



# Universidad Nacional Autónoma de México

---

---

Maestría en Ciencias de la  
Producción y de la Salud Animal

Evaluación de la participación del circovirus  
porcino tipo 2 (PCV-2) en la falla reproductiva

TESIS

Para obtener el grado de maestra en ciencias

Presenta  
Karina Enríquez Ramírez

Tutora: Lucía Angélica García Camacho  
Comité tutorial: Humberto Ramírez Mendoza  
Ignacio Soto Zarate



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.

# *Agradecimiento*



*A la Máxima Casa de Estudios  
Universidad Nacional Autónoma de México*

*En especial a  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan*

*CONACyT*

*"Por mi raza hablara el espíritu"*

*Arturo*

Porque pueda mirar el cielo, besar tus manos  
Sentir tu cuerpo, decir tu nombre.  
Sabes lo amado y excepcional que eres para mí.

Jaime, Erika, Gabriel, Carmen y San.

Gracias por estar, por compartir y porque  
Cada vez los disfruto más. Los amo.

A los que han estado cerca de mí en los momentos buenos y en los más  
difíciles, que son mis amigos y a los que nunca dejare de querer.

Andrea, Lucía, Gustavo, Valeria, José Antonio,  
Ricardo, Miriam, Fernando, Carlos, Toño, Luz y Liliana.

## INDICE

	Página
Resumen	I
Índice de tablas, cuadros y figuras	II
1.Introducción	1
1. 1. Antecedentes	1
1. 2. Síndromes asociados a circovirus porcina	2
1.2.1. Falla reproductiva	2
1.2.2. Síndrome multisistémico y de adelgazamiento post-destete	3
1.2.3. Síndrome de dermatitis y neuropatía porcina	4
1. 3. Marco teórico	5
1. 4. Justificación	7
2. Objetivos e hipótesis	8
3. Material y métodos	10
3. 1. Diseño Experimental	10
3. 2. Patología	10
3. 3. Extracción de ADN	11
3. 4. PCR anidado para PCV2	11
3. 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%	12
3. 6. Producción y marcaje de sondas diagnósticas	13
3. 7. Hibridación <i>in situ</i>	14
3. 8. Evaluación de la Hibridación <i>in situ</i>	16
3. 9. Análisis de resultados	16
4. Resultados	19
5. Discusión	33
6. Conclusión	39
7. Abreviaturas	30
8. Bibliografía	42

## INDICE DE TABLAS Y CUADROS

	Págs.
• Tabla 1. Mezcla de amplificación para PCR anidado de PCV2.	12
• Tabla 2. Condiciones de amplificación para PCV2.	12
• Tabla 3. Mezcla para marcaje de la sonda cADN.	14
• Tabla 4. Resumen de los hallazgos histopatológicos y severidad de lesiones cardiacas.	20
• Tabla 5. Cuadro de contingencia de 2X2 de las evaluaciones histopatológicas e HIS.	30
• Tabla 6. Valor diagnóstico de la evaluación histopatológica frente a la Hibridación <i>in situ</i> .	30
• Tabla 7. Composición de los grupos	31
• Tabla 8. Resumen de los resultados de PCR punto final y su relación con la HIS	32

## 5. INDICE DE FIGURAS

• Figura 1. Edema severo (puntaje 4) e infiltrado perivascular no supurativo (puntaje 2) en un caso neonatal. Corazón, 400X. Hematoxilina-Eosina.	21
• Figura 2. Infiltrado perivascular linfocítico plasmocítico moderado (puntaje 3) y necrosis de las fibras cardiacas (puntaje 3) en un caso neonatal. Corazón, 100x. Hematoxilina-Eosina.	21
• Figura 3. Infiltrado linfocítico intersticial discreto (puntaje 2) Corazón, 400X, Hematoxilina-Eosina.	22
• Figura 4. Marcada acumulación perivascular de linfocitos (puntaje 4) y edema severo (puntaje 4) en tejido fetal. Corazón, 400X. Hematoxilina-Eosina.	22
• Figura 5. Infiltrado linfocítico plasmocítico intersticial moderado (puntaje 3) en un caso fetal. Corazón, 400X. Hematoxilina-Eosina.	23
• Figura 6. Necrosis miocárdica moderada/severa (Puntaje 3) entremezclada con un moderado infiltrado intersticial no supurativo (Puntaje 3) en un caso fetal. Corazón, 400X. Hematoxilina-Eosina.	23
• Figura 7. Marcaje de sonda para PCV2. Gel de agarosa al 1.5%.	24
• Figura 8. Animal sano en el cual no se observa reacción de hibridación positiva y exhibe fondo limpio. Tonsila. Control negativo. Hibridación <i>in situ</i> . Verde rápido.	26

400X.

- Figura 9. Señal de hibridación intensa difusa. Linfonodo. Hibridación *in situ*. Control positivo. Verde rápido. 10X 26
- Figura 10. Señal de hibridación intensa en citoplasma. Linfonodo. Hibridación *in situ*. Control positivo. Verde rápido 40X. 27
- Figura 11. El ácido nucleico de PCV2 está presente en los cardiomiocitos (Depósitos de color azul profundo) de distribución focal. Corazón. Hibridación *in situ*. Verde rápido 40X 27
- Figura 12. Se observa el aspecto granular a detalle dentro de las células miocárdicas. Acercamiento de la figura. Corazón. Hibridación *in situ*. Verde rápido. 100X 28
- Figura 13. El ADN de PCV2 está presente en el citoplasma celular. Corazón. Hibridación *in situ*. Verde rápido. 400X. 28
- Figura 14. Señal de hibridación positiva. Nótese la definición de la señal y el fondo limpio. Riñón. Hibridación *in situ*. Verde rápido. 100X. 29
- Figura 15. Detección de PCV2 (225 pb) por PCR anidado en fetos. 32

## RESUMEN

En la falla reproductiva asociada a PCV2 (FR-PCV2), la lesión más consistente en fetos es una miocarditis supurativa con PCV2 intralesional. Con el fin de establecer la participación del PCV2 en la falla reproductiva en México, 107 corazones (muestras fetales predominantemente) fueron evaluadas por histopatología e hibridación *in situ* (HIS) y agrupadas como: Fetos con miocarditis (Grupo 1), fetos sin miocarditis (Grupo 2), mortinatos/neonatos con miocarditis (Grupo 3) y mortinatos/neonatos sin miocarditis (Grupo 4). Cincuenta de los 107 casos, fueron seleccionados para realizar PCR anidada. Microscópicamente, 48 casos (45%) exhibieron miocarditis no supurativa, de los cuales 35/48 fueron positivos a PCV2 (73% de los casos con miocarditis, 32.7 del total) y 13 fueron negativos (27% de los casos con miocarditis, 12.4% del total). Hubo 5 (4.67%) casos fetales positivos a PCV2 por HIS sin miocarditis. El diagnóstico de miocarditis y una hibridación positiva muestran una alta relación ( $J_2 < 0.005$  y Coeficiente de Cramer = 0.64) revelando que ambas pruebas son comparables para el diagnóstico de la enfermedad. Veinte casos adicionales de los 107, sin considerar miocarditis, fueron detectados por PCR anidada, incrementando a 55 (51.4%) los casos positivos a PCV2 y entre estos, 13 casos (9 fetales) sin miocarditis y negativos por HIS fueron PCR-positivos. La severidad de lesiones fue estadísticamente significativa, mostrando valores de  $P = 0.04$  y  $P = 0.0001$  para los grupos 1-3 y 2-4, respectivamente. Las señales de HIS fueron discretas y de tamaño variable, invalidando el análisis estadístico. En conclusión, el uso de la histopatología como prueba de tamizaje es altamente recomendada, pero la asociación del PCV2 debe ser confirmada por HIS y/o PCR. Hubo 33-39% de casos compatibles con FR-PCV2 y una transmisión vertical de 46.72%, ambas son mayores que las descritas en informes previos. Los casos con miocarditis pero negativos a PCV2 sugieren una etiología no determinada. La severidad de las lesiones son dependiente de la edad y las señales de hibridación sugieren una baja carga viral. La relación entre la severidad de lesión y la carga viral puede ser determinada por PCR en tiempo real.

Palabras Clave: PCV2, miocarditis no supurativa, falla reproductiva, Hibridación *in situ*.



## ABSTRACT

The most consistent lesion in the fetus of Porcine Circovirus type 2-associated reproductive failure (PCV2-RF) is a non-suppurative myocarditis with intralesional PCV2. In order to assess the role of PCV2 in reproductive failure in Mexico, 107 hearts (predominantly fetal samples) were evaluated by histopathology and in-situ hybridization (ISH) and grouped as follows: Fetuses with myocarditis (Group 1), fetuses without myocarditis (Group 2), stillborns/neonates with myocarditis (Group 3), and stillborns/neonates without myocarditis (Group 4). Among these 107 cases, 50 were selected to perform nested PCR. Microscopically, 48 cases (45%) exhibited non-suppurative myocarditis, of which 35/48 were PCV2 positive (73% of cases with myocarditis, 32.7% overall) and 13 were PCV2 negative (27% of cases with myocarditis, 12.4% overall). There were 5 (4.67%) fetal cases PCV2 positive by ISH with no myocarditis. A diagnosis of myocarditis and a positive ISH showed a high relationship ( $J^2 < 0.005$  and Cramer coefficient = 0.64) revealing that both tests are comparable for disease diagnosis. Twenty out of 107 additional cases, regardless of myocarditis, were detected by nested PCR, increasing to 55 (51.4%) the cases positive to PCV2, among these, 13 cases (9 fetal) without myocarditis and negative to ISH were PCR-positive. The lesion severity was statistically significant, showing values of  $P = 0.04$  y  $P = 0.0001$  for 1-3 and 2-4 groups, respectively. The ISH signals were discrete and variable sized precluding a statistical analysis. In conclusion, the use of histopathology as screening test is highly recommended but association to PCV2-RF must be confirmed by ISH and/or PCR. There were 33-39% cases compatible to PCV2-RF, and vertical transmission of 46.72%, both are higher than previous reports. Cases with myocarditis but PCV2-negative suggest a undetermined etiology. The lesion severity is age-dependent and the ISH signals suggest low viral load. Real-time PCR can be performed to assess the relationship between lesion severity and viral load.

Key words: PCV-2, non-suppurative myocarditis, reproductive failure, in-situ hybridization.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Antecedentes

El Circovirus porcino (PCV) se describe por primera vez en 1991 como un contaminante común de los cultivos de células de riñón de cerdo PK-15 (ATCC CCL31), que infecta de forma natural a la especie porcina y de muy fácil difusión en la población (Tischer, *et al.*, 1974; Allan y Ellis, 2000; Segalés y Domingo, 2002). Se han caracterizado dos tipos distintos de circovirus, el tipo 1 (PCV1), apatógeno para el cerdo, y circovirus tipo 2 (PCV2), aislado por primera vez en 1998 en cerdos con Síndrome de adelgazamiento post-destete (PMWS), descrito en 1991 en Canadá (Allan, *et al.*, 2000; Segalés y Domingo, 2002). Con base a las diferencias genómicas se han clasificado 2 genogrupos de PCV2 que circulan en la población porcina sin que hasta el momento se haya demostrado que dichas diferencias estén asociadas al desarrollo de PMWS (Allan, *et al.*, 2007). Los **hospedadores** naturales son el cerdo doméstico y el jabalí. El movimiento de animales entre explotaciones es la causa más importante de entrada del virus. El virus es muy estable en el ambiente y puede ser transportado de forma mecánica a través de camiones, ropa, calzado, material y equipamiento, e incluso también probablemente roedores y pájaros. **Una vez presente en una explotación, la transmisión más común es por contacto directo entre cerdos enfermos y sanos.** Entre los países que han descrito la presencia de PCV2 destacan Canadá, Estados Unidos de América, Francia, Alemania, Gran Bretaña, España, Dinamarca, Irlanda del Norte, Suecia, Bélgica, Italia y Holanda, Corea del Sur y Japón, entre otros (Segalés y Domingo, 2002).

En condiciones naturales el virus entra por vía oronasal (Segalés, *et al.*, 2000b). En infecciones naturales post-natales, el PCV2 infecta principalmente células de la línea monocito/macrófago, células dendríticas de los órganos linfoides, hepatocitos, epitelio renal y epitelio bronquial. Actualmente no existen datos concluyentes acerca de que PCV2 pueda infectar linfocitos (Segalés, *et al.*, 2000a). Pueden observarse inclusiones víricas esféricas múltiples en el citoplasma de células infectadas (Segalés y Domingo, 2002). La diseminación inicial de PCV2 está ligada a la movilidad de las células infectadas, **generalizándose la infección al sistema linfoide y a numerosos órganos.** Posteriormente, la presencia del virus en sangre, que puede durar

meses, contribuye a la diseminación de PCV2. Los datos existentes, sugieren que en las infecciones subclínicas por PCV2, la baja carga viral se encuentra en sangre y en los órganos linfoides durante al menos unas 10 semanas. 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. Se ha confirmado la presencia de PCV2 en mortinatos y recién nacidos (Lyo, *et al.*, 2001; Kim, *et al.*, 2004; Nielsen, *et al.*, 2004; Ritzmann, *et al.*, 2005) y varios investigadores han documentado y comprobado la transmisión transplacentaria (Sánchez, *et al.*, 2001; Sánchez, *et al.*, 2003; Pensaert, *et al.*, 2004; Nielsen, *et al.*, 2004).

Desde las fases iniciales de la infección por PCV2, los cerdos eliminan el virus fundamentalmente a través de **heces, orina y secreciones nasales**, durante meses. **También se ha detectado en semen de verracos aparentemente sanos**, y aunque hasta el momento no se han realizado estudios que confirmen su transmisión por esta vía, este dato debe ser considerado teniendo en cuenta las prácticas habituales de inseminación artificial. (Segalés y Domingo, 2002). La detección de PCV2 en muestras y calostro ha sido registrada y por lo tanto potencialmente el PCV2 puede ser transmitido por vía oral a la camada (Shibata, *et al.*, 2006; Park J.S, *et al.*, 2009).

## **1.2 Síndromes asociados a circovirus porcina.**

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

### **1.2.1 Falla reproductiva asociada a PCV2**

El PCV2 está asociado con falla reproductiva en cerdas, se describe como una nueva manifestación clínica de la infección por PCV2, debido a que en los estudios retrospectivos realizados en Canadá, no se encontraron casos de falla reproductiva asociada

a PCV2 antes de 1999 (Bogdan, *et al.*, 2001). La detección de PCV2 en mortinatos y recién nacidos aunado a la transmisión transplacentaria del virus en ausencia de otros agentes infecciosos y en condiciones naturales y experimentales han sugerido una participación primaria del PCV2 (Sánchez, *et al.*, 2001, Sánchez, *et al.*, 2003, Pensaert, *et al.*, 2004; Nielsen, *et al.*, 2004). Las lesiones fetales y neonatales más consistentes son la miocarditis y la encefalitis no supurativa asociadas a una consistente detección de PCV2 en las lesiones (Pensaert, *et al.*, 2003; Nielsen, *et al.*, 2004; Mikani, *et al.*, 2005). De hecho existe una alta carga viral de PCV2 asociada a la muerte fetal y alta mortalidad en lechones en casos de falla reproductiva sin participación de PPV y virus de la encéfalomiocarditis (Brunborg, *et al.*, 2007). El PCV2 se ha replicado en el corazón, pulmón, hígado, riñones, encéfalo, bazo y linfonodos de fetos inoculados intrafetalmente a los 57, 75 y 92 días de gestación (d.d.g) y las lesiones más severas y la detección de antígeno viral fueron encontradas en lechones infectados a los 57 d.d.g. (Sánchez, *et al.*, 2001; Pensaert, *et al.*, 2003; Pensaert, *et al.*, 2004) justo antes del desarrollo de inmunocompetencia fetal la cual está descrita a los 70 d.d.g. (Pensaert, *et al.*, 2004). También se ha detectado la presencia de PCV2 en lechones nacidos vivos a partir de madres infectadas (Allan, *et al.*, 2000; Pensaert, *et al.*, 2003; Nielsen, *et al.*, 2004). La inoculación intranasal con PCV2 en cerdas con anticuerpos positivos frente PCV2 a los 72 y 92 d.d.g. sólo promovió transmisión transplacentaria en la cerda inoculada a los 92 d.d.g. (Nielsen, *et al.*, 2004). Ambas cerdas fueron inoculadas posteriormente a la inmunocompetencia fetal por lo que es posible que los títulos de anticuerpos maternos hayan marcado la diferencia. Los títulos de anticuerpos frente a PCV2 de la cerda inoculada a los 72 d.d.g. eran considerablemente mayores que los de la cerda inoculada a los 92 d.d.g (Nielsen, *et al.*, 2004). El efecto de la cerda sobre la camada ha sido confirmado ya que las cerdas con bajos títulos de anticuerpos y/o alta viremia de PCV2 presentan una mayor mortalidad fetal y neonatal (Hassing, *et al.*, 2003; Calsamiglia, *et al.*, 2007; Rose, *et al.*, 2007). La inmunidad pasiva materna protege a los lechones de la circovirus porcina (CP). Los lechones presentan anticuerpos calostrales hasta las 5-8 semanas de vida y a las 8 y 12 semanas se produce la seroconversión frente a PCV2. A esa edad, aún en granjas sin problemas de PMWS, es probable encontrar cerdos virémicos por PCR. Al final del periodo de engorde, la mayoría de cerdos presentan títulos altos frente a

PCV2, pero la detección de viremia se convierte en un hecho infrecuente (Segalés y Domingo, 2002).

### **1.2.2 Síndrome multisistémico y de adelgazamiento post-destete (PMWS)**

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

### **Síndrome de dermatitis y neuropatía porcina (PDNS)**

Se considera al PDNS como otra patología asociada a la infección por PCV2 el cual fue descrito por primera vez en el Reino Unido en 1993 (Smith, *et. al.*, 1993). Desde

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

### **1.3 Marco teórico**

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

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

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

Las sondas ARN (ribosondas) son generadas utilizando técnicas de clonación y recombinación molecular mediante la transcripción *in vitro* de una plantilla linearizada incorporando nucleótidos marcados durante dicho proceso. Para dicho efecto un promotor para las ARN polimerasas (SP6, T6, o T7) deben ser disponibles en el vector de ADN que contiene la plantilla. Al igual que los oligonucleótidos incrementan su eficiencia cuando existe abundancia de ARNm. Las mayores ventajas de estas sondas son que los híbridos de ARN-ARN y de ARN-ADN son más estables y tienen una mayor eficiencia de marcaje lo cual incrementa la sensibilidad de la detección (Herrington, *et. al.*, 1992; Boehringer Mannheim, 1996; Brown, 1998).

Las sondas de ADN complementario (cADN) generado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tienen la ventaja de que su producción es relativamente fácil y automatizada, permitiendo un eficiente marcaje simultaneo y la optimización del tamaño de las sondas de hibridación. La incorporación de nucleótidos marcados durante el PCR puede producir grandes cantidades de sondas a partir de cantidades mínimas de ADN genómico o de plásmidos linearizados. En PCR, los dos iniciadores hibridizan en secuencias específicas de los extremos opuestos de las cadenas de ADN. Posteriormente,

una polimerasa termoestable (Taq polimerasa) amplifica los dos iniciadores en una serie repetitiva de ciclos lo cual resulta en una acumulación exponencial de copias. La incorporación de nucleótidos marcados durante el PCR puede producir grandes cantidades de sondas a partir de cantidades mínimas de ADN genómico o de plásmidos linearizados. Además, el tamaño de la sonda amplificada puede ser definido en las terminaciones 5' de los iniciadores permitiendo una producción sencilla de sondas de un tamaño requerido. (Boehringer Mannheim, 1996).

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

Para el diagnóstico de enfermedad asociada a PCV2 necesariamente se deben cubrir 3 criterios: la presencia de signos clínicos compatibles, lesiones microscópicas características y la presencia del virus con estas lesiones (Kim, *et al.*, 2001; Calsamiglia, 2002). En tejidos, el PCV2 puede ser detectado por inmunohistoquímica (IHQ), HIS, inmunofluorescencia indirecta, PCR y aislamiento viral (Calsamiglia, *et al.*, 2002). Se ha descrito que la sensibilidad y especificidad de la HIS frente al aislamiento viral puede llegar a ser del 100%, y por lo tanto presentan una concordancia perfecta, mientras que la IHQ es del 90% (Kim y Chae, 2004). Adicionalmente, los datos de la HIS se obtienen con mayor rapidez que los obtenidos por aislamiento viral con serotipificación las cuales requieren por lo menos 2 semanas (Kim y Chae, 2001). Aunque existe una alta concordancia entre la HIS y la PCR, siendo la PCR más sensible, la HIS debe ser considerada mejor técnica que la PCR para el diagnóstico de PCV2 al estar asociada a la presencia de lesiones microscópicas



(Calsamiglia, *et al.*, 2002). De este modo, la HIS es considerada como estándar de oro para el diagnóstico de PCV2 por consenso.

#### **1.4. Justificación**

El PCV2 ha sido retirado de la lista A de enfermedades de reporte obligatorio en México (enfermedades exóticas). Sin embargo, la presencia de PCV2 en México había sido ya informada en animales con PMWS y PDNS) (Trujano, *et al.*, 2001; García-Reyna, *et al.*, 2004b) mediante HIS en tejidos con lesiones características de circovirus porcino (CP). Además, la FR-PCV2 en México, ha sido descrita en casos de muertes neonatales de lechones de alrededor de 3 días de nacidos en camadas selectas de granjas de cerdos sin la participación del vPRRS y el vPPV. En dichas camadas se observó miocarditis, hepatitis y encefalitis no supurativas, lesiones características de circovirus fetal y neonatal, y se detectó la presencia de PCV2 por aislamiento viral, PCR e HIS (García-Reyna, *et al.*, 2004<sup>a</sup>; García-Camacho, *et al.*, 2006; García-Reyna, 2006). La transmisión transplacentaria (O'Connor, *et al.*, 2001; Nielsen, *et al.*, 2004) y los sitios de replicación viral de PCV2 intrauterina (Pensaert, *et al.*, 2004) son reconocidos así como la existencia de casos en los que el PCV2 es el agente primario de falla reproductiva (Sánchez, *et al.*, 2001; Sánchez, *et al.*, 2003; Pensaert, *et al.*, 2004; Nielsen, *et al.*, 2004). En España la identificación de patógenos a partir de fetos abortados y mortinatos y las diversas asociaciones etiológicas sugieren que el PCV2 representa bajo riesgo e incluso se cuestiona su participación en falla reproductiva debido a la baja incidencia de PCV en tejidos de fetos y mortinatos ya que de un total de cien casos analizados solo un caso fue positivo a PCV por PCR.(Maldonado, *et al.*, 2003; Maldonado, *et al.*, 2005) mientras que en Suecia, Canadá, Corea y Alemania informan una alta prevalencia de PCV2 en fetos y mortinatos (Lyoo, *et al.*, 2001; Kim, *et al.*, 2004; Nielsen, *et al.*, 2004; Ritzmann, *et al.*, 2005), llegando a presentar incluso una prevalencia mayor que el vPRRS (Lyoo, *et al.*, 2001). Los datos clínicos en México sugieren una situación similar (Quintero-Ramírez, comunicación personal).

## **2. OBJETIVOS**

- Determinar la frecuencia y grado de lesiones histopatológicas características de FR-PCV2 en fetos y lechones.
- Evaluar la distribución del PCV2 en los tejidos de fetos y lechones nacidos vivos de casos sospechosos a FR-PCV2.
- Determinar la relación entre las lesiones histopatológicas características y los resultados de la HIS.
- Determinar el valor diagnóstico de la evaluación histopatológica en casos de FR-PCV2.
- Determinar la participación de PCV2 en el desarrollo de falla reproductiva.

## **HIPÓTESIS**

Si el PCV2 requiere de células que se encuentren en mitosis constante o que contengan ADN polimerasa, entonces la distribución de virus en los tejidos y la severidad de las lesiones serán mayores en los fetos y mortinatos que en los neonatos y por tal motivo los primeros mueren durante la gestación y los segundos nacen a término pero débiles.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1 Diseño Experimental**

La evaluación de la falla reproductiva asociada a circovirus porcino tipo 2 (FR-PCV2) se realizó mediante la histopatología de tejidos de fetos y neonatos porcinos remitidos para el diagnóstico (sugestivo de infección por PCV2) durante los años 2007-2008, procedentes de granjas de diversos estados de la república (Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Puebla, Sonora y Veracruz) con problemas de falla reproductiva caracterizada por alta incidencia de mortinatos y lechones nacidos vivos que presenten debilidad y muerte alrededor de la primera semana de vida. De esta población, los tejidos remitidos fueron corazones y se evaluaron microscópicamente para establecer la presencia de lesiones características y la presencia de PCV2 por HIS con el fin de evaluar el valor diagnóstico y la correlación de la HP frente a la HIS. Posteriormente, los casos evaluados se dividieron de acuerdo al tipo de animal y a la evaluación histopatológica del tejido cardiaco como se indica a continuación: Fetos con miocarditis (Grupo 1), fetos sin miocarditis (Grupo 2), mortinatos y neonatos con miocarditis (Grupo 3) y mortinatos y neonatos sin miocarditis (Grupo 4) para determinar el grado de severidad de las lesiones y su distribución por HIS con el propósito de analizar diferencias significativas entre los grupos. Finalmente, se seleccionaron 50 casos para realizar PCR punto final y correlacionar los resultados obtenidos con la HP e HIS.

#### **3.2 Patología**

Los tejidos remitidos en formalina buffer (corazón y cordón umbilical) se procesaron para su inclusión en parafina y se obtuvieron secciones de 3  $\mu$ m para tinción de hematoxilina y eosina y su respectiva evaluación histopatológica. Posteriormente, se estableció la severidad de las lesiones observadas con base a los siguientes criterios: Cambios vasculares, necrosis, infiltrado inflamatorio perivascular e infiltrado intersticial. Cada criterio fue subjetivamente evaluado sobre una escala de 5 puntos: 1= tejido normal, 2= hasta 25%, 3= 25-50%, 4= 50-75%, y 5= 75-100%. El puntaje total de los criterios evaluados fue considerado como el grado de lesión de cada caso. Adicionalmente, de cada bloque se realizaron cortes adicionales en blanco en laminillas electrocargadas Probe On Plus (Fisher Scientific, Pittsburg, USA) para su utilización en protocolos de HIS.

### 3.3 Extracción de ADN

La extracción de ADN para el marcaje de la sonda de cADN para PCV2 se realizó en cortes con un grosor de veinte micras a partir de bloques de parafina de tejidos que exhibieron las lesiones características de circovirus porcino. Los cortes se colocaron en tubos Eppendorf de dos mililitros estériles y se desparafinaron en dos pases de xilol (1000  $\mu$ l) de 5 minutos cada uno, centrifugando a 12000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos en cada pase y se rehidrataron en un pase de 5 minutos en alcohol etílico absoluto (EtOH) al 100%, se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos y un pase de EtOH al 70%, se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos. Se decantó el EtOH al 70%. Posteriormente, se dejó secar la muestra a temperatura ambiente o en estufa (36° C), hasta eliminar cualquier residuo de alcohol y se agregó 500  $\mu$ l del amortiguador de digestión (Tris 10mM pH 8.5, EDTA 1mM, Tween 20, 0.5% con 200  $\mu$ g/ml de proteínasa K) y se incubó por 3 horas a 56° C para lograr la desnaturalización de las proteínas. Transcurrido el tiempo de incubación se agregó 700  $\mu$ l de alcohol isoamílico-cloroformo (1:24), se agitó por 10 segundos y se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos teniendo como objeto acabar de digerir las proteínas y separarlas del ADN. Posteriormente, se transfirió el sobrenadante a otro tubo Eppendorf estéril, evitando tomar la interfase, se agregaron 350  $\mu$ l de isopropanol y se mantuvo la muestra a -20° C toda la noche seguido de una centrifugación durante 10 minutos a 12000 rpm. Se decantó el sobrenadante y posteriormente se lavó el botón obtenido con 500  $\mu$ l de EtOH 70% y después con 500  $\mu$ l de EtOH 100%, centrifugando a 12000 rpm durante 5 minutos entre cada lavado. Se decantó el sobrenadante. El ADN se dejó secar y se resuspendió en 35-40  $\mu$ l de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) o agua grado biología molecular (Eppendorf, Hamburg, Germany) y se congeló a -20° C hasta su uso. La concentración del ADN se cuantificó por medio de un espectrofotómetro.

### 3.4 PCR anidado para PCV2

El marcaje de la sonda de cADN específica marcada con digoxigenina (DIG) para PCV2 se llevó a cabo utilizando los iniciadores y condiciones descritas (Kim *et al.*, 2001) en reacciones de 50  $\mu$ l (Tabla 1 y 2) los cuales amplifican productos de 481 pb (iniciadores A y B) y 221 pb (iniciadores C y D), respectivamente. Los productos amplificados se

visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en un transluminador de luz UV (Apollo, Instrumentation, Claremont CA.,USA).

**Tabla 1. Mezcla de amplificación para PCR anidado de PCV2.**

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración original</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Volumen en <math>\mu</math>l</b>
Agua DEPC*	-----	-----	Ajustar
Buffer	5x	1x	10
MgCl	25Mm	1.5 Mm	3.0
dNTP's	10Mm	0.2mM	1.0
Iniciadores A (o C)	50 pmol	-----	1.0
Iniciadores B (o D)	50 pmol	-----	1.0
Taq polimerasa	5 U/ $\mu$ l	2.5 U	0.5
Templado	Cuantificar	1 ng/ $\mu$ l	Ajustar
Volumen final: 50 $\mu$ l			

\* Dietilpirocarbonato.

**Tabla 2. Condiciones de amplificación para PCV2**

<b>Reacción</b>	<b>Ciclos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
Desnaturalización inicial	1	94	1 minuto
Desnaturalización	35	95	1 minuto
Alineación	35	65	1 minuto
Extensión	35	72	1 minuto
Elongación	1	72	10 minuto
Conservación	1	4	$\infty$

### 3.5 Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %

La visualización de los productos amplificados se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con solución amortiguadora Tris 1M, ácido bórico anhidro 1M, Na<sub>2</sub> EDTA 2H<sub>2</sub>O 20M (TBE, Promega Corp. Madison, WI, USA) teñido con 4 µl de bromuro de etidio (Promega Corp. Madison, WI, USA). En el llenado de los pozos se utilizaron 5 µl de cada mezcla con 5 µl del amortiguador de corrida (Glycerol 50% v/v, Na<sub>2</sub> EDTA 2H<sub>2</sub>O 100mM, duodecil sulfato de sodio 1% w/v, azul de bromofenol 0.1% w/v) y un marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder, Promega Corp, Madison WI, USA). El gel se corrió a 90 volts durante 40-50 minutos y los productos se visualizaron en un transiluminador de luz UV (Apollo, Instrumentation, Claremont CA.,USA).

### **3.6 Producción y Marcaje de las sondas diagnósticas**

Las sondas de cADN se obtuvieron por marcaje directo con DIG empleando un juego de reactivos comerciales (PCR DIG Probe synthesis Kit, Roche Biochemical, Diagnostic, Mannheim, Germany). Para PCV2, se utilizó como templado el producto de 481 pb del PCR descrito previamente utilizando los iniciadores anidados (C y D). Durante el marcaje de la sonda se emplearon dos testigos, uno no marcado que incorpora nucleótidos no modificados y otro marcado (control de marcaje) en el que se utilizó el templado de Activador de Plasminógeno Tisular (tPA) proporcionado en el juego de reactivos comercial. Los tubos fueron identificados y se realizaron las mezclas como se describe en la tabla 3. Posteriormente, una vez realizadas las mezclas se procedió a la PCR utilizando un termociclador MasterCycler (Eppendorf, Hamburg, Germany), empleando las condiciones de amplificación referidas en la tabla 2. La visualización de los productos amplificados se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

**Tabla 3. Mezcla para marcaje de la sonda cADN.**

<b>REACTIVO</b>	<b>1 Control de marcaje (tPA)</b>	<b>2 Sonda no marcada</b>	<b>3 Sonda marcada</b>
Amortiguador de PCR 10X con MgCl <sub>2</sub> (15 mM)	5 µl	5 µl	5l µl
Mezcla de marcaje (2mM de dGTP, dATP, y dCTP, 1.3 mM dTTP y 0.7Mm dUTP-DIG)	5 µl	-----	2.5 µl
Solución dNTP (2mM dGTP, dATP, dCTP y dTTP de cada uno)	-----	5 µl	2.5 µl
Iniciador sentido (+) (100 pmol/µl)	-----	1.0 µl	1.0 µl
Iniciador antisentido (-) (100 pmol/µl)	-----	1.0 µl	1.0 µl
Templado problema		5.0 µl	5.0 µl
Iniciadores tPA	5.0 µl	-----	-----
Templado tPA	5.0 µl	-----	-----
Mezcla de Enzima (3.5U/ µl)	0.75 µl	0.75 µl	0.75 µl
H <sub>2</sub> O estéril	29.5 µl	32.25 µl	32.25 µl
Volumen final: 50 µl			

### **3.7 Hibridación *in situ***

Desparafinización

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

### Digestión

Se colocaron las laminillas en el soporte de la estación de trabajo Fischer Microprobe (Fisher Scientific, Pittsburg, USA) y se introdujeron en Automation buffer<sup>TM</sup> 1x (Biomeda Corp., Foster City CA. USA) durante un minuto, se secaron en almohadillas absorbentes. Posteriormente se digirieron los tejidos con pepsina al 0.25% pH 2.0 a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos y posteriormente 8 minutos a  $105^{\circ}\text{C}$ , en una estación de trabajo Fischer Microprobe, se secaron en almohadillas absorbentes. La digestión se detuvo con 4 lavados en Automati3n buffer<sup>TM</sup> 1x secando entre cada uno de ellos, se agrego formamida al 100% y se incubo a  $105^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos, después se procedió a secar las laminillas en almohadillas absorbentes.

### Hibridación

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

### Detección

Las laminillas se lavaron tres veces en solución salina de citratos al 0.5x, (Promega Corp. Madison, WI, USA), 3 veces en solución salina de citratos al 0.2x, secando entre cada lavado. Posteriormente se incubaron con la solución salina de citratos al 0.2x por 5 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  y se procedió a secarlas. Las laminillas se introdujeron en amortiguador 1 (NaCl 0.15M, Tris HCl 0.1M, pH 7.5) suplementado con 0.3% de Triton X-100 (Fisher Scientific, Pittsburg, PA) y 1% de suero de borrego y se procedió a realizar el secado. La



detección se realizó mediante la incubación por 45 minutos a 37° C con anti-DIG-AP (Roche Applied Sciences, Mannheim, Germany), dilución 1:500 en amortiguador 1 con 0.3% de Triton-X-100 y 1% de suero de borrego. Se lavaron las laminillas 6 veces en amortiguador 1, secando entre cada lavado. Se removieron las laminillas del soporte y se agitaron en Automation buffer™ durante 2 minutos. Las laminillas se colocaron nuevamente en el soporte (se reviso que no hubiera formación de burbujas) y se secaron. Se introdujeron las laminillas en amortiguador 2 (MgCl<sub>2</sub> 0.06M, NaCl 0.12M, Tris 0.1M pH 9.5) suplementado en el momento de ser utilizado con Tween 20 al 0.4% (Hycel de México SA. De CV), y Brij 35 (Fisher Scientific, Pittsburg, USA) al 0.25%.

#### Revelado

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

#### Teñido y Montaje

Las laminillas se introdujeron en verde rápido durante 5 minutos, posteriormente se realizo 1 pase en agua destilada, 1 pase en EtOH 70%, 1 pase en EtOH 95% y 1 pase en EtOH 100%. Posteriormente las laminillas se montaron en medio permanente con Entellan (Merk, Hamburg, Germany).

### **3.8 Evaluación de la Hibridación *in situ***

En cada protocolo de HIS se incluyeron las muestras referidas así como testigos positivos. Simultáneamente, el mismo grupo de laminillas seleccionadas se procesaron en ausencia de la sonda marcada para conformar el testigo interno de la hibridación. La distribución de PCV2 fue evaluada mediante la escala de 5 puntos referida en la evaluación histopatológica tomando como criterio a la señal de hibridación en los tejidos.

### **3.9 Análisis de resultados**

Los valores obtenidos de las evaluaciones histopatológicas y de la HIS se agruparon en un cuadro de contingencia de 2X2 para realizar la prueba  $J_i^2$  y se determinó la concordancia

entre la histopatología y la HIS, y entre la severidad de las lesiones de fetos frente a los neonatos mediante el coeficiente de Cramer. Así mismo, se determinó el valor diagnóstico de la HP frente a la HIS mediante el calculo de los valores de sensibilidad, especificidad, índice predictivo positivo, índice predictivo negativo, índice de falsos positivos e índice de falsos negativos utilizando las siguientes fórmulas (Milton, 1989).

		<b>HIS</b>		Total
		<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	
<b>HP</b>	<b>Positivo</b>	A	B	$a + b$
	<b>Negativo</b>	C	D	$c + d$
Total		$a + c$	$b + d$	<b>Gran total</b>

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

- Sensibilidad =  $\frac{a}{a + c} \times 100$

- Especificidad =  $\frac{d}{b + d} \times 100$

- Índice de falsos negativos (I.F.N.)=  $\frac{c}{a + c} = \%$
- Índice de falsos positivos (I.F.P.)=  $\frac{b}{b + d} = \%$
- Valor predictivo positivo (V.P.P.)=  $\frac{a}{a + b} \times 100$
- Valor predictivo negativo (V.P.N.)=  $\frac{d}{c + d} \times 100$

Adicionalmente, el grado de severidad de las lesiones histopatológicas (puntaje total de cada caso) y la distribución del PCV2 en los tejidos se analizaron mediante el procedimiento NPAR1WAY para el análisis de varianza para datos categóricos el cual incluye prueba de Kruskal-Wallis y prueba de Wilcoxon (SAS, 1996). Los resultados se consideraron estadísticamente significativos a  $P < 0.05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Histopatología

Se recibieron 107 casos de tejido cardiaco sospechosos de infección natural por PCV2 de los cuales 86 correspondieron a muestras fetales y sólo 21 fueron productos nacidos a término. Los casos se evaluaron histológicamente para el diagnóstico histopatológico de miocarditis no supurativa y determinar la severidad de las lesiones observadas con base a criterios microscópicos establecidos. La frecuencia de los grados de lesión y los puntajes correspondientes se muestran en la tabla 5. En general la mayoría de las lesiones observadas fueron leves y una frecuencia muy reducida de lesiones severas. El 64.47% de los casos presentaron diversos grados de cambios vasculares (congestión y edema) siendo en su mayoría leves, 34.57% (37/107) seguidos por cambios moderados y severos mientras que en 39/107 (36.44%) casos no se observaron. El infiltrado inflamatorio intersticial y perivascular revelaron la misma tendencia que los cambios vasculares con frecuencias mayores para los casos leves y menores para los casos severos, sólo que la proporción de casos con inflamación severa fue marcadamente menor (4.67% (5/107) y 0.93% (1/107), respectivamente. La frecuencia de necrosis fue relativamente mayor (36.44%) (30/107) leve, 18.69% (20/107) moderado y un 15.88% (17/107) severo, si se considera que se observó aún en casos sin evidencia de miocarditis. Una alta proporción (71.42%) de los animales nacidos a término no presentaron miocarditis y/o cambios histopatológicos significativos. Los casos restantes (6/21) exhibieron un grado leve de lesión (Tabla 4).

Las figuras representativas de los criterios histopatológicos evaluados se aprecian en la figura 1 donde existe edema severo e infiltrado perivascular no supurativo en un caso de corazón neonatal, en la figura 2 se observa infiltrado perivascular linfocítico plasmocítico moderado y necrosis de las fibras cardiacas en un corazón de caso neonatal, la figura 3 presenta infiltrado linfocítico intersticial discreto en tejido cardiaco neonatal, en la figura 4 se observa marcada acumulación perivascular de linfocitos y edema severo en tejido cardiaco fetal, en la figura 5 se observa infiltrado linfocítico plasmocítico intersticial moderado en un caso fetal y en la figura 6 se presenta necrosis miocárdica moderada/severa entremezclada con un moderado infiltrado intersticial no supurativo en un caso fetal.

**Tabla 4. Resumen de los hallazgos histopatológicos y severidad de lesiones cardiacas.**

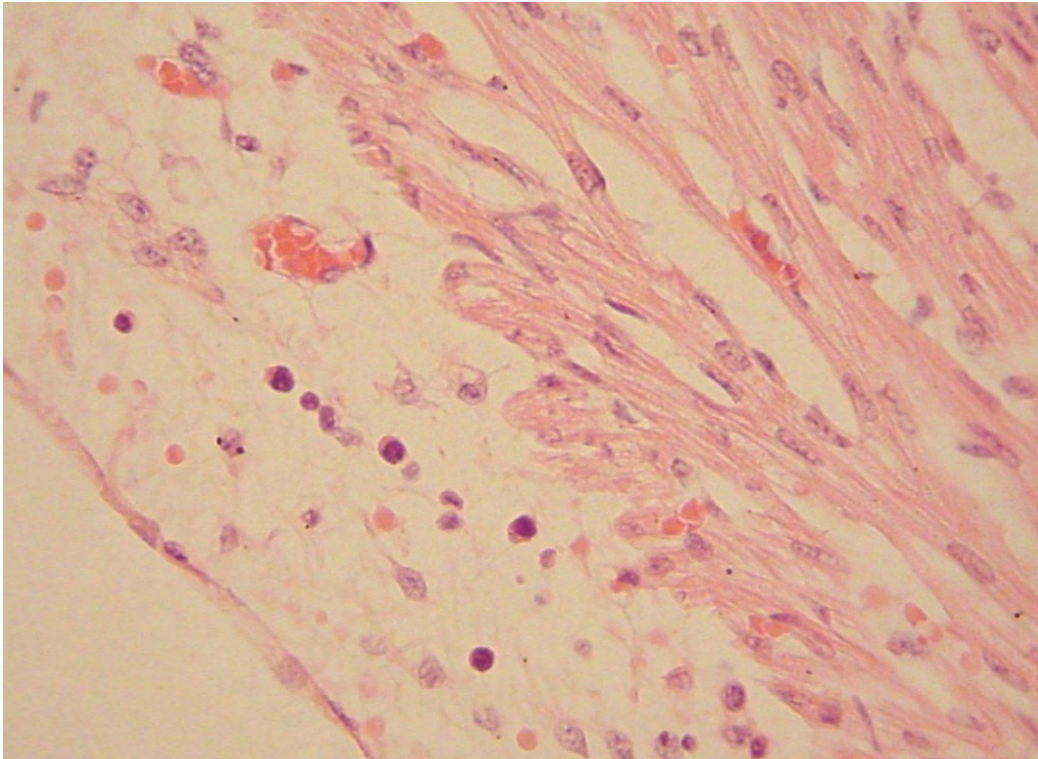
Criterio Grado	Cambios vasculares*		Infiltrado en parénquima		Infiltrado perivascular		Necrosis	
	Sin cambios [1]	39 (36.44%)		55 (51.40%)		58 (54.20%)		32 (29.90%)
	F	N	F	N	F	N	F	N
	23	16	40	15	43	15	19	13
Leve [2]	37 (34.57%)		42 (39.25%)		40 (37.38%)		39 (36.44%)	
	F	N	F	N	F	N	F	N
	33	4	36	6	34	6	38	1
Moderado [3]	18 (16.82%)		6 (5.60%)		9 (8.41%)		20(18.69%)	
	F	N	F	N	F	N	F	N
	17	1	6	0	9	0	19	1
Moderado-severo [4]	14 (13.08%)		5 (4.67%)		1 (0.93%)		17 (15.88%)	
	F	N	F	N	F	N	F	N
	14	0	5	0	1	0	17	0

[ ] = Puntaje asignado

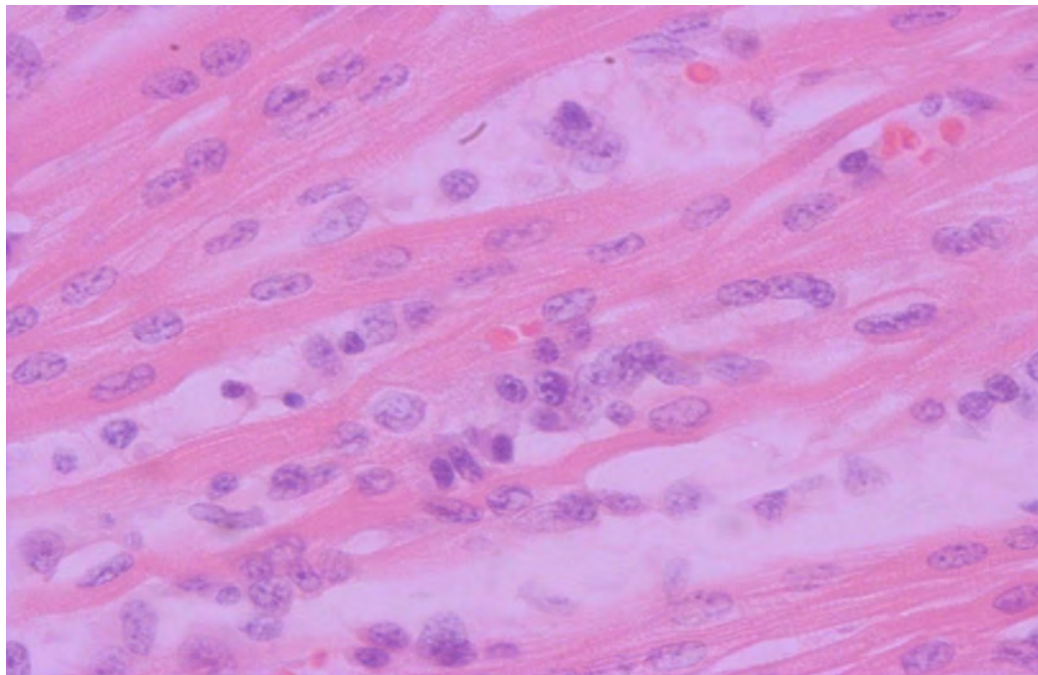
F = Fetos

N = Nacidos a término (mortinatos o neonatos).

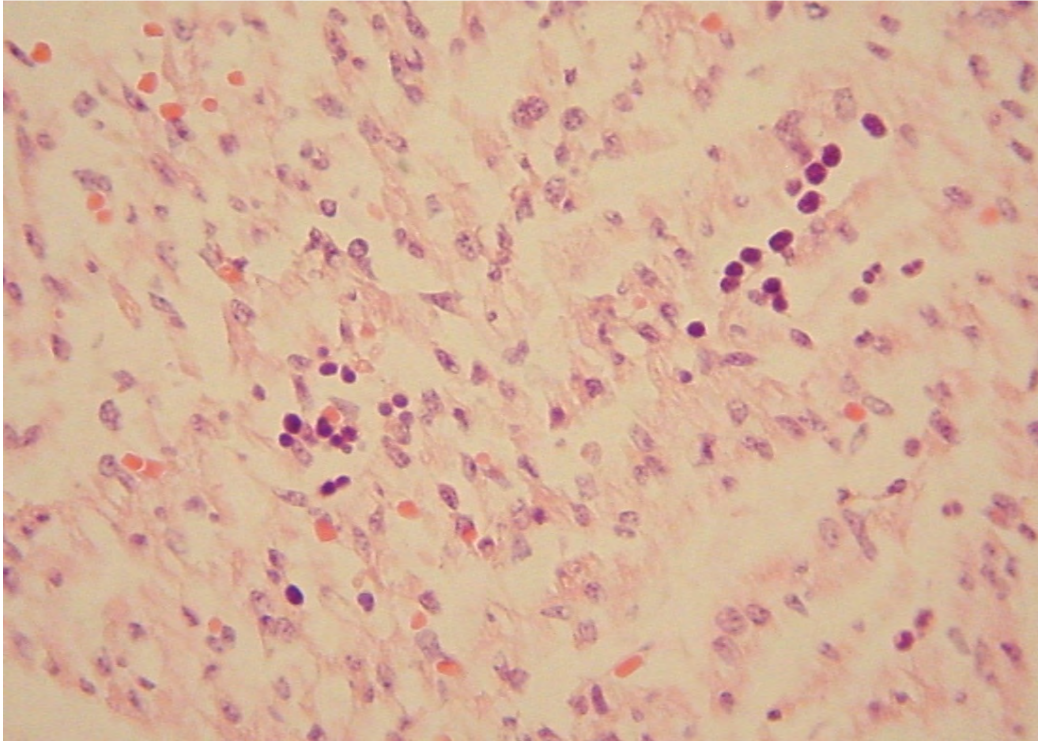
\* = Congestión y edema.



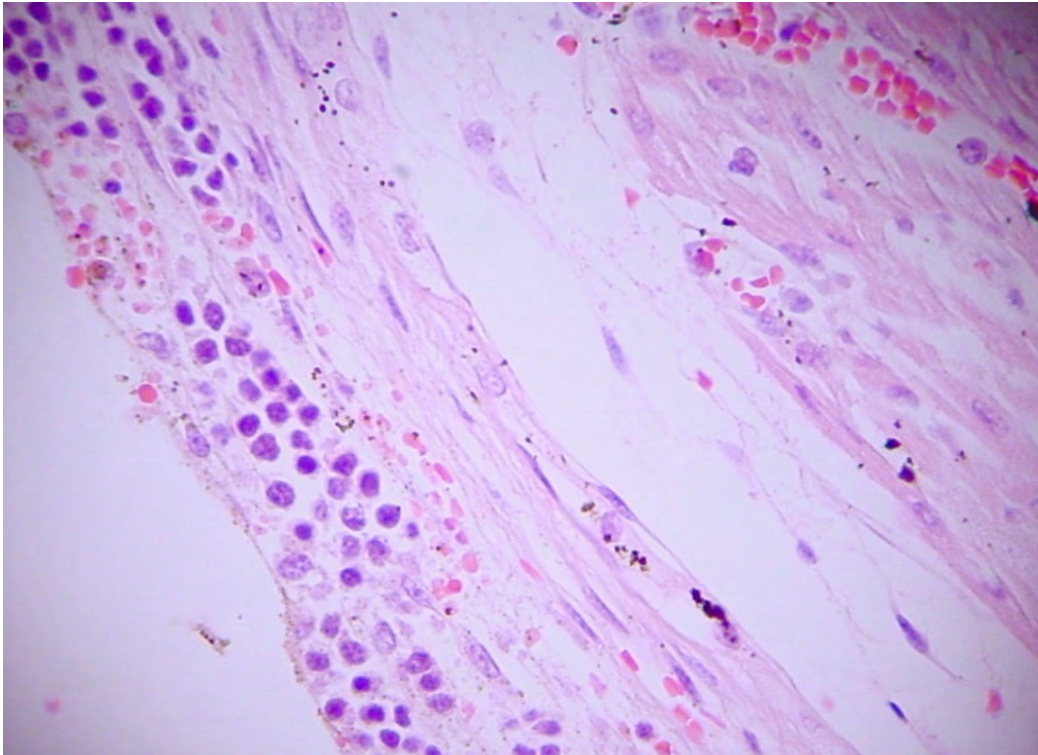
**Figura 1.** Edema severo (puntaje 4) e infiltrado perivascular no supurativo (puntaje 2) en un caso neonatal. Corazón, 400X. Hematoxilina-Eosina.



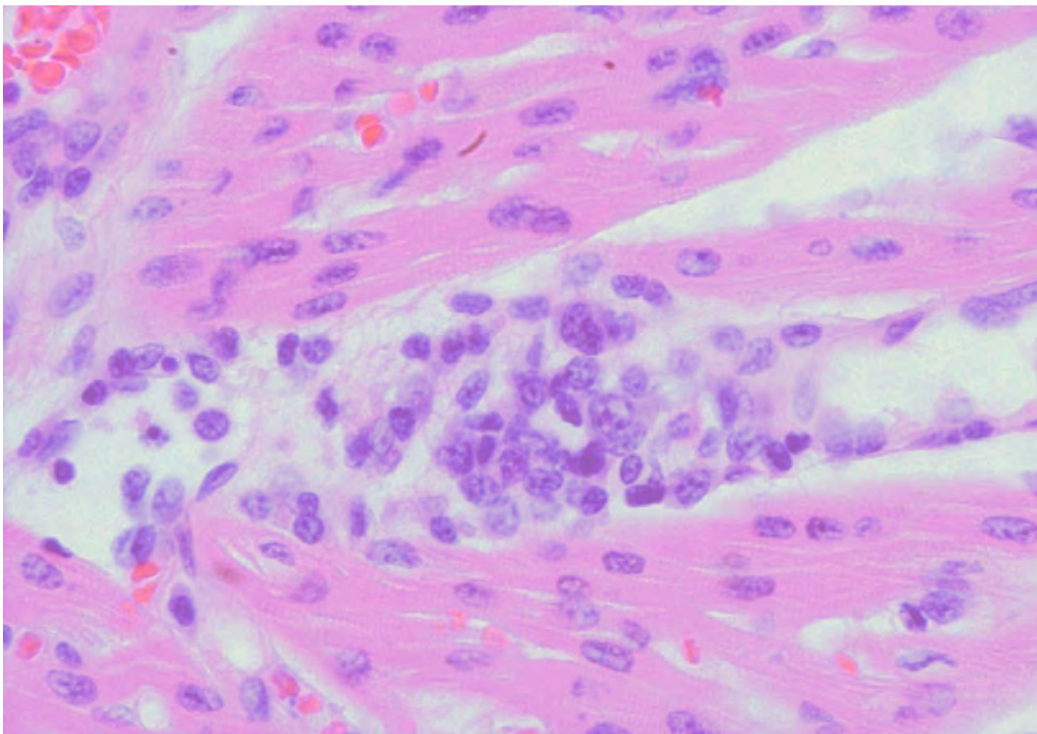
**Figura 2.** Infiltrado perivascular linfocítico plasmocítico moderado (puntaje 3) y necrosis de las fibras cardiacas (puntaje 3) en un caso neonatal. Corazón, 100X. Hematoxilina-Eosina.



**Figura 3.** Infiltrado linfocítico intersticial discreto (puntaje 2) Corazón, 400X, Hematoxilina-Eosina.

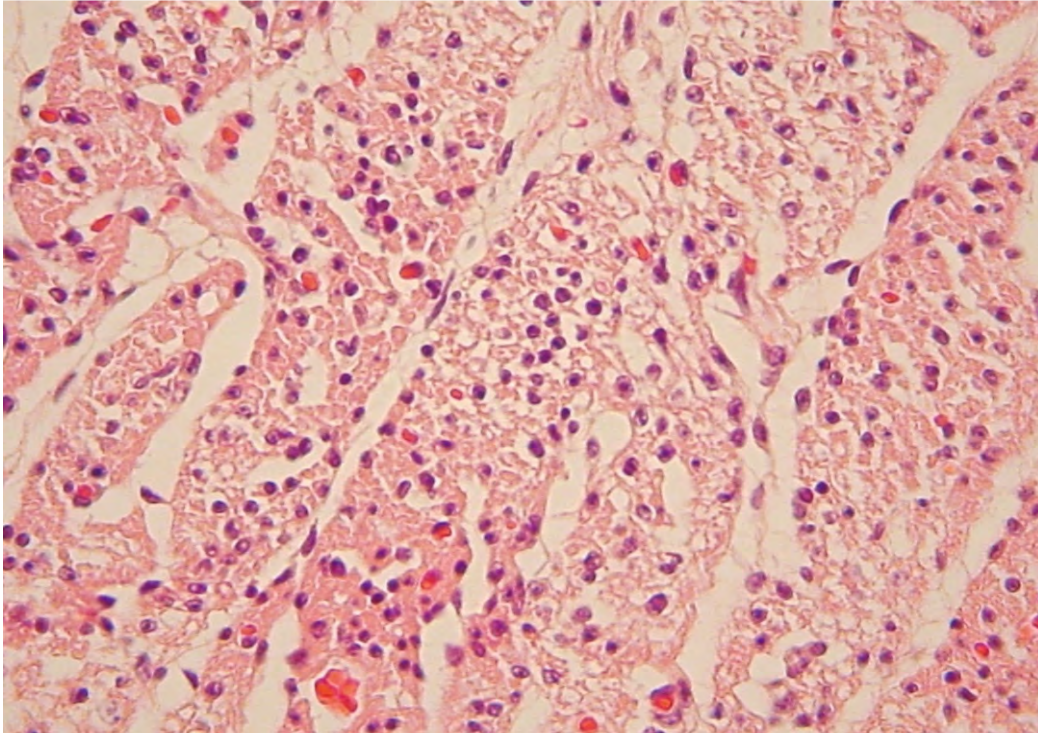


**Figura 4.** Marcada acumulación perivascular de linfocitos (puntaje 4) y edema severo (puntaje 4) en tejido fetal. Corazón, 400X. Hematoxilina-Eosina.





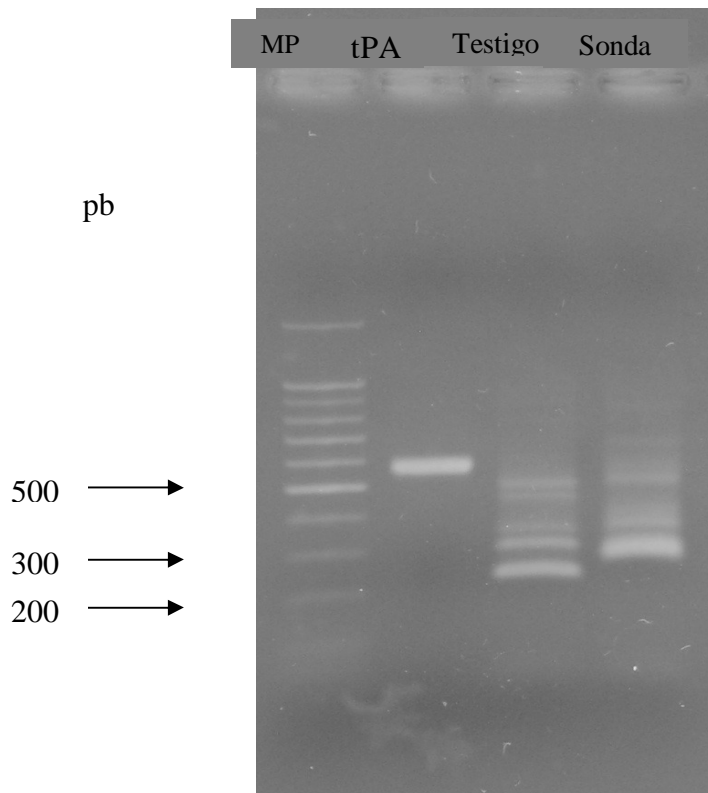
**Figura 5.** Infiltrado linfocítico plasmocítico intersticial moderado (puntaje 3) en un caso fetal. Corazón, 400X. Hematoxilina-Eosina.



**Figura 6.** Necrosis miocárdica moderada/severa (Puntaje 3) entremezclada con un moderado infiltrado intersticial no supurativo (Puntaje 3) en un caso fetal. Corazón, 400X. Hematoxilina-Eosina.

#### **4.2. Hibridación *in situ***

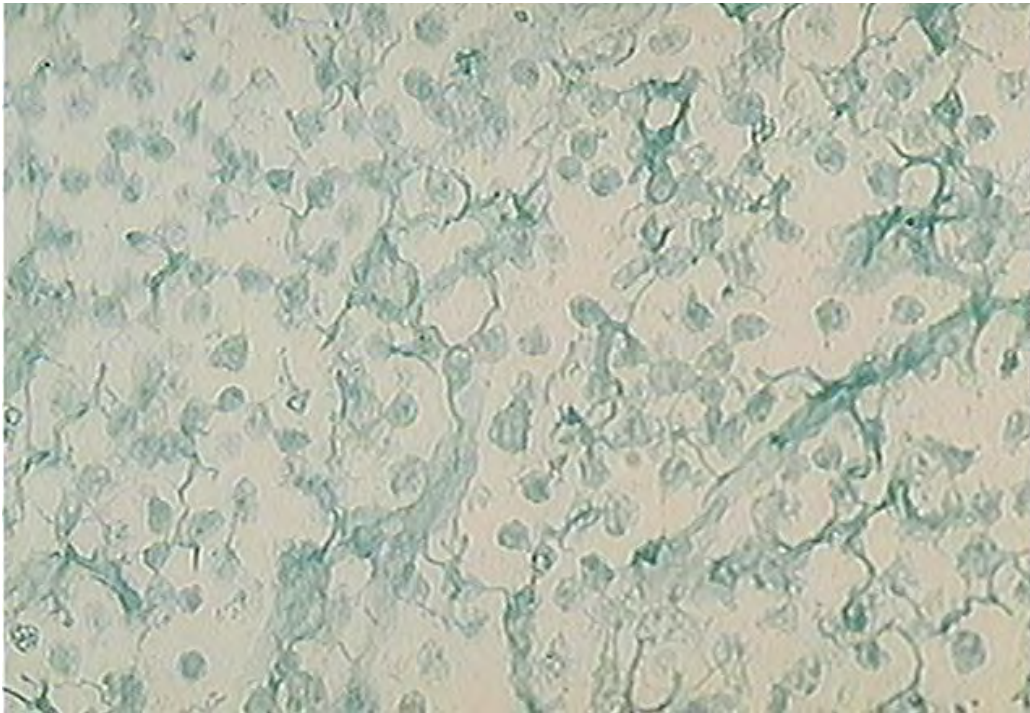
El método de marcaje de la sonda específica para PCV2 consistió en la incorporación directa de nucleótidos marcados en proporción 2:1 de dTTP y dUTP-DIG durante la amplificación por la PCR. Este método produce una sonda para HIS altamente marcada. La visualización de los productos en el gel de agarosa se muestra en la figura 7 en donde se aprecia en el pozo 1 las bandas del marcador de peso molecular (PM), en el pozo 2 una banda con un PM > 500 bp que corresponde el producto del testigo de tPA. En el pozo 3 se ubica la banda del testigo no marcado de PCV2 con un PM de aproximadamente 225 pb y en el pozo 4 con un PM aparente de > 300 pb la banda que corresponde a la sonda DIG-marcada de PCV2.



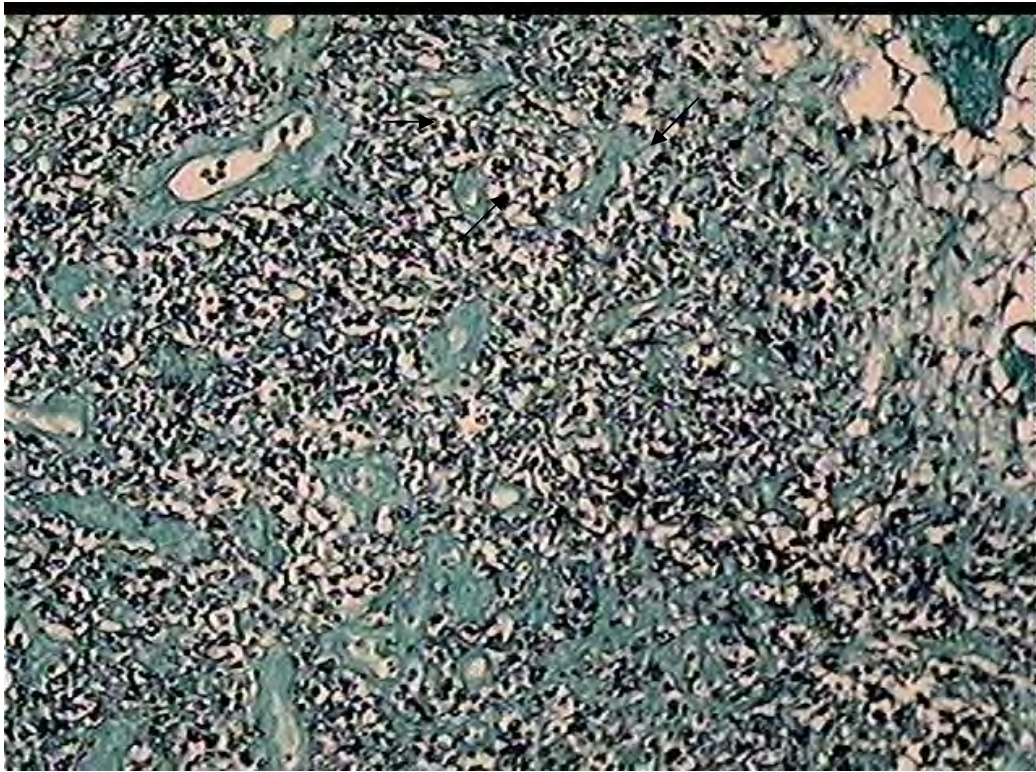
**Figura 7.** Marcaje de sonda para PCV2. PM: marcador de peso molecular, tPA: producto del testigo de tPA, Testigo: testigo no marcado de PCV2, Sonda: sonda marcada con Digoxigenina. Gel de agarosa al 1.5%.

En todos los ensayos de Hibridación *in situ* para PCV2 se utilizo un testigo negativo proveniente de un animal sano sin circovirus porcino (CP) y un testigo positivo proveniente de un caso de síndrome multisistémico y de adelgazamiento post-destete (PMWS). En todos los casos y testigos se utilizó un control interno de HIS el cual no presentó señal de hibridación exhibiendo fondos limpios. La falta de reacción de hibridación en presencia de la sonda se puede apreciar en la tonsila de un animal sano libre de CP utilizado como testigo negativo (figura 8). Todos los testigos positivos utilizados presentaron intensas señales de hibridación de color azul profundo y distribución difusa (figura 9) que se observa claramente en el citoplasma celular (figura 10). En tejido cardiaco, los casos positivos a PCV2 presentaron focos pequeños de tamaño variable, distribuidos azarosamente a lo largo de los cortes. En la figura 11 se aprecian dos focos

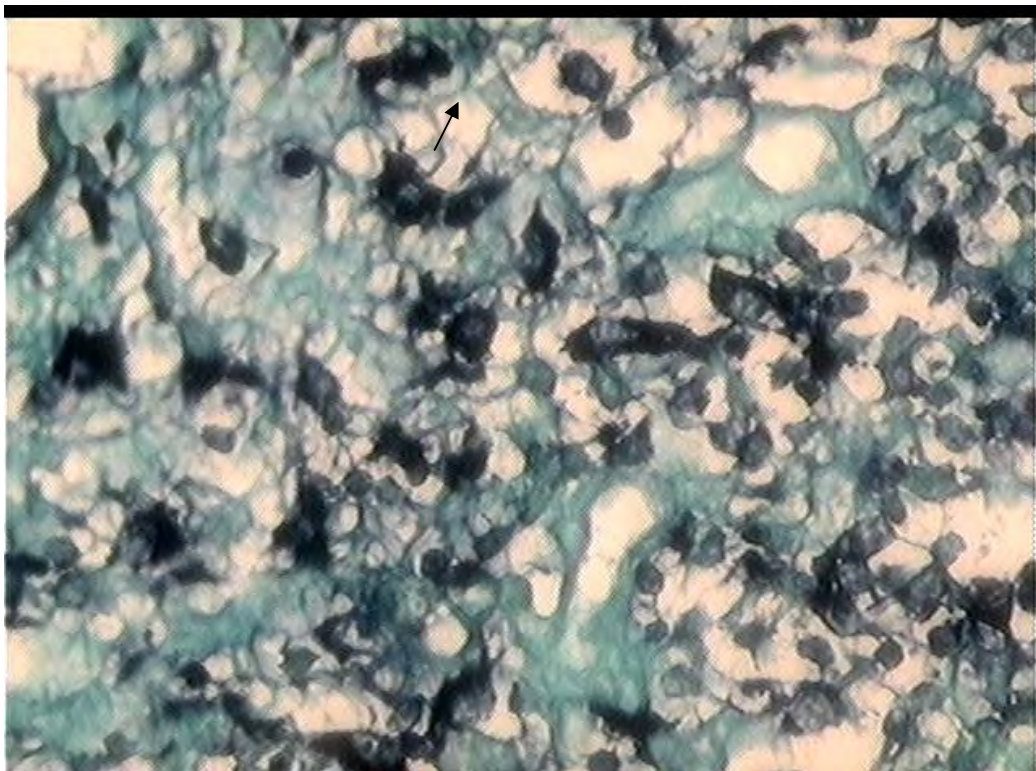
distintivos con señal positiva de hibridación a PCV2 sobre un fondo limpio que indica que no existen reacciones inespecíficas derivadas de la técnica. En los acercamientos de las figuras 12 y 13 se muestra claramente la señal de hibridación positiva a PCV2 en el citoplasma de los cardiomiocitos. Con menor frecuencia, debido al bajo número de casos remitidos, se apreciaron señales de hibridación positivas en riñón (figura 14) hígado y pulmón. En conjunto, las imágenes revelan que la extensión de los focos era variable que va desde focos pequeños (figura 11) hasta áreas focalmente extensivas (figura 12) así como su distribución puesto que existían 2-3 focos en un mismo campo visual (figura 14) y zonas en donde la observación de señales de hibridación era frecuente mientras que el tejido restante se encontraba desprovisto de focos.



**Figura 8.** Animal sano en el cual no se observa reacción de hibridación positiva y exhibe fondo limpio. Tonsila. Testigo negativo. Hibridación *in situ*. Verde rápido. 400X.



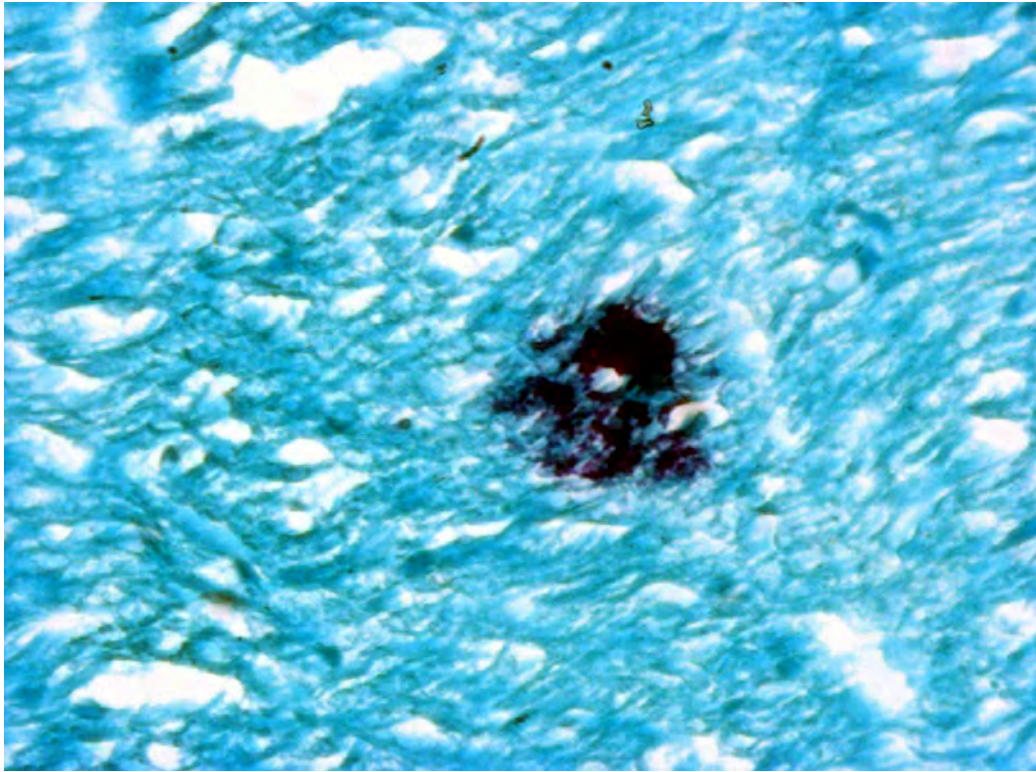
**Figura 9.** Señal de hibridación intensa difusa. Linfonodo. Hibridación *in situ*. Testigo positivo. Verde rápido. 10X.



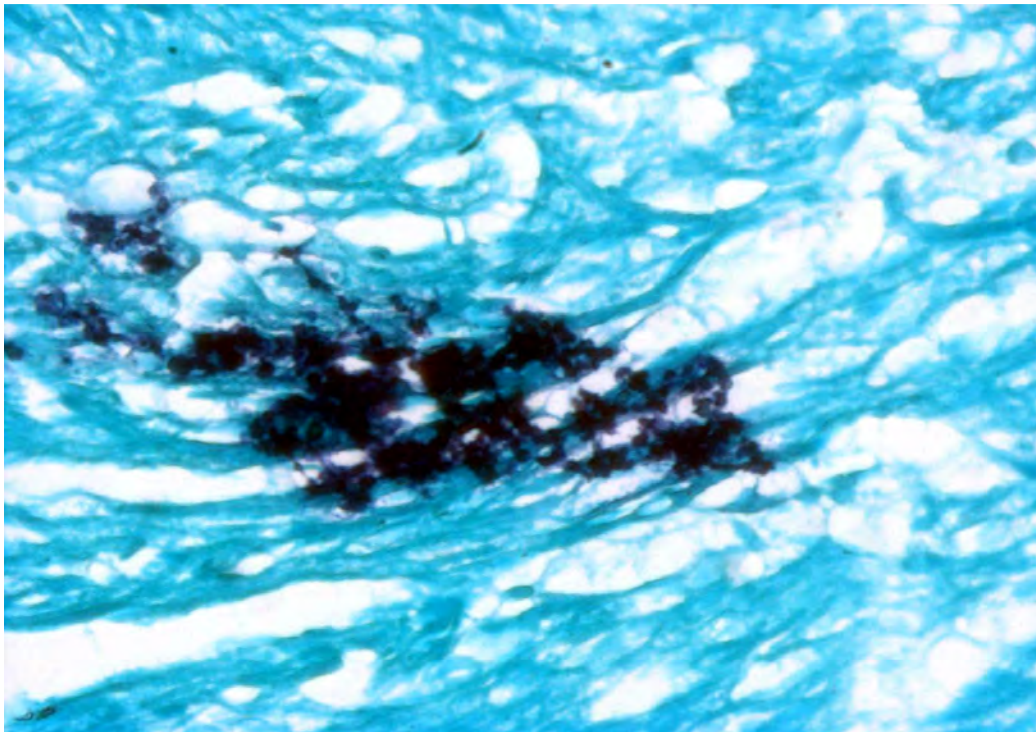
**Figura 10.** Señal de hibridación intensa en citoplasma. Linfonodo. Hibridación *in situ*. Testigo positivo. Verde rápido 40X.



**Figura 11.** El ácido nucleico de PCV2 está presente en los cardiomiocitos (Depósitos de color azul profundo) de distribución focal. Corazón. Hibridación *in situ*. Verde rápido 40X.



**Figura 12.** Se observa el aspecto granular a detalle dentro de las células miocárdicas. Acercamiento de la figura 11. Corazón. Hibridación *in situ*. Verde rápido. 100X.



**Figura 13.** El ADN de PCV2 está presente en el citoplasma celular. Corazón. Hibridación *in situ*. Verde rápido. 400X.



**Figura 14.** Señal de hibridación positiva. Nótese la definición de la señal y el fondo limpio. Riñón. Hibridación *in situ*. Verde rápido. 100X.

#### **4.3. Valor diagnóstico de la histopatología frente a HIS.**

Los resultados de la evaluación histopatológica frente a la HIS se presentan en la tabla de contingencia de 2x2 (Tabla 5). Los datos revelan que la presencia de miocarditis es semejante a la HIS por prueba de  $Ji^2$  a un nivel de significancia del 0.005 y coeficiente de Cramer (0.64). El valor diagnóstico calculado (Tabla 6) muestra que los valores de sensibilidad y especificidad no rebasan el 90% y que los índices de falsos negativos y falsos positivos son bajos. Es importante resaltar que de los 107 casos evaluados, 48 (45%) exhibieron miocarditis no supurativa de los cuales 35 (33 fetales y 2 a término) fueron positivos a PCV2 (32.7%) y 13 fueron negativos a PCV2 (12.4%). Hubo 5 casos fetales positivos a PCV2 por HIS (4.67%) sin evidencia de miocarditis.

**Tabla 5. Cuadro de contingencia de 2X2 de las evaluaciones histopatológicas e HIS.**

	HIS		Total
	Positiva	Negativa	
Miocarditis positiva	35	13	48
Miocarditis negativa	6	53	59
			107
Total	41	66	Gran total

**Tabla 6. Valor diagnóstico de la evaluación histopatológica frente a la Hibridación in situ.**

Parámetro	%
Sensibilidad	85.36
Especificidad	80.30
I.F.P	0.19
I.F.N	0.14

#### **4.4 Relación grado de lesión/ Distribución de PCV2**

Los grupos integrados para el análisis del grado de lesión cardiaca y la distribución de PCV2 con base al tipo de animal y la presencia de miocarditis se muestran en la



quedaron conformados como se aprecia en la Tabla 7. El grupo 1 consiste de 41 casos de los cuales 32 son positivos a HIS, el grupo 2 consiste de 45 casos y 6 son positivos a HIS, grupo 3 integrado por 6 casos de los cuales 2 son positivos a HIS y grupo 4 conformado por 15 casos de los cuales 1 es positivo a HIS. El grado de severidad cardíaca mostró una diferencia estadística significativa por el procedimiento de NPAIR1WAY en todos los grupos ( $P < 0.05$ ). Los grupos 1 y 3 (fetos y neonatos con miocarditis) tuvieron una diferencia de  $P= 0.0488$  y los grupos 2 y 3 de  $P= 0.0233$ . La diferencia de las parejas 2 y 4 (fetos y neonatos sin miocarditis) y las parejas 1 y 4 fue de  $P= 0.0001$ . La distribución de PCV2 descrita en corazón (focos múltiples positivos de tamaño variable, distribuidos a lo largo de los cortes), impidió una apropiada evaluación estadística.

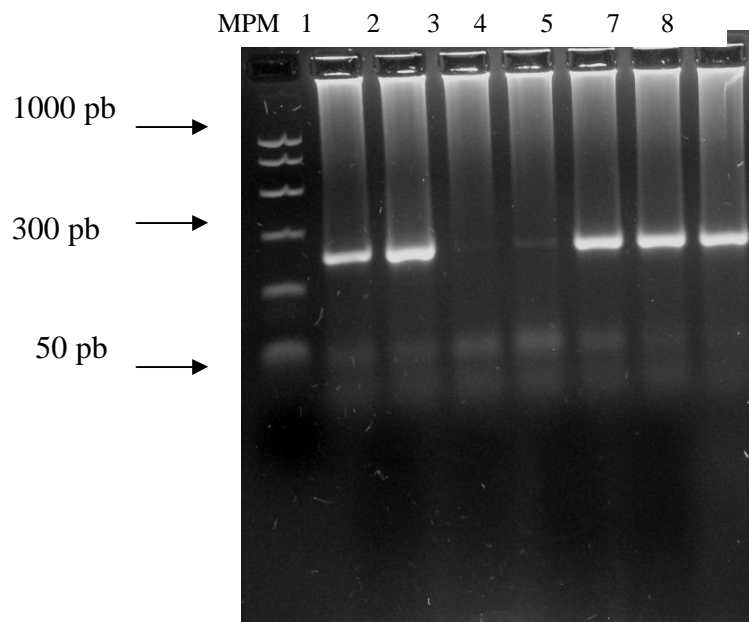
**Tabla 7. Composición de los grupos**

Grupo	HIS+	HIS--	TOTAL
1 Fetos/miocarditis	32	9	41
2 Fetos/ sin miocarditis	6	39	45
3 Término/miocarditis	2	4	6
4 Término/ sin miocarditis	1	14	15
TOTAL	41	66	107

#### **4.5 PCR punto final**

De los 107 casos se seleccionaron 50 para la detección de PCV2 en muestras parafinizadas por PCR punto final. La selección de los casos fetales fue al azar mientras

que los casos de los mortinatos/neonatos se tomaron en su totalidad por ser un número reducido de casos. El PCR de tiempo final detectó bandas de 228 pb compatibles con la presencia de PCV2 (figura 15) en los casos positivos. En la tabla 8 se muestra que por PCR, fueron detectados 20 casos adicionales incrementando los casos positivos a PCV2 a 55 casos (51.4%) de los cuales 42 (38.75%) exhibieron miocarditis, siendo 36 de estos muestras fetales. Cabe señalar que 13 casos (9 de estos fetales) sin miocarditis y negativos por HIS resultaron positivos por PCR. Ningún caso positivo a la HIS fue negativo por PCR. En total, se detectaron 50 casos fetales positivos a PCV2.



**Figura 15.** Detección de PCV2 (225 pb) por PCR anidado en fetos. MPM: marcador de peso molecular, Testigo positivo a PCV2, 3: Testigo negativo, 4 - 8: ADN extraído del corazón de fetos.

**Tabla 8. Resumen de los resultados de PCR punto final y su relación con la HIS**

Grupo	HIS+/PCR+	HIS--/PCR+	HIS--/PCR--
1	12	4	0
2	2	9	2
3	3	3	0
4	1	4	10
TOTAL	18	20	12

## 5. DISCUSIÓN

Actualmente, el circovirus porcino tipo 2 (PCV2) es considerado un importante patógeno emergente asociado con diferentes síndromes y enfermedades en los cerdos (Ellis, J, *et al.*, 2004; Chae C, 2005). El PCV2 es un virus que se aisló por primera vez en 1997 en cerdos con síndrome multisistémico y de adelgazamiento post-destete (PMWS) (Allan, G, *et al.*, 2000). Este cuadro se describió en 1996 en Canadá (Harding, J. 1996). El PMWS se ha descrito en la mayor parte del mundo en donde la producción porcina es una actividad económica importante. En México se informó la presencia de PCV2 en tejidos procedentes de cerdos con signología y lesiones de PMWS (Trujano, M., *et al.*, 2001; García-Reyna, *et al.*, 2004b). El síndrome de Enfermedades Asociadas a Circovirosis Porcina (PCVAD) se relaciona de manera primaria a la presencia de PCV2 en los cerdos afectados.

Se han descrito diversos síndromes asociados al cuadro de PCVAD, entre los que se incluyen el PMWS, el Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina (PDNS) y el Síndrome de Falla Reproductiva, de la cual existen varios informes (Nauwynck, H., *et al.*, 2007; Madson, D, *et al.*, 2009; McDowell, E, *et al.*, 2009). Los desordenes reproductivos relacionados con PCV2 son caracterizados por abortos a término, momias y mortinatos o cerdos prematuros. Los signos clínicos consistentes de granjas afectadas incluyen elevación de abortos, mortinatos y momificación fetal (Harding, J, 2003; Nauwynck, H., *et al.*, 2007; Pittman, 2008). La muerte embrionaria temprana ha sido observada en un estudio Coreano del 2004 (Kim, *et al.*, 2004). Las lesiones microscópicas son áreas extensivas de degeneración miocárdica o necrosis con edema y fibrosis leve además de infiltración moderada de linfocitos y macrófagos (Quintana, J, *et al.*, 2001; Chae, 2005; Nauwynck., H, *et al.*, 2007; Pittman., 2008).

El diagnóstico de PCV2 asociado a falla reproductiva está basado en tres criterios: 1) Incremento de abortos a término y mortinatos o momias o ambos; 2) Miocarditis no supurativa necrotizante o fibrosante en tejido cardiaco fetal; y 3) Presencia de PCV2 en el tejido fetal afectado (Segales, *et al.*, 2006). Las pruebas usadas para determinar que el PCV2 es una causa de aborto y falla reproductiva son aislamiento viral, PCR, inmunohistoquímica (IHQ) e Hibridación *in situ* (HIS) (Chae, 2005) y para relacionar al virus con las lesiones en los tejidos se requiere a la IHQ e HIS (Kim, *et al.*, 2002).

La sensibilidad de la HIS depende considerablemente de tener un número adecuado de copias de ácido nucleico viral, arriba de 20-50, en las células infectadas. Lo anterior es una gran ventaja de la HIS pues detecta una célula infectada con un alto número de copias de ácido nucleico o unas cuantas células (3-4) con la cantidad adecuada de ácido nucleico viral (Syrjänen, S.M. 1992; Brown, C. 1998). La HIS constituye un estándar de oro (Kim y Chae, 2001, Kim, *et al.*, 2001; Calsamiglia, *et al.*, 2002) ya que se reporta un 100% sensibilidad y especificidad frente al aislamiento viral (Kim y Chae, 2001). Por tal motivo, en este trabajo se consideró el uso de la HIS con el fin de cubrir con los criterios de diagnóstico de FR-PCV2.

De este modo, la técnica inicial para el diagnóstico de FR-PCV2 de los casos clínicos compatibles con FR-PCV2 es la HP con el fin de confirmar las lesiones características de PCV2. En el presente estudio, el valor diagnóstico de la histopatología (HP) exhibió valores aceptables de sensibilidad, especificidad, IFP e IFN frente a la HIS (85.36%, 80.30%, 0.19% 0.14%, respectivamente) por lo que constituye una buena prueba de tamizaje para los casos probables de FR-PCV2 con base a los criterios microscópicos descritos y así proceder a la detección de PCV2 en tejidos lesionados. Como se mencionó anteriormente, la HIS es una técnica distintiva del proceso infeccioso que muestra la localización específica del virus en el tejido asociado a las lesiones microscópicas características (mismas que son el segundo criterio diagnóstico de PCV2-AD). Por tal motivo, la ventaja de la HIS para cubrir el tercer criterio diagnóstico es indiscutible (Kim y Chae; 2004). En este sentido, la implementación de ambas pruebas incrementa la asociación de PCV2 con la FR puesto que la prueba de  $J_i^2$  y el coeficiente de Cramer revelan una similitud importante entre ambas pruebas y de este modo se cumple con los tres criterios diagnósticos para FR-PCV2.

En este estudio sólo 21/107 (19.62%) fueron productos a término (mortinatos y neonatos). Microscópicamente (Tabla 1), 48 casos (45%) exhibieron miocarditis no supurativa (M+) de los cuales 35 (33 fetales y 2 a término) fueron positivos a PCV2 por HIS (32.7%) y 13 fueron negativos a PCV2 (12.4%). Hubo 5 casos fetales positivos a PCV2 por HIS (4.67%) sin evidencia de miocarditis.

Estos casos son compatibles con FR-PCV2 y es congruente con base a los criterios diagnóstico y a los casos informados en la literatura (Chae, 2000; O'Connor, B, *et*

*al.*, 2001; Pensaert, M., *et al.*, 2004; Brunborg, *et al.*, 2007; Pittman, J, 2008) ya que la miocarditis y la detección de antígeno y/o de ADN de PCV2 en tejidos fetales en ausencia del virus del parvovirus porcino (PPV) y virus de la encefalomiocarditis (EMCV) es una evidencia robusta de la participación del PCV2 como agente causal del incremento de momias y mortinatos en las camadas afectadas (Pensaert M.B. *et al.*, 2004; Chae C, 2000; Brunborg, I, *et al.*, 2007; Pittman JS, 2008). La detección de PCV2 por PCR anidado en los casos M+ incrementó al 39% la proporción de casos compatibles con FR-PCV2. Lo anterior fue posible dado que la sensibilidad de la PCR es mayor que la de la HIS. Esto se debe a que la PCR es capaz de amplificar desde una sola copia de ADN viral (Syrjänen, S.M. 1992). Además, la modalidad anidada incrementa la sensibilidad de la detección al requerir menor concentración de ADN y diagnosticar una mayor proporción de casos que en ocasiones puede alcanzar hasta el 100% (Kim y Chae, 2001) y en un estudio comparativo de pruebas diagnósticas superó a la IHQ, HIS, PCR convencional, y PCR in situ, en orden ascendente (Lin, CM, *et al.*, 2009). Adicionalmente, el que ningún caso positivo a la HIS fuera negativo por PCR demuestra que ambas pruebas tienen alta especificidad.

Por tal motivo, el conjunto de pruebas utilizadas garantizaron el diagnóstico de FR-PCV2 al determinar lesiones por HP y detección de PCV2 por HIS con el fin de relacionar el detalle celular y arquitectura histológica con las detección de ADN viral, complementando el diagnóstico por PCR debido a la posibilidad de contar con un pequeño número de células infectadas con escasas copias virales.

El rango de 32.7-39% casos compatibles con FR-PCV2 diagnosticados en el presente estudio contrasta con el 13.1% de los casos de mortinatos y fetos abortados positivos a PCV2 por PCR informado por Kim J, (2004) y el 1% encontrado por PCR en España (Maldonado J, *et a.*, 2005). Por tal motivo, en éste último estudio se concluye que el PCV2 tiene un impacto menor en el desarrollo de falla reproductiva. Por otro lado, en un estudio retrospectivo de 252 casos de fetos abortados, momificados, neonatos no viables se detectó PCV2 en 27.1% de los casos y se encontró una asociación estadística significativa entre la detección de PCV2 y vPRRS mientras que no hubo asociación significativa entre el PCV2 y PPV y entre el vPRRS y PPV (Ritzmann M, *et al.*, 2005). Lo anterior concuerda

con los resultados del presente trabajo y revela la importancia de estudiar la asociación del vPRRS con el PCV2 en la población de cerdos en México.

Adicionalmente, en un estudio de prevalencia del vPRRS, PCV2 y PPV determinada por PCR en tejidos de lechones con problemas respiratorios fue de 31.4%, 46.5% y 8.1%, respectivamente y también fue detectado PCV2 en fetos abortados (Lyo, KS, *et al.*, 2001).

Debido a que por PCR anidado fueron detectados 20 casos adicionales se incrementó a 55 (51.4%) los casos positivos a PCV2 de los cuales 42 (38.75%) exhibieron miocarditis siendo 36 de estas muestras fetales. Cabe señalar que 13 casos sin miocarditis y negativos por HIS, resultaron positivos por PCR (9 de estas fetales). Estos últimos en conjunto con los 5 casos fetales positivos a PCV2 ya diagnosticados previamente por HIS suman un total de 14 casos fetales sin miocarditis con presencia de PCV2. Dichos casos en conjunto con los 36 casos fetales positivos a PCV2 y a miocarditis dan un total de 50 casos fetales positivos a PCV2 (46.72%) lo cual no es un diagnóstico de FR-PCV2 pero es un hallazgo significativo de transmisión transplacentaria debido a que el virus no debe estar presente en un animal que no ha tenido contacto con el medio ambiente y esto sólo es posible a través de su madre. Esta noción se apoya en informes en los que se concluye la transmisión vertical como un importante medio de transmisión debido a la detección de PCV2 en mortinatos (O'Connor *et al.*, 2001; Chae, C., 2005). De este modo, la transmisión vertical encontrada en este estudio es más alta que los informes previos referidos (Lyo KS, *et al.*, 2001; Kim J, 2004; Maldonado J, *et al.*, 2005; Ritzmann M, *et al.*, 2005). De este modo, los resultados del presente trabajo concuerdan con los hallazgos obtenidos recientemente por diversos autores los cuales revelan la asociación PCV2 en casos de FR sin la presencia y/o participación de vPRRS, PPV y EMVC (West KH, *et al.*, 1999; Lyo K, *et al.*, 2001, Brunborg, *et al.*, 2007).

La severidad de las lesiones presentó una tendencia inversamente proporcional con la edad del animal (Tabla 4) puesto que la mayoría de los casos de productos a término fueron negativos a miocarditis (71.42%) y los positivos presentaron lesiones discretas. Lo anterior fue validado estadísticamente al observarse diferencias significativas entre los grupos y corrobora la teoría de que el miocardio es el tejido blanco para PCV2 en fetos y cerdos jóvenes (Brunborg IM, *et al.*, 2007) y que en FR-PCV2, la severidad de las lesiones

dependerá de la edad del feto en el momento que ocurre la infección ya que entra más temprana sea la edad de la infección mayor será la gravedad de la infección puesto que el virus necesita de que en las células del hospedero haya una gran cantidad de actividad mitótica (Sánchez, *et al.*, 2003; Pensaert, *et al.*, 2004; Pittman, J, 2008,). Por eso los macrófagos se encuentran infectados tanto en los fetos como en los lechones recién nacidos (Sánchez, *et al.*, 2003), Además de que el estado inmunológico e infección mezclada con otros agentes es determinante (Mikami *et al.*, 2005).

Las señales de Hibridación *in situ* de los casos evaluados fueron discretas, de tamaño variable y aleatoriamente distribuidas (figuras 11 y 12). Lo anterior no permitió el análisis estadístico para establecer la correlación de la severidad de las lesiones con la distribución de PCV2. Sin embargo, la distribución de PCV2 observada por HIS sugiere una baja carga viral y por tal motivo se detectaron casos adicionales por PCR al ser una técnica más sensible lo cual probó ser de gran utilidad para confirmar la presencia de PCV2 en los casos con miocarditis. Por tal motivo, esta correlación podría ser determinada posteriormente realizando protocolos de PCR en tiempo real utilizando el ADN de las muestras parafinizadas evaluadas por HP. Lo anterior, permitirá correlacionar la carga viral con la severidad de las lesiones. La determinación de la carga viral de PCV2 se ha realizado por PCR cuantitativa en suero (Olvera, *et al.*, 2004; Brunborg IM, *et al.*, 2007) y en tejidos (Segalés J, *et al.*, 2005; Brunborg IM, *et al.*, 2007) de casos de PMWS y PDNS.

A pesar de que no fue un hallazgo, por el bajo número de casos remitidos con otros tejidos, se apreciaron señales de hibridación positivas en riñón, pulmón e hígado fetales. Como se señaló anteriormente, la replicación del PCV2 requiere de células en mitosis para disponer de ADN polimerasa activa (Sánchez, *et al.*, 2003) y por ende el miocardio, el hígado y macrófagos son el blanco de infección en fetos y cerdos jóvenes (Sánchez, *et al.*, 2003; Pensaert, *et al.*, 2004; Pittman, J, 2008) Por lo tanto, es importante la remisión de la mayoría de los órgano blanco posibles y no solo el tejido cardiaco para confirmar la presencia de PCV2 asociado a la FR.

El resto de los casos evaluados con miocarditis positiva, fue negativo a PCV2 por HIS y probablemente indican la presencia de otro agente como puede ser el virus de la encefalomiocarditis ya que PRRS y PPV no producen miocarditis no supurativa como lesión consistente en los productos (Brewer, LA, *et al.*, 2001; Brunborg IM, *et al.*, 2007;



Gelmetti, D. *et al.*, 2006; Billinis C, 2009). Desafortunadamente, el virus de la encefalomiocarditis no fue evaluado en transcurso del presente estudio pero puede ser detectado en corto plazo por HIS en los casos evaluados para confirmar o descartar su participación mediante la metodología descrita por Brewer LA, *et al.*, (2001) y con la colaboración de Brown, C en la Universidad de Georgia (USA).

Por otro lado, a partir de 1997 se informaron brotes asociados a la reaparición de actividad viral de fiebre porcina clásica (FPC) en explotaciones de traspatio y tecnificadas y se sugiere que la vacunación masiva que se implementó durante 1994-1996 posiblemente promovió una selección y evaluación de cepas virales de baja patogenicidad modificando en los últimos años el cuadro clínico de la enfermedad y ha provocado el subdiagnóstico de la misma. También en dicho estudio se menciona que los brotes pueden ser atribuidos a otros virus como el vPRRS (Socci. G, *et al.*, 2003).

Con base a los resultados de este estudio y a lo establecido en un estudio reciente que comparó la mayoría de las pruebas disponibles para la detección de PCV2 (Lin, C., *et al.*, 2009), se resalta la necesidad de emplear diversas técnicas para el diagnóstico de PCV2-AD. Particularmente, para el diagnóstico de FR-PCV2 el uso de la HIS en tejidos en combinación con la PCR anidada puede incrementar la detección de casos positivos. Adicionalmente, los hallazgos informados en tejido cardíaco indican que en nuestro país el PCV2 es un agente vírico fetotrópico relevante y debe considerarse en el diagnóstico diferencial de casos de FR caracterizada por abortos tardíos, momificación, lechones viables y gestaciones prolongadas.

## 6. CONCLUSIÓN

- Las lesiones microscópicas de circovirus porcino en el tejido cardíaco evaluado corresponden a las descritas por la bibliografía.
- El diagnóstico de miocarditis no supurativa es importante para determinar la participación de PCV2 en la falla reproductiva al ser comparable estadísticamente con la HIS.
- Los tejidos fetales con miocarditis y presencia de PCV2 por HIS y/o PCR son compatibles con FR-PCV2..
- La presencia de PCV2 en tejidos fetales con o sin hallazgo de miocarditis es sugestiva de transmisión transplacentaria.
- La ausencia de PCV2 en casos con miocarditis no supurativa indican la participación de otro agente viral no determinado en este estudio
- La severidad de la lesión cardíaca es inversamente proporcional a la edad del producto
- La señal de hibridación discreta aunado a la detección de casos adicionales positivos por PCR son compatibles con una baja carga viral en el tejido cardíaco misma que puede ser determinado por PCR en tiempo real.
- La presencia de PCV2 en otros tejidos blanco de infección indica la necesidad de evaluar más tejidos para el diagnóstico de FR-PCV2.
- La combinación de técnicas moleculares incrementa el diagnóstico de FR-PCV2.

## 7. ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

cADN: ADN complementario.

cbp: Cuanto baste para.

d.d.g.: Dias de gestación.

DEPC: Dietilpirocarbonato.

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

EDTA: Ácido etilendiamino tetraacético (Ethylenediaminetetraacetic acid).

EMCV: Virus de la encefalomiocarditis.

EtOH: Alcohol etílico.

FR: Falla reproductiva.

FR-PCV2: Falla reproductiva asociada a PCV2.

HIS: Hibridación *in situ*.

HP: Histopatología.

IHQ: Inmunohistoquímica.

M: Mol o moles.

MgCl<sub>2</sub>: Cloruro de magnesio.

ml: Mililitros.

mM: Milimolar.

nm: Nanómetros.

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

pb: Pares de bases.

Pmol: picomol.

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

PCV: Circovirus porcino (Porcine circovirus).

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

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

PDNS: Síndrome de dermatitis y neuropatía porcina.

PK-15: Línea celular de riñón de cerdo.

PCV2-AD: Enfermedades asociadas a PCV2.

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

PPV: Virus del parvovirus porcino.

rpm: Revoluciones por minuto.

vPRRS: Virus del síndrome respiratorio y reproductivo del cerdo.

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

Taq: *Thermus aquaticus*.

tPA: Templado de Activador de Plasminógeno Tisular.

U: Unidades.

$\mu$ l: Microlitros.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Allan G. M., Ellis J.A. 2000, Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest.* 12:3–14.
- [Allan G.M](#), [McNeilly F](#), [McMenamy M](#), [McNair I](#), [Krakowka SG](#), [Timmusk S](#), [Walls D](#), [Donnelly M](#), [Minahin D](#), [Ellis J](#), [Wallgren P](#), [Fossum C](#). 2007, Temporal distribution of porcine circovirus 2 genogroups recovered from postweaning multisystemic wasting syndrome affected and nonaffected farms in Ireland and Northern Ireland. *J Vet Diagn Invest.* 19:668-73
- Boehringer Mannheim. 1996 general Introduction to In situ Hibridization. In: Nonradiative In situ Hibridization Aplicacion Manual. Second Edition. Boehringer Mannheim. Germany.
- Bogdan J, West K, Clark E, Konoby C, Haines D, Allan G, et al. 2001. Association of porcine circovirus 2 with reproductive failure in pigs: a retrospective study, 1995-1998. *Can. Vet. J.* 42:548-50.
- Brown C. 1998, In situ hybridization with riboprobes: an overview for veterinary pathologists. *Vet Pathol.* 35:159-67.
- Brunborg I. M, Jonassen C. M, Moldal T, Bratberg B, Lium B, Koenen F, Schönheit J. 2007, Association of myocarditis with high viral load of porcine circovirus type 2 in several tissues in cases of fetal death and high mortality in piglets. A case study. *J. Vet. Diagn. INvest.* 19: 368-375.
- Calsamiglia M., Segalés J., Quintana J., Rosell C., Domingo M.. 2002, Detection of Porcine Circovirus Types 1 and 2 in Serum and Tissue Samples of Pigs with and without Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1848-1850.
- Calsamiglia M, Fraile L, Espinal A, Cuxart A, Seminati C, Martín M, 2007, Sow porcine circovirus type 2 (PCV”) status effect on litter mortality in postweaning multisystemic wasting síndrome (PMWS). *Res. Vet. Sci.* 82:299-304.
- Chae, C. 2004. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of etiology, diagnosis and pathology. *Vet. J.* 169.
- Chae C. 2005. A review of porcine Circovirus 2-associated syndromes and diseases. *J. Vet.* 169:326-336.

- Choi, C. and Chae, C. 1999. In situ Hybridization for the Detection of Porcine Circovirus in Pigs with Postweaning Multisystemic wasting syndrome. *J. Com. Path.* 121:132-142.
- Choi, C. and Chae, C. 2000. Distribution of Porcine Parvovirus in Porcine Circovirus 2 infected Pigs with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome as show by In-situ Hybridization. *J. Com. Paht.* 123:187-198.
- 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.
- García-Camacho, LA., Enríquez-Ramírez K., Araiza-Nava D., Rangel-Rodríguez I.C., Quintero-Ramírez V., García-Reyna P.B. 2006. “Porcine circovirus 2-associated syndromes in mexican farms as detected by in situ hybridization. *L.A. Vet. Pathol.* 43(5):15.
- García-Reyna P.B, Rodríguez R.A, Vargas C. V, Mercado P.M., Batalla C.D, Quintero R.V, García C.L.A, 2004<sup>a</sup>, Reporte de un caso de circovirus porcino tipo 2 en cerdos recién nacidos procedentes del estado de México. *Memorias del XIX Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, Buenos Aires, Arg.* P.35-37.
- García-Reyna, P.B., Segalés, J., García, C.L., Quintero, R.V. 2004b “Reporte de un caso de síndrome de nefropatía y dermatitis porcina asociado al circovirus porcino tipo2 en una granja del estado de México” *Memorias XIX Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Buenos Aires, Arg.* P.58-62
- García-Reyna PB; Quintero-Ramírez V; Rangel-Rodríguez IC; Romero-Sánchez Y; García-Camacho LA. 2006. Circovirosis neonatal detectada por hibridación in situ y microscopía electrónica en méxico (Neonatal circovirosis detected by in situ Hybridization and electron microscopy in Mexico). *Memorias XX Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, 14° Congreso Chileno de Medicina Veterinaria. Santiago, Chile.* P. 67-74.
- Hassing A. G, Kristensen C S, Baekbo P. 2003, Effect of sow on the mortality of pigs after weaning. *Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Symposium on Emerging and Re-emerging pig diseases.* P.193.

- Harding JC. 1996, Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): preliminary epidemiology and clinical presentation. Proc. West Can Assoc. Swine Pract. 21: 249-254.
- Helie, P., Drolet, R., Germain, M., Bourgault, A. 1995. Systemic necrotising vasculitis and glomerulonephritis in grower pigs in southwestern Quebec. Canadian Vet. J. 36:174-182.
- Herrington C.S. and McGee J.O'D. 1992, Principles and basic methodology of DNA/RNA detection by in situ hybridization. In: Diagnostic Molecular Pathology. A Practical Approach Series. IRL Press/Oxford University Press. USA. 35: 69-102.
- Higgins, R. 1993. Glomerulo-nephropathy síndrome. Pig Vet. J. 31:125-132.
- Kim, J., Chae, C., 2001(a). Differentiation of porcine Circovirus 1 and 2 in formalin-fixed, paraffin-wax-embedded tissues from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome by in-situ hybridization. Vet Sci. 70: 265-269.
- Kim J., Chae C., 2001(b), Optimized protocols for the detection of porcine Circovirus 2 DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues using nested polymerase chain reaction and comparison of nested PCR with in situ hybridization. J. Virol. Methods 92: 105-111.
- Kim J., Chung H., Jung t., Cho W., Choi C., Chae C., 2002, Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms. J. Vet. Med. Sci. 64: 57-62.
- Kim J., Jung K., Chae C. 2004, Prevalence of porcine circovirus type 2 in aborted fetuses and stillborn piglets. Vet. Rec. 155:489-92.
- Ladekjaer-Mikkelsen A-S., Nielsen J, Storgard T, Botner A, Allan G, McNelly, F, 2001. Transplacental infections with PCV-2 associated with reproductive failure in a gilt. Vet Rec 148: 759-760.
- Lin CM, Jeng CR, Hsiao SH, Chang CC, Liu CH, Tsai YC, Chia MY, Pang VF. 2009, Development and evaluation of an indirect in situ polymerase chain reaction for the detection of porcine circovirus type 2 in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue specimens. [Vet Microbiol.](#) 138:225-234.
- Lyoo KS, Park YH, Park BK. 2001, Prevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus

from aborted fetuses and pigs with respiratory problems in Korea. *J. Vet. Sci.* 2:201-207.

- Maldonado J, Segalés J, Martínez-Piug D., Calsamiglia M, Riera P., Domingo 2003, Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Symposium on Emerging and Re-emerging pig diseases. P. 194.
- Maldonado J, Segalés J, Martínez Piug D, Calsamiglia M, Riera P, Domingo M, 2005, Identification of viral pathogens in aborted fetuses and stillborn piglets from cases of swine reproductive failures in Spain. *Vet. J.* 169:454-456.
- Mikami O, Nakajima H, Kawashima K, Yoshii M, Nakajima Y. 2005, Nonsuppurative myocarditis caused by porcine circovirus type 2 in a weak-born piglet. *J. Vet. Med. Sci.* 67:735-738.
- Milton J. S, Tsokos J.O. 1989, *Bioestadística para Biología y Ciencias de la Salud.* Interamericana-McGraw-Hill.
- Mullink, H., Walboomers, J.M.M., Tadema, T.M., Jansen, D.J., and Meijer, C.J.L.M. 1989. Combined immuno- and non-radioactive hybridocytochemistry on cells and tissue sections: influence of fixation, enzyme pre-treatment, and choice of chromogen on detection of antigen and DNA sequences. *J.Histochem. Cytochem.* 37: 603-609.
- Nielsen J, Ladekjaer-Hansen A-S, Bille-Hansen V, Lohse L, Bøtner A. 2004, PCV2-associated disease following intrauterine infection. Proceedings of the 18<sup>th</sup> IPVS Congress, Hamburg, Germany. I: 14.
- Park J-S, Ha Y, Kwon B, Cho K D, Lee B H, Chae C. 2009, Detection of porcine circovirus 2 in mammary and other tissues from experimentally infected sows. *J. Comp. Path.*140: 208-211.
- Pensaert M.B, Sánchez Jr, Ladekjær-Mikkelsen A-S, Allan G.M, Nauwynck H.J. 2004, Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. *Vet. Microbiol.* 98: 175-183.
- Pittman JS, 2008, Reproductive failure associated with porcine circovirus type 2 in gilts. *J Swine Health Prod.* 16: 144-148.
- Ritzmann M, Wilhelm S, Zimmermann P., Etschmann B, Bogner KH, Selbitz HJ, Heinritzi K, Truyen. 2005, Prevalence and association of porcine circovirus type 2 (PCV2), porcine parvovirus (PPV) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in aborted fetuses, mummified fetuses,



stillborn and nonviable neonatal piglets. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 112:348-351.

- Rose N, Blanchard P., Cariolet R, Grasland B, Amenna N, Oger A, Durand B, Balasch M, Jestin A, Madec F. 2007, Vaccination of porcine circovirus type 2 (PCV)-infected sows against porcine parvovirus (PPV) and erysipelas: effect on postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and on PCV2 genome load in the offspring. *J. Comp. Pathol.* 136:133-144.
- Rosell, C., Segalés, J., Plana-Durán, J., Balasch, M., Rodríguez-Arrijoja, G.M., Kennedy, S., Allan, G.M., McNeilly, F., Latimer, K.S. and Domingo, M. 1999. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *Journal of comparative pathology.* 120: 59-78.
- Saoulidis, K., Kyriakis, S.C., Kennedy, S., Lekkas, S., Miliotis, Ch. C., Allan, G.M., Balkamos, G.C., and Papoutsis. 2002. First report of Post-Weaning Multisystemic Wasting Síndrome and Porcine Dermatitis and Nephropathy Síndrome in Pigs in Greece. *J. Vet. Med.* 4: 202-205.
- Sanchez Jr. R.E, Nauwynck H.J, McNeilly F, Allan G.M, Pensaert M.J. 2001, porcine circovirus 2 infection in swine foetus inoculated at different stages of gestation. *Vet. Microbiol.* 83: 169-176.
- Sanchez Jr, R.O, Meerts P, Nauwynck H.J, Pensaert M.B. 2003, Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life. *Vet. Microbiol.* 95: 15-25.
- Segalés J., Piella, J., Domingo, M. 1998. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Spain. *Veterinary Record.* 142: 483-486.
- Segalés J, Rosell C, Rodríguez-Arrijoja G. And Domingo M. 2000a. Patología de la circovirosis porcina. *Porci* 56: 41-54.
- Segalés J, Pastor J, Cuenca R. And Domingo M. 2000b, Haematological parameters in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. *Vet. Rec.* 146: 675-676.
- Segalés J. and Domingo M. 2002. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Vet. Quartely* 24: 109-124.

- Segales J, Allan GM, Domingo M. 2006, porcine circovirus diseases. In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ, eds. Diseases of Swine. 9th ed. Ames, Iowa: Blacwell Publishing. 299-307.
- Saoulidis, K., Kyriakis, S.C., Kennedy, S., Lekkas, S., Miliotis, Ch. C., Allan, G.M., Balkamos, G.C., and Papoutsis. 2002. First report of Post-Weaning Multisystemic Wasting Síndrome and Porcine Dermatitis and Nephropathy Síndrome in Pigs in Greece. *J. Vet. Med.* 4: 202-205.
- Shibata I, Okuda Y, Kitajima K, Asai T. 2006, Shedding of porcine circovirus into colostrum of sows. *J. Vet. B. Infect. Dis. Vet Public Health.* 53: 278-80.
- Sierra, M., De las Mulas, J., Molenbeek, R., Quezada, M. 1997. Porcine immune complex glomerulonephritis dermatitis síndrome. *European Journal of veterinary pathology.* 3: 63-70.
- Solignac, T. 1997. Syndrome dermatite-néphropathie Quelques obstions cliniques chez le porcelet. *Seminaire Veterinaire* 841.
- Speel, E.J.M., Jansen, M.P.H.M., Ramaekers, F.C.S, Hopman, A.H.N. 1994, A novel triple-color detection procedure for brightfield microscopy, combining in situ hybridization with immunocytochemistry. *J. Histochem Cytochem.* 42: 1299-1307.
- Syrjänen S.M. 1992, Viral Gene Detection by in situ hybridization. In: Diagnostic Molecular Pathology. A practical approach. Vol. I. C.S. Edited by Herrington and J.O'D. McGee. The Practical Approach Series. IRL Press/Oxford University Press. USA. 45: 103-139.
- Tischer I, Rasch R, Tochtermann G. 1974, Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl Bakteriol Orig A.* 226:153–167.
- Trujano M., Iglesias G., Segalés J., Palacios J.M. 2001, PCV-2 from emaciated pigs in Mexico. *Vet. Rec.* 148: 792-806.
- Van Halderen, A., Baker, S., Wessels, J. 1995. Dermatitis/nephropathy syndrome pigs. *Veterinary Record* 132: 199.
- West KH, Bystrom JM, Wojnarowicz C, Shantz N, Jacobson M, Allan GM, Haines DM, Clark EG, Krakowka S, McNeilly F, Konoby C, Martin K, Ellis JA. 1999, Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J Vet Diagn Invest.* 11:530–532.