

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**DETECCIÓN DE CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2 EN CERDOS DEL  
ECUADOR MEDIANTE PCR**

Estefanía Bermeo

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de  
Médico Veterinario

Quito

Mayo de 2012

**Universidad San Francisco de Quito**  
**Colegio de Ciencias de la Salud**

**HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS**

**Detección de Circovirus Porcino Tipo 2 en cerdos del Ecuador mediante  
PCR**

**Estefanía Bermeo**

Gabriel Trueba, PhD  
Director de Tesis

.....

María Inés Baquero, MSc  
Miembro del Comité de Tesis

.....

Luis Vasco, MVZ  
Miembro del Comité de Tesis

.....

Luis Donoso, MVZ  
Decano de la Escuela de Medicina Veterinaria

.....

Quito, mayo 2012

© Derechos de autor  
Estefanía Bermeo  
2012

## **Dedicatoria**

Esta tesis la dedico a mis padres, Carmen y Juan Carlos, por darme su apoyo incondicional y la fortaleza para hacer mis sueños realidad.

## **Agradecimiento**

En primer lugar quisiera agradecer a mis padres por su apoyo incondicional durante toda mi carrera y, especialmente, en el desarrollo de este trabajo.

Quisiera agradecer al Dr. Gabriel Trueba por darme la oportunidad de ser parte de este proyecto y por su guía durante la realización del mismo.

Esta investigación no hubiera sido posible sin el apoyo financiero y logístico de la Asociación de Porcicultores del Ecuador (ASPE) y de manera especial a su Director Ejecutivo, el Ing. José Orellana. También, fue fundamental la colaboración de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD), particularmente, del Ing. Alfredo Acosta.

Al Dr. Alejandro Torres, gracias por ser un apoyo y guía a lo largo de este proyecto. Quisiera agradecer a mis compañeros en el Instituto de Microbiología de la USFQ; y finalmente, realizar un reconocimiento especial a Verónica Barragán, pues su colaboración fue indispensable para el desarrollo de esta tesis.

A todos ustedes, muchas gracias.

## **Abstract**

This report describes the first detection of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) from pigs affected with and without Porcine Circovirus Associated Diseases (PCVA) in Ecuador. A total of 162 samples were collected during November 2010 and March 2011: 25 from commercial swine herds with a range of clinical signs and the rest randomly at slaughter houses. Using two sets of polymerase chain reaction (PCR) primers, it was possible to detect PCV2 DNA in 62.35% (101/162) of pigs. Positive PCR reactions (24/25) from samples of pigs with clinical signs suggest that PCV2 is associated with the symptoms of PCVA. Additionally, the nucleotide sequence analysis confirms the PCV2 detection with at least a 95% homology compared with other PCV2 found in the GenBank database. Previous to this study vaccines were not commercially available in Ecuador. With these results, the Sanitary Institution in Ecuador has extended the importation permission.

## Resumen

Este trabajo describe por primera vez la presencia de Circovirus Porcino Tipo 2 (PCV2) en cerdos con sintomatología clínica compatible y en animales tomados al azar en el Ecuador. Se tomaron un total de 162 muestras entre noviembre de 2010 y marzo de 2011; 25 de granjas tecnificadas con distintos signos clínicos compatibles con Enfermedades Asociadas a Circovirus Porcino (PCVA) y las restantes, al azar, de distintos centros de faenamiento. Mediante dos sets de primers para la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se logró detectar ADN de PCV2 en 62.35% (101/162) de los animales. En el presente estudio se encontró que 24/25 de los animales con sintomatología sugestiva, fue positivo a la prueba de PCR. Adicionalmente, el análisis de las secuencias de ADN obtenidas confirma la presencia de PCV2 en los animales muestreados con un porcentaje de homología mínimo de 95% comparado con otras secuencias de PCV2 en la base de datos del GenBank. Previo a este estudio, las vacunas para Circovirus porcino tipo 2 no se expedían en nuestro país. Los resultados obtenidos permitieron se extendiera el permiso de importación por parte de la autoridad sanitaria.

## Tabla de contenido

|   |    |
|---|----|
| 1. Introducción .....   | 1  |
| 2. Revisión de Literatura .....   | 4  |
| 2.1 Características del virus .....   | 4  |
| 2.2 Distribución y transmisión del virus .....  | 5  |
| 2.3 Sintomatología .....  | 6  |
| 2.3.1 Síndrome de Desmedro Porcino (PMWS) .....   | 6  |
| 2.3.2 Enfermedades Asociadas al Circovirus Porcino tipo 2 (PCVAD).....  | 8  |
| 2.4 Diagnóstico .....   | 13 |
| 2.4.1 Detección de Circovirus porcino tipo 2 utilizando la metodología de<br>reacción de cadena de la polimerasa..... | 13 |
| 3. Materiales y Métodos .....   | 15 |
| 4. Resultados y Discusión .....   | 18 |
| 5. Conclusión .....   | 20 |
| 6. Recomendaciones .....  | 21 |
| 7. Figuras .....  | 22 |
| 8. Anexos .....   | 23 |
| 9. Literatura Citada.....   | 26 |

## Tablas

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1</b> Sintomatología compatible con Circovirus Porcino Tipo 2 .....  | 23 |
| <b>Tabla 2</b> Primers específicos para la amplificación de PCV-2 y tamaño de fragmento esperado. ....  | 23 |
| <b>Tabla 3</b> Resultados del análisis de PCR para Circovirus Porcino Tipo 2.....   | 24 |
| <b>Tabla 4</b> Resultados del análisis de las secuencias de ADN luego de ser analizadas con MEGA 5.0 y comparadas con la base de datos del GenBank mediante BLAST. .... | 25 |

## Figuras

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> Comparación entre las secuencias obtenidas a partir de una muestra de campo (1A), la amplificación de la vacuna <i>Suvaxyn PCV2 One Dose</i> (Fort Dodge) (vacuna) y la cepa vacunal (Gen Bank acc. number 40895)..... | 22 |
|--|----|

## 1. Introducción

El Circovirus porcino tipo 2 es un virus de ADN de cadena simple, circular y sin envoltura. Pertenece a la familia *Circoviridae* y al género *Circovirus* (Tischer *et al.*, 1982). El impacto del virus en el sector porcícola ha producido grandes pérdidas económicas, se ha establecido merma por sobre los \$20 (Fort Dodge animal Health) e incrementos en la mortalidad que alcanzan el 18%. (Connor, 2006). Ante esta situación, países de América como Brasil (Ciacci-Zanella y Morés, 2003), Chile (Noriega, 2008), México (Ramirez-Mendoza *et al.*, 2009) y Colombia (Rincón *et al.*, 2009) se han declarado positivos a PCV-2 e incluso han implementado la única medida de control disponible, la vacunación (Burch, 2008).

La circovirosis es un conjunto de síntomas de amplia distribución, fue reportado inicialmente en Bélgica desde 1969, en el Reino Unido (1970), Irlanda (1973), Canadá (1985) y España (1985) (Díaz *et al.*, 2008; Opriessnig *et al.*, 2007). Los efectos del circovirus tipo 2 en cerdos son múltiples. La primera patología descrita fue el Síndrome de Desmedro Porcino (PMWS), el cual afecta a animales entre 5 -12 semanas y se caracteriza por pérdida de peso progresiva, taquipnea, disnea y jadeo, aumento en el tamaño de linfonodos, palidez, diarrea y, ocasionalmente, ictericia (Ellis *et al.*, 2000; Shibata *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003). Con los años se le han sumado otras manifestaciones que, en conjunto, se denominan Enfermedades Asociadas al PCV-2 (PCVAD). En este último se incluyen procesos asociados al Complejo Respiratorio Porcino (Morin *et al.*, 1990), el Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina, fallos reproductivos (West *et al.*, 1999), enteritis granulomatosa (Jensen *et al.*, 2006), linfadenitis necrotizante y epidermitis exudativa (Gagnon *et al.*, 2007). Esta diversidad de

manifestaciones clínicas asociadas al Circovirus tipo 2 se observa en coinfecciones y asociaciones a otros patógenos, ya que la depleción linfoidea e inmunodeficiencia causada por el virus dejan a los animales más susceptibles a otras infecciones (Ellis *et al.*, 2000).

El PVC-2 es un virus ubicuo en los cerdos y jabalíes (Díaz *et al.*, 2008) y se desconoce si otras especies son susceptibles (Castillo *et al.*, 2007). La transmisión puede ser tanto horizontal como vertical. Horizontal por contacto directo vía oronasal, fecal, urinaria (Bolin *et al.*, 2001) y seminal (Larochelle *et al.*, 2000). La transmisión vertical se da vía intrauterina y resulta en fallos reproductivos (West *et al.*, 1999). Estudios retrospectivos han establecido la presencia de Circovirus tipo 2 en granjas con animales sintomáticos y asintomáticos, e incluso en aquellas granjas con sistemas de bioseguridad apropiados (Segalés, 2007).

Se reconocen a nivel mundial cuatro genotipos distintos del virus: PCV-2a, PCV-2b, PCV-2c y PCV-2d (Segalés, 2008; Guo *et al.*, 2010). Los dos primeros han sido encontrados en síndromes multisistémicos y de desmedro alrededor del mundo. PCV-2a fue el más común entre 1997 y a partir de 2004, PCV-2b ha sido responsable de epizootias en Europa y brotes en América del Norte. PCV-2c ha sido solo encontrado en muestras recolectadas en Dinamarca en los años 80 (Segales, 2008), mientras que PCV-2d ha sido aislado únicamente en China (Guo *et al.*, 2010).

El impacto económico en las granjas de los países en los que se ha detectado el virus y la falta de respuesta de tratamientos de soporte en animales infectados ha obligado al desarrollo de vacunas. En general, se ha observado grandes ventajas en las explotaciones porcinas que usan la vacuna debido a la

estimulación del sistema inmune adaptativo y al paso de anticuerpos maternos, logrando un aumento en la tasa de crecimiento y una evidente disminución de la tasa de mortalidad (Noriega *et al.*, 2007). Ante el favorable impacto de la vacunación contra PCV-2 la industria porcina ha colocado esta herramienta sanitaria en un estándar en la mayoría de mercados alrededor del mundo.

Previo a este estudio, las vacunas para Circovirus porcino tipo 2 no se expedían en nuestro país. Los porcicultores ecuatorianos describían problemas en sus animales compatibles con la enfermedad causada por PCV-2, sin embargo, la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD), entidad reguladora del Estado, no permitía la importación y distribución de las vacunas al no contar con pruebas sobre la circulación del virus en el país. Los resultados obtenidos permitieron reportar por primera vez la presencia de PCV-2 en el Ecuador lo que permitió la autorización por parte de AGROCALIDAD del ingreso de las vacunas.

Este estudio, fue realizado en colaboración con la Asociación Ecuatoriana de Porcicultores (ASPE) y AGROCALIDAD.

## 2. Revisión de Literatura

### 2.1 Características del virus

El Circovirus porcino tipo 2 es un virus ADN de cadena simple, circular y sin envoltura. Pertenece a la familia *Circoviridae* y al género *Circovirus* (Tischer *et al.*, 1982). Es relativamente pequeño, con un diámetro de 17nm y un rango de 1767 a 1768 nucleótidos (Guo *et al.*, 2010). Su genoma contiene dos grandes marcos de lectura abiertos (ORF, por sus siglas en inglés Open Reading Frame). ORF1 está asociada a la producción de dos proteínas (Rep y Rep') implicadas en la replicación viral. ORF2 codifica la proteína de cápside (Cap), la cual juega un papel importante en la respuesta inmunitaria del hospedador (Guo, *et al.*, 2010; Nawagitgul *et al.*, 2000). Karupannan y Kwan (2011) demostraron que un tercer marco de lectura abierto, ORF3, está involucrado en la proliferación del virus. La proteína codificada por este gen causa apoptosis en las células infectadas en lechones, induce depleción de los linfocitos (B y T-CD4) y destrucción de los órganos linfoides. Además, se piensa juega un rol en la diseminación sistémica del virus al inducir una liberación temprana del mismo por las células infectadas.

El circovirus porcino (PCV) fue reconocido inicialmente como un contaminante de la línea celular PK-15 en los riñones de los cerdos en 1974 (Tischer *et al.*, 1982). Bajo condiciones experimentales esta variante no produjo enfermedad en los animales. (Tischer *et al.*, 1986). Desde 1991 a 1997 en Saskatchewan-Canada se describió una nueva enfermedad caracterizada por retraso en el crecimiento, anemia y alta mortalidad en animales destetados. Ésta fue rápidamente conocida como Síndrome de Desmedro Multisistémico Porcino (PMWS) (Clark, 1997; Harding y Clark, 1997). La misma condición fue descrita en Canadá, Estados Unidos, México, Argentina, Brasil, Corea del Sur, Japón y

algunos países de Europa (Villadiego *et al.*, 2007). Se descubrió diferencias relevantes entre el virus de la línea celular PK-15 y la asociada a PMWS. El primero, no patogénico, recibió el nombre Circovirus porcino tipo 1; el segundo fue designado como Circovirus Porcino tipo 2 (Meehan, *et al.*, 1998). La Universidad Estatal de Iowa realizó una investigación durante 5 años en la que encontró que el Síndrome Respiratorio Asociado a PCV2 era la patología más común en la clínica universitaria. Las lesiones características fueron, una vez más, neumonía necrotizante, bronquilitis ulcerativa, bronquiolitis obliterans fibrosa, inflamación y fibroplasia de la lámina propia y del área peribronquial y, por último, inflamación granulomatosa de los alveolos (Halbur y Opriessnig).

Existen cuatro genotipos distintos del virus: PCV-2a, PCV-2b, PCV-2c y PCV-2d. Los dos primeros han sido encontrados en PMWS. Existe estudios que demuestran que PCV-2a fue más común entre 1997 y 2003 y que a partir de 2004 el PCV-2b ha sido responsable por epizootias en Europa y en América del Norte. Las secuencias pertenecientes a PCV-2c han sido solo encontradas en muestras recolectadas en Dinamarca en los años 80 (Segales, *et al.*, 2008). En una investigación realizada en China encontraron secuencias variantes en virus aislados entre 2004 y 2008. Clasificaron al genotipo como PCV-2d (Guo *et al.*, 2010).

## **2.2 Distribución y transmisión del virus**

El PCV-2 es un virus ubicuo en cerdos y jabalíes (Díaz *et al.*, 2008). Se han realizado pruebas en: perros, gatos, cabras, caballos, bovinos, conejos, ratas, ratones, pollos y humanos, y el resultado ha sido negativo (Castillo *et al.*, 2007). Estudios epidemiológicos han demostrados que el virus es endémico en

granjas con y sin enfermedad por circovirus, e incluso en aquellas con sistemas de bioseguridad apropiados (Segalés, 2007).

La transmisión de la enfermedad, se ha visto que ocurre tanto de manera horizontal como vertical. De forma horizontal, por contacto directo vía oronasal, fecal, urinaria (Bolin *et al.*, 2001) y seminal (Larochelle *et al.*, 2000). Un estudio realizado en 2010 por Chiou *et al.* examinó el patrón de eliminación viral y seroconversión en lechones nacidos por cesárea y privados de calostro. Un grupo fue inoculado vía intranasal con el virus y otro fue dejado como cohabitante. La eliminación del virus ocurrió entre las semanas 6-11 y 7-12, respectivamente, en los grupos bajo investigación. En los animales seleccionados de granjas se observó que la seroconversión empieza en la semana 11 y que la eliminación viral ocurre entre las semanas 9-15. Además se concluyó que la fuente de infección en estas granjas fueron los animales en crecimiento.

La enfermedad sistémica de la madre durante la preñez se traduce en la transmisión vertical del circovirus tipo 2 durante el tiempo de viremia (Madson *et al.*, 2009).

## **2.3 Sintomatología**

### **2.3.1 Síndrome de Desmedro Porcino (PMWS)**

El Síndrome de Desmedro Porcino se caracteriza por afectar a lechones entre 5-12 semanas de edad (Ellis *et al.*, 2000). Está caracterizado clínicamente por pérdida de peso progresiva, taquipnea, disnea, jadeo, anemia, retraso en el crecimiento, aumento en el tamaño de ganglios linfáticos (especialmente los inguinales), palidez del cuerpo, diarrea, ocasionalmente ictericia y alta mortalidad

(Allan *et al.*, 1998). Microscópicamente se observa: depresión linfoidea, infiltración granulomatosa, células gigantes multinucleadas y cuerpos de inclusión en tejido linfoide (Hamel *et al.*, 2000). Se puede observar, también, ausencia de colapso pulmonar con una disminución en la capacidad de expansión y áreas consolidadas situadas de manera anteroventral. Histológicamente, se observa neumonía linfocítica a intersticial granulomatosa, con presencia de células gigantes. Algunas veces, se presentan animales con necrosis y cambios en el epitelio que pueden progresar a bronquiolitis obliterans (Allan *et al.*, 2000).

En el 2007 se publicaron dos estudios que asocian un desorden neurovascular al Síndrome de Desmedro Porcino. Se tomaron animales con signos de desmedro y déficit neuronales. En ellos se observaron hemorragia aguda, edema de las meninges y del parénquima cerebral dado por una vasculitis necrotizante que resultó en necrosis de la materia gris y blanca (Mendes *et al.*, 2007; Seeliger *et al.*, 2007).

En un estado final se observa daño hepático con inflamación y vacuolación de los hepatocitos con cardiomegalia. Además, hay un reemplazo progresivo de las células hepáticas por histiocitos (Allan *et al.*, 2000). Se ha observado también, que animales clínicamente afectados con PMWS presentan hepatocitos apoptóticos. Sinha *et al.* (2010) estableció en un estudio con cerdos gnotobióticos que el virus está involucrado en la apoptosis hepática y que esto constituye una parte importante en la patogénesis de la enfermedad. Además, probó que no existen diferencias entre PCV2a y PCV2b en la inducción a apoptosis.

El sistema gastrointestinal también podría verse involucrado: palidez, edema, ulceraciones no hemorrágicas la pars esofágica del estómago, intestinos de paredes finas con líquido en el lumen (Allan *et al.*, 2000). Sin embargo, los

trastornos gastrointestinales, pueden ocurrir en animales libres de PMWS como se verá posteriormente.

Estudios recientes sugieren que la expresión clínica de la enfermedad podría estar relacionada a la genética de los animales. López-Soria et al. (2010) utilizó tres líneas genéticas distintas: A: 100% Pietrain, B: 50% Large White-50% Pietrain y C: 25% Large White-75% Duroc. Tras la inseminación de animales de la misma raza se evaluaron tres parámetros: mortalidad post-destete total, mortalidad post-destete asociada a circovirus tipo 2 y ganancia de peso. Los resultados mostraron que los animales del grupo C presentaban la mayor muerte post-destete total, muerte post-destete y menor ganancia de peso asociadas a circovirus. La línea A fue la de mejores resultados productivos. Un estudio anterior, comparó lesiones causadas por PMWS en Duroc, Landrace y Large White, y concluyó que podría existir una predisposición de la raza Landrace a desarrollar la enfermedad y lesiones (Opriessnig *et al.*, 2006).

### **2.3.2 Enfermedades Asociadas al Circovirus Porcino tipo 2 (PCVAD)**

#### **A Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina (PDNS)**

Fue descrito por primera vez en el Reino Unido en 1993 bajo distintos nombres y caracterizada principalmente por una vasculitis sistémica con un tropismo por las células de la piel y el riñón. Existe evidencia de que éste es una inmunopatología (Smith et al., 1993; White y Higgins, 1993).

Los animales afectados son afebriles o ligeramente febriles, deprimidos y presentan una edema subcutáneo ventrocaudal. El signo clínico más obvio durante la fase aguda son las lesiones cutáneas multifocales rojas o púrpura

(Drolet *et al.*, 1999). Estas máculas y pápulas crecen y llegan a formar grandes placas que, en animales que logran recuperarse, se convierten en costras negras que desaparecen gradualmente (Rosell *et al.*, 2000). Las lesiones aparecen gradualmente desde los cuartos traseros, el perineo, abdomen, tórax y orejas. En casos muy severos se observan en todo el cuerpo (Drolet *et al.*, 1999; Rosell *et al.*, 2000).

Las lesiones microscópicas en la piel consisten en una vasculitis necrotizante en los vasos de mediano y pequeño calibre. Éstas pueden estar asociadas a hemorrágicas dérmicas y necrosis epidérmica (Rosell *et al.*, 2000).

Los riñones se presentan agrandados, pálidos y con petequias hemorrágicas en la corteza. Microscópicamente vasculitis sistémica, glomerulonefritis fibrinosa, exudativa y, ocasionalmente, necrotizante (Rosell *et al.*, 2000). Se ha demostrado también la presencia de cuerpos de inclusión en el citoplasma de las células del epitelio tubular renal (Huang *et al.*, 2008). En animales crónicamente infectados es común encontrar inflamación y fibrosis intersticial, y atrofia tubular.

El pronóstico depende del grado de daño, especialmente en el riñón. En los casos severos los cerdos son urémicos, presentan presión alta y niveles de creatinina elevados (Rosell *et al.*, 2000).

La patogénesis de la enfermedad todavía es incierta, pero las lesiones microscópicas y la presencia de depósitos de inmunoglobulina y factores de complemento sugieren que puede tratarse de una reacción de hipersensibilidad tipo III (Hélie *et al.*, 1995; Sierra *et al.*, 1997). Un estudio publicado en 2004 propone que un exceso de anticuerpos contra PCV2 podría desarrollar el Síndrome de Dermatitis y Nefropatía porcina. El grupo bajo investigación

presentó una gran acumulación de IgG1+ IgG2 e IgM, los factores de complejo C1q y C3, y las células CD8+ en los riñones, comparado con el grupo control (Wellenberg *et al.*, 2004).

## **B Problemas respiratorios asociados a Circovirus tipo 2**

La Enfermedad Respiratoria asociada al PCV2 es parte del Complejo Respiratorio Porcino (PRCD), un complejo multi-etiológico que asocia al virus y otros patógenos (Morin *et al.*, 1990). Afecta a animales entre las 8 y 26 semanas, y se caracteriza por falta de crecimiento, anorexia, fiebre, tos, disnea y neumonía (Opriessnig, *et al.*, 2007). Corresponde a los animales en etapa de destete y en la fase de terminación. Desde las primeras investigaciones se han encontrado lesiones histológicas que muestran bronquiolitis proliferativa y necrotizante (Clark, 1997). En un caso observado en Hungría se encontró abundante tejido hialino en los alveolos y fibrina en los bronquiolos. A esto se le sumo lesiones vasculares como degeneración endotelial, edema perivascular e intramural, necrosis fibrinoide, vasculitis, perivasculitis y trombos. Un descubrimiento importante en esta investigación es que el Circovirus porcino tipo 2 parecía actuar solo, pues no se encontraron antígenos de Influenza porcina (SIV), Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS) y los cultivos bacterianos fueron negativos (Szeridi y Szentirmai, 2008). Por medio de inmunohistoquímica se han observado cuerpos de inclusión citoplasmáticos en los epitelios bronquial y glandular bronquial (Huang, *et al.*, 2008).

Aquellos patógenos más comúnmente asociados al PCV2 son PRRS, SIV, *Mycoplasma hyopneumonie*, virus de Aujeszky (ADV), *Pasteurella multocida*,

*Pneumocitis carinii*, y una variedad de bacterias oportunistas (Allan *et al.*, 2000; Grau-Roma y Segalés, 2007).

Una investigación retrospectiva realizada en Corea del Sur estudió la asociación del PCV2 con otros patógenos en casos de Complejo Respiratorio Porcino. De estos animales, 85 fueron positivos para Circovirus tipo 2, 66 para PRRS, 60 para Parvovirus Porcino (PPV) y 14 para SIV. Encontraron 80 coinfecciones y 25 infecciones por un solo patógeno; la coinfección más común fue con PCV2: 38 casos con *Pasteurella multocida*, 33 con *M. hyopneumoniae* (Kim *et al.*, 2003).

En Irlanda un trabajo en lechones privados de calostro probó que la combinación de PCV2 con PRRSV potencia la replicación y distribución de circovirus, al compararla con animales infectados únicamente con PCV2. La distribución y replicación de PRRS en los animales coinfectados no se vio incrementada. Se piensa que puede darse porque ambos virus utilizan a los monocitos/macrófagos como células blanco (Allan *et al.*, 2000).

Un estudio realizado en 2010 encontró que la expresión de algunas citocinas pro-inflamatorias podrían jugar un papel importante en la respuesta inmunopatológica en el Síndrome Respiratorio asociado a PCV2. La expresión de mRNA de IL-1 $\alpha$  e IL-8 estaban aumentadas; no se encontró expresión de IL-10 (Chae y Choi, 2011).

### **C Enteritis asociada a Circovirus tipo 2**

Los casos de enteritis asociados al virus se han observado en lechones entre 8-16 semanas (Jensen *et al.*, 2006). Clínicamente los animales presentan diarrea. Macroscópicamente se observa un engrosamiento de la mucosa junto a

un incremento en los nódulos linfáticos asociados. Microscópicamente, inflamación granulomatosa que afecta a las placas de Peyer, infiltrados de macrófagos y células multinucleadas. También se observaron cuerpos de inclusión en los histiocitos y las células multinucleadas. El tejido linfoide permanece libre de estas lesiones (Halbur y Opriessnig; Kim *et al.*, 2004).

#### **D Fallas reproductivas asociadas al Circovirus tipo 2**

A la transmisión vertical del virus se le asocian fallos reproductivos. Se manifiesta en forma de abortos, mortinatos y momificaciones fetales (West *et al.*, 1999). Los fallos reproductivos se han asociado al momento de la infección durante la preñez. Se manifiesta, entonces, como muerte embrionaria temprana, aborto y tamaño de camada reducido. La enfermedad sistémica de la madre durante la preñez se traduce en la transmisión vertical del circovirus tipo 2 durante el tiempo de viremia (Madson *et al.*, 2009). Se ha demostrado que el virus posee tropismo por el miocardio, lo que resulta en miocarditis necrosante o fibrosa e inflamación (Madson *et al.*, 2009; Mikami *et al.*, 2005; West *et al.*, 1999). Sin embargo, si la infección ocurre tarde en la gestación el virus afecta principalmente a células presentadoras de antígeno y tejido linfoide. Aquellos lechones que nacen vivos son virémicos (Madson *et al.*, 2009).

#### **E Tremor congénito asociado a PCV2**

En el año 2001, Stevenson *et al.* publicó un estudio en que se relacionaba al PCV2 y un déficit anormal de mielina con Tremores Congénitos tipo A2. Se tomaron cerdos de dos días que presentaban tremores en 4 diferentes granjas en los Estados Unidos. Por medio de hibridación in situ, reacción en cadena de

polimerasa (PCR) inmunofluorescencia indirecta se probó la presencia del virus. Las lesiones asociadas más comunes fueron en el sistema nervioso central. Sin embargo, dos estudios posteriores no han podido replicar los resultados. En estos casos los lechones eran de España, Reino Unido, Irlanda, Suiza y Corea del Sur (Ha *et al.*, 2005; Kennedy *et al.*, 2003).

## **2.4 Diagnóstico**

Villadiego, *et al.*, indica que el diagnóstico indirecto de Circovirus puede realizarse por medio de la detección de anticuerpos séricos, utilizando técnicas como ELISA, inmunofluorescencia directa e inmunoperoxidasa. Por otro lado, para la detección directa del virus se utilizan técnicas como hibridación *in situ* e inmunohistoquímica, las cuales relacionan las lesiones con la presencia del virus (McNeilly *et al.*, 2002). Técnicas moleculares como el PCR son también aplicadas para la detección del virus tanto en el tejido afectado, como en muestras de suero, heces y semen (Calsamiglia *et al.*, 2002; Mc.Neilly *et al.*, 2002; Sorden, 2000).

### ***2.4.1 Detección de Circovirus porcino tipo 2 utilizando la metodología de reacción de cadena de la polimerasa***

La reacción en cadena de polimerasa (PCR) es una técnica desarrollada en 1980 por Kary Mullis que permite la síntesis de copias de un fragmento de ADN a partir de una secuencia inicial (PCR: Introduction; Sambrook y Russell, 2001). Se basa en la capacidad de la ADN polimerasa para adherir nucleótidos en presencia de un primer específico, el cual provee el primer nucleótido de un

fragmento específico. Al final, se obtienen billones de copias conocidas como amplicones (PCR: Introduction).

Los componentes esenciales de la reacción son:

- ADN molde- que contiene la región específica que se quiere amplificar.
- ADN polimerasa termoestable- enzima que permite sintetizar nuevas cadenas complementarias. La más común es la *Taq* polimerasa.
- Primers: secuencias cortas de oligonucleótidos complementarios al fragmento blanco. Es el factor más influyente en la eficacia y especificidad de la amplificación. Son dos, cada uno complementario a una de las dos hebras de ADN.
- Nucleótidos (dNTPs)- Bases A, T, G Y C libres que sirven como sustrato (PCR: Introduction; Sambrook y Russell, 2001)
- Cationes divalentes- necesarios para el correcto funcionamiento de la polimerasa. Generalmente se trata de Mg<sup>2+</sup>.
- Buffer- ayuda a mantener el pH entre 8.3 y 8.5 a temperatura ambiente. Hecho de Tris-Cl.
- Cationes monovalentes- usualmente están incluidos en el Buffer (KCl) (Sambrook y Russel, 2001).

El proceso de amplificación consiste de tres pasos esenciales: desnaturalización del ADN por calor, alineamiento al cebador al ADN blanco de cadena simple y extensión de la cadena por la ADN polimerasa. El producto final se puede conservar a largo plazo manteniéndolo a una temperatura de 4° a -15°C (Sambrook y Russel, 2001).

Calsamiglia *et al.*, realizó un estudio en el que comparó la sensibilidad entre PCR e hibridación in situ y demostró que el PCR de ganglios inguinales es el

más sensible para la detección de PCV2. Además, concuerda casi a la perfección con las muestras obtenidas de suero.

### **3. Materiales y Métodos**

**Población y muestra.** Este estudio fue realizado entre noviembre de 2010 a marzo de 2011. Se priorizó el muestreo en las provincias con mayor población porcina y aquellos lugares considerados de alto riesgo por el transporte y comercio de animales. Se incluyeron animales provenientes de: Pichincha, Santo Domingo, Los Ríos, Cotopaxi, Guayas, El Oro y Orellana. Se recolectaron en total 162 muestras: 25 de granjas tecnificadas y las restantes de distintos centros de faenamiento.

En establecimientos tecnificados se muestreó a animales entre 5 y 26 semanas de edad con sintomatología compatible a PMWS y otras Enfermedades Asociadas al circovirus porcino tipo 2 (Anexo 1). Se muestrearon animales que presentaran alguna de las siguientes características clínicas: dermatitis, adelgazamiento, crecimiento retardado, aumento de la mortalidad, alteraciones respiratorias (disnea y jadeo), y aumento en el tamaño de linfonodos. Macroscópicamente se priorizaron animales que presentaran: linfadenopatía regional o generalizada, nefropatía y dermatitis.

Por otro lado, se tomaron muestras de nódulos linfáticos inguinales y de riñón de animales en establecimientos de faenamiento de los cuales no se obtuvo registro de su status sanitario.

Las muestras fueron colocadas en recipientes estériles con etanol absoluto y transportadas a 4°C hasta el laboratorio de microbiología de la Universidad San Francisco de Quito, donde fueron conservadas a -20°C hasta ser procesadas.

### **Detección de Circovirus tipo 2 utilizando la técnica de PCR**

**Extracción de ADN.** Las muestras fueron extraídas utilizando CTAB como detergente para separar el ADN de los componentes celulares (Doyle y Doyle, 1987). Brevemente, cada muestra fue macerada con 1000 µL de PBS 1X (137mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7) seguido de 5 minutos de centrifugación a 3000 rpm. Se colocó 700 µL de CTAB (CTAB 2% p/v, ClNa 1.4M, EDTA 20 mM, HCl 100 Mm, pH 8) para luego incubar a 65°C durante dos horas. Una vez concluido, se añadió 700 µL de una relación 24:1 de cloroformo-alcohol isoamílico y se centrifugó a 15 115 xg. Al sobrenadante se adicionó 1000 µL de etanol absoluto y 50 µL de acetato de sodio (3M, pH 5) e incubó a -20°C durante 24 horas. Finalmente, el precipitado de ADN fue lavado con etanol 70%. Las muestras fueron resuspendidas en buffer TE (10mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, pH 8) y conservada a -20°C.

**PCR.** Se utilizaron dos sets de primers específicos para PCV-2 (Anexo 2): 1443- 150 (Meehan *et al.*, 1998) y Fa2-Ra2 (Castro, 2005; Villadiego *et al.*, 2007). La reacción de PCR fue estandarizada utilizando reactivos Promega (Estados Unidos, Madison) en un termociclador marca Biometra. Para el primer set de primers se utilizó: 200 µM dNTP's, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 pmoles de cada primer, 1X Taq Buffer, 1.25 U Taq Polimerasa y 100 ng DNA. Las condiciones del

PCR consistieron en una denaturación inicial por 1 minuto a 94°C, seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, alineamiento por 1 minuto a 55°C, extensión de 1 minuto a 72°C y una extensión final de 10 minutos a 72°C (Meehan *et al.*, 1998). Las concentraciones de reactivos para la PCR con el segundo set de primers fueron: 1X PCR Buffer, 200  $\mu$ M dNTPs , 1.5mM MgCl<sub>2</sub> , 1  $\mu$ M de cada uno de los primers, 0.75 U Taq polimerasa y 100 a 125ng de ADN. Las condiciones del PCR para este set de primers consistieron en una denaturación inicial de 5 minutos a 94°C, seguida de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 63°C por 45 segundos y 72°C por 1 minuto. Se concluyó con una extensión final de 72°C por 10 minutos (Castro, 2005; Villadiego *et al.*, 2007).

Como control positivo para PCV-2, se utilizó la vacuna inactivada de virus quimérico y Suvaxyn PCV2 One Dose de Fort Dodge. Para evaluar la reacción, los productos se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se los visualizó con tinción de bromuro de etidio (2 $\mu$ L/100mL) bajo luz ultravioleta. Las muestras se corrieron a 80V en un buffer TBE 1X. El gel se fotografió con una cámara Kodak® ensamblada en la oscuridad y las imágenes fueron procesadas mediante el programa Kodak 1D.

A fin de descartar falsos negativos, todas las muestras se sometieron primero a una amplificación para el gen  $\beta$ -actina (du Breuil *et al.*, 1993). En el caso de no obtener amplificación, se realizó una nueva extracción con el kit para ADN genómico High Pure PCR Template Preparation Kit bajo las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics, Alemania) y se procedió a repetir los PCRs.

**Secuenciamiento.** Nueve amplicones fueron enviados a Functional Biosciences Inc. (Madison, Wisconsin EEUU) para su secuenciamiento. Los

resultados fueron analizados con los programas MEGA 5.0 ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)) y BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

#### **4. Resultados y Discusión**

Este estudio es el primer reporte confirmado de la presencia de Circovirus Porcino tipo 2 (PCV-2) en el Ecuador. Se determinó que el 62.35% de un total de 162 muestras fue positivo para PCV-2 (Anexo 3). De estas muestras positivas, el 23.8% fue obtenido a partir de animales con sintomatología compatible con la enfermedad. En el presente estudio se encontró que el 98% de los animales con sintomatología sugestiva, fue positivo a la prueba de PCR. Adicionalmente, el análisis de las secuencias de ADN obtenidas confirma la presencia de PCV2 en los animales muestreados y descarta la posibilidad de la circulación de contaminación por la cepa vacunal (Fig.1).

Los resultados encontrados son similares a reportes de otros países. En el 2003, se encontró un 70% de positividad a PCV-2 en animales afectados con PMWS en granjas de Brasil (Ciacci-Zanella y Morés, 2003). Por otro lado, Colombia reportó la presencia del virus en el 100% de animales enfermos dentro de una sola granja durante los años 2006 y 2007, y el 63.4% de positividad en muestras tomadas a partir de animales en ocho granjas durante el año 2009 (Rincón *et al.*, 2009). Los reportes en países fuera de nuestra región son similares: en un centro de faenamiento de Nueva Zelanda se encontró el 93 al 100% de positividad (Tham y Hansen, 2003); en Brittany (Francia) se encontró PCV2 en 100% de los animales con sintomatología positiva y 76% en animales seleccionados al azar (de Boissésón *et al.*, 2004); en España, del 66% al 52% de

muestras de sueros obtenidos a partir de animales con y sin sintomatología para la enfermedad fue positivo para PCV2 (Calsamiglia *et al*, 2002). Por último, datos publicados el 2011 en Estados Unidos evidenciaron que el 82%, de 4147 animales muestreados (previo a la vacunación), fue positivo para PCV2 (Puvanendiran *et al.*, 2011).

En el 19.31% (31 muestras) de las muestras se detectó que uno de los dos sets de primers mostró un falso negativo. De estas, se observó que el set de primers Fa2/Ra2 tiene una mayor sensibilidad, amplificando en 19 de las 31 muestras versus 12 amplificadas sólo por 150/1443.

La circulación de PCV2 ha producido grandes pérdidas económicas en el sector porcicultor a nivel mundial y, a partir de este estudio, Ecuador es incluido dentro de las estadísticas. El presente estudio reporta por primera vez la presencia de PCV2 en nuestro país y surge a partir de la preocupación del sector porcícola Ecuatoriano frente a la observación de sintomatología sugestiva de la enfermedad en sus granjas. Es importante recalcar que el hallazgo del virus en individuos con y sin sintomatología sugiere la circulación del virus en animales con enfermedad subclínica. Se espera que los resultados obtenidos deriven en nuevas investigaciones que permitan conocer la prevalencia de la enfermedad e incentiven la planificación de programas de vigilancia epidemiológica, para de esta manera, manejar adecuadamente la tomar las decisiones pertinentes a brotes de la enfermedad y promover programas que controlen su dispersión. En este caso particular, los resultados de este trabajo impulsaron a que la Agencia Ecuatoriana de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD) permita la importación de la vacuna a nuestro país. Con esto se espera reducir, en gran proporción, las pérdidas económicas asociadas a la circulación de esta enfermedad.

Es importante mencionar que la metodología utilizada para este hallazgo es altamente sensible (Calsamiglia *et al.*, 2002; McNeilly *et al.*, 2002; Villadiego *et al.*, 2007) y permitió identificar de manera precisa el tipo de virus circulante. Adicionalmente, los protocolos utilizados pueden ser aplicados a futuro para diagnóstico y monitoreo de la enfermedad en el Ecuador.

## **5. Conclusión**

La circovirus es una enfermedad que ha sido diagnosticada desde hace más de treinta años alrededor del mundo. Sus manifestaciones son variadas y el impacto económico que causan las mismas, impulsó al diagnóstico del virus en nuestro país mediante la técnica de PCR.

Esta herramienta permitió demostrar la presencia del agente en más del 50% del total de las muestras recolectadas en las siete provincias. Estos resultados son similares a los publicados en otros países.

El impacto de este resultado a nivel nacional, resultó en el permiso de importación e implementación de la vacuna por parte de la entidad sanitaria del Estado.

## 6. Recomendaciones

- Realizar un estudio epidemiológico amplio en el que se investigue valores de incidencia y prevalencia de la enfermedad.
- Utilizar de forma ideal los dos sets de primers para la detección del ADN viral. De no ser posible, optar por los primers Fa2/Ra2.
- Reconocer el impacto subclínico de PCV2 y desarrollar un estudio que determine su importancia económica en granja.
- Analizar la eficacia de las medidas de control implementadas a partir de este estudio.

## 7. FIGURAS

**Figura 1** Comparación entre las secuencias obtenidas a partir de una muestra de campo (1A), la amplificación de la vacuna *Suvaxyn PCV2 One Dose* (Fort Dodge) (vacuna) y la cepa vacunal (Gen Bank acc. number 40895).

En amarillo se muestran los SNPs.

|             |   |
|-------------|---|
| 1A          | A T A T T A A T G A C T T T C T T C C C C A G G A G G G G G C T C A A A C C C C C G C T C T G T G C C C T T T G A A T A C T A C A G A A T A A G A A A G G   |
| vacuna      | . . . . . G C . . . . . G . . . . . G A C . . . . . A A A A T . . . . . A A . . . . .   |
| 40895       | . . . . . G C . . . . . G . . . . . G A C . . . . . A A A A T . . . . . A A . . . . .   |
| 1A          | T T A A G G T T G A A T T C T G G C C C T G C T C C C C G A T C A C C C A G G G T G A C A G G G G A G T G G G C T C C A G T G C T G T T A T T C T A G A T G |
| vacuna 1443 | . . . . . C . . . . . C . . . . . T . . . . . C . . . . .   |
| 40895       | . . . . . C . . . . . C . . . . . T . . . . . C . . . . .   |
| 1A          | A T A A C T T T G T A A C A A A G G C C A C A G C C C T C A C C T A T G A C C C C T A T G T A A A C T A C T C C T C C C G C C A T A C C A T A A C C C A G C |
| vacuna 1443 | . . . . . A . . . . . A . . . . . A . . . . . A . . . . . A . . . . . C C C . . . . . A .   |
| 40895       | . . . . . A . . . . . A . . . . . A . . . . . A . . . . . A . . . . . C C C . . . . . A .   |
| 1A          | C C T T C T C C T A C C A C T C C C G C T A C T T T A C C C C A A A C C T G T C C T A G A T T C C A C T A T T G A T T A C T T C C A A C C A A A C A A C A   |
| vacuna 1443 | . . . . . T . . . . . C . . . . . T . . . . . T . . . . . C . . . . . C . . . . . C . . . . . T . . . . .   |
| 40895       | . . . . . T . . . . . C . . . . . T . . . . . T . . . . . C . . . . . C . . . . . C . . . . . T . . . . .   |
| 1A          | A A A G A A A T C A G C T G T G G C T G A G A C T A C A A A C T G C T G G A A A T G T A G A C C   |
| vacuna 1443 | . . . . . G . . . . . T . . . . . A . . . . . G . . . . . C T . . . . . A . . . . . G . . . . .   |
| 40895       | . . . . . G . . . . . T . . . . . A . . . . . G . . . . . C T . . . . . A . . . . . G . . . . .   |

## 8. ANEXOS

### ANEXO 1.

**Tabla 1** Sintomatología compatible con Circovirus Porcino Tipo 2

| <b>SÍNTOMATOLOGÍA COMPATIBLE CON PMWS</b> | <b>SINTOMATOLOGÍA COMPATIBLE A OTRAS ENFERMEDADES ASOCIADAS A PCV-2</b> |
|---|---|
| Adelgazamiento                            | Dermatitis  |
| Crecimiento retardado                     | Disnea y jadeo  |
| Aumento en la mortalidad                  |   |
| Aumento en el tamaño de linfonodos        |   |

### ANEXO 2.

**Tabla 2** Primers específicos para la amplificación de PCV-2 y tamaño de fragmento esperado.

| <b>PRIMERS</b>  | <b>SECUENCIA</b>   | <b>TAMAÑO DEL FRAGMENTO AMPLIFICADO</b> |
|---|--|---|
| 1443 (Meehan et al, 1998)<br>150 (Meehan et al, 1998) | 5'-CGGATATTGTAGTCCTGGTTCG-3'<br>5'-ACTGTCAAGGCTACCACAGTCA-3' | 481 bp                                  |
| Fa2 (Castro, 2005)<br>Ra2 (Castro, 2005)              | 5'-ATTACCAGCAATGAGACCCCGT-3'<br>5'-CAACCCTTCTCCTACCAGTCC-3'  | 476bp                                   |

**ANEXO 3.****Tabla 3** Resultados del análisis de PCR para Circovirus Porcino Tipo 2

|   | <b>PCV2<br/>POSITIVO</b> | <b>PCV2<br/>NEGATIVO</b> | <b>No<br/>DIAGNÓSTICO</b> |
|---|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| <b>ANIMALES CON<br/>SINTOMATOLOGÍA<br/>COMPATIBLE</b> | 24                       | 1                        | 0                         |
| <b>MUESTRAS<br/>TOMADAS AL<br/>ASAR</b>               | 77                       | 57                       | 3                         |
| <b>TOTAL</b>  | 101                      | 58                       | 3                         |

#### ANEXO 4.

**Tabla 4** Resultados del análisis de las secuencias de ADN luego de ser analizadas con MEGA 5.0 y comparadas con la base de datos del GenBank mediante BLAST.

| <b>Código de Muestra</b> | <b>Primers</b>                         | <b>BLAST</b> | <b>Resultado</b> |
|--------------------------|--|--------------|------------------|
| 7                        | 150/1443 (Meehan <i>et al.</i> , 1998) | 100% PCV2    | Positivo         |
|                          | Fa2/Ra2 (Castro, 2005)                 | 100% PCV2    | Positivo         |
| 20                       | 150/1443 (Meehan <i>et al.</i> , 1998) | 98% PCV2     | Positivo         |
|                          | Fa2/Ra2 (Castro, 2005)                 | 99% PCV2     | Positivo         |
| P3                       | 150/1443 (Meehan <i>et al.</i> , 1998) | 95% PCV2     | Positivo         |
|                          | Fa2/Ra2 (Castro, 2005)                 | 99% PCV2     | Positivo         |
| P8                       | 150/1443 (Meehan <i>et al.</i> , 1998) | 99% PCV2     | Positivo         |
|                          | Fa2/Ra2 (Castro, 2005)                 | 99% PCV2     | Positivo         |

## 9. Literatura Citada

1. Allan GM. Ellis JA. Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest.* 2000;12:3-14
2. Allan GM. McNeilly F. Kennedy S. Daft B. Clarke EG. Ellis JA. Haines DM. Meehan BM. Adair BM. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with wasting disease in the USA and Europe. *J Vet Diagn Invest.* 1998;10:3-10
3. Bolin SR. Stoffregen WC. Nayar GP. Hamel AL. 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
4. Burch D. Porcine circovirus vaccines-where are we?. *Pig Progress.* 2008;6:7-9
5. Calsamiglia M. Segales J. Quintana J. Rosell C. Domingo M. Detection of Porcine Circovirus Type 1 and 2 IN Serum and Tissue Samples of Pigs with and without Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome. *Journal of Clinical Microbiology.* 2002; 40:1848-1850
6. Castillo JM. Chacón JA. Cortes LE. González MY. Diagnóstico de circovirus porcina por histopatología e historia clínica en piaras del área metropolitana de Bucaramanga. *Rev Col Cienc Pec.* 2007;20:657
7. Castro A. Caracterização genética de amostras brasileiras de Circovirus suino tipo 2 (PCV-2). Trabajo de doctorado (Phd.). Universidad de São Paulo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva y Salud Animal. 2005

8. Chae JS. Choi KS. Proinflammatory cytokine expression in the lung of pigs with porcine circovirus type 2-associated respiratory disease. *Res Vet Sci.* 2011;90:321-323
9. Chiou MT. Yang CY. Chang TC. Chen C. Lin CF. Ye LJ. Shedding Pattern and Serological Profile of Porcine Type 2 Infection in Cesarean-Derived, Colostrum-Deprived and Farm-Raised Pigs. *J Vet Med Sci.*2010
10. Cicci-Zanella JR. Morés N. Diagnosis of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Brasil caused by porcine circovirus type 2. *Arq.Bras.Med.Vet.Zootec.* 2003;55:522-527
11. Clarck E. Post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Proceedings of the American Association of Swine Practitioners.*1997;28:499-501
12. Connor JF. Economic losses associated with postweaning multi-systemic wasting syndrome. *American Association of Swine Veterinarians Annual Meeting.* 2006;12:55-60
13. De Boissésou C. Béven V. Bigarré L. Thiéry R. Rose N. Eveno E. Madec F. Jestin A. Molecular characterization of *Porcine circovirus* type 2 isolates from post-weaning multisystemic wasting syndrome-affected and non affected pigs. *J Gen Virol.* 2004;85:293-304
14. Díaz CA. Jaime J. Vera V. Rodríguez N. Casas GA. Mogollón JD. Síndrome de emaciación posdestete porcino: Aspectos epidemiológicos. *Rev Med. Vet Zoot.* 2008;55:100-114
15. Doyle JJ. Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin.* 1987;19:11-15
16. Drolet R. Thibault S. D'Allaire S. Thomson JR. Done SH. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS): An overview of the disease. *Swine Health Prod.* 1997;7:283-285

17. du Breuil RM. Patel JM. Mendelow BV. Quantitation of beta-actin-specific mRNA transcripts using xeno-competitive PCR. *PCR Methods Appl.* 1993;3:57-59
18. Ellis JA. Bratanich EG. Clarck G. Allan B. Meehan DM. Haines J. Harding J. West KH. Krakowka S. Konoby C. Hassard L. Martin K. McNeilly F. Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquires postweaning multisystemic syndrome. *J Vet Diagn Invest.* 2000;12:21-27
19. Fort Dodge Animal Health. Cost of the Disease. [www.stopcircovirus.com](http://www.stopcircovirus.com)
20. Gagnon CA. Tremblay D. Tijssen P. Venne MH. Houde A. Elahi SM. The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. *Can Vet J.* 2007;48:811-819
21. Grau-Roma L. Segalés J. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, swine influenza virus and Aujeszky's disease virus in cases of proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) in Spain. *Vet Microbiol.* 2007;119:144-151
22. Guo LJ. Lu YH. Wei YW. Huang LP. Liu CM. Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China. *Virology Journal.* 2010;7:273
23. Ha Y. Jung K. Chae C. Lack of evidence of porcine type 1 and type 2 infection in piglets with congenital tremors in Korea. *Vet Rec.* 2005;156:383-384
24. Halbur P. Opriessnig T. Update on Porcine Circovirus Type 2 (PCV2)-Associated Diseases. [www.gene-alliance.ca](http://www.gene-alliance.ca). 12-23
25. Hamel AL. Lin LL. Sachvie C. Grudeski E. Nayar GPS. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *Can J Vet Res.* 2000;64:44-52

26. Harding JG. Clarck EG. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome. *Swine Health and Production*. 1997;5:201-203
27. Hélie P. Drolet R. Germain MC. Bourgault A. Systemic necrotizing vasculitis and glomerulonephritis in grower pigs in southwestern Quebec. *Can Vet J*. 1995;36:150-154
28. Huang YY. Walther I. Martinson SA. López A. Yason C. Godson DL. Clarck EG. Simko E. Porcine Circovirus 2 Inclusion Bodies in Pulmonary and Renal Epithelial Cells. *Vet Pathol*. 2008;45:640-644
29. Jensen TK. Vigre H. Svensmark B. Billi-Hansen V. Distinction between porcine circovirus type 2 enteritis and porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *J Comp Pathol*. 2006.135:176-182
30. Karuppannan AK. Kwang J. ORF3 of porcine circovirus 2 enhances the in vitro and in vivo spread of the virus. *Virology*. 2011;410:248-256
31. Kennedy S. Segalés J. Rovira A. Scholes S. Domingo M. Moffet M. Moffet D. Meehan B. O'Neill R. McNeilly F. Allan G. Absence of evidence of porcine circovirus infection in piglets with congenital tremors. *J Vet Diagn Invest*. 2003;15:151-156
32. Kim J. Chung HK. Chae C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *Vet J*. 2003;166:251-256
33. Kim J. Yoocheol Ha. Kwonil J. Chansung C. Chanhee C. Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs. *Can J Vet Res*. 2004;68:218-221
34. Larochelle R. Bielanski A. Müller P. Magar R. PCR Detection and Evidence of Shedding of Porcine Circovirus Type 2 in Boar Semen. *J. Clin. Microbiol*. 2000;38:4629-4632

35. López-Soria S. Nofrarías M. Calsamiglia M. Espinal A. Valero O. Ramírez-Mendoza H. Mínguez A. Serrano JM. Marín O. Callén A. Segalés J. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) clinical expression under field conditions is modulated by the pig genetic background. *Vet Microbiol.* 2010
36. Madson DM. Patterson AR. Ramamoorthy S. Pal N. Meng XJ. Opriessnig T. Reproductive failure experimentally induced in sows via artificial insemination with semen spiked with porcine circovirus type 2. *VetPathol.* 2009;46:707-716
37. McNeilly F. McNair I. O'Connor M. Brockbank S. Gilpin D. Lasagna C. Boriosi G. Meehan B. Ellis J. Krakowka S. Allan GM. Evaluation of porcine circovirus type 2-specific antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs: comparison with virus isolation, immunohistochemistry, and the polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest.* 2002;14:106-112
38. Meehan BM. McNeilly F. Todd D. Kennedy S. Jewhurst VA. Ellis JA. Hassard LE. Clarck EG. Haines DM. Allan GM. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndrome in pigs. *J Gen Vir.* 1998;79:2171-2179
39. Mendes A. Zlotowski P. Santos Neves de Barcellos DE. Ferias da Cruz CE. Driemeier D. Brain lesions in pigs affected with postweaning multisystemic wasting síndrome. *J Vet Diagn Invest.* 2007;19:109-112
40. Mikami O. Nakajima H. Kawashima K, Yoshii M. Nakajima Y. Nonsuppurative myocarditis caused by porcine circovirus type 2 in a weak-born piglet. *J Vet Med Sci.* 2005;67:735-738
41. Morin M. Girard C. Elazhary Y. Fajardo R. Drolet R. Lagacé A. Severe proliferative and necrotizing pneumonia in pigs: A newly recognized disease. *Can. Vet J.* 1990;31:837-839

42. Nawagitgul P. Morozov I. Bolin SR. Harms PA. Sorden SD. Paul PS. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *Journal of General Virology*. 2000;81:2281-2287
43. Noriega J. Detección y Caracterización Genotípica de Circovirus Porcino Tipo 2 PCV-2 en Chile. Memoria para optar por el título de Médico Veterinario. Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. 2008
44. Noriega J. Reyes P. Bucarey S. Circovirus Porcino: Un virus pequeño que genera un gran problema. *Avances en Ciencias Veterinarias*. 2007;22:62-71
45. Opriessnig T. Fenaux M. Thomas M. Hoogland J. Rotschild F. Meng XJ. Albur PG. Evidence of Breed dependent Differences in Susceptibility to Porcine Circovirus Type 2-associated Disease and Lesions. *Vet Pathol*. 2006;43:281-293
46. Opriessnig T. Meng XJ. Albur PG. Porcine circovirus type 2-associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, patogénesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest*. 2007;19:591-615
47. PCR:Introduction. [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
48. Puvanerin S. Stone S. Yu W. Johnson C. Abrahante J. García L. Griggs T. Haley C. Wagner B. Murtaugh M. Absence of porcine circovirus type 1 (PCV1) and high prevalence of PCV2 exposure and infection in swine finisher herds. *Virus Research*. 2011;157:92-98
49. Ramírez-Mendoza H. Castillo-Juárez H. Hernández J. Correa P. Segalés J. Retrospective serological survey of Porcine circovirus-2 infection in Mexico. *Can J Vet Res*. 2009;73:21-24

50. Rincón MA. Mogollón JD. Correa JJ. Díaz CA. Corredor A. Vera V. Detección del Circovirus porcino tipo 2 en poblaciones porcinas intensivas de Colombia. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 2009; 22:3
51. Rosell C. Segalés J. Ramos-Vara JA. Folch JM. Rodríguez-Arriola GM. Durán CO. Balasch M. Plana-Durán J. Domingo M. Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Veterinary Record.* 2000;146:40-43
52. Sambrook J. Russell D. *Molecular Cloning: A laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 2001
53. Seeliger FA. Brüggemann ML. Krüger I. Greiser-Wilke I. Verspohl J. Segalés J. Baumgärtner. Circovirus Type 2-Associated Cerebellar Vasculitis in Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS)-Affected Pigs. *Vet Pathol.* 2007;44:621-634
54. Segales J. Factores de Riesgo y/o desencadenantes de la cicovirosis porcina. [www.3tres3.com](http://www.3tres3.com). 2008
55. Segales J. Historia y controversia de la enfermedad. [www.3tres3.com](http://www.3tres3.com). 2007
56. Segales J. Olvera A. Grau-Roma L. Charreyre C. Nauwynck H. Larsen L. Dupont K. McCullough K. Ellis J. Krakowka S. Mankertz A. Fredholm M. Fossum C. Timmusk S. Stockhofe-Zurwieden N. Beattie V. Armstrog D. Grassland B. Baekbo P. Allan G. PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Vet. Rec.* 2008;162:867-868
57. Shibata I. Okuda Y. Yazawa S. Ono M. Sasake T. Itagaki M. Nakajima N. Okabe Y. Hidejima I. PCR Detection od Porcine circovirus type 2 DNA in Whole Blood Serum, Oropharyngeal Swab, Nasal Swab, and Feces from Experimentally Infected Pigs and Field Cases. *J. Vet. Med. Sci.* 2003;65:405-408

58. Sierra MA. de las Mulas JM. Molenbeek RF. van Maanen C. Quezada M. Gruys E. Porcine immune complex glomerulonephritis dermatitis (PIGD) syndrome. *Europ J Vet Pathol.* 1997;3:63-70
59. Sinha A. Schalk S. Lager KM. Wang C. Opriessnig T. Singular PCV2a or PCV2b infection results in apoptosis of hepatocytes in clinically affected gnotobiotic pigs. *Res Vet Sci.* 2010
60. Smith WJ. Thompson JR. Done S. Dermatitis/nephropathy syndrome of pigs. *Veterinary Record.* 1993;132:47
61. Stevenson GW. Kiupel M. Mittal SK. Choi J. Latimer KS. Kanitz CL. Tissue distribution and genetic typing of porcine circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tremors. *J Vet Diagn Invest.* 2001;13:57-62
62. Szeredi L. Szentirmai C. Proliferative and necrotizing pneumonia and severe vascular lesions in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. *Acta Vet Hung.* 2008;56:101-109
63. Tham KM. Hansen M. Detection of porcine circovirus types 1 and 2 in abattoir-slaughtered pigs in New Zealand. *Surveillance.* 2003;30:3-5
64. Tischer I. Glederblom H. Vetterman W. Koch MA. A very small porcine virus with circular single stranded DNA. *Nature.* 1982; 91:271-276
65. Tischer I. Miels W. Wolff D. Vagt M. Griem W. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch Virol.* 1986;91:271-276
66. Villadiego LF. Villareal LY. Richtzenhain LJ. Brandao PE. Validación y aplicación de una técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) para la detección de circovirus porcino tipo 2 (PCV-2) en muestras de suero porcino. *Revista Medicina Veterinaria.* 2007;14:7-15
67. Wellenberg GJ. Stockhofe-Zurwieden N. de Jong MF. Boersma WJ. Elbers AR. Excessive porcine circovirus type 2 antibody titres may trigger the

development of porcine dermatitis and nephropathy syndrome: a case-control study. *Vet Microbiol.* 2004;99:203-214

68. West KH, Bystrom JM. Wojnarowicz C. Shantz N. Jacobson M. Allan GM. Haines M. Clarck EG. Krakowka S. McNeilly F. Konoby C. Martin K. Ellis JA. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J Vet Diagn Invest.* 1999;11:530-532
69. White M. Higgins RJ. Dermatitis nephropathy syndrome of pigs. *Veterinary Record.* 1993;132:199
70. Yang JS. Song DS. Kim SY. Lyoo KS. Park BK. Detection of porcine circovirus type 2 in feces of pigs with or without enteric disease by polimerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest.* 2003;15:369-373