80µl de solución CTAB/NaCl (calentar antes de usar), mezclar e incubar a 65°C/10 min. en un baño maría. Esto es para remover los polisacáridos y otras macromoléculas contaminantes.
3. Adicionar un volumen igual de Cloroformo-Alcohol Isoamílico (778.5µl), mezclar y centrifugar a 13000rpm/5min. Recuperar el sobrenadante y transferir a un tubo nuevo.
4. Agregar al sobrenadante recuperado una cantidad igual de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico, mezclar y centrifugar a 13000rpm/5min, recuperar el sobrenadante y transferir a un tubo nuevo.
5. Adicionar al sobrenadante recuperado 600µl de Isopropanol¹¹, mezclar y para precipitar centrifugar a 13000 rpm/5min. Se formará un botón de color blanquecino, tirar el sobrenadante cuidando de no desprender el botón.
6. Lavar el precipitado (botón), agregar 1ml de etanol al 70%¹² y centrifugar a 13000 rpm/5min. Tirar el sobrenadante y dejar secar el botón a T° ambiente por una noche, o en una secadora al vacío por 10 min.
7. Finalmente resuspender el botón en 50 ml de solución TE. Conservar en congelación a -20° C.

¹⁰ Sigma-Aldrich # Cat. P-2308

¹¹ Sigma-Aldrich Cat # 154970-2L (Alcohol Isopropílico)

¹² Sigma-Aldrich # Cat. E-7023-4X4L

Soluciones utilizadas

- **SDS 10% pH 7.2** (Sulfato Dodecil de Sodio¹³). Disolver 100g de SDS en 900 ml de H₂O¹⁴.
- **NaCl 5M**. Para preparar 500ml; disolver 146.1g de NaCl¹⁵ (PM= 58.44) en 500 ml de H₂O¹⁴
- **CTAB¹⁶/NaCl** (Bromuro de Cetiltrimetilamonio/ Cloruro de Sodio). Para preparar 100ml: disolver 10g de CTAB en una solución de NaCl¹⁵ al 0.7M (PM=58.44), aforar hasta tener los 100ml.
- **Cloroformo¹⁷-Alcohol Isoamílico¹⁸**. Mezclar 24 partes de Cloroformo y 1 de Alcohol Isoamílico.
- **Fenol¹⁹-Cloroformo¹⁷-Alcohol Isoamílico¹⁸**. Mezclar 25 partes de Fenol, 24 de Cloroformo y 1 de Alcohol Isoamílico.
- **TE**. Para preparar 1000μl, agregar 10μl de solución TRIS²⁰ 1M pH de 8 y 2μl de EDTA²¹ 0.5M pH de 8.5; aforar a 1000μl (998μl) con H₂O¹⁴
- **TRIS 1M**. Para preparar 200ml tomar 24.23 g de TRIS²⁰, disolver en 200ml de H₂O¹⁴ y ajustar el pH a 8 con un Potenciómetro.
- **EDTA 0.5M**. Para 200ml, disolver 37.22g de EDTA²¹, en 200ml de H₂O¹⁴ y ajustar el pH con un Potenciómetro.
- **TAE 50X** (TRIS-Acetato-EDTA). 242g de TRIS²⁰, 51.1 ml de ácido Acético Glacial²², 100 ml de EDTA²¹ 0.5 M pH 8.

¹³ Sigma-Aldrich # Cat. L-4509

¹⁴ Milli Q® Millipore

¹⁵ J. T. Backer # Cat. 3624-01

¹⁶ Sigma-Aldrich # Cat. H-5882

¹⁷ Sigma-Aldrich # Cat. 366919

¹⁸ Sigma-Aldrich # Cat. 320021

¹⁹ Sigma-Aldrich # Cat. P-1037

²⁰ Ultra-Pure®, Invitrogen # Cat. 15504-020

²¹ J.T. Backer # Cat. 8993-01

²² Merk # Cat. K-25686663