



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA



IUSA
Instituto Universitario
Sanidad Animal

Tesis Doctoral

*Estudio Etiopatogénico del
Circovirus Porcino Tipo 2
Asociado a Virus y Bacterias en
una Infección Natural*

I. Óscar Quesada Canales

*Las Palmas de Gran Canaria
Julio 2015*



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA



Anexo I

DÑA. MARÍA SORAYA DÉNIZ SUÁREZ, SECRETARIA DEL INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.

CERTIFICA

Que el Consejo de Doctores del Instituto en su sesión de fecha 15 de mayo de 2015 tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada: **“Estudio etiopatogénico del circovirus porcino tipo 2 asociado a virus y bacterias en una infección natural.”** presentada por el doctorando D. Ildefonso Óscar Quesada Canales y dirigida por los Dres. Dña. Marisa Ana Andrada Borzollino y D. Antonio J. Fernández Rodríguez.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 73.2 del reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a quince de mayo de dos mil quince.





UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA



Anexo II

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Departamento: Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria.
Programa de Doctorado: Sanidad y Patología Animal

Título de la Tesis

**“ESTUDIO ETIOPATOGENICO DEL CIRCOVIRUS PORCINO
TIPO 2 ASOCIADO A VIRUS Y BACTERIAS EN UNA
INFECCIÓN NATURAL”**

Tesis Doctoral presentada por: **D. I. Óscar Quesada Canales**

Dirigida por la **Dra. Marisa Andrada** y codirigida por el **Dr. Antonio Fernández**

El Director,

El Codirector,

El Doctorando

Las Palmas de Gran Canaria, a 15 de mayo de 2015



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
FACULTAD DE VETERINARIA
DIVISIÓN DE HISTOLOGÍA Y PATOLOGÍA ANIMAL
INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD
ALIMENTARIA
PROGRAMA DE DOCTORADO DE SANIDAD Y PATOLOGÍA ANIMAL

**“ESTUDIO ETIOPATOGÉNICO DEL CIRCOVIRUS
PORCINO TIPO 2 ASOCIADO A VIRUS Y BACTERIAS
EN UNA INFECCIÓN NATURAL”**

I.Óscar Quesada Canales

Las Palmas de Gran Canaria, mayo de 2015



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA



**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
FACULTAD DE VETERINARIA
DIVISIÓN DE HISTOLOGÍA Y PATOLOGÍA ANIMAL
INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD
ALIMENTARIA
PROGRAMA DE DOCTORADO: SANIDAD Y PATOLOGÍA ANIMAL**

**“ESTUDIO ETIOPATOGENICO DEL CIRCOVIRUS
PORCINO TIPO 2 ASOCIADO A VIRUS Y BACTERIAS
EN UNA INFECCIÓN NATURAL”**

Tesis doctoral presentada por D. I. Óscar Quesada Canales para optar al
grado de Doctor en Veterinaria.

Fdo: I. Óscar Quesada Canales

Las Palmas de Gran Canaria, mayo de 2015



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA



MARISA ANDRADA BORZOLLINO, PROFESORA CONTRATADA DOCTORA DE UNIVERSIDAD DEL ÁREA DE CONOCIMIENTO DE ANATOMÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA COMPARADAS DEL DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.

INFORMA:

Que **D. I. Óscar Quesada Canales**, Licenciado en Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado **“Estudio Etiopatogénico del Circovirus Porcino Tipo 2 Asociado a Virus y Bacterias en una Infección Natural”**, el cual considero reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

FDO.: DRA. MARISA ANDRADA

LAS PALMAS DE GRAN CANARIA, MAYO DE 2015



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA



**ANTONIO FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD DEL
ÁREA DE CONOCIMIENTO DE ANATOMÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA
COMPARADAS DEL DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA DE LA FACULTAD DE
VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.**

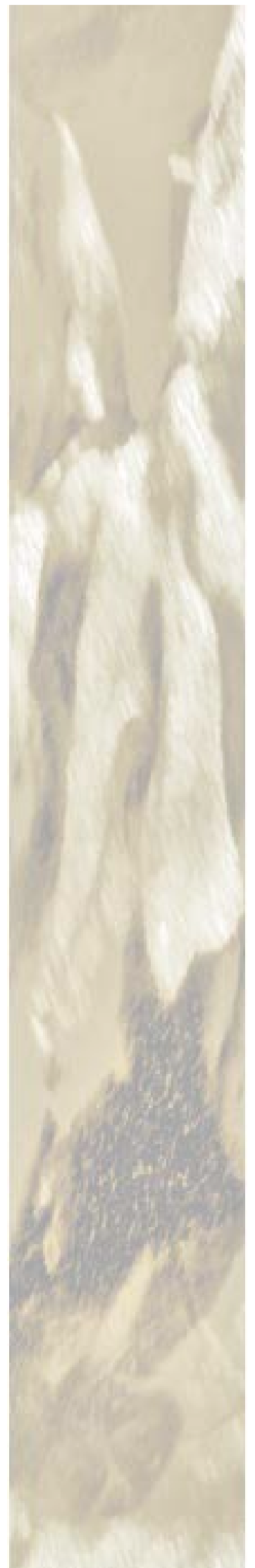
INFORMA:

Que **D. I. Óscar Quesada Canales**,, Licenciado en Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado **“Estudio Etiopatogénico del Circovirus Porcino Tipo 2 Asociado a Virus y Bacterias en una Infección Natural”**, el cual considero reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

FDO.: DR. ANTONIO FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

LAS PALMAS DE GRAN CANARIA, MAYO DE 2015

ÍNDICE



1	INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
2.1	Antecedentes Históricos	9
2.2	Taxonomía	11
2.3	Propiedades o Características Físicoquímicas.....	13
2.3.1	Organización del Genoma.....	14
2.4	Replicación Vírica	16
2.5	Epidemiología	18
2.5.1	Especies Susceptibles	20
2.5.2	Transmisión	21
2.6	Patogenia de PCVD.....	22
2.6.1	Factores Dependientes del Virus	25
2.6.2	Factores Dependientes del Hospedador	28
2.6.3	Efecto de las Coinfecciones	29
2.6.4	Efectos de la Modulación Inmunológica o del Estado Inmune	31
2.7	Inmunidad.....	33
2.7.1	Respuesta Inmune a PCV2 y Protección.....	33
2.7.2	Interacción entre PCV2 y el Sistema Inmune en PCVD	35
2.8	Enfermedades Asociadas a PCV: Signos Clínicos y Lesiones.....	38
2.8.1	PCV1	38
2.8.2	PCV2	39
2.9	Diagnóstico.....	59
2.9.1	Diagnóstico de Enfermedad Sistémica por PCV2	59
2.9.2	Diagnóstico de Enteritis por PCV2	61
2.9.3	Diagnóstico de PDNS	61
2.9.4	Diagnóstico de Enfermedad Reproductiva por PCV2.....	61
2.9.5	Diagnóstico Diferencial.....	62
2.10	Técnicas Diagnósticas disponibles para PCVD	63
2.10.1	Técnicas Directas. Detección del virus PCV2, antígeno viral y ácido nucleico. ...	64
2.10.2	Técnicas Indirectas. Detección de antígenos anti-PCV2. Estudios serológicos ...	71
2.11	Prevención y Control	73
2.11.1	Buenas Prácticas de Manejo	73
2.11.2	Desinfección	74
2.11.3	Control de Coinfecciones	75
2.11.4	Estatus de Infección por PCV2 y Títulos Serológicos de la Cerda en el Parto ...	77
2.11.5	Papel de la Nutrición en PCV2-SD/PMWS	77
2.11.6	Terapia Sérica	78
2.11.7	Vacunas frente PCV2	78
3	MATERIAL Y MÉTODOS.....	81
3.1	Material.....	83
3.2	Métodos	84
3.2.1	Estudio Histológico	84
3.2.2	Estudio Histoquímico	85
3.2.3	Estudio Inmunohistoquímico.....	85
3.2.4	Estudio Microbiológico	92
3.2.5	Estudio mediante Técnicas Moleculares (PCR-ELISA)	93
3.2.6	Estudio Serológico	94

3.3	Preparación de los Reactivos Empleados.....	97
3.4	Protocolos Empleados	99
4	RESULTADOS	111
4.1	Hallazgos Anatomopatológicos Macroscópicos	113
4.2	Hallazgos Anatomopatológicos Microscópicos	120
4.2.1	Linfonodos	120
4.2.2	Tonsila.....	138
4.2.3	Bazo.....	141
4.2.4	Pulmón	144
4.2.5	Corazón	149
4.2.6	Hígado.....	150
4.2.7	Aparato Digestivo	152
4.2.8	Riñón.....	155
4.2.9	Sistema Nervioso Central.....	156
4.3	Estudio Histoquímico.....	160
4.4	Estudio Inmunohistoquímico.....	162
4.4.1	Detección Inmunohistoquímica de Antígenos de PCV2	162
4.4.2	Detección Inmunohistoquímica de Antígenos de PRRSV	174
4.4.3	Detección Inmunohistoquímica de Antígenos de ADV.....	178
4.4.4	Detección Inmunohistoquímica de Antígenos de Mh.....	178
4.4.5	Detección Inmunohistoquímica de Antígenos de <i>Pasteurella spp.</i>	179
4.4.6	Detección Inmunohistoquímica de Antígenos de <i>Mannheimia haemolytica</i>	179
4.4.7	Detección Inmunohistoquímica de Antígenos de <i>Pasteurella multocida</i>	181
4.5	Estudio Bacteriológico	183
4.6	Estudio con Técnicas Moleculares (PCR-ELISA)	187
4.6.1	Resultados de IHQ y PCR-ELISA frente a PCV2.....	191
4.6.2	Resultados de IHQ y PCR-ELISA frente a PRRSV.....	193
4.7	Estudio Serológico	194
4.7.1	Resultados Serología ADV.....	194
4.7.2	Resultados Serología MR	194
4.7.3	Resultados Serología PPV	194
4.7.4	Resultados Serología PRRSV	194
4.7.5	Resultados Serología APP	194
4.7.6	Resultados Serología Mh	195
5	DISCUSIÓN	197
5.1	Clínica	199
5.2	Hallazgos Anatomopatológicos Macroscópicos.....	202
5.3	Hallazgos Anatomopatológicos Microscópicos.....	203
5.4	Estudio Inmunohistoquímico.....	206
5.5	Estudios con Técnicas Moleculares (PCR- ELISA)	210
5.6	Coinfecciones	212
5.6.1	PRRSV	212
5.6.2	ADV.....	215
5.6.3	PPV	216
5.6.4	Mh	216
5.6.5	CAR-Bacillus	218
5.6.6	Bacterias.....	219
5.6.7	<i>Cryptosporidium spp.</i>	221
5.6.8	<i>Balantidium spp.</i>	222
5.7	Integración de Resultados.....	223
6	CONCLUSIONES.....	227

7	RESUMEN	231
8	SUMMARY	235
9	ABREVIATURAS	239
10	AGRADECIMIENTOS.....	245
11	BIBLIOGRAFÍA.....	249

1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



El Síndrome Multisistémico de Adelgazamiento Postdestete (PMWS, Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome) se considera una enfermedad multifactorial, siendo el circovirus porcino tipo 2 (PCV2) el agente imprescindible para su desarrollo. Dicho síndrome, también denominado ahora enfermedad sistémica por PCV2 (PCV2 systemic disease, PCV2-SD) fue descrito por primera vez en 1991 en Canadá, siendo identificado posteriormente en todos los continentes. El PMWS/PCV2-SD afecta principalmente a cerdos de 2-4 meses de edad y los principales signos clínicos incluyen pérdida de peso o reducción en la tasa de ganancia de peso, emaciación, dificultad respiratoria, diarrea y palidez o ictericia.

Las lesiones macroscópicas incluyen, principalmente, un aumento del tamaño de los linfonodos así como ausencia de colapso pulmonar, mostrando los pulmones una consistencia elástica. También se puede observar punteado blanco en los riñones o úlceras gástricas, entre otros hallazgos. Histológicamente, a nivel de los tejidos linfoides, se caracteriza por depleción linfoide, infiltrado histiocítico con células gigantes multinucleadas, así como la presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos botrioides. Además se ha descrito neumonía intersticial, hepatitis linfocítica, nefritis intersticial y enteritis linfocítica, e infiltrado linfocítico en cualquier otro tejido.

Aparte del PMWS/PCV2-SD, el PCV2 se ha asociado a otras presentaciones clínicas, como infección subclínica, enfermedad respiratoria, enteritis o enfermedad intestinal, fallo reproductivo y el síndrome de dermatitis y nefropatía porcina. Todas estas presentaciones han sido englobadas bajo el término de enfermedades por circovirus porcino (Porcine circovirus diseases, PCVD).

El PCV2 se considera un virus ubicuo, presente en la mayoría, sino en todas, las poblaciones porcinas, en los cinco continentes. El cerdo parece ser el hospedador natural aunque también se ha detectado en jabalíes, produciendo una enfermedad similar al PMWS.

Aunque se considera que el PCV2 es el agente esencial para el desarrollo de la enfermedad, éste puede estar presente en cerdos sanos, sugiriendo la existencia de factores desencadenantes para pasar del estado de infección a enfermedad clínica. Esto explicaría las dificultades para reproducir experimentalmente el PMWS/PCV2-SD usando sólo PCV2, y por tanto la falta de un modelo experimental consistente y eficaz. Estos factores pueden ser

variaciones genéticas del virus, estado inmunitario del animal, momento de la infección, tipo de manejo en la explotación, o coinfecciones, entre muchos otros.

Los animales afectados de PCVD muestran un amplio espectro de coinfecciones. Entre los agentes implicados se incluyen virus, bacterias, micoplasmas y otros patógenos oportunistas. Esto sugiere que no hay un único copatógeno que pueda ser atribuido a una mayor prevalencia y severidad de la enfermedad. Lo más probable es que diversos agentes patógenos y no patógenos conocidos y desconocidos, que varían de una región geográfica a otra, sean los factores desencadenantes de la progresión de la infección de PCV2 a PCVD.

Los criterios de diagnóstico de PMWS/PCV2-SD son:

1. Signos clínicos incluyendo retraso del crecimiento y adelgazamiento, frecuentemente con disnea y aumento del tamaño de los linfonodos.
2. Presencia de lesiones histológicas características en los tejidos linfoides (depleción linfocitaria, histiocitosis y presencia de cuerpos de inclusión) y/o inflamación linfocitaria en otros órganos (pulmón, hígado, riñón, intestino, páncreas, etc.).
3. Detección, moderada a elevada, de PCV2 en las lesiones.

Dado que la infección por PCV2 es ubicua en la población porcina mundial, el diagnóstico no puede basarse únicamente en la detección del virus o de anticuerpos frente a él. Esto hace que la elección y la interpretación de los test de diagnóstico sean importantes para la confirmación de PCVD. De igual forma, la variación de los órganos afectados y por tanto las diferentes manifestaciones clínicas de PCVD, determina la necesidad de tomar muestras de diversos órganos de varios animales, puesto que animales clínicamente enfermos pueden tener lesiones severas en un sistema orgánico y no presentar lesiones en otros.

Debido a que el diagnóstico de PCVD se basa en la demostración de las lesiones características asociadas a antígeno o ácido nucleico de PCV2 en los respectivos órganos, la inmunohistoquímica (IHQ) o la hibridación in situ (ISH) se consideran las pruebas principales (gold standard) para su detección como parte del diagnóstico de PCVD.

Ni los signos clínicos ni las lesiones macroscópicas observadas son suficientes para diagnosticar la enfermedad, aunque si son indicativas. Sin embargo, la presencia de sintomatología, lesiones macroscópicas compatibles con PCVD y la demostración de altos niveles de PCV2 o anticuerpos frente a PCV2 por diferentes métodos, pueden ser consideradas

diagnósticas en caso de no poder realizar estudio histopatológico. Por otro lado, la detección de ADN de PCV2 por PCR convencional sólo es diagnóstica de PCVD si se interpreta junto con las lesiones histológicas características.

Las circovirus porcinos tienen un gran impacto sobre la producción porcina, estimándose un coste de entre 562-900 millones de euros anuales para la Unión Europea, siendo el coste por animal de 2,31 a 16,19 euros según sea su presentación moderada o severa. Por ello es fundamental realizar un diagnóstico correcto para poder aplicar las estrategias necesarias para minimizar su impacto.

Con estos antecedentes surge la necesidad de profundizar en el conocimiento del papel patogénico de PCV2 en la infección natural, de forma aislada o en asociación con otros patógenos víricos y/o bacterianos y las diferentes presentaciones clínicas, así como su caracterización a partir de modelos que surgen de inoculaciones experimentales utilizando diferentes métodos diagnóstico. Para ello se establecieron los siguientes objetivos:

Objetivos:

1. Estandarizar la técnica inmunohistoquímica para la detección del PCV2 y ADV utilizando anticuerpos monoclonales en muestras de tejido fijadas en formol e incluidas en parafina.
2. Estudiar la presencia en sangre y la distribución del PCV2 en tejido mediante diferentes técnicas (IHQ, PCR-ELISA).
3. Estimar el estadio y severidad de la infección por PCV2 a partir de una clasificación basada en modelos experimentales.
4. Evaluar la asociación de PCV2 con otros agentes etiológicos mediante la utilización de diferentes técnicas diagnósticas directas e indirectas.

*2 REVISIÓN
BIBLIOGRÁFICA*



2.1 Antecedentes Históricos

El circovirus porcino (Porcine Circovirus, PCV) fue descrito por primera vez en 1974 por Tischer y colaboradores como un contaminante vírico no citopático similar a un picornavirus, de los cultivos celulares de riñón porcino PK/15, o línea celular continua de riñón de cerdo PK-15 (ATCC-CCL31) (Tischer et al., 1974 y 1982).

Ocho años más tarde, este agente fue definido como un nuevo virus de mamífero, pequeño, sin envoltura e icosaédrico, con un genoma constituido por una cadena simple circular de ADN, pasando a denominarse circovirus porcino (Tischer et al., 1982). Desde entonces, el PCV ha sido asignado a la familia *Circoviridae*.

En Canadá en 1991, en granjas de alto estatus sanitario, se identificó una enfermedad aparentemente nueva, que se denominó Síndrome Multisistémico de Adelgazamiento Postdestete (Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome, PMWS) (Clark, 1996a, Harding, 1996). Dicho síndrome se asoció a PCV (Daft et al., 1996; Clark, 1997; LeCann et al., 1997; Segalés et al., 1997). A finales de los años 90, un virus similar a PCV fue aislado por primera vez en cerdos con enfermedad debilitante en el oeste de Canadá (Ellis et al., 1998). Poco después, virus prácticamente idénticos al aislado canadiense fueron detectados en cerdos enfermos en Estados Unidos (EEUU) y Europa (Allan et al., 1998a). Mediante el uso de anticuerpos policlonales y monoclonales, y el análisis de la secuencia genómica, se demostró que esos virus eran antigénica y genéticamente diferentes al PCV contaminante de los cultivos celulares PK-15. Por lo tanto, se propuso que el PCV aislado de cerdos clínicamente enfermos se denominara Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2) y el PCV original contaminante de los cultivo celulares PK-15, Circovirus Porcino tipo 1 (PCV1). (Allan et al., 1998b; Meehan et al., 1998; Morozov et al., 1998).

Estudios retrospectivos realizados sobre tejido y/o suero, utilizando distintas técnicas, han puesto de manifiesto que el PCV2 podría haber estado presente en la población porcina, en diferentes regiones y/o países con bastante anterioridad a la primera descripción.

En Alemania, la detección de ADN de PCV2 en tejido mediante hibridación in situ (in situ hybridization, ISH) fue del 2.77% entre los años 1961-1984, incrementándose a 32.14% entre 1985-1998 (Jacobsen et al., 2009).

En sueros obtenidos en 1969, 1975 y 2000 en mataderos belgas que fueron testados mediante ensayo de inmunoperoxidasa en monocapa (immunoperoxidase monolayer assay, IPMA) se encontró positividad a anticuerpos específicos de PCV2 en el 100% de las muestras (Sánchez et al., 2001b).

En Inglaterra se han identificado retrospectivamente casos esporádicos de PMWS en tejidos fijados en formalina y archivados desde 1970, antes de la detección del PMWS en los años 90 (Grierson et al., 2004a). Se ha encontrado ácido nucleico específico de PCV2 en muestras de tejidos archivados en el 41% de los casos de los años 90, en el 31% de los casos de los 80, y en el 32% de los casos de los 70. La secuenciación de PCV2 de 5 de estas muestras reveló una alta homología con los aislados de PCV2 obtenidos de un caso de Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina (Porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PDNS) en el 2000, indicando que un aislado similar de PCV2 ha estado presente en la población porcina del Reino Unido durante más de 30 años (Grierson et al., 2004a).

En Irlanda del Norte se han detectado anticuerpos de PCV2 en la mayoría de las muestras de suero recogidas desde 1973 hasta 1999 (Walker et al., 2000). El porcentaje de sueros positivos a PCV2 mostró un marcado incremento en las muestras recogidas en 1988 (100%) y 1999 (92,1%) comparativamente a los obtenidos en 1973 (69,1%), 1981 (61,3%), y 1984 (55%) (Walker et al., 2000).

En Canadá se analizaron muestras de suero obtenidas en mataderos mediante inmunofluorescencia indirecta (indirect immunofluorescence assay, IFA) frente a anticuerpos de PCV1 y PCV2 (Magar et al., 2000b). Se observó que en 1985, un 8% (14/177) de sueros fueron positivos a PCV1 y un 13,6% (24/177) a PCV2. En 1989, el 41,4% (60/145) fue positivos a PCV1 y el 72,4% (105/145) a PCV2. En 1997, el 38,1% (56/147) de los sueros fueron positivos a PCV1 y 66,7% (98/147) a PCV2 (Magar et al., 2000b). Estos resultados señalan al PCV2 como el principal tipo circulante en la población porcina de Canadá, incluso antes de las primeras descripciones de PMWS.

En España, se analizaron muestras de tejidos de 189 cerdos y sueros de 388 cerdos recogidos desde 1985 hasta 1997, para determinar la presencia de ADN de PCV2 mediante ISH en tejidos y de anticuerpos específicos de PCV2 mediante IPMA en suero. Un 41,3% de los tejidos y un 72,7% de los sueros fueron positivos, lo que indica una infección enzoótica en España desde 1985 (Rodríguez-Arrijoja et al., 2003b).

2.2 Taxonomía

Ambos, PCV1 y PCV2, son miembros de la familia *Circoviridae* (Todd et al., 2005). La familia *Circoviridae* está dividida en el género *Circovirus* ("Circo" indica que el genoma viral tiene una conformación circular) y el género *Gyrovirus* ("Gyro" deriva del griego *gyrus* que significa anillo o circuito). El género *Circovirus* contiene las siguientes 11 especies: virus de la enfermedad del pico y las plumas (Beak and Feather Disease Virus, BFDV), circovirus del canario, el circovirus del pato, circovirus del pinzón, circovirus del ganso, circovirus de la gaviota, circovirus de la paloma, PCV1, y PCV2, circovirus del estornino, y circovirus del cisne. El género *Gyrovirus* solo contiene el virus de la anemia del pollo (Chicken Anemia Virus, CAV) (www.ictvonline.org).

Los viriones de la familia *Circoviridae* muestran una simetría icosaédrica y ausencia de envoltura. El genoma es circular covalentemente cerrado, con una cadena simple de ADN, cuyo tamaño varía de 1,8 a 2,3 Kb. La polaridad del genoma del CAV posee un sentido negativo, mientras que el resto de circovirus lo es en ambos sentidos (Todd et al., 2005). CAV, PCV2 y BFDV tienen una estructura icosaédrica con una cápside de 60 moléculas de proteína dispuestas en 12 unidades agrupadas en pentámeros (Crowther et al., 2003).

Los circovirus son específicos de hospedador o tienen un estrecho rango de hospedadores, y la mayoría de los circovirus conocidos infectan especies de aves (Todd et al., 2005). Las infecciones subclínicas son comunes; sin embargo, las infecciones solo por circovirus están asociadas, en algunos casos, con enfermedades tales como CAV, BFD, y la enfermedad por circovirus en palomas. La infección por circovirus, en muchas especies, causa varios grados de depleción linfocítica y se piensa que es inmunosupresora (Todd et al., 2005).

El análisis filogenético de PCV1 lo clasificó como el más cercano a BFDV (Niagro et al., 1998). Más aún, se ha sugerido que el predecesor de PCV1 y BFDV podría haberse originado de un nanovirus de plantas que infectó a un huésped vertebrado y se recombinó con un virus ARN infectante de vertebrados, posiblemente un calicivirus (Gibbs y Weiller, 1999).

Investigaciones recientes han mostrado que los aislados de PCV2 pueden agruparse en dos grupos mayores, PCV2 grupo 1 y PCV2 grupo 2, que pueden dividirse a su vez en clusters: PCV2 grupo 1 puede dividirse en 3 clusters (1A-1C), y PCV2 grupo 2 en 5 clusters (2A-2E)

(Olvera et al., 2007). De forma simultánea a la introducción de los términos PCV2 grupo 1 y PCV2 grupo 2, Gagnon y colaboradores, en 2007, en EEUU empezaron a agrupar los aislados de campo de PCV2 en aislados similares a los europeos o PCV2b (sería PCV2 grupo 1), y en aislados similares a los norteamericanos o PCV2a (PCV2 grupo 2).

Algunos laboratorios de EEUU han aportado datos moleculares por lo que la mayoría de los aislados encaja en uno de los dos patrones de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (Restriction fraction length polymorphism, RFLP) designados 422 y 321 (DeLay et al, 2005; Carman et al., 2006). Los aislados con el patrón RFLP 422 encajan en PCV2 grupo 2 (PCV2a o aislados similares a los norteamericanos), mientras que los aislados con un patrón RFLP 321 pueden ser tanto PCV2 grupo 2 (PCV2a o aislados similares a los norteamericanos) o PCV2 grupo 1 (PCV2b o aislados similares a los europeos). Esto ha llevado al uso del término clásico 321, que está asociado con PCV2 grupo 2, y el nuevo 321, que está asociado con PCV2 grupo 1 que puede ser verificado solo por secuenciación. En Dinamarca se ha aislado un genotipo distinto, que ha sido clasificado como PCV2c (Dupont et al., 2008).

Para unificar la nomenclatura existente a nivel internacional, Segalés y colaboradores en 2008, han propuesto la nomenclatura estandarizada PCV2a, PCV2b y PCV2c (tabla 2.1). Recientemente se ha descrito el PCVd y PCVe, identificados hasta el momento solamente en China (Wang et al., 2009), si bien, hay dudas, de que se trate de nuevos genotipos (Cortey et al., 2011).

Tabla 2.1. Relación de las diferentes propuestas de nomenclatura utilizadas en referencia a los dos principales genotipos de PCV2. Modificado de Grau-Roma y colaboradores, 2011.

Propuesta Segalés et al., 2008	Grau-Roma et al., 2008	Gagnon et al., 2007	Martins Gomes de Castro et al., 2007	Olvera et al., 2007	DeLay et al., 2005	Timmusk et al., 2005	De Boissésou et al., 2004
PCV-2a	PCV-2 genotipo 2	PCV-2a	Grupo B	Grupo 2	Patrón 422-like	SG1/SG2	II
PCV-2b	PCV-2 genotipo 1	PCV-2b	Grupo A	Grupo 1	Patrón 321-like	SG3	I
PCV-2c							

2.3 Propiedades o Características Fisicoquímicas

El PCV es un virus desnudo, sin envoltura, pequeño, de aproximadamente 17-20,7 nm de diámetro con simetría icosaédrica. El genoma está constituido por un ADN monocatenario circular (Tischer et al., 1982; Todd et al., 2005).

La densidad de flotación del PCV1 es de 1,33 a 1,37 g/cm³ en un gradiente de CsCl (cloruro de cesio) (Tischer et al., 1974; Allan et al., 1994c). El coeficiente de sedimentación (S) fue determinado en 57S cuando se comparaba con el coeficiente de sedimentación del enterovirus bovino (Allan et al., 1994c). El PCV1 no hemaglutina eritrocitos de diversas especies animales, incluyendo cerdo, oveja, vaca, pollo, pavo y cobaya (Allan et al., 1994c). Hasta el momento se desconoce si el PCV2 puede hemaglutinar eritrocitos de alguna especie. El PCV es altamente resistente a la inactivación en el ambiente, lo cual representa un serio problema para la eficaz limpieza y desinfección de las instalaciones en los sistemas de producción porcina. Un ejemplo de esto es el hecho de que el PCV1 permanece infectivo incluso después de su exposición a pH 3, cloroformo y altas temperaturas, 56°C y 70°C durante 15 minutos (Allan et al., 1994c).

El PCV2 es relativamente resistente, bajo condiciones in vitro, a diferentes desinfectantes comerciales a base de clorhexidina, formaldehído, yodo o alcoholes, consiguiéndose una reducción de 1⁸-4⁴ log TCID₅₀ (tissue culture infections dose, dosis infectiva en cultivo tisular) (Royer et al., 2001). Se ha demostrado que los desinfectantes a base de amonio cuaternario (Roccal-D), fenol (One-Strock Environ), hidróxido sódico o agentes oxidantes son eficaces en la inactivación del PCV2 in vitro (Royer et al., 2001).

La infectividad de PCV2 se redujo a 1,6 log mediante pasteurización durante 10 horas a 60°C, a 0,75 log mediante tratamiento con calor seco durante 72 horas a 80°C, y a 1,25 log mediante tratamiento extremo con calor seco durante 30 minutos a 120°C (Welch et al., 2006). PCV2 es fácilmente aislado de tejido conservados a -70°C (Ellis et al., 1998).

2.3.1 Organización del Genoma

2.3.1.1 PCV1

El análisis de la secuencia de proteínas codificada por ORF1 (Open Reading Frame, marco de lectura abierto), ha indicado un grado de homología con los ORFs del nanovirus de las plantas, conocidos por codificar proteínas asociadas a la replicación viral. Como se referenció anteriormente, la infección por PCV en cerdos podría haberse iniciado por un nanovirus de planta que cambió de hospedador para infectar a vertebrados y recombinarse con un virus infectante de vertebrados (Gibbs y Weiller, 1999).

Esta homología con los nanovirus de las plantas y la gran similitud en la secuencia de aminoácidos entre el potencial producto proteico ORF1 del virus de la enfermedad del pico y las plumas y el producto ORF1 del PCV1 ha sido descrita por varios autores (Bassami et al., 1988; Meehan et al., 1997). Así mismo se ha sugerido que la principal proteína estructural de PCV1 está codificada por ORF2 (Mahé et al., 2000).

2.3.1.2 PCV2

El genoma circular viral del PCV2 contiene 1767-1768 nucleótidos (Hamel et al., 1998; Meehan et al., 1998; Mankertz et al., 2000). El análisis genómico de los PCV2 procedentes, tanto de animales enfermos como no enfermos en todo el mundo, ha demostrado que todos ellos pertenecen a un grupo filogenético con una similitud en su secuencia de nucleótidos mayor del 94% (Meehan et al., 1998; Mankertz et al., 2000; Laroche et al., 2002). Sin embargo, la comparación de la secuencia genómica de los aislados de PCV2 y de PCV1 ha mostrado una similitud menor del 80% (Hamel et al., 1998; Meehan et al., 1998; Morozov et al., 1998).

Para el genoma del PCV2 se han sugerido 11 potenciales ORFs, con un tamaño previsto de proteínas codificadas por ORFs individuales de 2 a 36 kDa, (Hamel et al., 1998), siendo solo 6 ORFs mayores de 200 nucleótidos (Hamel et al., 1998; Meehan et al., 1998) mientras que otros autores solo han identificado 6 potenciales ORFs (Meehan et al., 1998; Morozov et al., 1998). Parece ser que solo ORF1 y ORF2 están involucrados en la expresión de proteínas.

El análisis de ORF1 (proteínas replicasa; Rep) y ORF2 (proteínas de cápside; Cap) de PCV2 ha mostrado un 83% de homología en nucleótidos y un 86% en homología de proteínas predichas con el PCV1 para el ORF1, y un 67% de homología en nucleótidos y un 65% de homología en proteínas predichas con el PCV1 para el ORF2, respectivamente. (Morozov et al., 1998; Mankertz et al., 2000). Por esta razón, se ha sugerido que ORF2 o su producto podrían utilizarse para diferenciar los dos tipos de PCV (Mahé et al., 2000).

Recientemente se ha descrito un tercer gen viral en PCV2 denominado ORF3 implicado en los mecanismos de apoptosis inducidos por PCV2 (Liu et al., 2005 y 2006; Karuppanan et al., 2009). La proteína ORF3 parece estar altamente conservada, con una alta homología de aminoácidos (mayor del 95%) entre cepas de PCV2. Poco se sabe sobre la importancia del resto de potenciales ORFs más pequeños (Liu et al., 2005) (Fig. 2.1).

Se ha postulado que los circovirus se multiplican a través de un replicón de doble cadena usando un mecanismo de círculo rodante (Mankertz et al., 1997; Meehan et al., 1997). Se cree que los ARNm víricos se transcriben en el núcleo a partir de ambas cadenas de ADN, es decir, en los dos sentidos (Meehan et al., 1998). Igualmente, se cree que las proteínas de expresión temprana y las proteínas no estructurales del PCV están involucradas en la inducción y regulación de la replicación del ADN vírico (Tischer et al., 1995c). La acumulación de proteínas estructurales, un proceso independiente de la síntesis de ADN, tiene lugar en el citoplasma de las células infectadas y da lugar a la destrucción celular (Tischer et al., 1995c).

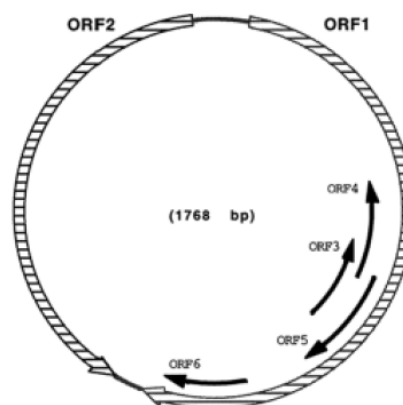


Fig. 1.1. Organización del genoma de PCV2 (Gillespie et al., 2009).

Los ORFs individuales codifican potencialmente varios productos de naturaleza polipeptídica (Hamel et al., 1998). El ORF1 se cree que codifica potencialmente la proteína replicasa, la cual es necesaria para la replicación del genoma vírico (Mankertz et al., 1998). La masa molecular que se ha predicho para el producto de ORF1 es de 35,7 kD (Hamel et al., 1998) para el PCV1 y de 35,8 kDa para el PCV2. Se considera que el ORF2 codifica la proteína de la cápside, que es la principal proteína estructural (Mankertz et al., 1998). La masa molecular del producto deducido de la secuencia del ORF2 es de 27,8 kDa tanto para el PCV1 como para el PCV2 (Hamel et al., 1998). Los tamaños supuestos de las proteínas codificadas por los ORFs individuales 3 a 11 del PCV1 son aproximadamente 23, 13, 10, 7, 6, 4, 3, 4, 3 kDa, respectivamente. Las masas moleculares de los productos de los ORFs 3 a 11 del PCV2 se cree que son aproximadamente 12, 7, 6, 3, 2, 2, 5, 4, 2 kD, respectivamente (Hamel et al., 1998). Aunque en el análisis computerizado de la secuencia se han identificado 11 ORFs potenciales, sólo se ha identificado una proteína con masa molecular de 36 kDa en el virión del PCV1 (Tischer et al., 1982). Posteriormente se identificó también en el PCV1 otra proteína con masa molecular de 31 a 33 kDa, pero su papel no se ha determinado (Tischer et al., 1995b).

Aunque la composición real de las proteínas estructurales del PCV2 no ha sido bien caracterizada, un estudio longitudinal reveló que los cerdos infectados experimentalmente con PCV2 desarrollaron anticuerpos a tres polipéptidos putativos específicos de virus con masa molecular aproximada de 28, 28,5 y 35 kDa. Se postuló que las proteínas de 28 y 35 kDa son productos de ORF2 y ORF1 respectivamente. La proteína de 28 kDa fue la más específica e inmunogénica, por lo que podría aportar las bases antigénicas para el desarrollo de test diagnósticos para la detección de anticuerpos específicos frente a PCV2 (Pogranichnyy et al., 2000).

2.4 Replicación Vírica

Se ha visto que el PCV infecta diversos tipos celulares. El virus o antígeno del virus ha sido aislado o detectado en órganos linfoides, hígado, bazo, riñón, placas de Peyer del intestino, pulmón, tonsila y otros tejidos, incluido el sistema nervioso central (Allan et al., 1995; Rosell et al., 1999; Corrêa et al., 2007). El ácido nucleico o antígenos de PCV2 se encuentra generalmente en el citoplasma de histiocitos, células gigantes multinucleadas y otras células de la línea monocito/macrofágica tales como macrófagos alveolares, células de Kuppfer y células dendríticas foliculares de los tejidos linfoides (Rosell et al., 1999, 2000a; Allan y Ellis, 2000).

También es posible encontrar ácido nucleico o antígeno viral en el citoplasma del epitelio renal y respiratorio (bronquial, bronquiolar y alveolar), endotelio vascular, células acinares y ductales pancreáticas, y en el núcleo de células de la línea monocito/macrofágica, células musculares lisas, hepatocitos, y enterocitos (Kiupel et al., 1998; McNeilly et al., 1999; Rosell et al., 1999, 2000a y b; Sirinarumitr et al., 2000). También se ha detectado PCV2 en neuronas, en células mononucleares del infiltrado perivascular cerebral, células similares a fibroblastos, células endoteliales en meninges, plexos coroideos, cerebro y cerebelo de cerdos infectados, principalmente en el citoplasma y ocasionalmente en el núcleo (Allan et al., 1999a; Kennedy et al., 2000; Stevenson et al., 2001; Fenaux et al., 2002; Corrêa et al., 2007). En los fetos, la principal célula que contiene PCV2 es el cardiomiocito, tanto en el núcleo como en el citoplasma (Sánchez et al., 2001a).

Dentro de las células de los tejidos de cerdos infectados pueden verse cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos intensamente basófilos de 5 a 25 nm de tamaño (Harding y Clark, 1997; Kiupel et al., 1998).

Sin embargo, no se sabe cómo el PCV establece la infección y se replica en los cerdos, pudiéndose replicar "*in vitro*", en células PK-15, en la línea celular Vero de riñón de mono verde africano, en células semicontinuas de pulmón porcino, en células semicontinuas de testículo porcino, en células primarias de riñón bovino, en células semicontinuas de pulmón bovino, en células semicontinuas de testículo bovino, en células primarias de riñón de cordero, en células semicontinuas de testículo de cordero y otros cultivos celulares primarios y permanentes (Allan et al., 1994c).

En los cultivos celulares, el virus no causa lisis visible de las células infectadas (Allan et al., 1994c; Tischer et al., 1982), y su presencia puede demostrarse solo por métodos indirectos, tales como inmunofluorescencia (Tischer y Buhk 1988; Allan et al., 1998a), inmunohistoquímica (Ellis et al., 1998; McNeilly et al., 1999; Sorden et al., 1999) hibridación *in situ* (Allan et al., 1998a; Ellis et al., 1998; Morozov et al., 1998; Choi y Chae, 1999; McNeilly et al., 1999; Sorden et al., 1999), y PCR (Morozov et al., 1998; Larochelle et al., 1999a). Usando estas técnicas, el PCV sólo puede encontrarse en un pequeño número de células, pudiendo presentar cuerpos de inclusión citoplasmáticos heterogéneos, consistentes en redes electrodensas paracrystalinas de pequeñas partículas víricas sin envoltura (Kiupel et al., 1998; Stevenson et al., 1999).

La replicación *in vitro* del PCV depende de la disponibilidad de enzimas celulares que se expresan durante la fase S del crecimiento celular (Tischer et al., 1987). Se encontró que la producción de la progenie vírica y el número de células infectadas se incrementaba por el tratamiento de las células con D-glucosamina, aunque este reactivo tiene un efecto adverso sobre el cultivo celular debido a su citotoxicidad (Tischer y Buhk 1988; Allan et al., 1998a). La D-glucosamina sincroniza el ciclo celular e inicia la replicación vírica al permitir la entrada del genoma del PCV al núcleo de las células. Si la célula no está tratada, el virus entrará en el núcleo de la célula hija al final de la mitosis, dando lugar a muy pocas células infectadas (Tischer et al., 1987).

2.5 Epidemiología

El PCV2 se considera un virus ubicuo, presente en la mayoría, sino en todas, las poblaciones porcinas, en los cinco continentes, tanto en los países donde se ha detectado circovirus porcino (porcine circovirus diseases, PCVD) como en los que no (Tischer et al., 1986; Dulac y Afshar, 1989; Horner, 1991; Allan et al., 1994c; Edwards y Sands, 1994; Hines y Lukert, 1995; Tischer et al., 1995b; LeCann et al., 1997; Segalés et al., 1997; Kennedy et al., 1998; Choi y Chae 1999; Onuki et al., 1999; Allan y Ellis, 2000; Walker et al., 2000; Wellenberg et al., 2000; Chen et al., 2001; Trujano et al., 2001; Sarradell et al., 2002; Castro et al., 2004; Segalés et al., 2004b; Raye et al., 2005).

En Alemania, se determinó la alta prevalencia del PCV, alcanzando un 95% (Tischer et al., 1986). En dicho estudio, el 60% de los sueros de cerdos sacrificados contenían títulos de anticuerpos tan elevados, como los observados a las 3-6 semanas post-inoculación experimental con PCV. Estos resultados podrían indicar que la infección por PCV, probablemente, ocurriría en las unidades de engorde, donde los animales están en mayor contacto. En el análisis de la dinámica de los anticuerpos anti-PCV en poblaciones de cerdos en Alemania, se observó como el porcentaje de cerdos seronegativos frente a PCV disminuía conforme aumentaba la edad de los animales, pasando de un 65% en los recién destetados, a tan solo un 5,6% en los cerdos reproductores mayores (Tischer et al., 1995b).

Un estudio longitudinal llevado a cabo sobre los perfiles de anticuerpos frente a PCV en 2 camadas de cerdos en Irlanda del Norte mostró que los anticuerpos séricos maternos frente a PCV desaparecían a las 8-9 semanas tras el nacimiento. Los anticuerpos séricos volvían a aparecer a las 13-15 semanas, indicando una exposición al virus entre la 11^a y 13^a semana de vida. Esta escala temporal coincidía con el movimiento de los cerdos desde la unidad de cría a la de engorde dentro de la granja (Allan et al., 1994c).

En Canadá, tanto en granjas con grandes unidades de engorde libres de patógenos específicos (specific pathogen free, SPF), como en pequeñas granjas familiares, se detectó, mediante inmunofluorescencia indirecta, una amplia distribución de anticuerpos séricos frente a PCV2 en todos los tipos de granja ocurriendo la seroconversión a las 3-4 semanas postdestete (Cotrell et al., 1999).

Los primeros estudios serológicos se llevaron a cabo utilizando PCV1 como antígeno. Sin embargo, diversos estudios han revelado reacción cruzada entre anticuerpos de PCV1 y PCV2 (Allan et al., 1998a; Mahé et al., 2000; Pogranichnyy et al., 2000; Rodríguez-Arriola et al., 2000). Por tanto, las primeras estimaciones sobre la prevalencia de infección por PCV1 y PCV2 necesitarían ser nuevamente evaluadas. Mediante el uso de una PCR múltiple, que permite la tipificación de los PCV, se demostró que el PCV2 es el principal tipo de PCV que circula en la población porcina (Larochelle et al., 1999a; Ouardani et al., 1999; Ellis et al., 2000a). Sólo entre el 4% y el 6% de los virus de campo identificados fueron PCV1 independientemente del estado sanitario de los cerdos y sin estar correlacionada con ninguna enfermedad concreta (Larochelle et al., 1999a; Ouardani et al., 1999).

Bajo condiciones experimentales, los cerdos inoculados con PCV1 seroconvirtieron el día 7 postinoculación y los títulos de anticuerpos continuaron aumentando durante 5 semanas después de la inoculación. El virus se detectó en diversos tejidos y se excretó por secreciones nasales y heces (Tischer et al., 1986) sugiriendo que los cerdos desprovistos de inmunidad eran susceptibles al PCV1 (Allan et al., 1995). Sin embargo, la inoculación experimental del PCV1 no fue capaz de inducir cambios patológicos o enfermedad clínica en los cerdos, sugiriendo que el PCV1 no era patógeno para el cerdo (Krakowka et al., 2000).

Aunque se reprodujeron temblores en cerdos muy jóvenes infectados con PCV y se aisló circovirus de cerdos recién nacidos con temblor congénito, clínicamente con contracciones clónicas de los músculos esqueléticos, el aislado vírico no fue caracterizado genética o

antigénicamente (Hines y Lukert, 1994). Posteriormente, en lechones que presentaron de forma natural temblor congénito tipo A2 se detectó PCV2 (Stevenson et al., 2001).

El PCV2 ha sido implicado en numerosos síndromes de enfermedad, tales como el Síndrome Multisistémico de Adelgazamiento Postdesdete (Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome, PMWS), el Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina (porcine dermatitis and nephropaty syndrome, PDNS), enteritis granulomatosa, linfadenitis necrotizante, epidermitis exudativa y trastornos reproductivos, aunque el papel causal del PCV2, en alguna de estas enfermedades, no se ha demostrado de forma concluyente (Chae, 2005; Segalés et al., 2005a).

2.5.1 Especies Susceptibles

El cerdo parece ser el hospedador natural del PCV1 y PCV2 (Segalés y Domingo, 2002). También se han detectado anticuerpos frente a PCV2 en el suero de jabalíes, siendo positivos el 33% y 37% de los animales examinados en 1993 y 2000 respectivamente en Bélgica, y el 48% en España entre 2000 y 2003 (Sánchez et al., 2001b; Vicente et al., 2004).

Una enfermedad similar al PMWS también ha sido descrita en jabalíes en Norteamérica y en Europa (Ellis et al., 2003; Schulze et al., 2004; Vicente et al., 2004). Los genomas de los PCV2 aislados de los jabalíes enfermos en dos de los estudios fueron secuenciados mostrando una homología en nucleótidos casi idéntica a otros PCV2 caracterizados de cerdos domésticos (Ellis et al., 2003; Schulze et al., 2004).

No se han encontrado anticuerpos séricos frente a PCV2 en vacas, ovejas, pollos, pavos, cabras, ratones, cobayas, conejos, caballos, perros, gatos y humanos (Tischer et al., 1982; Allan et al., 1994c y 2000c; Ellis et al., 2001; Rodríguez-Arrijoja et al., 2003a). El estudio serológico en la población humana expuesta tampoco ha mostrado anticuerpos anti-PCV2 (Ellis et al., 2000b). Sin embargo, en Alemania, mediante la combinación de técnicas de inmunofluorescencia indirecta y ELISA, se han detectado anticuerpos anti-PCV en humanos (30.2%), ratones (12-69%) y vacas (35%) (Tischer et al., 1995a).

Si bien el PCV es capaz de infectar *in vitro* células mononucleares de bovino (Allan et al., 1994b), y ratones bajo condiciones experimentales (Kiupel et al., 2001; Cságola et al., 2008), la implicación de especies no porcinas en la transmisión del PCV a los cerdos queda aún por determinar. Las pruebas actuales disponibles indican que el PCV2 no representa un riesgo zoonótico para las personas (Segalés et al., 2005a).

2.5.2 Transmisión

Se piensa que la transmisión del PCV2 ocurre a través de contacto directo vía oronasal, fecal y urinaria (Magar et al., 2000a; Bolin et al., 2001). El contacto directo con cerdos que habían sido inoculados con PCV2 42 días antes, produjo la transmisión del virus a cerdos control (Bolin et al., 2001).

Para valorar la diseminación del PCV2, Shibata y colaboradores, en 2003, inocularon intranasalmente 16 lechones extraídos por cesárea y privados de calostro con PCV2. Mediante PCR se identificó ADN del virus sobre muestras de hisopos orofaríngeos y nasales, heces, sangre entera y suero desde el día 1 al 70 postinoculación.

Mediante el uso de PCR cuantitativa a tiempo real, se analizaron hisopos tonsilares, nasales, traqueobronquiales, urinarios y fecales de cerdos sin y con signos de enfermedad, detectándose ADN de PCV2 en un alto porcentaje de las muestras (el % varía según muestras y tipos), sugiriendo que el virus es excretado a través de las secreciones respiratorias, orales, orina y heces de cerdos tanto sanos como clínicamente afectados de PCVD, con una mayor carga viral en estos últimos (Segalés et al., 2005b).

Otros investigadores analizaron, mediante PCR convencional, muestras de intestino y heces procedentes de animales con y sin enfermedad entérica, detectando ADN viral en 14/54 intestinos y 4/9 muestras de heces de animales enfermos, en 3/14 intestinos y 16/20 muestras de heces de animales sin enfermedad, proponiendo los autores la vía oro-fecal como el mecanismo de transmisión del PCV2 (Yang et al., 2003).

La transmisión vertical ha sido demostrada en cerdas tanto de forma natural como experimental (Ladekjaer-Mikkelsen et al., 2001; O'Connor et al., 2001; Johnson et al., 2002). West y colaboradores, en 1999, describieron la transferencia vertical intrauterina de PCV2 dando lugar a lechones virémicos o persistentemente infectados al nacimiento. En la inoculación intranasal con PCV2 de machos de 7 meses de edad se detectó ADN en muestras de suero a los 4 días post-inoculación en 3 de 4 machos. Sucesivas muestras fueron positivas hasta los 35 post-inoculación, pero negativas a los 90 días post-inoculación. El ADN del virus se detectó en muestras de semen a los 5 días post-inoculación en 2 de los machos y de forma intermitente hasta los 47 días post-inoculación en los 4 machos (Larochelle et al., 2000).

En 46 granjas en Corea se analizó el semen de 98 machos de un año de edad utilizando técnicas de biología molecular y aislamiento viral. Mediante PCR convencional se detectó ADN en 13 muestras, por PCR semianidada en 26 y en 11 muestras se aisló PCV2. Conjuntamente se analizaron las distintas fracciones del semen, determinándose que la mayor cantidad de ADN de PCV2 se encontraba en el fluido seminal y fracción no espermática (Kim et al., 2003e).

En Canadá, en machos infectados naturalmente, el porcentaje de identificación de ADN de PCV2 mediante PCR anidada fue bajo y esporádico, no detectándose en muestras de semen procedentes de machos mayores de 17,5 meses de edad, aunque habría que considerar la posibilidad de que machos seropositivos se comporten como diseminadores continuos (McIntosh et al., 2006). En cuanto a los posibles efectos del virus sobre la composición del semen, no parece afectar a el porcentaje de células espermáticas vivas ni a su morfología (McIntosh et al., 2006). Se ha demostrado experimentalmente que PCV2 puede ser transmitido vía inseminación artificial dando lugar a viremia en las cerdas causando fallos reproductivos (Madson et al., 2009).

2.6 Patogenia de PCVD

Todavía no existe un total conocimiento de la patogenia de enfermedad por PCV2. La depleción linfoide y la linfopenia en sangre periférica es una característica constante en los cerdos que desarrollan clínicamente PCVD (porcine circovirus diseases, enfermedades por circovirus porcino).

Las técnicas de IHQ e ISH (in situ hybridization, hibridación in situ) muestran grandes cantidades de antígeno o ácido nucleico de PCV2 en el citoplasma de macrófagos y células dendríticas reemplazando a los linfocitos en los folículos deplecionados (Allan y Ellis, 2000; Sorden, 2000; Chianini et al., 2003). Sin embargo, la presencia de antígeno de PCV2 en linfocitos es esporádica (Chianini et al., 2003), y aún se desconoce si la reducción de linfocitos en cerdos afectados por PCVD es debida a una producción reducida en la médula ósea, a una reducción de la proliferación en los tejidos linfoides secundarios o a un incremento de la pérdida de linfocitos en médula ósea, sangre periférica, o en tejidos linfoides secundarios vía necrosis o apoptosis inducida por el virus (Opriessnig et al., 2007).

A pesar de la presencia de PCV2 en macrófagos y células dendríticas, estudios *in vitro* sugieren que las células monocíticas no representan la célula blanco principal de la replicación del PCV2 (Gilpin et al., 2003). En dichos estudios se analizó la capacidad de los monocitos y los macrófagos de mantener la replicación de PCV2 *in vitro*, y no se observó replicación en las mismas; sin embargo, el PCV2 no fue degradado en el citoplasma de las células (Gilpin et al., 2003).

Otros autores no encontraron evidencia de replicación *in vitro* en células dendríticas; sin embargo, el PCV2 persistía en las células dendríticas sin perder infectividad o inducir la muerte celular (Vincent et al., 2003). Es posible que el PCV2 se replique en una pequeña subpoblación de dicho tipo celular, aun no adecuadamente identificadas. Una hipótesis sostiene que debido a su capacidad migratoria, las células dendríticas podrían proporcionar un vehículo para el transporte del virus a través del hospedador (Vincent et al., 2003). Otros trabajos realizados *in vitro* e *in vivo* sugieren que el PCV2 sí podría replicarse en macrófagos (Pérez-Martín et al., 2007; Rodríguez-Cariño y Segalés, 2009).

La ruta de entrada del PCV2 en las células diana todavía no ha sido determinada. Sin embargo, algunos resultados preliminares obtenidos *in vitro* usando una línea celular monocítica porcina han mostrado que el PCV2 entra en dichas células mediante endocitosis dependiente de clatrina en un ambiente ácido (Misinzo et al., 2005). Además, se ha demostrado que las células dendríticas (dendritic cell, DC) maduras e inmaduras permiten la internalización del PCV2 mediante micropinocitosis en ausencia de replicación vírica (Vincent et al., 2005).

Cuando el PCVD clínico es evidente, el daño en el sistema inmune es la principal característica en los cerdos afectados (Nielsen et al., 2003, Darwich et al., 2004). La depleción linfocitaria de los tejidos linfoides, cambios en las subpoblaciones de células mononucleares de la sangre periférica (PBMC, peripheral blood mononuclear cell) y la alteración de los patrones de expresión de citoquinas, han sido todos ellos demostrados en cerdos afectados naturalmente y experimentalmente de PCVD sistémico (Clark, 1997; Rosell et al., 1999; Darwich et al., 2002 y 2003a, Nielsen et al., 2003).

Aunque muchos aspectos de la patogenia del PCV2 están aún pendientes de una confirmación e identificación definitiva, se ha propuesto un esquema de la patogenia de los cerdos afectados de PCVD sistémico e infectados subclínicamente por PCV2 en relación a los aspectos inmunológicos de la enfermedad (Darwich et al., 2004).

Se han publicado múltiples intentos dirigidos a reproducir experimentalmente PCVD sistémico. Algunos de los ensayos experimentales iniciales en los que se utilizaron inóculos de tejidos homogenizados (Balasch et al., 1999) o PCV2 aislados y propagados en cultivos celulares (Ellis et al., 1999b, Magar et al., 2000a, Pogranichiniy et al., 2000) solo reprodujeron lesiones histológicas de intensidad leve a moderada similares a las del PCVD sistémico, pero no el síndrome clínico de adelgazamiento.

Sin embargo, en estudios realizados en cerdos privados de calostro e inoculados solo con PCV2 se describió, en un lechón, la enfermedad clínica y lesiones compatibles con PMWS (Allan et al., 1999a; Kennedy et al., 2000; Bolin et al., 2001, Harms et al., 2001; Okuda et al., 2003). Consecuentemente, se ha sugerido que la infección por PCV2, necesita de otros cofactores para el desarrollo de la enfermedad clínica completa en cerdos.

Retrospectivamente, se ha observado que diversos factores, tales como la edad y el origen de los cerdos, condiciones ambientales, la genética de los animales y la naturaleza del inóculo de PCV2 pueden jugar un importante papel en la reproducibilidad experimental de la enfermedad (Segalés et al., 2005a).

Se han descrito modelos de enfermedad de PMWS más consistentes y repetibles usando cofactores infecciosos (Allan et al., 1999a; Krakowka et al., 2000; Allan et al., 2003) y no infecciosos (Krakowka et al., 2001). La reproducción de la enfermedad clínica completa ha sido descrita en un alto porcentaje de cerdos privados de calostro y gnotobióticos co-inoculados con PCV2 y el parvovirus porcino (PPV), o inoculados con un potente inmunoestimulante como la hemocianina en adyuvante incompleto de Freund.

Para aclarar el papel del PCV2 en PCVD sistémico y otras manifestaciones clínicas atribuidas solamente a la infección por PCV2, se desarrolló un clon ADN infeccioso de PCV2 (Fenaux et al., 2002). Mediante este clon ADN infeccioso se ha asegurado la pureza y homogeneidad del inóculo en estudios *in vivo* y ha permitido evaluar los efectos biológicos de los cambios genéticos (Fenaux et al., 2002, 2003 y 2004b; Opriessnig et al., 2006g). Cerdos libres de patógenos específicos (SPF) infectados con el clon ADN de PCV2 desarrollaron lesiones linfoides asociadas a PCV2 (Fenaux et al., 2002). Clínicamente no se observó evidencia de debilidad durante los 35 días de duración del experimento, pero sí se determinó que el PCV fue el causante de las lesiones linfoides características de PCVD (Fenaux et al., 2002).

Un grupo francés demostró que cerdos SPF inoculados con un clon ADN de PCV2 desarrollaron lesiones compatibles con PCVD sistémico (Grasland et al., 2005). Los trabajos con el clon ADN infeccioso apoyan la hipótesis de que el PCV2 es esencial para el desarrollo de PCVD; sin embargo, la mayoría de cepas de PCV2 requieren otros cofactores o elementos para inducir el espectro completo de signos clínicos y lesiones asociadas con casos avanzados de PCVD. Todo esto se ve respaldado por las pruebas de campo, que apoyan la idea de que PCVD posee una causalidad multifactorial y que no todos los cerdos infectados con PCV2 desarrollarán PCVD clínico (Opriessing et al., 2007).

Los factores que actualmente se piensa puedan influir en el desarrollo de la infección por PCV2 pueden desglosarse en 4 grupos: virus, hospedador, coinfecciones y modulación inmune. Los trabajos experimentales han confirmado que al menos estos 4 componentes, identificados hasta la fecha, son claves en los modelos etiopatogénicos de PCVD (Opriessing et al., 2007).

2.6.1 Factores Dependientes del Virus

Es sabido que un alto porcentaje de cerdos clínicamente sanos están infectados por PCV2, mientras que otros desarrollan una enfermedad severa. Hasta la fecha, los análisis genéticos y la comparación de secuencias de aislados de PCV2 no han podido explicar plenamente las diferencias en las manifestaciones clínicas. Los genomas completos de 10 aislados holandeses de PCV2 de granjas afectadas y no afectadas de PCVD fueron secuenciados y cuando se compararon se encontró que tenían una homología del 95,6 % al 100% (Grierson et al., 2004b). No hubo evidencia de ningún patrón constante entre los aislados de PCV2 de cerdos afectados y no afectados, llevando a los autores a la conclusión que las diferencias en las manifestaciones clínicas eran debidas probablemente a otros factores aparte del virus (Grierson et al., 2004b).

Del Éste de Canadá se secuenciaron 34 aislados de PCV2 de granjas con diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad y se encontró que estaban estrechamente relacionadas entre sí y con otras cepas de Canadá, EEUU, Europa y Asia (Larochelle et al., 2002).

Más tarde, en Francia, se determinó la secuencia completa de 38 aislados de PCV2 de granjas afectadas y no afectadas de PCVD, sin embargo, los autores no lograron identificar marcadores moleculares de virulencia. Se concluyó que todas las granjas estudiadas estaban infectadas con aislados de PCV2 estrechamente relacionadas pero diferentes, y que los brotes recientes de PCVD no fueran debidos probablemente a la aparición de un nuevo genotipo de PCV2 (de Boisseson et al., 2004).

En Suecia se describió una cepa del virus que había persistido durante 10 años en una granja SPF sin causar PCVD clínico. La misma fue capaz de inducir la enfermedad sistémica en cerdos bajo condiciones experimentales (Allan et al., 2003; Hasslung et al., 2005). Cuando la compararon con una cepa de referencia reciente de PCV2 de Canadá (PCV2-1010), se encontró que ambos aislados eran altamente virulentos en el modelo de coinfección PCV2-parvovirus porcino (PPV), esto llevó a la conclusión general de que la virulencia del aislado sueco era igual o incluso mayor al de la cepa de referencia más reciente encontrada en Canadá (Hasslung et al., 2005).

Los estudios sobre la elaboración y caracterización de 2 clones quiméricos de ADN infecciosos de PCV1 y PCV2 han proporcionado mayor entendimiento sobre los factores dependientes del virus (Fenaux et al., 2004a). El virus quimérico PCV1-2 (contiene el gen de la cápside de PCV2 clonado en el genoma del PCV1 no patógeno) indujo experimentalmente una fuerte respuesta específica de anticuerpos frente al antígeno de cápside del PCV2 patogénico con lesiones mínimas o sin lesiones, nivel bajo y reducida duración de viremia, y bajos o no detectables niveles de antígeno viral en tejidos linfoides (Fenaux et al., 2003 y 2004a).

Un grupo de investigadores describió dos mutaciones de aminoácidos en la proteína de la cápside de PCV2 después de 120 pases seriados en cultivo celular que dieron lugar a la atenuación del virus *in vivo* (Fenaux et al., 2004b). Igualmente se observaron diferencias significativas en las lesiones macro y microscópicas de los cerdos inoculados con el aislado salvaje de PCV, siendo más graves que las causadas por aislados atenuados. Esto demostró que cambios mínimos en el genoma de aislados de PCV2 pueden alterar considerablemente la virulencia del virus (Fenaux et al., 2004b).

También se han estudiado las posibles diferencias de virulencia entre los aislados de campo de PCV2 del Medio Oeste de USA con una homología del 98% en ácidos nucleicos y 96,1% en aminoácidos en ORF2 (Opriessnig et al., 2006g). Uno de los aislados, el PCV2 ISU-40895 fue obtenido de un caso con severa depleción linfoide e inflamación asociados a gran cantidad de antígeno de PCV2 compatible con PCVD. El aislado PCV2 ISU-4838 fue identificado de un caso sin lesiones asociadas a PCV2. Cuando ambos fueron utilizados en experiencias *in vivo* usando cerdos SPF, los autores observaron que los aislados de PCV2 con mínimas diferencias genómicas pueden diferir de manera importante en virulencia, medida ésta por los niveles de carga viral en suero y tejidos, así como la gravedad de las lesiones asociadas a PCV2 (Opriessnig et al., 2006g).

Desde finales de 2004, se ha observado en Ontario, Canadá, un aumento de la incidencia y gravedad, y un cambio en las manifestaciones clínicas de PCVD. Veterinarios clínicos, e investigadores han manifestado la observación de nuevas lesiones patológicas en Ontario, incluyendo edema pulmonar, enteritis granulomatosa, depleción linfoide más severa con gran cantidad de cuerpos de inclusión y necrosis linfoide asociadas a antígeno de PCV2. El análisis de los aislados de PCV2 demostró un cambio en la secuencia génica (DeLay et al., 2005; Gagnon et al., 2007; Carman et al., 2008).

Posteriormente se han realizado descripciones similares de aumento de la incidencia y severidad de PCVD asociada con un reciente genotipo emergente en EEUU, el PCV2 tipo 1 (PCV2b) (Cheung et al., 2007). No se han descrito aislados de dicho genotipo en EEUU antes de 2005, pero parece estar asociado con los brotes de PCVD en 2006 en Kansas, Carolina del Norte e Iowa (Cheung et al., 2007). El PCV2 tipo 1 (PCV2b) ya había sido descrito con anterioridad en Europa y Asia (Mankertz et al., 2000; Wen et al., 2005).

Se desconoce si el aumento de la detección de PCV2 tipo 1 (PCV2b) se debe a un cambio de su virulencia, a una nueva introducción en el área (p.e., vía semen, etc.), o si otro factor X puede apoyar el aumento de replicación de un genotipo PCV2 previamente insignificante (Opriessnig et al., 2007).

La teoría del factor X se basa en un estudio realizado en 116 granjas inglesas entre 2003 y 2004 (Woodbine et al., 2007). Las principales conclusiones de este trabajo fueron que el PMWS se comportó como un proceso epidémico a través de una población no expuesta previamente sin asociación causal obvia entre PMWS y antígenos y anticuerpos de PCV2 e

indicativa de un agente infeccioso nuevo. De forma similar, un grupo de investigación de Nueva Zelanda, encontró que el PMWS puede ser transmitido a cerdos sanos vía contacto directo o indirecto, pero la exposición de cerdos solo a PCV2 no causó enfermedad, lo que indica que un agente transmisible distinto al PCV2 es necesario para el PMWS (Jaros et al., 2006).

2.6.2 Factores Dependientes del Hospedador

Existen varios trabajos que pretenden determinar la susceptibilidad a la infección por PCV2 en las distintas razas de cerdos, habiéndose observado PCVD clínico en una amplia variedad de cerdos de raza pura e híbridos (Opriessnig et al., 2007). Para ello, se llevó a cabo un estudio de cohorte para investigar una supuesta susceptibilidad reducida de los cerdos Pietrain a PCVD en 4 granjas afectadas de PMWS. La mitad de las hembras fueron inseminadas con semen de Pietrain, mientras que el resto de las hembras recibieron el semen que se usaba habitualmente en esas granjas. La enfermedad asociada a PCV2 en los lechones Pietrain no se diferenciaba de la observada en otros cerdos en esas granjas en términos de seroconversión a PCV2, morbilidad y mortalidad (Rose et al., 2004).

En contraposición, un estudio de campo usando 2 piaras iguales de 5000 cerdas con 3 líneas genéticas paternas diferentes (100% Pietrain, 50% Large White/50% Pietrain, 25% Large White/75% Duroc) demostró que, bajo las condiciones de dicho estudio de campo, la genética del hospedador influía en la expresión de PCVD manifiesta como incremento de la mortalidad en los lechones de la línea paternal Large White/ Duroc comparada con los lechones de las otras dos líneas (López-Soria et al., 2004).

Un proyecto piloto controlado ha investigado la susceptibilidad del hospedador y su efecto en el desarrollo de la infección por PCV2 (Opriessnig et al., 2006a). En dicho estudio se compararon tres razas: Duroc, Landrace, y Large White. La incidencia del PCVD sistémico basado en las lesiones macro y microscópicas fue de 0% (0/23) en Duroc, 15,8% (3/19) en Landrace, y 0% (0/21) en Large White. Los cerdos de raza pura Landrace fueron claramente más susceptibles a las enfermedades asociadas a PCV2, interpretada y medida en la severidad de los signos clínicos y lesiones microscópicas asociadas a PCV2 (Opriessnig et al., 2006a).

Otras infecciones experimentales usando el mismo aislado de PCV2, en un pase de cultivo celular similar y dosis, fallaron en inducir PCVD clínica en cerdos híbridos SPF (Fenaux et al., 2002, 2003, 2004a y 2004b; Hoogland et al., 2006; Opriessnig et al., 2003; 2004a, 2004b, 2006b y 2006e). Por otra parte, se indujo experimentalmente PCVD sistémico en cerdos híbridos Landrace/Large White privados de calostro, inoculados con un aislado de PCV2 procedente de un cerdo Yorkshire infectado subclínicamente, sugiriendo factores dependientes del hospedador y/o ambientales asociados al desarrollo de PMWS (Allan et al., 2003).

La correlación entre el tipo de respuesta inmune adaptativa contra PCV2 y el nivel de replicación del virus ha aportado pruebas de variaciones en el hospedador en el inicio de la respuesta inmune adaptativa, que podrían explicar las diferencias en la replicación del PCV2 y manifestaciones clínicas y desarrollo de PCVD entre los cerdos (Meerts et al., 2005b). Un estudio *in vitro* sobre los patrones de replicación del PCV2 en los macrófagos alveolares encontró claras diferencias entre los macrófagos de diferentes cerdos híbridos convencionales, sugiriendo diferencias en la susceptibilidad a PCVD (Meerts et al., 2005a). Aunque las pruebas clínicas y experimentales son mínimas, se están realizando más estudios sobre las diferencias de susceptibilidad del hospedador frente a PCVD.

2.6.3 Efecto de las Coinfecciones

Los animales afectados de PMWS muestran un amplio espectro de infecciones concomitantes (Grau-Roma et al., 2011). Las coinfecciones experimentales en cerdos con PCV2 y otros virus, tales como PPV (Allan et al., 1999a y 2000d; Kennedy et al., 2000; Krakowka et al., 2000; Opriessnig et al., 2004a), el virus del PRRS (Allan et al., 2000a; Harms et al., 2001; Rovira et al., 2002), o bacterias como *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mh) (Opriessnig et al., 2004b), han demostrado que cuando participan otros agentes bacterianos y/o víricos, la carga viral de PCV2 aumenta, así como las lesiones asociadas a PCV2 y la incidencia de PCVD. De hecho, el efecto potenciador de las coinfecciones sobre la replicación y la enfermedad por PCV2 fue detectado accidentalmente cuando se inocularon cerdos gnotobióticos con material filtrado de cultivo celular y tejidos linfoides de cerdos infectados naturalmente con PCVD (Ellis et al., 1999b). Los cerdos inoculados experimentalmente desarrollaron PCVD clínica; y *a posteriori* se detectó que el inóculo contenía PCV2 y PPV, responsables de la infección y los signos clínicos de la enfermedad en los cerdos inoculados.

Las coinfecciones con PCVD más frecuentemente encontradas en 484 cerdos estudiados en EEUU fueron: PRRSV en el 51,9% (251/484) de los casos, Mh en el 35,5% (172/484), septicemia bacteriana y/o neumonía en el 21,6% (105/484), Virus de la influenza porcina (SIV) en el 5,4% (26/484), siendo la infección única por PCV2 del 1,9% (9/484) (Pallarés et al., 2002). La infección simultánea de PCV2 y virus de la Enfermedad de Aujeszky (ADV) fue demostrada en cerdos asociada a tonsilitis y linfadenitis necrotizante multifocal (Rodríguez-Arrijo et al., 1999), esporádicamente en casos de PNP, (Grau-Roma y Segalés, 2007) así como en otros brotes de PCVD (Quintana et al., 2001).

Se ha sugerido que la infección de los cerdos con PCV2 o la coinfección con PRRSV y PCV2 podría ser responsable de la clínica y lesiones atribuidas a una infección atípica por PRRSV (Ellis et al., 1999a). En dicho trabajo se demostró la presencia de ácido nucleico de PCV2 en 2 de los 5 aislados de PRRSV de 5 diferentes estados de EEUU.

Se ha descrito que en más del 60% de los casos diagnosticados como PMWS en el medio-oeste de EEUU, existía coinfección con PRRSV (Sorden et al., 1998). Por el contrario, solo en un 20% de los casos de PMWS en el oeste de Canadá se observó coinfección con PRRSV. Estos resultados dispares podrían ser el reflejo de la prevalencia del PRRSV (Allan y Ellis, 2000).

En el 13% de los cerdos infectados por PCV2 en el oeste de Canadá se ha demostrado coinfección con el parvovirus porcino (PPV) (Ellis et al., 2000a). Este tipo de coinfecciones por PCV2 y PPV también han sido descritas en Europa (Allan et al., 1999a).

En un estudio caso-control en cerdos con historial clínico de adelgazamiento progresivo y lesiones microscópicas características de PCVD, y en cerdos control sin signos clínicos ni lesiones microscópicas típicas de PCVD se identificaron los siguientes virus: PCV2, PRRS, PPV, enterovirus porcino tipo 1 y 3 (porcine enterovirus, PEV), virus de la influenza porcina (swine influenza virus, SIV), coronavirus respiratorio porcino (porcine respiratory coronavirus, PRCV), retrovirus endógeno porcino (porcine endogenous retrovirus, PERV), herpesvirus linfotrópico porcino tipo 1 (porcine lymphotropic herpesvirus type 1, PLHV-1). El PCV2 fue el que tenía la asociación más fuerte con PCVD, y el riesgo de PCVD era mucho mayor si existía coinfección con PCV2/PRRSV (Pogranichniy et al., 2002).

Se sugiere que no hay un único copatógeno (agente X) que pueda ser atribuido a una mayor prevalencia y severidad de la enfermedad PCVD. Lo más probable es que diversos

organismos patógenos y no patógenos conocidos y desconocidos (agente X), que varían de una región geográfica a otra, sean los factores desencadenantes de la progresión de la infección de PCV2 a PCVD (Opriessnig et al., 2007).

2.6.4 Efectos de la Modulación Inmunológica o del Estado Inmune

2.6.4.1 Inmunoestimulación.

Diversos estudios han demostrado que la inmunoestimulación con agentes infecciosos y no infecciosos puede desencadenar la progresión de la infección de PCV2 hacia la enfermedad y lesiones características de PCVD (Ellis et al., 1999b, Krakowka et al., 2000 y 2001), probablemente por un aumento del número de células sensibles o tolerantes a la replicación del PCV2 entrando en la fase S de su ciclo celular (Ellis et al., 1999b; Krakowka et al., 2000), una condición necesaria para la replicación del virus (Tischer et al., 1987).

Krakowka y colaboradores en 2001, reprodujeron PCVD clínico en cerdos gnotobióticos estimulados con hemocianina en adyuvante incompleto de Freund e inoculados con PCV2. Basándose en este trabajo inicial, ha habido un considerable interés sobre el efecto de los adyuvantes vacunales y en la severidad de la enfermedad inducida por PCV2. Existen diversos trabajos que apoyan la hipótesis de que pautas comunes de vacunación, bajo determinadas circunstancias, podrían realmente aumentar PCVD (Allan et al., 2001; Kyriakis et al., 2002; Opriessnig et al., 2003).

Por el contrario, otros autores han demostrado que PCVD podría ser inducido por la infección de PCV2 sin coinfección o inmunoestimulación, lo que implicaría el papel de patógeno primario en algunos casos de PCV2 (Balasch et al., 1999; Bolin et al., 2001; Ladekjaer-Mikkelsen et al., 2002).

Además del tipo de vacuna utilizada, otros factores, tales como el momento de vacunación con adyuvante y la edad de los cerdos también podría influir en el resultado clínico de la infección por PCV2 (Opriessnig et al., 2007).

Opriessnig y colaboradores en 2006, no observaron una mayor severidad de las lesiones asociadas a PCV2, después de utilizar una vacuna comercial de Mh, en los animales de 2 a 4 semanas y posteriormente inoculados con PCV2 (Opriessnig et al., 2006b).

En otra línea, se estudió el efecto de los diferentes adyuvantes (oleoso, acuoso e hidróxido de aluminio) de vacunas comerciales y experimentales frente a Mh, como probables inductores de aumentar la replicación de PCV2, la incidencia de la enfermedad y las lesiones asociadas a PCV2. Para ello, se vacunaron, por vía intramuscular, cerdos a las 4 y 6 semanas de edad y se inocularon intranasalmente a las 6 semanas de edad con PCV2. Se observó que en el grupo que recibió adyuvante oleoso, la viremia fue de mayor duración, se detectó mayor cantidad de PCV2 en suero y tejidos y se produjo una mayor depleción linfocítica en comparación con los grupos que fueron vacunados con adyuvante acuoso o hidróxido de aluminio. (Hoogland et al., 2006).

2.6.4.2 Inmunosupresión.

Para evaluar el efecto de la inmunosupresión, doce cerdos gnotobióticos con 1 día de vida fueron inoculados por vía oronasal con PCV2. Cuatro de ellos recibieron ciclosporina oral en dosis diarias y otros 4 cerdos recibieron corticoesteroides (suspensión de acetónido de triamcinolona) intramuscular 2 veces por semana. El primer tratamiento dio lugar a un aumento de la replicación de PCV2 en los tejidos e indujo la diseminación de PCV2 a los hepatocitos, no observándose reacciones inflamatorias típicas de PCVD, aunque los tejidos tenían gran cantidad de virus. Estos resultados proponen que las lesiones inflamatorias granulomatosas son inmunomediadas (Krakowka et al., 2002).

Por otra parte, en otro estudio, donde se utilizaron 7 cerdos obtenidos por cesárea y privados de calostro, e inoculados con PCV2 intranasal e intraperitonealmente, los tres animales que fueron tratados con dexametasona a los 8 días de edad desarrollaron linfadenitis granulomatosa, que no se observó en los cerdos inoculados solo con PCV2. Por tanto, los autores concluyeron que el tratamiento con dexametasona influyó en la infección por PCV2 de los tejidos linfocíticos y que la supresión de la inmunidad mediada por células podría jugar un papel en la etiología de PCVD (Kawashima et al., 2003).

2.7 Inmunidad

2.7.1 Respuesta Inmune a PCV2 y Protección

La mayoría de la granjas de cría y de las reproductoras dentro de esas granjas, son seropositivas a PCV2 (Magar et al., 2000b; Walker et al., 2000; Opriessnig et al., 2004c). Bajo condiciones de campo, los anticuerpos calostrales disminuyen durante los periodos de lactación y transición, seguido de una seroconversión activa (Rodríguez-Arrijoja et al., 2002; Blanchard et al., 2003; Larochelle et al., 2003). La media de vida de los anticuerpos maternos frente a PCV2 en animales destetados se ha estimado en 19 días, y el plazo para la disminución de los anticuerpos pasivos frente a PCV2, dentro de la población, es relativamente amplia. Los anticuerpos anti-PCV2 adquiridos pasivamente presentes a los 10-12 días de edad, empiezan a disminuir por debajo de los niveles de corte del ELISA aproximadamente, a las $4,9 \pm 1,2$ semanas de edad en los lechones con niveles bajos de anticuerpos al destete, aproximadamente a las $8,1 \pm 1,9$ semanas de edad en los lechones con niveles moderados de anticuerpos al destete, y aproximadamente a las $11,1 \pm 2,5$ semanas de edad en los lechones con niveles altos de anticuerpos pasivos al destete (Opriessnig et al., 2004c).

La seroconversión activa ocurre normalmente sobre las 7-12 semanas de edad y los anticuerpos pueden durar al menos hasta las 28 semanas de edad en casos naturales (Rodríguez-Arrijoja et al., 2002).

En cerdos infectados experimentalmente, se ha demostrado que la seroconversión a PCV2 ocurre entre los 14 y 28 días postinfección (PI) (Allan et al., 1999a; Balasch et al., 1999; Pogranichniy et al., 2000) Dicha seroconversión se ha comprobado en animales infectados experimentalmente con y sin enfermedad clínica (Bolin et al., 2001; Rovira et al., 2002) pero algunos estudios muestran que los animales enfermos clínicamente seroconvierten mas tarde (Okuda et al., 2003).

En estudios experimentales y de campo se ha observado que el PMWS aparece al final de la transición y en cebo lo que podría estar asociado con la inmunidad maternal protectora contra el desarrollo del PMWS (Allan et al., 2002b; Rodríguez-Arrijoja et al., 2002; Ostanello et al., 2005; Calsamiglia et al., 2007).

Tanto en condiciones naturales como experimentales, se ha observado que títulos bajos de anticuerpos frente a PCV2 en las cerdas están positivamente relacionados con la mortalidad de los lechones, sugiriendo que los anticuerpos maternos frente a PCV2, inmunidad pasiva, tienen un efecto protector sobre el desarrollo de PMWS en los lechones (Allan et al. 2002b; McKeown et al., 2005; Ostanello et al., 2005). Mediante infección experimental se demostró que animales jóvenes no expuestos previamente son susceptibles a la enfermedad (Allan et al., 1999a; Kennedy et al., 2000; Bolin et al., 2001; Harms et al., 2001; Krakowka et al., 2001) mientras que los signos de PMWS en el campo suelen aparecer en etapas más tardías y de finalización, coincidiendo con el declive de los anticuerpos maternos (Rodríguez- Arrijoja et al., 2002; Rose et al., 2003; Sibila et al., 2004).

Por otra parte, otros estudios de campo no han mostrado un efecto protector significativo contra PMWS en asociación con altos niveles de anticuerpos séricos derivados del calostro frente a PCV2 (Hassing et al., 2004). Aunque la respuesta inmune humoral frente a PCV2 en campo tiene lugar sobre los 2-3 meses de edad, un porcentaje variable de cerdos en la fase de engorde-cebo pueden ser virémicos, sugiriendo que los anticuerpos frente a PCV2 no son totalmente protectores frente a la infección (Rodríguez-Arrijoja et al., 2002; Larochelle et al., 2003; Sibila et al., 2004).

Esta situación también parece ocurrir en cerdos adultos bajo condiciones naturales de infección ya que se pueden infectar pero no mostrar signos clínicos aparentes o detectables. Todavía no se sabe, si esto es debido a la inmunidad humoral frente a PCV2 o a una resistencia natural por la edad (Segalés et al., 2005a).

Los estudios sobre anticuerpos neutralizantes han mostrado que estos se producen durante el curso de las infecciones naturales y experimentales con PCV2 (Pogranichniy et al., 2000; Meerts et al., 2005b y 2006), y su ausencia ha sido asociada con una replicación viral activa dando lugar al desarrollo de PMWS (Meerts et al., 2006). El descenso de la viremia coincidía con el aumento del título de anticuerpos neutralizantes, lo que sugiere que la circulación viral en sangre se reduce por neutralización mediada por anticuerpos, siendo posiblemente un importante mecanismo en la eliminación del virus y en la recuperación de la infección (Fort et al., 2007).

2.7.2 Interacción entre PCV2 y el Sistema Inmune en PCVD

El efecto del PCV2 sobre el sistema inmune en cerdos afectados de PMWS y cerdos infectados subclínicamente por PCV2 no ha sido caracterizado completamente. Se ha demostrado experimentalmente que la estimulación y/o activación del sistema inmune de los cerdos infectados con PCV2 por parte de algunos virus o factores no infecciosos favorece la replicación de PCV2 e incrementa la carga viral en tejidos y suero (Allan et al., 1999a; Krakowka et al., 2000 y 2001; Harms et al., 2001; Rovira et al., 2002), indicando que la infección de PCV2 y la inmunoestimulación pueden ser eventos cruciales en el desarrollo del PMWS (Krakowka et al., 2001).

En cambio, las lesiones microscópicas típicas en los tejidos linfoides de los cerdos afectados por PMWS (Clark, 1997; Rosell et al., 1999), la asociación de la enfermedad con patógenos oportunistas (Clark, 1997; Carrasco et al., 2000; Núñez et al., 2003; Segalés et al., 2003b), y otros cambios en las subpoblaciones celulares inmunes de los tejidos linfoides y en las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) (Segalés et al., 2001; Darwich et al., 2002 y 2003b; Chianini et al., 2003; Nielsen et al., 2003) son características frecuentes del PMWS en cerdos afectados de forma grave, sugiriendo un estado de inmunosupresión en los cerdos enfermos (Segalés et al., 2004a).

Estudios de casos naturales de PMWS han mostrado que los cerdos con enfermedad clínica tienen una evidente y significativa alteración de los patrones de expresión del mRNA de diversas citoquinas pro-inflamatorias y reguladoras en diferentes tejidos linfoides (Darwich et al., 2003b). Sin embargo, no está claro si estos perfiles alterados están relacionados con el desarrollo del PMWS o son consecuencia de la dinámica de la población celular gravemente afectada en los tejidos linfoides de los animales enfermos, cuando se compara con animales no enfermos (Segalés et al., 2005a).

Se ha descrito una sobreexpresión significativa del mRNA de IL-10 en el timo de cerdos afectados de PMWS comparado con animales no enfermos, que se ha asociado con depleción tímica y atrofia de dicho órgano (Darwich et al., 2003b). Por el contrario, Sipos y colaboradores en 2004, no encontraron diferencias significativas en la expresión de citoquinas en sangre y tejidos procedentes de casos de campo de cerdos afectados de PMWS cuando se compararon con cerdos no afectados, y concluyeron que la respuesta inmune a PMWS no se caracterizaba por un perfil de citoquinas basada en Th1 ni por un perfil indicativo de inmunosupresión de

células T. Sin embargo, los mismos autores sugieren que los animales estudiados probablemente estaban en la fase de remisión de la enfermedad (Sipos et al., 2004).

Estudios sobre muestras secuenciales de sangre de cerdos infectados experimentalmente con PCV2 han indicado un incremento en la producción de IL-10 en los animales afectados de PMWS en comparación con los infectados subclínicamente. Este incremento solo se detectó de forma tardía en el curso de la infección y coincidía con el inicio de la enfermedad, no pudiéndose determinar si esto contribuye, distingue o define el desarrollo del PMWS o solo es una consecuencia de la enfermedad (Stevenson et al., 2004 y 2006). También se observó un descenso prematuro de interferón en los cerdos infectados que desarrollaron PMWS, comparativamente con los cerdos que se mantenían infectados subclínicamente. Se concluyó que la incapacidad de algunos cerdos infectados por PCV2 para producir interferón en las primeras etapas de la infección podría ser un factor clave en la respuesta inmune inadecuada frente a la infección por PCV2, lo que favorecería el desarrollo de la enfermedad (Stevenson et al., 2004 y 2006).

La reducción en la producción de interferón y el aumento en la producción de IL-10 en cerdos infectados experimentalmente por PCV2 y que han desarrollado PMWS ha sido confirmada por otros autores usando diferentes modelos experimentales (Hasslung et al., 2005). Estos efectos están probablemente relacionados con genes identificados en el genoma de PCV2 que inhiben la producción de interferón alfa (IFN- α) (Hasslung et al., 2003).

Estudios *in vitro* de PBMC de cerdos sanos y afectados de PMWS han revelado efectos sustanciales y específicos (alteración y/o disminución) en la capacidad funcional de PBMC de cerdos afectados de PMWS en términos de liberación de citoquinas (Darwich et al., 2003a). Por otro lado, no se han visto diferencias específicas en la expresión de marcadores de superficie celular de PBMC o de macrófagos alveolares expuestos *in vitro* a PCV2 cuando se comparaban con los grupos control (Gilpin et al., 2001; Vincent et al., 2003).

La infección *in vitro* por PCV2 de células dendríticas (DC) sanguíneas y plasmocitoides así como de precursores de DC, ha mostrado que el virus no inhibe la diferenciación de DC y que dichas células mantienen la capacidad de producir citoquinas proinflamatorias, de procesar y presentar antígenos a los linfocitos T (Vincent et al., 2005). Sin embargo, el PCV2 parece ser capaz de dañar el efecto de CpG-ODN (secuencias dinucleótidas de citosina fosfato guanina, que se encuentran en el genoma de las bacterias y algunos virus y son reconocidas como

señales de peligro por el sistema inmune) sobre las DC plasmocitoides (células productoras de interferón natural, NIPC, natural interferon-producing cells,) mediante la inducción de la inhibición de IFN- α y TNF- α . Las defensas innatas dependientes de IFN- α y TNF- α , tales como efectos antivirales directos, maduración de DC, activación de las células natural killer (NK), así como la promoción de las respuestas específicas de células T y B, se volverían ineficaces o inefectivas (Fitzgerald-Bocarsly, 2002; Fonteneau et al., 2004; Liu, 2004; Vincent et al 2005). Mientras que esto podría tener un valor potencial para la supervivencia del PCV2, también daría lugar a una reducción de la eficiencia frente a infecciones adicionales. Por lo tanto, la supresión de la función de las NIPC por parte del PCV2 afectaría a la capacidad del hospedador para combatir infecciones secundarias o paralelas (Vincent et al., 2005).

Se ha reconocido que la etiología de las enfermedades asociadas a PCV2 puede incluir la infección por agentes secundarios o la activación del sistema inmune (Allan et al., 1999a; Krakowka et al., 2000 y 2002). El medio por el cual esto ocurre podría estar relacionado con el hecho de que las DC y macrófagos acumulan el virus (Gilpin et al., 2003; Vincent et al., 2003) proporcionando un medio de transporte del PCV2 a diversos lugares del cuerpo, lo que explicaría el hecho de que animales sintomáticos muestren histiocitos positivos a PCV2 en la mayoría de tejidos y órganos (Rosell et al., 1999; Krakowka et al., 2002). Esta extensa distribución del virus facilitaría la interacción con otras células tales como NIPC en las mucosas, donde la eficacia de la actividad de las NIPC es esencial para el control de la entrada de patógenos (Vincent et al., 2005).

Los mecanismos responsables de la depleción linfocitaria e inmunodeficiencia asociadas a la infección por PCV2 han sido poco estudiados. Algunos autores han señalado a la apoptosis como el mecanismo de depleción de células B en los linfonodos (Shibahara et al., 2000), sin embargo, otros estudios no apoyan esta hipótesis, demostrando que la apoptosis no es una característica notable en el desarrollo de las lesiones linfoides en el PMWS (Mandrioli et al., 2004; Resendes et al., 2004a). Por otra parte, hay evidencias de que la proliferación linfocítica podría estar inhibida en el timo y en los órganos linfoides secundarios (Darwich et al., 2003b; Mandrioli et al., 2004).

De la misma manera, se dispone de poca información respecto a la interacción entre el sistema inmune y PCV2 en otras PCVD. Se ha sugerido que un excesivo título de anticuerpos frente a PCV2 puede desencadenar el desarrollo de PDNS (Wellenberg et al., 2004b), pero por el momento no se ha podido demostrar experimentalmente. Por otra parte, el perfil de

citoquinas y las variables hematológicas de los cerdos con PDNS indicarían un estado proinflamatorio, apoyando una tendencia Th1 en estos animales (Sipos et al., 2005). Sin embargo, en dicho estudio no se dio una descripción patológica detallada de los animales, y no se observó diferencia en los niveles de urea y creatinina entre PDNS y PMWS (Segalés et al., 2005a; Sipos et al., 2005).

La forma reproductiva de PCVD parece ser bastante infrecuente en condiciones de campo. Esto podría ser debido a la seroprevalencia generalizada frente a PCV2 en los cerdos adultos, que daría como resultado que las piaras de reproductores fueran inmunes al virus y, por lo tanto, no susceptibles a la enfermedad clínica (Sánchez et al., 2001b; Pensaert et al., 2004).

2.8 Enfermedades Asociadas a PCV: Signos Clínicos y Lesiones

2.8.1 PCV1

El PCV1 se considera un virus no patogénico (Tischer et al., 1986; Allan et al., 1995). Sin embargo, dicho virus se ha aislado de lechones nacidos muertos. La ausencia de anticuerpos frente a PCV1 en el suero fetal sugiere que la infección transplacental es extremadamente rara y ocurre antes de la inmunocompetencia fetal. (Allan et al., 1995).

En cuanto a la inoculación experimental con PCV1, si bien se observó seroconversión, ningún animal mostró signos clínicos de enfermedad ni presentó lesiones macro ni microscópicas (Tischer et al., 1986). En un estudio similar no se logró reproducir la enfermedad clínica, sin embargo, en este caso se pudo demostrar, mediante inmunofluorescencia, la presencia de antígeno viral en tejidos del sistema linfoide, pulmón e intestino. El virus se localizó principalmente en el bazo, timo y pulmón, y se asoció a células monocíticas/macrofágicas, por lo que se concluyó que la infección por PCV1 podría comprometer el sistema inmune porcino (McNeilly et al., 1996).

2.8.2 PCV2

En 1996 se publicó la descripción de un síndrome de adelgazamiento o desmedro identificado, por primera vez en 1991, en granjas de alto estatus sanitario (SPF) en el oeste de Canadá (Clark, 1996b; Harding, 1996). Este síndrome se caracterizaba por la pérdida progresiva de la condición corporal junto con la presencia de lesiones en múltiples órganos, los autores propusieron el término de "Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome" (PMWS, síndrome multisistémico de adelgazamiento postdestete). En las lesiones multisistémicas se detectó ácido nucleico y antígeno de PCV2, al tiempo que se pudo aislar y caracterizar el virus. (Ellis et al., 1998).

La asociación de PCV con neumonía intersticial y linfadenopatía fue descrita en California en 1996 al detectarse, mediante ISH, ADN de PCV en muestras de pulmón y linfonodo en un cerdo de 6 semanas de edad (Daft et al., 1996). Posteriormente el aislamiento del virus y su caracterización demostró que se trataba del PCV2 (Allan et al., 1998a).

En Francia en 1996, se describió una enfermedad debilitante, aunque inicialmente, no se pudo identificar el agente causal (Albina et al., 1996). Posteriormente, se identificó PCV2 en los animales afectados (Allan et al., 1998a). Un año más tarde en España, también fue descrita una enfermedad asociada al PCV2 que cursaba con adelgazamiento (Segalés et al., 1997).

En Canadá, PMWS ha sido diagnosticado principalmente en granjas de alto estatus sanitario, libres de las principales enfermedades digestivas y respiratorias que afectan al ganado porcino incluyendo neumonía por *Actinobacillus* spp., *Mycoplasma* spp., rinitis atrófica, salmonelosis, disentería porcina, gastroenteritis transmisible y pseudorabia. Dichas granjas así como muchas otras en las que se ha diagnosticado el PMWS eran negativas al virus del síndrome respiratorio y reproductor porcino (PRRSV), de ciclo cerrado, 1 o 2 fases, de cría de lechones y cebaderos con un número de 50 a 1200 madres (Ellis et al., 1998; Harding et al., 1998).

Desde estos primeros casos descritos de PMWS asociado a PCV2, dicha enfermedad ha sido identificada en casi todos los países productores de porcino en el mundo (Clark, 1997; Harding, 1997; LeCann et al., 1997; Segalés et al., 1997; Kiupel et al., 1998; Spillane et al., 1998; Choi y Chae, 1999; Hinrichs et al., 1999; Onuki et al., 1999; Choi et al., 2000b; Kiss et al., 2000; Vyt et al., 2000; Wellenberg et al., 2000; Borel et al., 2001; Trujano et al., 2001;

Celer y Carasova, 2002; Sarradell et al., 2002; Saoulidis et al., 2002; Lawton et al., 2004; Wallgren et al., 2004).

En España, Reino Unido y Japón, los estudios retrospectivos realizados en muestras de cerdos procedentes de archivos histológicos desde 1986 y 1989, en los cuales se diagnosticaron lesiones de PMWS, se detectó abundante antígeno de PCV2 (Mori et al., 2000; Rodríguez-Arriola et al., 2003b; Grierson et al., 2004a). En otras valoraciones retrospectivas, se han encontrado evidencias de infección por PCV2 en cerdos desde 1969 (Sánchez et al., 2001b). Por lo tanto, hay quien piensa que el PMWS no debería considerarse una nueva enfermedad, ni el PCV2 un nuevo virus.

Dado que el PCV2 es ubicuo en la población porcina y la infección no equivale necesariamente a enfermedad, Sorden, en 2000, propuso una definición de caso de PMWS. Basándose en dicha definición, el diagnóstico de PMWS requiere 1) la presencia de signos clínicos tales como debilidad, pérdida de peso, con o sin disnea o ictericia; 2) la presencia de lesiones microscópicas típicas asociadas a PCV2 (depleción linfocítica y/o infiltrado histiocítico en tejidos linfocíticos u otros órganos), y 3) antígeno o ácido nucleico de PCV2 asociado a las lesiones microscópicas, detectado mediante IHQ o ISH (Sorden, 2000).

Al poco tiempo se hizo evidente que el PMWS describía solo una porción de las enfermedades asociadas a PCV2. Por ejemplo, se puede detectar gran cantidad de antígeno de PCV2 en cerdos adultos o incluso fetos y neonatos que no manifiestan debilidad, o se puede encontrar antígeno de PCV2 únicamente en un sistema orgánico que no sea tejido linfocítico, como pulmón o intestino. Por tanto, en 2002, se propuso que las abreviaciones existentes, incluido el PMWS, deberían sustituirse por la de "Enfermedad por Circovirus Porcino" o PCVD (porcine circovirus disease) (Allan et al., 2002a). Esta nomenclatura se usa en Europa para englobar las enfermedades asociadas a PCV2 (Segalés et al., 2005a). Así mismo, en 2012 se propuso una terminología para los diferentes síndromes o expresiones de PCVD y que incluye la infección subclínica (PCV2 subclinical infection, PCV2-SI); enfermedad sistémica (PCV-2 systemic disease, PCV2-SD), donde se incluiría el PMWS; enfermedad respiratoria (PCV-2 lung disease, PCV2-LD) que incluiría también PNP; enfermedad entérica o enteritis (PCV-2 enteric disease, PCV2-ED); enfermedad o fallo reproductivo (PCV-2 reproductive disease PCV2-RD); y síndrome de dermatitis y nefropatía porcina (PDNS) (Segalés, 2012).

En Norte América, consideraban que cualquier término nuevo usado en conexión con PCV2 debería incluir la palabra “asociado”, lo cual llevó a la creación e introducción del término “enfermedad asociada al circovirus porcino” o PCVAD (porcine circovirus associated disease), propuesto en marzo del 2006 por la Asociación Americana de Veterinarios de Porcino (American Association of Swine Veterinarians, AASV). Hay muchas razones por las cuales el término debilidad o debilitante ha sido eliminado de la definición de caso y categorizaciones: 1) debilidad o debilitante es un término clínico subjetivo usado normalmente en referencia a la pérdida de peso, 2) la pérdida de peso o incapacidad para ganar peso es común en animales con una amplia variedad de diferentes enfermedades infecciosas y no infecciosas, y 3) el término debilidad o debilitante podría asociarse incorrectamente con encefalopatías espongiiformes transmisibles observadas en cérvidos (Opriessnig et al., 2007).

Basándose en la definición de caso de la AASV de octubre de 2006, PCVAD puede ser subclínica o incluir una o más manifestaciones clínicas tales como enfermedad multisistémica con pérdida de peso, alta mortalidad (doblando la tasa de mortalidad sin introducción de un nuevo patógeno conocido), síntomas respiratorios, PDNS, síntomas digestivos incluyendo diarrea, y trastornos reproductivos individuales o en combinación en una piara o grupo de cerdos.

En la base de datos del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Universidad del Estado de Iowa, PCVAD ahora incluye una infección sistémica (categoría que incluye el PMWS), neumonía asociada a PCV2, enteritis asociada a PCV2, fallos reproductivos asociados a PCV2, y PDNS asociado a PCV2. Los casos que son categorizados de esta forma, pueden tener lesiones asociadas a PCV2 que varíen en severidad de moderada a severa y tales descripciones son añadidas a los informes del caso (Opriessnig et al., 2007).

2.8.2.1 Infección Subclínica por PCV2, PCV2-SI

La infección subclínica por PCV2 implica que, aunque el PCV2 está presente, no es el responsable de la enfermedad que padezca el cerdo (es decir, baja cantidad de antígeno de PCV2 asociada a lesiones mínimas o sin lesiones). Basándose en cerdos inoculados experimentalmente con PCV2, se sabe que la infección y lesiones por PCV2 pueden estar limitadas a 1 o 2 linfonodos sin causar ningún aparente signo clínico (Opriessnig et al., 2004b y 2006c). Sin embargo, también se ha demostrado experimentalmente que la infección subclínica

por PCV2 puede estar asociada a efectos indirectos como una disminución en la eficacia de la vacunación frente a PRRSV (Opriessnig et al., 2006e).

También se ha descrito la linfadenitis necrotizante asociada a PCV2 en linfonodos individuales en cerdos clínicamente sanos. La principal lesión en esta forma de presentación es la necrosis centrofolicular, normalmente limitado a 1 o 2 linfonodos. Su importancia se desconoce y se limita a los casos de canales con linfonodos aumentados de tamaños que son requisadas o declaradas no aptas para consumo humano, donde el diagnóstico histopatológico se corresponde con una linfadenitis necrotizante (Kim y Chae, 2005; Opriessnig et al., 2006c).

2.8.2.2 PCVD Sistémico, PCV2-SD o PMWS

PCV2-SD/PMWS afecta principalmente a cerdos de 2-4 meses de edad, aunque también ha sido descrito en animales de 1 a 6 meses. Así mismo existe una sola descripción de un caso natural de PCV2-SD/PMWS en lechones de 3 días de edad (Hirai et al., 2001). El PMWS ha sido descrito en casi todos los tipos de granjas, desde 30 a 10000 madres. La morbilidad y mortalidad en las granjas afectadas de PCV2-SD/PMWS es variable, dependiendo del tipo de granja, práctica de cría y manejo, coinfecciones, etc. Las tasas de morbilidad observadas en las granjas afectadas varían de 4 a 30%, y las de mortalidad entre 4 y 20%, con tasas excepcionales de 50-60% de morbilidad y 70-80% de mortalidad; (Segalés y Domingo, 2002; Segalés et al., 2005a). Factores medioambientales tales como hacinamiento, aire de mal calidad, mezcla de grupos de diferentes edades, y otros factores estresantes podrían exacerbar la severidad de la infección (Harding y Clark, 1997).

También se han observado esporádicamente cerdos afectados de PMWS, de forma aislada, en granjas con muy buenos índices de producción y mínima mortalidad postdestete (Segalés et al., 2005a).

Por otra parte, en algunas granjas, la mayoría de los cerdos que desarrollan PCV2-SD/PMWS pertenecen a unas pocas camadas, sugiriendo un potencial efecto camada (Madec et al., 2000). También se ha descrito que los cerdos machos castrados son más susceptibles a PCV2-SD/PMWS que las hembras (Corrégé et al., 2001; Rodríguez-Arrijo et al., 2002). Los cerdos con un menor peso al nacimiento y al destete tienden a desarrollar PMWS con mayor

frecuencia, al igual que los cerdos más delgados al inicio del periodo de engorde (Corrégé et al., 2001).

Otras enfermedades o infecciones coexisten más frecuentemente en las granjas afectadas de PCV2-SD/PMWS cuando las comparamos con las granjas no afectadas (Ellis et al., 2004). Estas enfermedades incluyen pseudorrabia (enfermedad de Aujeszky), síndrome respiratorio y reproductor porcino (PRRS), parvovirus porcino (PPV), enfermedad de Glässer, meningitis estreptocócica, salmonelosis, colibacilosis postdestete, diarreas no específicas, hepatitis dietética, y neumonía bacteriana. Si el incremento de la carga de enfermedades que se encuentra en las granjas afectadas de PCV2-SD/PMWS es consecuencia primaria de PCV2-SD/PMWS y la disfunción inmune asociada de los animales afectados, o la causa de PCV2-SD/PMWS en asociación con la infección por PCV2 todavía no ha podido ser determinado. Es posible que el desenlace clínico final observado en las granjas afectadas de PMWS sea la suma de los efectos de varias enfermedades concurrentes (Segalés et al., 2005a).

El principal signo clínico de PCV2-SD/PMWS es el adelgazamiento, pero se suele ver acompañado de otros signos clínicos, tales como palidez de la piel, distress respiratorio, diarrea, y, en ocasiones, ictericia (Harding and Clark, 1997). Las principales lesiones de PMWS tienen lugar en los tejidos linfoides aunque también se ha detectado infiltrado inflamatorio asociado a la infección por PCV2 en una gran variedad de tejidos de animales afectados.

Una característica llamativa de los cerdos en las fases clínicas iniciales de PCV2-SD/PMWS es el incremento en tamaño de los linfonodos subcutáneos, principalmente inguinal superficial, aunque no siempre se ve (Segalés et al., 2004b). Este incremento en el tamaño también se distingue fácilmente en los linfonodos bronquial, mediastínicos y mesentéricos. Asimismo, otros linfonodos pueden estar comprometidos. La superficie de corte de los linfonodos es marrón pálido homogéneo o blanquecina, y ligeramente edematosa. En un pequeño número de cerdos afectados, aproximadamente un 2% de los casos, se observa linfadenitis necrotizante (Segalés et al., 2004b). En otros casos se han observado linfonodos normales e incluso atróficos en fases más avanzadas de PCV2-SD/PMWS (Segalés et al., 2004b) y el timo está normalmente atrófico en los cerdos enfermos (Ladekjaer-Mikkelsen et al., 2002; Darwich et al., 2003b).

Un resumen de las lesiones macroscópicas y microscópicas más frecuentes ha sido publicado por Segalés y Domingo, 2002.

Las lesiones microscópicas en el tejido linfoide de los cerdos afectados de PCV2-SD/PMWS son muy características (Clark, 1997; Rosell et al., 1999). Éstas consisten en infiltración de los senos subcapsulares por numerosas células histiocíticas y células gigantes multinucleadas y una pérdida de celularidad en los folículos linfoides (células B). Las células gigantes multinucleadas también pueden aparecer en los folículos linfoides y en la zona parafolicular. Esto es seguido por una depleción de linfocitos en la zona parafolicular (células T) que puede variar en intensidad, desde leve a muy marcada (Clark, 1997; Rosell et al., 1999).

En el timo, un hallazgo muy significativo es la atrofia cortical (Darwich et al., 2003b). En un gran número de casos se han observado inclusiones citoplasmáticas en histiocitos y/o células dendríticas. Dichas inclusiones son basófilas o anfófilas, redondeas y de muy diferente tamaño. Estos cambios están asociados con, a menudo, grandes cantidades de antígeno PCV2 intracitoplasmático en células de la línea monocito-macrofágica incluyendo células dendríticas. Los estadios finales de depleción muestran un tejido linfoide vacío, con un estroma prominente y células accesorias (Rosell et al., 1999; Segalés et al., 2005a).

Los pulmones pueden estar aumentados de tamaño, no colapsados y de consistencia elástica, siguiendo una distribución difusa, irregular o multifocal. Estos hallazgos se corresponden microscópicamente con una neumonía intersticial, con infiltrado mononuclear peribronquial, peribronquiolar y alveolar. No se observa un daño evidente en las células epiteliales que tapizan las vías aéreas o los alvéolos. En casos avanzados puede haber fibrosis peribronquial y bronquiolitis obliterante (Clark, 1997; Segalés et al., 2004b). Los septos pulmonares intersticiales suelen estar distendidos y llenos de líquido (edema intersticial). Otras lesiones pulmonares frecuentes son bronconeumonía catarral-purulenta de los lóbulos anteriores, o incluso neumonía necrotizante, atribuible a infecciones bacterianas secundarias (Segalés et al., 2005a). Estos cambios histológicos están asociados con la presencia de antígeno PCV2, el cual se encuentra a veces intranuclear en células epiteliales y principalmente intracitoplasmático en fagocitos mononucleares (Allan y Ellis, 2000).

El hígado en la mayoría de los cerdos afectados de PCV2-SD/PMWS puede aparecer sin cambios o ligeramente pálido. En unos pocos casos, el hígado está aumentado de tamaño, pálido, con consistencia firme y con una superficie finamente granular (Rosell et al., 2000a). En los casos más avanzados, los cerdos pueden tener el hígado reducido de tamaño, con pérdida marcada de hepatocitos, un aumento de la cantidad de tejido fibroso e infiltrado inflamatorio difuso (Krakowka et al., 2000; Rosell et al., 2000a).

En función de la intensidad y distribución de las lesiones microscópicas, el daño hepático visto en animales infectados naturalmente por el PCV2 ha sido clasificado en 4 estadios (Rosell et al., 2000a):

I: leve infiltrado linfocítico multifocal en torno a los espacios porta.

II: moderado a intenso infiltrado linfocítico en torno a espacios porta e infiltrado mononuclear en el parénquima hepático. Las células de Kupffer suelen estar aumentadas de tamaño y las apoptosis de hepatocitos son infrecuentes.

III: severa inflamación linfocítica en los espacios porta de forma generalizada, infiltrado mononuclear multifocal en el parénquima hepático y, desorganización de los cordones hepáticos. Se pueden observar hepatocitos aumentados de tamaño con cariomegalia. Es frecuente la presencia de cuerpos apoptóticos (Councilman bodies).

IV: fibrosis perilobulillar generalizada, desorganización de los cordones hepáticos y pérdida masiva de hepatocitos con infiltrado mononuclear difuso.

La severidad de los daños observados en los hígados clasificados en el estadio IV sugiere la existencia de un fallo hepático en los estadios finales de PCV2-SD/PMWS. El PCV2 ha sido detectado, mediante HIS, principalmente en el citoplasma y ocasionalmente en el núcleo de las células de Kupffer y del infiltrado mononuclear, mientras que en los hepatocitos se ha detectado con más frecuencia en el núcleo y esporádicamente en el citoplasma. Según la distribución del PCV2 dentro de las lesiones hepáticas se establecieron cuatro patrones (Rosell et al. 2000a):

Kupffer: el ácido nucleico del PCV2 se detecta principalmente en las células de Kupffer. Se observó en hígados que no presentaban lesiones histológicas y en aquellos clasificados en los estadios I y II.

Periportal: intenso marcaje en el infiltrado inflamatorio en torno a los espacios porta y del parénquima hepático adyacente, siendo positivo algún hepatocito localizado en las proximidades del infiltrado inflamatorio. Se observó en el estadio I.

Mixto: mezcla de los dos patrones anteriores. Se observó en estadios I y II.

Difuso: hay marcaje de hepatocitos, células inflamatorias y de Kupffer de manera difusa en el parénquima hepático. Se observó, con frecuencia creciente, en los estadios II, III y IV.

Dichos resultados se podrían corresponder con la secuencia temporal de eventos patológicos que tienen lugar en el hígado de los animales afectados por el PMWS.

El daño inicial hepático empieza con la infección de las células de Kupffer por parte del PCV2 (patrón Kupffer). La susceptibilidad de dichas células y de otras de la línea monocítica-macrofágica ya ha sido descrita previamente (Allan et al., 1999a, Rosell et al., 1999). El patrón periportal y mixto serían formas de transición hacia la forma difusa. La extensión de la infección vírica desde las células contiguas parece ser el mecanismo por el cual se infectan los hepatocitos, aunque otros factores, como la fase del ciclo celular, también pueden ser importantes. Esto se basa, en el hecho de que los hepatocitos infectados se encuentran principalmente en las proximidades del infiltrado inflamatorio periportal y además, se sabe que es en la zona periportal donde mayor actividad mitótica de hepatocitos hay y, dado que la mitosis es necesaria para la replicación del PCV2, esto explicaría su mayor presencia en esas células y zonas (Rosell et al., 2000a).

Los hígados que mayores lesiones morfológicas presentaban en los hepatocitos (megalocitosis con cariomegalia, alteraciones apoptóticas) son los que tenían en mayor medida un patrón difuso de infección por PCV2, lo que sugiere que el PCV2 podría ser el causante de dichas lesiones y por tanto debería ser considerado como un nuevo agente vírico inductor de hepatitis en el ganado porcino (Rosell et al., 2000a). Sin embargo, en el trabajo realizado por Krakowka y colaboradores en 2004, en animales gnotobióticos inoculados con PCV2 e inmunosuprimidos con ciclosporina, el hecho de que no hubiera infiltrado inflamatorio, ni lesiones histológicas indicativas de daño en los hepatocitos, sugiere que la respuesta inflamatoria característica del PCV2-SD/PMWS juega un importante papel en el daño hepatocelular. Los mediadores proinflamatorios como los radicales libres de oxígeno y nitrógeno o citoquinas como interleuquina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF), que son producidos y secretados por las células inflamatorias, estarían, por tanto, implicados en la pérdida de hepatocitos observado en el PMWS.

Otro mecanismo para explicar la pérdida de hepatocitos sería la activación de la apoptosis. La apoptosis está implicada frecuentemente como mecanismo por el cual los virus pueden causar muerte celular en ausencia de efectos citopáticos asociados directamente al virus, siendo esta última una característica del ciclo de replicación del PCV2 (Allan y Ellis, 2000; Krakowka et al., 2004).

El hecho de que tejido procedente de animales sometidos a estrés térmico sea TUNEL positivo y el tejido de animales gnobióticos afectados por PCV2-SD/PMWS, TUNEL negativo, indica que los fenómenos de apoptosis descritos en animales convencionales o infectados naturalmente sean debidos más a la pirexia, mediada por citoquinas pirógenas, endotoxinas bacterianas o ambas, que a los efectos directos de la infección vírica en sí (Krakowka et al., 2004).

En el riñón, algunos cerdos muestran un punteado blanquecino en la corteza renal, indicativo de nefritis intersticial linfoplasmocitaria y/o granulomatosa (Segalés et al., 2004b; Opriessnig y Langohr, 2013), lesión que, a esta edad, se encuentra principalmente en los casos de PCV2-SD/PMWS (Segalés et al., 2005a). El PCV2 se localiza en el citoplasma de las células epiteliales tubulares (Segalés y Domingo, 2002; Opriessnig y Langohr, 2013).

La presencia de úlceras gástricas a nivel de la *pars oesophagea* también ha sido descrita frecuentemente en cerdos afectados de PCV2-SD/PMWS (Segalés y Domingo, 2002) aunque no se ha establecido relación directa entre la infección por PCV2 y estas lesiones. Otros órganos tales como páncreas, mucosa gástrica e intestinal, corazón, glándulas adrenales, glándulas salivares, y médula ósea pueden presentar también focos de infiltrado inflamatorio linfocítico, aunque en menor intensidad y extensión que los principales órganos afectados citados anteriormente (Segalés et al., 2005a).

La variación de los órganos afectados determina la necesidad de tomar muestras de diversos órganos de varios animales afectados dentro de un mismo grupo puesto que animales clínicamente enfermos pueden tener lesiones severas en un sistema orgánico y no presentar lesiones en otros. No se conocen bien los factores que determinan esta variación en los órganos involucrados, pero podría estar relacionado con la presencia de infecciones secundarias, diferencias en virulencia y tropismo del PCV, estadio de la infección, o con la genética o respuesta inmune del hospedador (Allan y Ellis 2000).

Desde los primeros casos descritos de enfermedad debilitante relacionada con PCV2 en lechones en Canadá, EEUU y Europa, los síndromes de adelgazamiento asociados a PCV2 con lesiones macroscópicas e histológicas fueron descritas en España (Allan et al., 1999b; Rosell et al., 1999; Segalés et al., 1997) Reino Unido (Kennedy et al., 1998), Republica de Irlanda (Spillane et al., 1998), EEUU (Kiupel et al., 1998; Morozov et al., 1998), Dinamarca (Allan et al., 1999b), Taiwán (Chen et al., 2001), Alemania (Hinrichs et al., 1999), Holanda (Wellenberg et

al., 2000), Bélgica (Vyt et al., 2000), Italia (Allan y Ellis, 2000) y Corea del Sur (Choi y Chae, 1999). En todos estos casos, se ha demostrado la presencia de antígeno o ácido nucleico de PCV2, normalmente en gran cantidad, asociado con las lesiones histológicas, y en la mayoría de los casos, se ha podido detectar o aislar PCV2 de los cerdos afectados.

Se han descrito varios sistemas de puntuación para caracterizar la enfermedad atendiendo a la intensidad de las lesiones y distribución y cuantificación de antígeno viral (Opriessnig et al., 2004b). Uno de los sistemas de puntuación considera 7 tejidos linfoides y determina la gravedad de las lesiones según la cantidad de antígeno de PCV2 y distribución de las lesiones. A cada tejido linfoide (linfonodo traqueobronquial, mesentérico, mediastínico, inguinal superficial, iliaco externo, tonsila y bazo) se le asigna una puntuación de 0 a 9 (puntuación de depleción linfoide de 0-3, puntuación de inflamación granulomatosa de 0-3, puntuación de IHQ de PCV2 de 0-3). Se suma la puntuación individual de los 7 tejidos linfoides y se divide entre 7. Dependiendo del número final, un cerdo se clasifica como sin lesiones asociadas a PCV2 (puntuación = 0), lesiones leves asociadas a PCV2 (puntuación = 1-3), lesiones moderadas asociadas a PCV2 (puntuación = 4-6) o lesiones graves asociadas a PCV2 (puntuación = 7-9) (Opriessnig et al., 2004b).

Este sistema de puntuación ha sido útil para la clasificación de la gravedad en PCVD inducido experimentalmente; sin embargo, su aplicación es poco factible en casos procedentes de infecciones naturales, donde normalmente se remite una serie incompleta de tejidos linfoides. Por ello, se ha propuesto que para diagnosticar una infección sistémica por PCV2 es necesario demostrar, al menos: 1. antígeno de PCV2 en más de un tejido linfoide (linfonodo, tonsila, bazo), o 2. en un tejido linfoide (linfonodo o tonsila o bazo) y en, al menos, otro sistema orgánico (pulmón o hígado o riñón o intestino), o 3. en dos sistemas orgánicos como pulmón, hígado, riñón, intestino.

Si se detecta una gran cantidad de antígeno de PCV2 asociado solo con un sistema orgánico específico, debería referirse a una enfermedad respiratoria asociada a PCV2, enteritis asociada a PCV2, o fallo reproductivo asociado a PCV2, más que a una infección sistémica asociada a PCV2. Si solo se encuentra una cantidad reducida de antígeno de PCV2, pero las lesiones son graves, esto es compatible con una PCVD crónica severa. Con la combinación de puntuación de las lesiones y la cantidad de antígeno de PCV2, también es posible establecer conclusiones sobre el estado de infección (Opriessnig et al., 2007).

En cuanto al efecto del estatus inmunitario de las cerdas en relación con el PCV2 sobre la mortalidad de las camadas debida a PMWS diversos estudios han sugerido la existencia de un fuerte efecto camada, en relación a la susceptibilidad a la enfermedad y mortalidad por PCV2-SD/PMWS (Madec et al., 2000; Allan et al., 2002b). La sospecha del efecto camada se basa en el hecho de que algunas camadas de ciertas hembras tienen una mayor incidencia de PCV2-SD/PMWS, en comparación con otras camadas de diferentes hembras de la misma granja (Madec et al., 2000).

En el estudio llevado a cabo por Calsamiglia y colaboradores en 2007, se evaluó como afecta el estatus de las cerdas frente a PCV2 sobre la mortalidad de las camadas por PCV2-SD/PMWS, utilizando tres variables, el número de partos, estatus de la infección por PCV2 y los títulos de anticuerpos para PCV2 en cerdas de explotaciones porcinas afectadas por PCV2-SD/PMWS. Según los resultados obtenidos, el número de partos no tenía un efecto significativo. En cuanto al título de anticuerpos frente a PCV2 de las cerdas, el riesgo de mortalidad en lechones procedentes de una cerda con títulos de anticuerpos bajos, era tres veces mayor que el de lechones de cerdas con títulos medios o altos. El estatus de infección por PCV2 de las cerdas también tuvo un efecto significativo, teniendo los lechones procedentes de cerdas infectadas (virémicas) por PCV2 el doble de riesgo de morir que los procedentes de cerdas no infectadas (no virémicas). Estos resultados demuestran que el estatus de infección por PCV2 y el título de anticuerpos frente a PCV2 de la cerda caracterizan, al menos en parte, el llamado efecto camada.

Dado que el riesgo de que un cerdo muera en una granja con PCV2-SD/PMWS parece depender en parte de la viremia frente a PCV2 de las cerdas en torno al parto, es probable que la infección por PCV2 a edades tempranas, es decir, durante la lactación, juegue un papel importante en la patogénesis de la enfermedad a nivel de grupo. No es posible valorar como el balance entre viremia frente a PCV2 y título de anticuerpos frente a PCV2 de la cerdas determina el resultado final de mortalidad en los lechones en una granja afectada de PCV2-SD/PMWS. Basándose en los modelos estadísticos utilizados, el efecto de la inmunidad maternal tiene, aparentemente, mayor influencia que el estatus de infección de las cerdas respecto a PCV2 (Calsamiglia et al. en 2007).

2.8.2.3 Enfermedad Respiratoria asociada a PCV2, PCV2-LD

Diversos estudios de campo y el análisis de tendencia de los casos en los laboratorios de diagnóstico de EEUU indican que el PCV2 podría jugar un importante papel en el complejo de enfermedad respiratoria porcina (porcine respiratory disease complex, PRDC) (Thacker y Thacker 2000; Harms et al., 2002; Kim et al., 2003d; Hansen et al., 2010c). PRDC es una enfermedad observada principalmente en cerdos de 8 a 26 semanas de edad y está asociada a múltiples patógenos respiratorios incluyendo el PRRS, SIV y Mh (Thacker, 2001; Harms et al., 2002; Choi et al., 2003). PRDC se caracteriza por una reducción en la tasa de crecimiento, reducción en la eficiencia alimentaria, aumento de los índices de conversión, anorexia, fiebre, tos, y disnea (Thacker y Thacker, 2000; Kim et al., 2003d). Dicho complejo se considera multifactorial-multietiológico, y en él están involucrados tanto agentes víricos como bacterianos. Además del PCV2, los principales patógenos implicados más frecuentemente en el PRDC son Mh, PRRSV, virus de la Influenza Porcina (Swine Influenza virus, SIV), así como *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App), *Streptococcus suis* y *Haemophilus parasuis* (Thacker y Thanawongnuwech, 2002).

Puede producirse un solapamiento diagnóstico entre PCV2-SD/PMWS, la neumonía asociada a PCV2 y PRDC debido al habitual componente respiratorio del PCV2-SD/PMWS (Harms et al., 2002; Segalés y Domingo, 2002). Además, casos clínicos diagnosticados como PRDC con presencia de PCV2 en pulmón, donde los tejidos linfoides no han sido examinados, podrían ser, potencialmente, casos de PCV2-SD/PMWS. Por lo tanto existe un límite borroso entre el PRDC y PCV2-SD/PMWS, debido fundamentalmente a la amplitud de la definición del PRDC (Segalés et al. 2005a; Ticó et al., 2013).

La presencia de enfermedad respiratoria clínica prolongada y severa, neumonía broncointersticial histiocítica con bronquiolitis y fibrosis bronquiolar, y abundante antígeno de PCV2 asociado con las lesiones es indicativo de que el PCV2 juega un papel en el PRDC (Kim et al., 2003d; Opriessnig et al., 2007).

La neumonía intersticial con bronquiolitis fue descrita en los primeros casos de PCV2-SD/PMWS (Clark, 1997; Ellis et al., 1998). La neumonía asociada a PCV2 se caracteriza por una neumonía intersticial linfocítica a granulomatosa, fibroplasia o fibrosis peribronquiolar, y bronquiolitis necrotizante y ulcerativa de leve a grave (Kim et al., 2003d; Opriessnig et al.,

2007; Segalés, 2012). La bronquiolitis asociada a PCV2 puede parecerse a la producida por SIV o por el coronavirus respiratorio porcino (Opriessnig et al., 2007).

La enfermedad respiratoria asociada a PCV2 caracterizada por neumonía broncointersticial y lesiones linfoides típicas de PCV2-SD/PMWS ha sido reproducida en cerdos SPF inoculados con PCV2 (Magar et al., 2000a). Posteriormente, se indujo una enfermedad respiratoria más leve con neumonía intersticial multifocal en cerdos nacidos por cesárea y privados de calostro, inoculados con PCV2 (Bolin et al., 2001). También se indujo neumonía intersticial leve y rinitis linfoplasmocitaria en cerdos convencionales inoculados con PCV2 (Rovira et al., 2002), así como neumonía broncointersticial granulomatosa o histiocítica de leve a moderada en cerdos convencionales cuando se utilizó un clon infeccioso ADN de PCV2 (Fenaux et al., 2002).

Según la clasificación de Segalés en 2012, la neumonía proliferativa y necrotizante (proliferative and necrotizing pneumonia, PNP) quedaría incluida dentro de PCV2-LD. PNP es una forma severa de neumonía intersticial descrita por primera vez en Canadá en 1990 (Morin et al., 1990). Afecta a animales entre los 15 días y los 4 meses de edad, con un pico entre las 4 y 10 semanas. Clínicamente se caracteriza por fiebre, disnea, respiración abdominal y ocasionalmente tos. Los animales que sobreviven muestran adelgazamiento y retraso en el crecimiento (Morin et al., 1990; Szeredi and Szentirmai, 2008).

Macroscópicamente se observa ausencia de colapso pulmonar, presentado los pulmones un color rojo oscuro grisáceo, aspecto húmedo y consistencia elástica. A nivel histológico la PNP se caracteriza por infiltrado intersticial linfohistiocítico con hiperplasia de neumocitos tipo 2 y, grupos de restos celulares necróticos en la luz alveolar (Morin et al., 1990; Drolet et al., 2003). Otras lesiones que también pueden encontrarse son membranas hialinas, infiltrado linfoplasmocitario y macrófagos intraalveolares, necrosis bronquiolar y células gigantes multinucleadas (Morin et al., 1990).

Inicialmente, la etiología de la PNP fue atribuida a una nueva cepa del virus de la influenza porcina tipo A (swine influenza virus, SIV) (Girard et al., 1992). Posteriormente, se aisló de manera repetida PRRSV a partir de lesiones de PNP en ausencia de SIV, por lo que el PRRSV fue propuesto como el principal agente de dicha patología (Larochelle et al., 1994). Fue a finales de los años 90, cuando algunos autores sugirieron la posible participación del PCV2 en

la PNP (Ellis et al., 1999a), y posteriormente, otro estudio indicó que la PNP era el resultado de la coinfección de PRRSV y PCV2 (Pesch et al., 2000).

El papel que el PCV2 juega en la PNP es contradictorio. Mientras que el estudio llevado a cabo por Drolet y colaboradores en 2003 en Canadá sugiere que el PRRSV es el principal causante de la PNP, descartando al PCV2 como agente importante en su desarrollo, basándose en que en los casos estudiados nunca se detectó PCV2 como agente único, en Europa señalan al PCV2 como principal agente etiológico de la PNP (Grau-Roma y Segalés, 2007; Szeredi y Szentirmai, 2008). Sin embargo, en el estudio realizado por Morandi y colaboradores en 2010, en Italia, el PRRSV estuvo más asociado a las lesiones de PNP que el PCV2, aunque la coinfección con ambos virus parecía incrementar la severidad de la enfermedad. Estas diferencias en la etiología podrían deberse a diferencias potenciales en la patogenicidad de distintas cepas del PRRSV (Halbur et al., 1995 y 1996b) y/o PCV2 (Opriessnig et al., 2006f), contexto epidemiológico, susceptibilidad del hospedador y factores ambientales o de manejo.

2.8.2.4 Enteritis asociada a PCV2, PCV2-ED

Los casos de enteritis asociada a PCV2 son cada vez más frecuentes. La mayoría de los casos ocurre en cerdos de 6 a 16 semanas de edad (Kim et al., 2004b; Chae, 2005; Opriessnig et al., 2007). La enteritis asociada a PCV2 es similar clínica y anatomopatológicamente a la ileitis subaguda o crónica asociada a *Lawsonia intracellularis*. La mucosa intestinal está macroscópicamente engrosada y los linfonodos mesentéricos están aumentados de tamaño (Jensen et al., 2006). El examen microscópico confirma la presencia de enteritis granulomatosa caracterizada por atrofia de vellosidades con infiltrado linfocítico transmural, con variable desprendimiento y/o regeneración de las células epiteliales de las glándulas y criptas. Estas lesiones están frecuentemente asociadas a abundante antígeno de PCV2, que se localiza en las células epiteliales de la mucosa afectada y en células monocito-macrofágicas en la mucosa, submucosa, túnica muscular, subserosa, vasos linfáticos y tejido linfoide asociado. Las placas de Peyer presentan las lesiones histológicas características de PCVD (Allan y Ellis, 2000; Jensen et al., 2006).

Dado que se han descrito casos de enteritis asociada a PCV2 en una granja aparentemente libre de PCV2-SD/PMWS y PDNS en animales postdestete mediante histopatología y aislamiento de PCV2 e ISH, pero sin presentar depleción linfoide ni sustitución

histiocítica en los folículos linfoides, se propuso que el diagnóstico de enteritis asociada a PCV2 se caracteriza solamente por, 1) si hay diarrea, 2) si las lesiones linfoides características están presentes en las placas de Peyer, pero no en otros linfonodos, y 3) si antígeno o ácido nucleico de PCV2 está presente en las lesiones (Kim et al., 2004b).

2.8.2.5 Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina, PDNS

El síndrome de dermatitis y nefropatía porcina (porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PDNS) puede afectar a cerdos en transición y en cebo y, esporádicamente, a animales adultos (Drolet et al., 1999). La prevalencia de este síndrome en las explotaciones afectadas es relativamente baja, siendo menor de un 1%, normalmente entre un 0,05 y un 0,5% (Segalés et al., 1998). Sin embargo, se han detectado prevalencias mayores en el Reino Unido y otros países con un historial de mortalidad en las explotaciones afectadas oscilando entre 0,25 y 20% (Gresham et al., 2000).

La mortalidad entre los cerdos de 3 meses de edad o mayores, se acerca al 100%, mientras que en los cerdos afectados de entre 1,5 y 3 meses de edad, es de aproximadamente un 33% (Segalés et al., 1998). Los cerdos con enfermedad aguda severa mueren a los pocos días del inicio de los signos clínicos (Drolet et al., 1999). Los cerdos que sobreviven tienden a recuperar y ganar peso de 7 a 10 días después del comienzo del síndrome (Segalés et al., 1998).

Los cerdos afectados de PDNS muestran anorexia, depresión, postración, andar rígido y/o reluctancia al movimiento, y temperatura normal o leve pirexia (Segalés et al., 1998; Drolet et al., 1999). Sin embargo, el signo más obvio en la fase aguda de la enfermedad es la presencia de máculas y pápulas de morfología irregular y color rojo a violáceo con centro negro, localizadas principalmente en las extremidades posteriores y zona perineal, con tendencia a coalescer, pudiendo tener una distribución generalizada en los animales afectados de manera más severa. Con el tiempo, dichas lesiones se cubren por una costra oscura y desaparecen gradualmente, normalmente en 2-3 semanas, dejando en ocasiones cicatrices (Thibault et al., 1998; Drolet et al., 1999).

La causa de la muerte en los cerdos afectados de PDNS es un fallo renal agudo (Smith et al., 1993; Helie et al., 1995; Segalés et al., 1998), normalmente con un marcado aumento de

los niveles de creatina y urea en suero (Drolet et al., 1999). En la piel, las máculas y pápulas de color rojo a oscuras se corresponden microscópicamente con tejido necrótico asociado a vasculitis necrotizante de los capilares y arteriolas de dermis e hipodermis, y amplias hemorragias (Helie et al., 1995; Segalés et al., 1998; Thibault et al., 1998). La vasculitis necrotizante es, además, una característica sistémica, dado que estas lesiones se pueden presentar en cualquier tejido, aunque son más destacadas en la piel, pelvis renal, mesenterio y bazo (Segalés et al., 1998; Thibault et al., 1998).

Aparte de las lesiones en piel, los cerdos que mueren de forma aguda con PDNS tienen ambos riñones aumentados de tamaño, los cuales presentan consistencia firme, una superficie cortical finamente granular y edema en pelvis renal (Helie et al., 1995; Ramos-Vera et al. 1997; Segalés et al., 1998). La corteza renal presenta múltiples lesiones puntiformes rojizas y de pequeño tamaño, similares a hemorragias petequiales.

Las lesiones microscópicas características de PDNS son la vasculitis generalizada y glomerulonefritis, que es indicativa de una reacción de hipersensibilidad tipo 3, que se caracteriza por el depósito de complejos antígeno-anticuerpo o inmunocomplejos en ciertos tejidos. Los glomérulos están aumentados de tamaño, con fibrina, células inflamatorias necróticas y eritrocitos dentro del espacio de Bowman, lo que define una glomerulitis fibrino-necrotizante. Histológicamente, también se puede observar una nefritis intersticial no purulenta, de moderada a severa, con dilatación de los túbulos renales. Los cerdos con un curso prolongado de la enfermedad pueden mostrar una glomerulonefritis crónica, probablemente como resultado de la progresión del daño glomerular inicial (Segalés et al., 1998).

Normalmente, tanto las lesiones en piel como las renales están de manera conjunta presentes en el PDNS, pero en algunos casos, pueden aparecer solas, en piel o en riñones (Drolet et al., 1999). Los linfonodos renales, así como otros linfonodos, pueden estar aumentados de tamaño y de color rojo debido al drenaje de sangre desde las zonas afectadas con hemorragias, principalmente en la piel. Microscópicamente, se pueden observar con frecuencia lesiones similares a PCV2-SD/PMWS como depleción linfoide y cierto grado de infiltrado histiocítico y/o células gigantes multinucleadas en los tejido linfoides de los cerdos afectados de PDNS (Ramos-Vera et al., 1997; Segalés et al., 1998; Thibault et al., 1998; Rosell et al., 2000b).

También puede haber infartos esplénicos como resultado de la vasculitis necrotizante de arterias o arteriolas esplénicas (Wellenberg et al., 2004b).

Muchos patógenos, incluidos virus (PRRSV) (Choi y Chae, 2001; Thibault et al., 1998) y bacterias (*Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis* tipo 1 y 2, *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, o *Salmonella* spp.) (Lainson et al., 2002; Thomson et al., 2002) han sido implicados como posibles agentes etiológicos del PDNS.

La asociación del PCV2 con el PDNS fue descrita, por primera vez, en el 2000 (Rosell et al., 2000b). El estudio de casos de PDNS observados en Irlanda del Norte en 1990, que en esa época era libre de PRRSV, demostró la presencia de antígeno de PCV2 asociado con linfadenitis granulomatosa (Allan et al., 2000b).

Un estudio caso-control de PDNS en los Países Bajos demostró que existía una asociación significativa entre títulos altos de anticuerpos anti-PCV2 y el desarrollo de PDNS sugiriendo que la base fisiológica causante del PDNS podría ser el excesivo nivel de anticuerpos frente a PCV2 (Wellenberg et al., 2004b). Aunque no se pudo demostrar la presencia de antígeno de PCV2 mediante IHQ en todos los casos de PDNS, si se confirmó la presencia de ADN de PCV2 mediante PCR en todos ellos. También se demostró que no había presencia de ácido nucleico de PPV o PRRSV mediante PCR en muchos de los casos de PDNS (Wellenberg et al., 2004b).

Cuando se comparó la carga viral en suero de PCV2 en casos de PMWS y PDNS se observó que los casos de PDNS tenían una cantidad significativamente menor de ADN de PCV2 en suero en relación con cerdos con lesiones moderadas o severas de PMWS. Este estudio también confirmó que los cerdos con PDNS estaban infectados con PCV2 (Olvera et al., 2004).

Sin embargo, un estudio más reciente ha conseguido reproducir experimentalmente el PDNS sin la participación de PCV2. Según los autores, el PDNS sería la manifestación de una coagulación intravascular diseminada (CID), y representaría una coagulopatía sistémica de comienzo súbito que se expresaría clínicamente como microtrombosis de la vasculatura renal y de la dermis. Cualquier agente etiológico epiteliotropo y toxinas bacterianas activarían la cascada de la coagulación y podrían potencialmente iniciar un CID, que desencadena posteriormente un PDNS (Krakowka et al., 2008).

2.8.2.6 Fallo Reproductivo asociado a PCV2, PCV2-RD

Se han descrito fallos reproductivos asociados a PCV2 desde la primera descripción por West y colaboradores en Canadá en 1999 (West et al., 1999; Ladekjaer-Mikkelsen et al., 2001; O'Connor et al., 2001). Las manifestaciones clínicas en las granjas afectadas incluyen abortos, nacidos muertos, momificaciones fetales, y un aumento de la mortalidad predestete. Las explotaciones afectadas son principalmente de cerdas primerizas o de nueva introducción.

Los neonatos nacidos muertos o no viables presentan congestión pasiva crónica hepática e hipertrofia cardíaca con áreas multifocales de decoloración del miocardio (West et al., 1999; O'Connor et al., 2001). La lesión microscópica típica en los nacidos muertos o neonatos en infecciones naturales es una miocarditis que puede variar de no supurativa a necrotizante o fibrótica asociada con moderada-abundante cantidad de antígeno o genoma de PCV2 (West et al., 1999; O'Connor et al., 2001; Mikami et al., 2005).

La infección experimental intrauterina de fetos con PCV2 dio lugar a la replicación del virus en los fetos y confirma que el corazón es el lugar primario de replicación del PCV2 en los fetos (Sánchez et al., 2001a). Cuando se inocularon fetos en el útero a los 57, 75, y 92 días de gestación, se encontró que la replicación del virus era significativamente mayor en los fetos inoculados a los 57 días de gestación que a los 75 y 92 días de gestación. Todos los fetos fueron sacrificados a los 21 días postinoculación y solo se observaron lesiones macroscópicas consistentes en edema, congestión, hemorragias y hepatomegalia, en los fetos inoculados a los 57 días de gestación (Sánchez et al., 2001a).

En otro estudio, 37 fetos de 3 cerdas fueron inoculados intramuscularmente a los 86, 92, y 93 días de gestación, observándose en el momento del parto, 24 lechones normales, 6 nacidos muertos, 5 débiles y 2 momificados, confirmando que el PCV2 puede infectar fetos a término y causar alteraciones reproductivas (Johnson et al., 2002).

Estos trabajos han demostrado que las células diana del PCV2 van cambiando de cardiomiocitos, hepatocitos y macrófagos durante la vida fetal a solo macrófagos tras el nacimiento (Sánchez et al., 2003). Sin embargo, como en PCV2-SD/PMWS, no se sabe realmente si los macrófagos mantienen la replicación viral del PCV2, o simplemente acumulan partículas víricas.

También se ha sugerido, que los títulos altos de PCV2 en los órganos linfoides de fetos infectados de forma intrauterina podrían llevar al desarrollo de lesiones histológicas similares a aquellas observadas en cerdos con PCV2-SD/PMWS sin causar enfermedad (Sánchez et al., 2004).

Se ha demostrado experimentalmente la transmisión transplacentaria del PCV2 mediante la inoculación intranasal de reproductoras seronegativas a PCV2 tres semanas antes de la fecha prevista de parto. De estas cerdas, cuatro abortaron y las otras dos parieron prematuramente, y en los lechones nacidos vivos y mortinatos se detectó ácido nucleico y antígeno de PCV2 en tejido linfoide y no linfoide. Sin embargo, no se observaron lesiones histológicas linfoides parecidas a las de PCV2-SD/PMWS ni lesiones cardíacas en los fetos procedentes de las cerdas que habían abortado o que habían parido prematuramente (Park et al., 2005). Esto podría explicarse por el hecho de que la infección por PCV2 tuvo lugar al final de la gestación, dado que las alteraciones cardíacas macroscópicas han sido descritas cuando los fetos eran infectados a la mitad de la gestación (Sánchez et al., 2001a).

Más recientemente, otro estudio experimental con inoculación intrauterina con semen infectado con PCV2, dio lugar a fallos reproductivos (mortinatos y fetos momificados), así como viremia en las cerdas y lechones, detectándose antígeno de PCV2 principalmente en el miocardio de los lechones (Madson et al., 2009).

Aunque las descripciones experimentales son convincentes sobre el PCV2 como patógeno reproductivo, los datos de casos de campo sugieren que las mayorías de las granjas de reproducción son aparentemente inmunes y que los fallos reproductivos asociados a PCV2 son relativamente raros (Opriessnig et al., 2007).

2.8.2.7 Encefalitis y Temblor Congénito asociado a PCV2

El PCV2 ha sido asociado a sintomatología nerviosa que incluye apatía, ataxia, pedaleo, opistótonos, nistagmo y convulsiones (Corrêa et al., 2007; Seeliger et al., 2007).

Macroscópicamente, las lesiones observadas se centraban principalmente a nivel de cerebelo y consistían principalmente en petequias en leptomeninges y edema (Corrêa et al., 2007), así como hiperemia y hemorragias tanto en meninges como en parénquima

predominantemente en la materia gris y blanca del cerebelo (Bukovsky et al., 2007; Seeliger et al., 2007).

Las lesiones histológicas incluyen leptomeningitis, meningoencefalitis y encefalitis, caracterizadas por vasculitis necrotizante linfocitaria en arterias y venas de pequeño a mediano calibre, hipertrofia del endotelio, infiltrado linfocítico perivascular con depósito de fibrina, degeneración y necrosis neuronal, espongiosis, apoptosis de células endoteliales y edema del neuropilo todo ello a nivel de cerebelo. Además se ha observado, infiltrado linfocítico y vasculitis en plexos coroideos, gliosis en médula oblongada, coroiditis linfocítica, meningitis mononuclear asociada a infiltrado perivascular linfocítico y vasculitis (Bukovsky et al., 2007; Corrêa et al., 2007; Seeliger et al., 2007).

En cuanto a la demostración del PCV2, mediante IHQ se ha detectado antígeno de PCV2 en el núcleo y citoplasma de macrófagos perivascuales intralesionales, así como en el citoplasma de células endoteliales de los vasos de pequeño y mediano calibre tanto en zonas afectadas como no afectadas del cerebelo y ocasionalmente en leucocitos intra y perivascuales, así como en células similares a fibroblastos (Allan et al., 1999a; Kennedy et al., 2000; Fenaux et al., 2002; Corrêa et al., 2007; Seeliger et al., 2007). Con la técnica de ISH se ha detectado el genoma de PCV2 en el citoplasma de las células endoteliales de los pequeños vasos afectados, y en menor medida en los vasos no afectados, principalmente en cerebelo, y en leucocitos perivascuales. También en células endoteliales de las meninges y en la materia blanca de la médula espinal (Seeliger et al., 2007), así como en células gliales, endoteliales y células con el fenotipo de macrófagos perivascuales y meníngeos o en macrófagos de meninges y perivascuales, en mesencéfalo, cerebelo y médula oblongada (Bukovsky et al., 2007).

El tropismo endotelial del PCV2 detectado mediante ISH e IHQ, y la falta de inmunocomplejos detectables en los vasos afectados apunta directamente a un daño vascular del PCV2 (Seeliger et al., 2007). En los casos descritos por Seeliger y colaboradores en 2007, los datos morfológicos e inmunohistoquímicos de presencia de apoptosis en las células endoteliales cerebelares afectadas, indicarían un papel de la apoptosis durante la infección del PCV2. No obstante, no se puede descartar en este caso que la apoptosis de las células endoteliales sea secundaria a la hipoxia local resultante del daño vascular.

De forma más reciente, Drolet y colaboradores en 2011, han descrito una meningoencefalitis linfocítica-granulomatosa multifocal con células gigantes multinucleadas asociada a PCV2 en dos cerdos en edad de sacrificio.

El temblor congénito (CT, congenital tremor) está asociado con hipomielinogénesis o desmielinización del cerebro y médula espinal. El tipo A2 es el más común y se ha asociado a ADV o a infecciones virales sin identificar. Este tipo se caracteriza por contracciones clónicas de diversa intensidad que decrecen con el tiempo, y suelen resolverse normalmente a las cuatro semanas de edad. La mortalidad en los cerdos afectados puede llegar hasta el 50%, como resultado de la incapacidad de los lechones para mamar (Kennedy et al., 2003; Chae, 2005).

Stevenson y colaboradores en 2001, detectaron ácido nucleico y antígeno de PCV2 en el encéfalo y médula espinal de animales con CT mediante ISH, inmunofluorescencia indirecta y PCR, principalmente en grandes neuronas y células de Purkinje. Aunque también se detectó en animales clínicamente sanos, la cantidad de células positivas fue mayor en los animales con CT. En ninguno de los dos grupos, afectados y clínicamente sanos, hubo lesiones macro ni microscópicas (Stevenson et al., 2001). Por otro lado, otros estudios no han podido detectar PCV2 en animales con CT (Kennedy et al., 2003; Ha et al., 2005). Por lo tanto, la asociación entre PCV2 y CT es, hoy en día, controvertida y son necesarios más estudios para aclarar el papel del PCV2 en CT.

2.9 Diagnóstico

2.9.1 Diagnóstico de Enfermedad Sistémica por PCV2

Los criterios de diagnóstico de enfermedad sistémica por PCV2 (PCV2-SD/PMWS) están muy bien definidos (Sorden, 2000; Segalés, 2002). Se considera que un cerdo o grupo de cerdos presentan PCV2-SD si cumplen los siguientes criterios (Sorden, 2000):

1. Signos clínicos incluyendo retraso del crecimiento y adelgazamiento, frecuentemente con disnea y aumento del tamaño de los linfonodos inguinales, y ocasionalmente ictericia.

2. Presencia de lesiones histológicas características en los tejidos linfoides (depleción linfocitaria junto con inflamación granulomatosa-linfohistiocítica y presencia de cuerpos de inclusión en cierto número de cerdos afectados) y/o inflamación granulomatosa-linfohistiocítica en otros órganos (pulmón, hígado, riñón, intestino, páncreas, etc.).
3. Detección, de moderada a elevada, de una cantidad de PCV2 en las lesiones en los tejidos linfoides y otros tejidos de los cerdos afectados.

Para diferenciar las diferentes manifestaciones clínicas de PCVD es importante evaluar las lesiones histopatológicas y la presencia de PCV2 en intestinos, pulmones, y tejidos linfoides (Segalés, 2012).

Esta definición de caso no excluye la presencia concomitante de otras enfermedades o coinfecciones con PCV2-SD/PMWS. Esto también significa que ni los signos clínicos ni las lesiones macroscópicas observadas en cerdos sospechosos de estar afectados de PCVD son suficientes para diagnosticar la enfermedad, aunque si son indicativas. Sin embargo, la presencia de signos clínicos, lesiones macroscópicas compatibles con PCVD y la demostración de elevada cantidad de PCV2 por diferentes métodos (inmunocitoquímica, captura cuantitativa de antígenos o ELISA de captura o PCR cuantitativa) pueden ser consideradas diagnósticas en ausencia de estudio histopatológico (Segalés et al., 2005a).

El diagnóstico de PCVD a nivel de granja tiene que tener en cuenta 1) el porcentaje de cerdos diagnosticados con PCVD de todos los remitidos y 2) un aumento de la mortalidad en la granja estudiada. Por lo general, se considera al PCVD como un problema de granja si se diagnostica PCVD en el 50% o más de los cerdos de una muestra representativa de la granja y si hay un aumento significativo de la mortalidad comparada con parámetros previos de la granja. Se considera como PCVD esporádico si se diagnostica PCVD en menos del 50% de una muestra representativa, simultáneamente con un aumento de la mortalidad o si se diagnostica PCVD en más del 50% de una muestra representativa sin aumento de mortalidad de forma simultánea (Segalés, 2006).

2.9.2 Diagnóstico de Enteritis por PCV2

El diagnóstico de enteritis asociada a PCV2 se caracteriza solo:

1. si hay diarrea.
2. si las lesiones características están presentes en las placas de Peyer pero no en otros linfonodos.
3. si el antígeno o ácido nucleico de PCV2 está presente en las lesiones.

Estos tres criterios por separado no son diagnósticos de enteritis asociada a PCV2 (Kim et al., 2004b).

2.9.3 Diagnóstico de PDNS

La definición de caso de PDNS es relativamente sencilla (Smith et al., 1993; Helie et al., 1995):

1. Presencia de lesiones necrotizantes y hemorrágicas en piel, localizadas principalmente en las extremidades posteriores y área perineal, y/o riñones pálidos y aumentados de tamaño, con petequias corticales generalizadas.
2. Presencia de vasculitis necrotizante sistémica, y de glomerulonefritis fibrinosa y necrotizante.

Desde el punto de vista diagnóstico, actualmente, la detección de PCV2 no está incluida dentro de los criterios diagnósticos para el PDNS.

2.9.4 Diagnóstico de Enfermedad Reproductiva por PCV2

La definición de caso para los problemas reproductivos asociados con la infección por PCV2 no ha sido establecida formalmente, pero teniendo en cuenta las características clínico-patológicas de los casos descritos (West et al., 1999; O'Connor et al., 2001; Brunborg et al., 2007; Pittman, 2008), debería incluir tres criterios principales:

1. Abortos tardíos o a término y nacidos muertos, en ocasiones con una hipertrofia evidente del corazón de los fetos.
2. Presencia de lesiones cardíacas caracterizadas por una extensa miocarditis necrótica y/o fibrosa.
3. Presencia de gran cantidad de PCV2 en las lesiones miocárdicas y en otros tejidos fetales.

2.9.5 Diagnóstico Diferencial

La lista de diagnósticos diferenciales para PCV2-SD/PMWS puede ser muy amplia dependiendo del signo clínico dominante en cada granja. La primera y más importante entidad a incluir en esta lista es la forma respiratoria del PRRS, sin embargo, la amplia distribución del PRRSV en las mayoría de los países hace que la diferenciación entre PCV2-SD/PMWS y PRRS sea muy difícil, a no ser que se use una adecuada batería de tests laboratoriales para PRRSV y PCV2 al mismo tiempo.

Además, toda enfermedad que cause adelgazamiento debe ser incluida en la lista de diagnósticos diferenciales (Harding y Clark, 1997). Aparte del PRRS, deberían ser incluidas condiciones como PRDC, enfermedad de Glässer, peste porcina clásica (PPC), ADV, enfermedad del ojo azul (infección por Rubulavirus porcino), toxicidad por carbadox/olaquinox, colibacilosis postdestete, disentería porcina, espiroquetosis colónica porcina, enteropatía proliferativa porcina, ulceración gástrica en la *pars oesophagea*, y eperitrozoosis, dependiendo del país de origen (Segalés et al., 2005a).

Para el PDNS se deben incluir aquellas enfermedades que causen una coloración de la piel de roja a roja oscura (peste porcina africana y clásica, erisipelas, salmonelosis septicémica, infección por *Actinobacillus suis*, síndrome de estrés porcino, viruela porcina, epidermitis exudativa, sarna sarcóptica, dermatofitosis, pitiriasis rosada y otras septicemias bacterianas), así como aquellas que causen hemorragias petequiales en los riñones como la peste porcina clásica/africana y salmonelosis septicémica. (Segalés, 2002; Thomson et al., 2002). Se debe hacer especial énfasis en diferenciar el PDNS de la peste porcina clásica en Europa y de la salmonelosis septicémica en Norte América (Segalés, 2002).

La forma reproductiva asociada con el PCV2 puede ser indistinguible clínicamente de otras enfermedades porcinas que causen abortos tardíos o a término y nacidos muertos tales como PRRSV, ADV, PPV, influenza porcina, enfermedad del ojo azul, infecciones por enterovirus, virus de la encefalomiocarditis, peste porcina clásica, erisipelas y leptospirosis, entre otras (Segalés et al., 2005a; Hansen et al., 2010a).

2.10 Técnicas Diagnósticas disponibles para PCVD

La infección por PCV2 es ubicua en la población porcina mundial. Se puede encontrar PCV2 en cerdos sano así como en cerdos enfermos (Allan y Ellis, 2000), por lo que el diagnóstico no puede basarse únicamente en la detección del virus o de anticuerpos frente a él (McNeilly et al., 2002; Segalés y Domingo, 2002; Opriessnig et al., 2007). Esto hace que la elección y la interpretación de los test de diagnóstico sean importantes para la confirmación de PCVD.

PCVD se diagnostica por la demostración de las lesiones características asociadas a antígeno o ácido nucleico de PCV2 en los respectivos órganos. Actualmente, la IHQ o ISH se consideran las pruebas principales (gold standard) para la detección de PCV2 como parte del diagnóstico de PCVD (Sorden, 2000).

Se ha observado una fuerte correlación entre la cantidad de ácido nucleico o antígeno de PCV2 y la severidad de las lesiones linfoides microscópicas en el PCV2-SD/PMWS (Rosell et al., 1999; Quintana et al., 2001). La detección de ácido nucleico o antígeno de PCV2 en tejidos de cerdos clínicamente sanos o cerdos enfermos sin signos clínicos ni lesiones macroscópicas compatibles con PCV2-SD/PMWS debe ser interpretada con cautela, dado que la infección subclínica de PCV2 con viremia ocurre en casi todas las granjas (McNeilly et al., 2002; Segalés et al., 2005a).

Puesto que la cantidad de PCV2 demostrada en muestras de tejidos con lesiones es la principal diferencia entre cerdos afectados de PCV2-SD/PMWS y cerdos infectados subclínicamente, aquellas técnicas que permitan la cuantificación del virus/antígeno en tejidos y/o suero, tales como métodos de PCR cuantitativos, ELISA de captura de antígenos, ISH y análisis inmunohistoquímicos podrían ser potencialmente utilizadas para el diagnóstico de PCVD

clínico (McNeilly et al., 2002; Olvera et al., 2004; Chae, 2004). Esto no es aplicable al PDNS (Olvera et al., 2004) pero si a la enfermedad reproductiva asociada a PCV2 ya que se ha observado gran cantidad de virus/antígeno en los tejidos con lesiones (West et al., 1999).

Las técnicas de diagnóstico laboratorial se pueden dividir en dos grandes grupos, directas e indirectas. Las técnicas directas son aquellas que permiten aislar, identificar y/o detectar el agente etiológico implicado, y entre ellas se encuentra el cultivo, IHQ, ISH y PCR, entre otras. Las técnicas indirectas son los estudios serológicos (ELISA, inmunofluorescencia, etc.), que permiten demostrar la presencia de anticuerpos específicos frente a un agente etiológico determinado, conociéndose de este modo, el estado inmunitario del animal y/o de la explotación en general.

2.10.1 Técnicas Directas. Detección del virus PCV2, antígeno viral y ácido nucleico.

2.10.1.1 Inmunohistoquímica (IHQ).

Las descripciones en relación con la IHQ para PCV2 se han realizado utilizando anticuerpos monoclonales y policlonales en tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina (McNeilly et al., 1999; Sorden et al., 1999). Con este método, es posible la localización del antígeno en el tejido y correlacionar las lesiones con la presencia de PCV2. Se ha determinado que es necesaria una carga viral mínima estimada de 10^8 genomas de PCV2 por 500 ng de ADN para dar una tinción visible en la IHQ (Brunborg et al., 2004).

La comparación de la ISH con la IHQ en tejidos de cerdos con PCV-SD/PMWS que habían sido almacenados hasta 6 meses en formalina tamponada al 10% antes de ser embebidos en parafina demostró que ambas técnicas eran capaces de detectar antígeno o ácido nucleico en todos los tejidos examinados (McNeilly et al., 1999). En este caso la IHQ fue más específica que la ISH, mientras que en otros trabajos ha sido al contrario (Kim y Chae., 2004a; Opriessnig y Langohr, 2013), o ha dado similares resultados (Chianini et al., 2003). Esto puede ser debido a que en el primer trabajo, se utilizó una sonda basada en la secuencia genómica completa del PCV1 (Kim y Chae, 2001a). Se ha descrito una sensibilidad para la IHQ del 75,2% y una especificidad del 100% cuando se comparó con el aislamiento viral en

muestras procedentes de animales inoculados experimentalmente, mientras que en casos naturales, la sensibilidad fue del 78,5% y la especificidad del 100% (Kim y Chae, 2004a).

2.10.1.2 Aislamiento Vírico (AV).

Las células PK-15 mantienen la replicación de PCV2 *in vitro*, y dichas células pueden ser inoculadas con fluidos corporales u homogenizados de cerdos sospechosos de estar infectados con PCV2 (Allan et al., 1998a; Pogranichnyy et al., 2000; McNeilly et al., 2002). El tratamiento de las células con glucosamina ha mostrado ser efectivo en el incremento de la replicación de PCV2 (Tischer et al., 1987). Una de las características del PCV2 es que no induce efecto citopático y, por lo tanto, para determinar la replicación viral hay que utilizar inmunofluorescencia o tinción de inmunoperoxidasas.

El AV no se hace de manera rutinaria para el PCV2 dado que lleva mucho tiempo, es más difícil y menos sensible que otras técnicas, y no es siempre eficiente ya que se requiere de virus viable, y la autólisis de las muestras y el tiempo transcurrido desde la toma de las mismas y su remisión al laboratorio, disminuyen el éxito del AV. Las aplicaciones de uso del AV pueden incluir determinar si el PCV2 diseminado por semen es infeccioso así como su utilización en la producción de vacunas (Opriessnig et al., 2007; Madson y Opriessnig, 2011).

El AV cuantitativo utiliza muestras clínicas diluidas 10 veces (suero u homogenizado de tejidos) las cuales son inoculadas en células PK-15. Este test es útil para discriminar la infección subclínica por PCV2 de la infección clínica (McNeilly et al., 2002).

2.10.1.3 Inmunofluorescencia (IF).

La IF es una técnica rápida que utiliza anticuerpos monoclonales o antisuero policlonal para detectar antígenos en cortes en congelación (McNeilly et al., 2001) o en suero (Magar et al., 2000b). Allan y colaboradores en 1999, aplicaron IF en aislados de células infectadas tanto con PCV1 como con PCV2, utilizando antisuero policlonal y anticuerpos monoclonales para ambos virus, no detectando reacción cruzada en las muestras analizadas (Allan et al., 1999b).

2.10.1.4 ELISA de captura de antígenos.

Esta técnica, realizada en homogenizados de tejidos de casos de infección natural y experimental, ha mostrado resultados comparables con el AV cuantitativo y la IHQ, siendo de utilidad para diferenciar la infección subclínica y PCVD clínico (McNeilly et al., 2002). También se ha desarrollado un ELISA de captura de antígenos (SERELISA PCV2 Ag Capture) optimizado para muestras fecales, en muestras con y sin historia de PCV2-SD/PMWS (López et al., 2005), aunque el uso de este test en los EEUU ha dado resultados variables (Opriessnig et al., 2007).

2.10.1.5 Microscopia Electrónica.

Esta técnica se utiliza para demostrar la presencia de partículas víricas, en que células se encuentra y su localización dentro de las mismas, así como para estudiar la estructura y tamaño del virus (Allan et al., 1998a; Ellis et al., 1998; Kiupel et al., 1998). La microscopia electrónica no se usa de manera rutinaria en los laboratorios de diagnóstico dado que lleva mucho tiempo y es costosa. La sensibilidad total es baja, y tiene que haber gran cantidad de virus en el tejido (al menos 10^5 partículas víricas) para poder ser detectadas (Opriessnig et al., 2007).

2.10.1.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (polymerase chain reaction, PCR).

La PCR es una técnica sensible, específica y rápida, que puede detectar ADN de PCV2 en muestras de tejidos frescos, congelados o fijados, así como en diversos fluidos corporales (sangre, heces, orina, hisopos nasales, oculares, tonsilares y semen) (Ellis et al., 1999b; Ouardani et al., 1999; Ellis et al., 2000a; Krakowka et al., 2000; Larochelle et al., 2000; Magar et al., 2000a; Kim y Chae, 2001b; Shibata et al., 2003).

Numerosos grupos de investigación han desarrollado y aplicado diversos test de PCR convencional para la detección de ácido nucleico específico de PCV2 (Morozov et al., 1998; Larochelle et al., 1999b; Hamel et al., 2000; Calsamiglia et al., 2002; Quintana et al., 2002; Shibata et al., 2003; Yang et al., 2003). Así mismo, también se describen variaciones del test de PCR, las cuales incluyen:

1. PCR múltiple. Se detecta más de una secuencia diana en un solo paso de PCR. Se ha descrito diversas PCR múltiples: PCV2/PCV1 (Larochelle et al., 1999a; Ouardani et al., 1999; Pogranichnyy et al., 2000), PCV2/PPV (Kim et al., 2001c), PCV2/PPV/ADV (Cao et al., 2005), PCV1/PCV2/ADV/PPV (Huang et al., 2004), PCV2/Mh/*Mycoplasma hyorhinis*/PRRSV cepa europea y americana/influenza virus tipo A (Harder y Huebert, 2004), PCV2/CSFV/ASFV/PRRSV/PPV (Giammarioli et al., 2008), PCV2/CSFV/PPV/PRRSV (Jiang et al., 2010) y PCV2/PPV/ADV/PRRSV (Yue et al., 2009).
2. PCR anidada. Permite amplificar un segmento específico de muy pequeño tamaño incluido dentro de fragmentos de ADN más extensos. Hay varias técnicas descritas en la literatura (Larochelle et al., 2000; Kim y Chae, 2001b; Kim et al., 2004a).
3. PCR múltiple anidada para la detección simultánea de PCV1/PCV2/PPV (Kim y Chae, 2003a; Kim et al., 2003e) y PCV1/PCV2 (Kim et al., 2001d).
4. PCR cuantitativa a tiempo real. Permite cuantificar el número de copias del genoma de PCV2 en suero y tejido. La reacción de PCR y detección están combinadas en un paso, lo que reduce el tiempo empleado en la técnica (Brunborg et al., 2004; Chung et al., 2005; Ladekjaer-Mikkelsen et al., 2002; Liu et al., 2000; Olvera et al., 2004; Opriessnig et al., 2003; Rovira et al., 2002).
5. PCR múltiple cuantitativa a tiempo real, para detectar y diferenciar los genotipos 2a y 2b de PCV2 (Gagnon et al., 2008).
6. PCR de transcripción inversa. Se usa para detectar ARN de PCV2, que solo está presente si el PCV2 se replica. Es necesaria la transcripción inversa del ARN para hacer el ADN complementario para una posterior amplificación (Yu et al., 2005).

La mayoría de los cerdos en condiciones naturales han tenido contacto con el PCV2 en algún momento de sus vidas. Por lo tanto, el uso de la PCR, que teóricamente puede detectar una copia del genoma, es considerada por muchos investigadores como demasiado sensible. La demostración de ácido nucleico de PCV2 por PCR no puede sustituir la valoración clínica de los cerdos ni el examen microscópico de los tejidos, dado que el PCV2 es ubicuo, y muchos cerdos pueden ser positivos a ADN específico de PCV2 sin estar, necesariamente, clínicamente y lesionalmente afectados de PCVD (Kim y Chae 2004a). Además, la detección de ácido nucleico de PCV2 en el suero o linfonodo inguinal superficial ha mostrado no tener correlación con las lesiones linfoides microscópicas típicas de PCVD cuando se comparaba con la HIS (Calsamiglia et al., 2002).

Sin embargo, Caprioli y colaboradores observaron, mediante PCR convencional, que se detectaba ADN de PCV2 con más frecuencia en el suero y plasma de cerdos con cantidades moderadas y elevadas de antígeno de PCV2 en tejidos lesionados (por tanto enfermos), por lo que la PCR podría ser una herramienta útil para el diagnóstico precoz de PCVD en animales vivos (Caprioli et al., 2006).

Una excepción podría ser el uso de la PCR para la detección de ácido nucleico de PCV2 en semen, y así asegurar mejor el estatus negativo. Se han descrito varios tipos de PCR para detectar PCV2 en semen (Larochelle et al., 2000; Kim et al., 2001d y 2003e; Pal et al., 2008). La cantidad de ácido nucleico de PCV2 en suero y tejido determinada por PCR cuantitativa a tiempo real es predictiva del resultado clínico y de este modo, puede ser utilizada por los veterinarios en el diagnóstico tanto de clínico como experimental (Brunborg et al., 2004; Olvera et al., 2004). Se ha demostrado que un umbral de 10^7 o mayor de copias genómicas de PCV2 por mililitro de suero, se correlaciona bien con lesiones graves y enfermedad asociadas a PCV2 y, por tanto, con un mal pronóstico (Brunborg et al., 2004; Olvera et al., 2004). Un resultado de PCR podría ser por lo tanto negativo; positivo sin PCVAD ($<10^6$ copias de ADN de PCV2); positivo con sospecha de PCVAD (10^6 copias de ADN de PCV2); o positivo PCVAD (10^7 o más copias de ADN de PCV2) (Brunborg et al., 2004).

Otros autores han propuesto umbrales de $10^{4.7}$ (Harding et al., 2008), $10^{6.21}$ (Grau-Roma et al., 2009), $10^{6.93}$ (Fort et al., 2007), 10^7 (Segalés et al., 2005b) y $10^{7.43}$ (Grau-Roma et al., 2009) copias genómicas/ml de suero, como indicativos de PCVD. Estas variaciones dependen tanto del laboratorio como de la técnica empleada. Por lo tanto, esta PCR no puede sustituir al examen histopatológico y a la detección del PCV2 en tejidos para el diagnóstico de PCVD a nivel individual (Grau-Roma et al., 2009), pero si es de utilidad para el diagnóstico a nivel de granja (Grau-Roma et al., 2011).

Los análisis moleculares de ácidos nucleicos se han realizado habitualmente utilizando ADN procedente de tejido fresco o congelado (Kim y Chae 2001b). En el campo del diagnóstico patológico, no siempre se dispone de tejido fresco o en congelación. En la patología veterinaria, la fijación en formalina es el método estándar para la preservación de los tejidos, y son estos los que constituyen la mayor fuente de material para los numerosos estudios a realizar sobre enfermedades del ganado porcino (Kim y Chae, 2004a). Además, este método de fijación permite el envío a los laboratorios de muestras bien preservadas y en un estado no infeccioso (Kim y Chae, 2001b).

La recuperación de ADN de tejido fijado en formalina y embebido en parafina y el desarrollo de la PCR para la amplificación de regiones específicas han aumentado la posibilidad para los análisis moleculares de tejido embebidos en parafina, teniendo un gran impacto en el campo del diagnóstico patológico. De esta forma se pueden realizar estudios retrospectivos sin necesidad de disponer de tejido fresco o congelado. En comparación con otros métodos de identificación tales como aislamiento viral o ISH, la PCR de tejido fijado en formalina y embebido en parafina es un método sencillo y sensible (Kim y Chae, 2003a). Aunque se considera que dichos tejidos son una fuente pobre de ADN debido a los supuestos daños que ocurren durante el procesado de los tejidos (Greer et al., 1991b) se pueden realizar protocolos optimizados de extracción con pequeñas modificaciones para obtener suficiente ADN de calidad para realizar la PCR y poder realizar estudios retrospectivos.

La calidad del ADN y por tanto el éxito de la PCR va a depender de factores como tiempo transcurrido entre la obtención del tejido y su fijación, tipo de fijador, tiempo de fijación, niveles de nucleasas, tiempo de almacenamiento del tejido en el bloque de parafina y longitud del fragmento de ADN a amplificar (Goelz et al., 1985; Ben-Ezra et al., 1991; Greer et al., 1991b; Greer et al., 1994).

La presencia de inhibidores de la PCR en tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina es un problema que frecuentemente lleva a resultados falsos negativos (An y Fleming, 1991; Bascuñana y Belák, 1996). Para eliminar estos inhibidores, algunos investigadores utilizan complejos protocolos de purificación (An y Fleming, 1991). Sin embargo, habría que sopesar su utilización ya que se incrementa el riesgo de contaminación en cada manipulación.

Utilizando como fijador el formol tamponado al 10%, se consiguió amplificar fragmentos de ADN de hasta 1327 pb en muestras fijadas durante 24h y embebidas en parafina, mientras que pasados 30 días, solo se pudieron amplificar fragmentos de 268 pb. (Greer et al., 1991a). Según Bogdan y colaboradores en 2001, la fijación de las muestras hasta 7 días en formalina no afectó a la amplificación de un fragmento de 481 pb de PCV2 (Bogdan et al., 2001).

La detección de PCV2 en tejido fijado en formol y embebido en parafina es un método sencillo y sensible que permite una detección fiable en el diagnóstico patológico (Kim y Chae, 2001b), aunque en ocasiones puede haber fallos en la amplificación que dé lugar a falsos negativos (Kiatipattanasakul-Banlunara et al., 2002). Hay que tener en cuenta que la detección

de ADN de PCV2 por PCR solo es diagnóstica de PCVD si se interpreta junto con las lesiones histológicas características (Chae, 2004)

2.10.1.7 Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (Restriction fraction length polymorphism, RFLP).

En el campo de la patología del ganado porcino, la diferenciación de las cepas por RFLP se hace de manera rutinaria para el PRRSV (Wesley et al., 1998) mostrando ser una herramienta epidemiológica útil para determinar si se ha introducido una nueva cepa en la granja, aunque la estabilidad del patrón RFLP de un determinado PRRSV está en duda debido a los continuos cambios genéticos (Cha et al., 2004). Un test PCR-RFLP basado en ORF2 usando las enzimas *HinfI*, *HinP1I*, *KpnI*, *MseI*, y *RsaI* fue capaz de diferenciar distintas cepas de PCV2 (PCV2A, B, C, D, y E) (Hamel et al., 2000). Por otra parte, el uso de la enzima *NcoI* sirve para diferenciar PCV1 de PCV2 (Fenaux et al., 2000). Posteriormente, mediante una PCR-RFLP basada en ORF2 y utilizando las enzimas *Sau3AI*, *BanII*, *NspI*, *XbaI*, y *CfrI* se diferenciaron 9 patrones de PCV2 (Wen et al., 2005). Por lo general, el análisis de los patrones RFLP ofrece un rápido medio para categorizar de forma general las cepas de PCV2; sin embargo, los genomas a menudo varían entre sí, fuera de los sitios de restricción, por lo que se debe tener cautela con la interpretación de los resultados (Opriessnig et al., 2007).

2.10.1.8 Secuenciación.

Con el análisis de secuencia es posible caracterizar la información genética y comparar las cepas entre sí (Choi et al., 2002; de Boissésón et al., 2004; Fenaux et al., 2000; Grierson et al., 2004b; Kim y Lyoo, 2002). El PCV2 tiene dos genes principales que están orientados en direcciones opuestas y que representan el 93% de todo el genoma: gen rep (asociado a la replicación; ORF1) y el gen cap (cápside; ORF2) (Kim y Lyoo, 2002; de Boissésón et al., 2004).

La diferencia genética entre los aislados de PCV2 se debe principalmente a la variabilidad en ORF2 (90,1-100% de la identidad de secuencia de aminoácidos (de Boissésón et al., 2004; Fenaux et al., 2000). El gen ORF1 parece estar bastante conservado entre los aislados de PCV2 (99-100% de la identidad de secuencia de aminoácidos) (de Boissésón et al., 2004). Para investigar posibles diferencias entre los aislados de PCV2, los laboratorios de diagnóstico e investigación deberían secuenciar solamente el gen ORF2 o la secuencia del genoma entero de PCV2 (de Boissésón et al., 2004; Fenaux et al., 2000). Actualmente, los

resultados de secuenciación pueden ser una herramienta epidemiológica útil, pero por el momento, no permiten identificar características de virulencia (Opriessnig et al., 2007).

2.10.1.9 Hibridación in situ (ISH).

La ISH para PCV2 usa sondas de ADN marcadas que se corresponden con una porción específica del genoma de PCV2 (Kim y Chae, 2003b; McNeilly et al., 1999; Rosell et al., 1999; Sirinarumitr et al., 2000). Dicha técnica permite visualizar la localización del PCV2 en los tejidos, proporcionando detalles de la arquitectura tisular y celular, correlacionando las lesiones con la presencia de PCV2. Dicha técnica es menos susceptible que la IHQ a las alteraciones estructurales causadas por la fijación en formalina cuando se utilizan tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina (Kim y Chae, 2001a). Se han descrito diversas ISH para la detección de múltiples virus en una misma sección de tejido: PCV1/PCV2 (Nawagitgul et al., 2000; Kim y Chae, 2001a), PCV2/PRRS (Sirinarumitr et al., 2001), y PCV2/PPV (Kim y Chae, 2002).

2.10.2 Técnicas Indirectas. Detección de antígenos anti-PCV2. Estudios serológicos

La serología se usa principalmente nivel de granja para determinar el momento de infección/contacto por PCV2, mediante análisis secuencial o estudio transversal en la población. Los estudios serológicos han mostrado que los anticuerpos frente a PCV2 están presentes globalmente en casi todas las granjas porcinas estudiadas y en, hasta el 100% de los cerdos en dichas granjas (Magar et al., 2000b; Walker et al., 2000; Opriessnig et al., 2004c).

2.10.2.1 Ensayo Indirecto con Anticuerpos Fluorescentes o Inmunofluorescencia Indirecta (indirect immunofluorescence antibody assay, IFA).

Esta técnica ha sido descrita para PCV2 por varios autores (Tischer et al., 1995a; Allan et al., 1998a; Pogranichnyy et al., 2000). Posteriormente se ha descrito una IFA basado en ORF2 (Racine et al., 2004). Al comparar esta nueva técnica con la IFA normal, basada en el PCV2 completo, se determinó que esta última tenía solo una sensibilidad relativa del 57,1% en comparación con la IFA basada en la proteína ORF2 utilizada como referencia (Racine et al., 2004). Los ensayos de inmunofluorescencia también han sido descritos para anticuerpos contra

el PCV1 no patogénico y parecen ser específicos (Fenaux et al., 2003). Los estudios muestran que hay un bajo nivel de reacción cruzada entre PCV1 y PCV2 en los ensayos IFA (Allan et al., 1998a; Pogranichnyy et al., 2000).

2.10.2.2 Ensayo de Inmunoperoxidasa en Monocapa (indirect immunoperoxidase monolayer assay, IPMA).

Dicha técnica es utilizada frecuentemente (Ellis et al., 1998; Blanchard et al., 2003). Una investigación interlaboratorial, en Europa y Canadá, comparó los resultados de IFA e IPMA en 20 muestras de suero. Los resultados revelaron una gran variación de títulos entre los laboratorios, siendo, de manera general, mas altos con IPMA que con IFA. Dichas diferencias pueden atribuirse a las distintas metodologías empleadas en cada laboratorio (McNair et al., 2004).

2.10.2.3 Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzima (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA).

El ELISA es una técnica sensible para la detección y medida de anticuerpos séricos. Hay diversas publicaciones que describen ELISAs para PCV2 (Nawagitgul et al., 2002; Blanchard et al., 2003; Liu et al., 2004;). En Europa se ha desarrollado un ELISA de captura comercial que detecta PCV2 IgG e IgM (Ingezim[®] PCV IgG/IgM, Ingenasa, España). La comparación de los niveles de IgG e IgM es útil para determinar el momento de la infección por PCV2: valores de IgM \geq IgG: infección temprana activa (dentro de los primeros 21 días postinoculación); valores de IgM < IgG: infección activa ya establecida (aproximadamente entre 20 y 50 días postinoculación); valores altos de IgG sin IgM: infección tardía o convaleciente (aproximadamente 2 meses después de la infección) (Segalés et al., 2005c). También hay disponible un ELISA por competición específico contra anticuerpos de PCV2 (SERELISA[®] PCV2 Ab Mono Blocking, Synbiotics Europe, Francia). Este ELISA también se puede utilizar para detectar anticuerpos específicos de PCV2 en heces (López et al., 2005).

2.10.2.4 Seroneutralización.

Dado que el PCV2 no induce un efecto citopático visible en las células infectadas, la seroneutralización requiere o anticuerpos fluorescentes o tinción de inmunoperoxidasa al final

del test para determinar la presencia o ausencia de replicación del virus. Los requisitos para el pretratamiento de las células para sincronizar el ciclo celular hacen que estos test de neutralización de virus en suero sean difíciles de realizar, y que los valores de la lectura final sean menos exactos (Opriessnig et al., 2007).

Se han detectado anticuerpos neutralizantes entre los 15 y 28 días (Pogranichnyy et al., 2000; Meerts et al., 2005b) después de la infección experimental por PCV2. La presencia de anticuerpos neutralizantes se ha correlacionado con la protección o eliminación de la infección por PCV2 en cerdos gnobióticos (Meerts et al., 2006).

2.11 Prevención y Control

Las circovirosis porcinas tienen un gran impacto sobre la producción porcina. Se ha estimado que su coste varía entre 562-900 millones de Euros anuales para la Unión Europea, siendo el coste por animal de 2,31 a 16,19 Euros según su presentación sea moderada o severa (Armstrong y Bishop, 2004; Tucker, 2006; Burch, 2007).

Las pérdidas pueden ser directas o indirectas. Las directas son debidas a cerdos no viables, incapaces de llegar al peso de mercado. Las pérdidas indirectas vienen dadas por el aumento en el uso de antibióticos en un intento de controlar las infecciones bacterianas concurrentes, y los cambios en las prácticas de manejo de la granja en un intento de reducir el impacto de las PCVD (Segalés et al., 2005a). Por ello se hace necesario aplicar una serie de estrategias de actuación para minimizar su impacto.

2.11.1 Buenas Prácticas de Manejo

Antes de la disponibilidad de vacunas para PCV2 en 2006 en Norteamérica, el éxito del tratamiento y control de PCVD estaba principalmente enfocado en asegurar buenas prácticas de producción que minimizasen el estrés, eliminaran las coinfecciones o minimizaran su efecto, y eliminaran los potenciales factores desencadenantes que inducen la estimulación inmune y desencadenan la progresión de infección por PCV2 a PCVD (Opriessnig et al., 2007).

Estudios prospectivos llevados a cabo en Francia desde 1998, han mostrado claramente que se han producido cambios en el manejo de las granjas severamente afectadas de PCV2-SD/PMWS. En este tiempo, se propuso el llamado plan de 20 puntos de Madec para el control de PCVD en las granjas gravemente afectadas (Madec et al., 1999 y 2000).

Los principales puntos de este plan han sido resumidos en las 4 reglas de oro e incluyen 1) limitar el contacto cerdo-cerdo, 2) reducción del estrés, 3) buena higiene y 4) buena nutrición. Se han obtenido resultados positivos significativos cuando dichas medidas de manejo han sido aplicadas y se han conseguido mejoras significativas en las tasas de pérdidas cuando el grado de cumplimiento de las medidas recomendadas fue alto (Guilmoto y Wessel-Robert, 2000).

En un estudio para determinar los factores de riesgo para PCVD en 62 granjas de España se observó que, la vacunación de las cerdas primerizas contra PRRSV aumentaba la probabilidad de expresión de PCVD y que la vacunación de las cerdas contra la rinitis atrófica disminuía la probabilidad de enfermedad, aunque pudieran ser solo variables de confusión sin una clara razón que pueda explicar estos efectos (López-Soria et al., 2005).

La investigación de los factores de manejo asociados con el estatus de las granjas, realizado en 61 explotaciones en Manitoba, Canadá, dio lugar a una fuerte asociación entre el incremento de la mortalidad en lechones y la infección por PCV2, Mh, PRRSV, diarrea causada por *E. coli* K88, proximidad de otras granjas, múltiples proveedores, amplio rango de edades dentro del mismo grupo de cerdos, y el no uso de plasma seco pulverizado en la primera ración en la transición (Dewey et al., 2006).

2.11.2 Desinfección

Una desinfección adecuada de las instalaciones es otro de los puntos clave para el control de PCVD. Se recomienda el uso, en edificios y medios de transporte, de los desinfectantes que han mostrado ser eficaces contra el PCV2. Se ha observado una reducción estadísticamente significativa de los títulos víricos *in vitro* con hidróxido sódico, Virkon[®] S (agente oxidante), lejía Clorox[®] (agente oxidante), Roccal[®] D Plus (amonio cuaternario), Fulsan[®] (amonio cuaternario), 1-Stroke Environ[®] (compuesto fenólico), y Tek-Trol[®] (compuesto fenólico) (Royer et al., 2001), así como con cloro activo, aldehídos con o sin amonio cuaternario y monopersulfato potásico en condiciones laborales controladas (Martin et al., 2008).

La efectividad real de los desinfectantes en condiciones de campo se desconoce. En las instalaciones de la Universidad del Estado de Iowa, se sigue habitualmente el siguiente protocolo: tras retirar los animales, las salas y corrales se cubren con un producto detergente desengrasante, aplicado en forma de espuma a una dilución de 1:64. Tras 10 minutos, el producto detergente desengrasante se aclara con agua caliente aplicada a presión. La descontaminación se realiza con la aplicación de Virkon® S a una dilución de 1:30 dejando actuar el producto durante 10 minutos, seguido de un aclarado con agua caliente. Antes de la llegada de nuevos animales, las instalaciones son nebulizadas con Clidox® S (agente oxidante) a una dilución de 1:5:1 y se deja secar. Para minimizar la corrosión, las instalaciones son aclaradas con agua de 6 a 12 horas después de la nebulización y se dejan secar antes de introducir nuevos cerdos (Opriessnig et al., 2007).

2.11.3 Control de Coinfecciones

Las coinfecciones juegan un importante papel en PCVD, tanto a nivel experimental como en infecciones naturales (Allan et al., 1999a; Krakowka et al., 2000; Harms et al., 2001; Rovira et al., 2002; Opriessnig et al., 2004b; Grau-Roma et al., 2011) y los diferentes estudios realizados indican que el diagnóstico y control de otros agentes infecciosos encontrados en cerdos con PCVD disminuyen la gravedad del cuadro clínico-lesional (Opriessnig et al., 2007).

Como se ha dicho anteriormente, aunque la activación inmune puede ser un importante factor desencadenante de PCVD y un hecho crucial en la patogenia de la enfermedad, desde el punto de vista práctico, el excluir el uso de las vacunas de los programas sanitarios puede ser inadecuado, en la medida que el riesgo de eliminar vacunas eficaces, es mayor que el riesgo de inducir PCVD en un bajo porcentaje de cerdos en la población porcina. Por lo tanto, en base a los resultados disponibles, los productores con granjas afectadas de PCVD deberían determinar el momento aproximado de la infección por PCV2, con el objetivo de replanificar las vacunaciones como un potencial plan para minimizar la enfermedad (Opriessnig et al., 2003).

Desde un punto de vista práctico, los intentos de controlar las PCVD mediante la vacunación frente a PPV en cebaderos en EEUU, con circulación confirmada de PPV, han sido repetidamente exitosos (Halbur, 2001). Sin embargo, el efecto positivo de la vacunación frente a PPV en la reducción de la incidencia clínica de PCV2-SD/PMWS no se ha probado experimentalmente (Opriessnig et al., 2004a). El efecto del PRRSV puede ser eliminado o minimizado mediante vacunación frente a PRRSV de las granjas de cría y en los lechones,

mejorando el estado sanitario y la productividad, reduciendo los efectos de PCVD (Mavromatis et al., 1999; Alexopoulos et al., 2005; Kritas et al., 2007).

Un estudio evaluó las pérdidas o ganancias asociadas con el uso de 3 bacterinas comerciales de Mh con diferentes coadyuvantes en cerdos coinfectados experimentalmente con Mh y PCV2 (Halbur et al., 2006). Un total de 296 cerdos negativos a Mh fueron asignados aleatoriamente a uno de los 4 grupos de tratamiento. Se probaron tres vacunas comerciales, administradas según indicaciones del fabricante: 2 bacterinas con adyuvante oleoso, y 1 bacteria con adyuvante acuoso. El desafío frente a Mh indujo lesiones macroscópicas y microscópicas graves en los cerdos no vacunados. Los cerdos de todos los grupos vacunados tuvieron una media de peso corporal y una ganancia media diaria significativamente mayor a los 100 y 131 días postinoculación comparados con los controles no vacunados (Halbur et al., 2006).

Por el contrario, otro estudio de campo con 930 cerdos de cebo de 53 a 54 días de edad, no encontró diferencias en la incidencia del PCV2-SD/PMWS (pérdida de peso o adelgazamiento, lesiones histopatológicas características, antígeno de PCV2 intralesional) entre los cerdos vacunados frente a Mh y los vacunados con placebo (Haruna et al., 2006). Se ha demostrado que para minimizar el efecto potenciador de los productos adyuvantes de las vacunas de Mh sobre la replicación del PCV2 y lesiones asociadas a PCV2, los cerdos deberían ser vacunados de 2 a 4 semanas antes de la exposición estimada al PCV2 (Opriessnig et al., 2006b).

Las infecciones bacterianas específicas (*S. suis*, *H. parasuis*, *P. multocida*, *L. intracellularis*, *Salmonella* spp.) tienen que ser confirmadas y pueden ser minimizadas mediante el uso de antimicrobianos y bacterinas apropiadas. El uso de clortetraciclina (Aureomycin) a una dosis aproximada de 22mg/Kg en la comida de cerdos experimentalmente coinfectados con Mh y PCV2, aportó pruebas de que dicho tratamiento es altamente eficaz en reducir las lesiones producidas por la coinfección de PCV2 y Mh (Opriessnig et al., 2006h).

El uso de antiinflamatorios también podría ser de utilidad. Se ha demostrado que el uso en la comida de ácido acetilsalicílico reduce significativamente la incidencia de tratamiento antibiótico en cerdos tratados comparados con cerdos no tratados en granjas, con una mortalidad postdestete del 10 al 15% (Fruergaard et al., 2006).

2.11.4 Estatus de Infección por PCV2 y Títulos Serológicos de la Cerda en el Parto

Se ha descrito que la infección por PCV2 o títulos séricos bajos frente a PCV2 en cerdas en el momento del parto tienen un efecto significativo sobre la mortalidad total de su camada debida a PCV2-SD/PMWS. Los lechones procedentes de cerdas infectadas (virémicas) por PCV2 tienen el doble de riesgo de morir que los procedentes de cerdas no infectadas (no virémicas), mientras que la mortalidad en lechones procedentes de una cerda con títulos de anticuerpos bajos, era tres veces mayor que el de lechones de cerdas con títulos medios o altos (Allan et al., 2002b; Calsamiglia et al., 2007). Por lo tanto, aquellas medidas que incrementen la inmunidad materna y reduzcan la viremia en las cerdas en el momento de parto, podrían disminuir el impacto de PCV2-SD/PMWS sobre la mortalidad de los lechones. Desde el punto de vista práctico, estas posibilidades podrían ser conseguidas potencialmente mediante la vacunación frente a PCV2 de cerdas y primerizas, y/o infección controlada de PCV2 durante el periodo de aclimatación (Joisel et al., 2007a).

2.11.5 Papel de la Nutrición en PCV2-SD/PMWS

En algunas granjas del Reino Unido se ha conseguido un control parcial del PCV2-SD/PMWS mediante cambios en la dieta de los animales afectados (Donadeu et al., 2003). Estos cambios incluyen un incremento en la densidad de nutrientes en la dieta de los cerdos jóvenes y la incorporación de aditivos comerciales, la mayoría de ellos con efectos antioxidantes. Sin embargo, estos resultados no han sido confirmados por otros autores.

Por otra parte, se ha demostrado que el ácido linoleico conjugado y el plasma seco pulverizado atenúan los efectos clínicos del PCV2-SD/PMWS (Bassaganya-Riera et al., 2003; Dewey et al., 2006). También, se ha sugerido que la adición de vitamina E y/o Selenio en la comida podría ser beneficiosa en aquellas granjas con PCV2-SD/PMWS (Baekbo et al., 2004) ya que se ha comprobado que el Selenio tiene un efecto inhibitorio sobre la replicación del PCV2 *in vitro* (Pan et al., 2008). En general, aunque ciertos datos preliminares en la nutrición en campo, así como en experimentos indican que ciertos factores nutricionales podrían favorecer una disminución en el desarrollo de PCV2-SD/PMWS, no hay suficiente información científica disponible para establecer el efecto real de la nutrición en esta enfermedad (Segalés et al., 2005a).

2.11.6 Terapia Sérica

La inyección subcutánea de suero hiperinmune frente a PCV2 de cerdos procedentes de mataderos comerciales o convalecientes, en lechones en lactación o en transición ha tenido éxito, reduciendo la mortalidad en diversas granjas afectadas de PCV2-SD/PMWS (Ferreira et al., 2001; Waddilove y Marco, 2002). Sin embargo, los resultados de este procedimiento han sido desiguales y su uso en algunas granjas no ha tenido efectos significativos (Hassing et al., 2006; Opriessnig et al., 2006i; Thomas et al., 2007).

Es importante señalar que se deben tomar precauciones rigurosas cuando se lleva a cabo la terapia sérica. La recogida de sangre debe ser de la misma granja afectada para evitar cualquier riesgo de introducir otros agentes patógenos y el sangrado e inyecciones deben llevarse a cabo bajo condiciones de máxima higiene (Segalés et al., 2005a). Dicha práctica se ha vuelto en gran medida irrelevante con la llegada de las vacunas (Grau-Roma et al., 2011).

2.11.7 Vacunas frente PCV2

En la actualidad existen 5 vacunas comerciales disponibles, Circovac[®], Ingelvac CircoFLEX[®], Porcilis[®] PCV (UE)/Circumvent[®] PCV (EEUU), Suvaxyn[®] PCV one dose y Foster[®] PCV-Mh (Gillespie et al., 2009; Grau-Roma et al., 2011; Neuberger et al., 2013).

Circovac[®] es una vacuna inactivada con adyuvante oleoso, para uso en hembras en edad de reproducción. Ingelvac CircoFLEX[®] es una vacuna de subunidad basada en la cápside expresada en baculovirus inactivado, y se administra en lechones mayores de 3 semanas de edad. Porcilis[®] PCV (UE)/Circumvent[®] PCV (EEUU), también es una vacuna de subunidad basada en la cápside expresada en baculovirus inactivado que se puede administrar a lechones mayores de 3 días de edad y repetir a las 3 semanas. Suvaxyn[®] PCV one dose es una vacuna inactivada quimérica PCV1-2, que se administra en lechones mayores de 4 semanas de edad. Foster[®] PCV-Mh, también es una vacuna inactivada quimérica PCV1-2, que se aplica en lechones a partir de las 3 semanas de edad. Aunque actualmente se considera que el genotipo PCV2b es el predominante (Gagnon et al., 2007; Dupont et al., 2008; Kim et al., 2011a; Shen et al., 2012), todas estas vacunas están basadas en el genotipo PCV2a, y han mostrado conferir inmunidad cruzada contra PCV2b en condiciones experimentales (Fort et al., 2008; Opriessnig et al., 2009).

La vacunación de las cerdas y de las primerizas aumenta los títulos de anticuerpos frente a PCV2 en el suero y en el calostro, protegiendo a los lechones contra el desarrollo de PCV2-SD/PMWS (Joisel et al., 2007a y b; Opriessnig et al., 2010). Los lechones suelen ser vacunados después de las 3 semanas de edad, que es cuando disminuyen los anticuerpos maternos. Esto provoca una respuesta de anticuerpos neutralizantes y reduce o retrasa la infección por PCV2 durante el destete o engorde (Fort et al, 2008; Opriessnig et al, 2009).

Todas estas vacunas han mostrado su eficacia tanto en condiciones naturales como experimentales, reduciendo la incidencia de PCV2-SD/PMWS, la tasa de mortalidad, mejorando la ganancia de peso media diaria y los índices de conversión de alimento (Fachinger et al., 2008; Horlen et al., 2008; Kixmöler et al., 2008; Segalés et al., 2009; Pejsek et al, 2010). Así mismo, la vacunación reduce el número de coinfecciones (Kixmöler et al., 2008) y la severidad de las lesiones en tejidos linfoides (Segalés et al., 2009).

Estudios experimentales han mostrado que las vacunas reducen los niveles de viremia y la severidad de las lesiones histológicas, incluso con la presencia de anticuerpos maternos, por lo que pueden aplicarse antes de la edad habitual de infección, y usando tanto una como dos dosis de vacuna (Fort et al., 2008 y 2009; Opriessnig et al., 2008a, 2008b y 2009; Neuberger et al., 2013). Otro trabajo ha demostrado que la vacunación de madres y lechones tiene efectos similares en términos de reducción de la carga viral, en los lechones en crecimiento, y que la vacunación de los lechones con la vacuna utilizada en sus madres no afectaba a la eficacia de la misma (Opriessnig et al., 2010). Se requieren más estudios para valorar la posibilidad de que los anticuerpos maternos interfieran con la respuesta humoral inducida por la vacuna (Fachinger et al., 2008, Fort et al., 2009), aunque los resultados de estudios de campo y experimentales indican que las vacunas superan, en parte, este efecto.

Por el contrario, también hay descripciones a nivel de campo de fallos de la vacuna, principalmente en casos en los que la exposición a PCV2 ocurre hacia la mitad o final del cebo en cerdos vacunados a temprana edad. Entre las posibles causas para el fallo vacunal se incluirían factores asociados a la granja, tales como falta de cumplimiento de unos correctos protocolos de vacunación, fallos en la dosificación, o vacunación de animales enfermos o inmunocomprometidos, factores asociados a la vacuna como diferencias antigénicas entre las cepas vacunales y las de campo, tipo de adyuvante, cantidad de antígeno PCV2 en la vacuna, y régimen de administración (Opriessnig et al., 2009), así como a mutaciones del PCV2 (Opriessnig et al., 2013; Salgado et al., 2014).

3 MATERIAL Y MÉTODOS



3.1 Material

En el presente estudio se utilizaron 25 animales procedentes de una explotación de porcinos híbridos, de 130 madres y ciclo cerrado, ubicada en Gran Canaria. Esta explotación tenía un plan sanitario que incluía la vacunación de las reproductoras frente a ADV (AD live Suivax, Fatro Iberica), MR y PPV (Parvosuín-MR, Hipra), y de los lechones frente a Mh (Stellamune Uno, Pfizer). Presentaba un estado sanitario de nivel 2 según los parámetros descritos por Muñoz y colaboradores en 2007, siendo la mortalidad esperada en transición o postdestete para este nivel de un 1.5-2%. En dicha explotación se produjo un aumento de la tasa de mortalidad en lechones de 2 meses de edad llegando la misma a un 17%. Los principales signos clínicos observados fueron retraso en el crecimiento, adelgazamiento, taquipnea, disnea y, en algunos casos, diarrea.

Se remitieron 14 animales vivos con esta sintomatología al Servicio de Necropsias del Departamento de Morfología e Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentario (IUSA) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC) y fueron sacrificados mediante sedación profunda por vía endovenosa con tiobarbital (Grupo B.Braun, Barcelona, España).

De estos animales, previamente al sacrificio, se extrajo sangre a partir de la vena cava craneal, que fue depositada en tubos, con y sin anticoagulante (EDTA).

En el presente estudio también se incluyeron 11 animales hallados muertos en la explotación donde se les practicó la necropsia, siempre dentro de las 24 horas posteriores a su muerte, o se trasladaron a la Facultad de Veterinaria con igual fin, igualmente, dentro de las 24 horas posteriores a su muerte.

A cada animal se le practicó una necropsia completa y reglada (King et al., 1989), y del mismo se recogieron sistemáticamente muestras para su posterior estudio. Las muestras tomadas para su posterior estudio histológico, histoquímico e inmunohistoquímico, se fijaron en formol tamponado al 10% durante 24-48 horas, y después se procesaron rutinariamente, en un procesador automático de tejidos (Leica TP-1050, Leica Instruments, GmbH, Nussloch, Alemania) hasta su inclusión en parafina. Para los estudios microbiológicos y de biología molecular las muestras tisulares y de exudados se almacenaron en congelación a -80°C. Los tubos con sangre sin anticoagulante se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos para

separar el suero de la fracción celular. Dicho suero se recogió en Eppendorf y se almacenó en congelación a -80°C. La sangre con anticoagulante se conservó también en congelación a -80°C.

3.2 Métodos

3.2.1 Estudio Histológico

Las muestras fijadas en formol tamponado al 10% e incluidas en parafina se cortaron con un microtomo (Leica RM 2135, Leica Instruments, GmbH, Nussloch, Alemania) a 5 µm de grosor para, posteriormente, ser desparafinadas, rehidratadas y teñidas con hematoxilina-eosina (protocolo de H-E). Todas las muestras se analizaron con un microscopio óptico, con objetivos ópticos de diferentes aumentos, con el fin de valorar las posibles lesiones y realizar un diagnóstico histopatológico.

De forma específica, en el tejido linfoide (linfonodos inguinal superficial, iliaco, mediastínico y mesentérico, tonsila y bazo), se evaluó el grado de depleción linfoide (- normal, + leve pérdida de celularidad, ++ moderada, +++ severa con pérdida de la estructura folicular), el grado de infiltrado histiocítico-granulomatoso (- ausencia, + leve infiltrado, ++ moderado, +++ severo con reemplazamiento de folículos), y la presencia de células gigantes multinucleadas y de cuerpos de inclusión (Quintana et al., 2001; Opriessnig et al., 2004b).

Para determinar en qué órgano-tejido linfoide (linfonodos, tonsila y bazo) había mayor grado de depleción linfoide y/o de histiocitosis, a cada grado de lesión se le asignó un valor (0: ausencia, 1: leve, 2: moderado, 3: severo), y se sumaron los valores de cada tejido en el total de los 25 animales, por lo que la puntuación máxima para un tejido sería 75 (3x25).

3.2.2 Estudio Histoquímico

Para la demostración del Cilia Associated Respiratory Bacillus (CAR-bacillus) se utilizó la técnica argéntica de Warthin-Starry (W-S). Para ello se emplearon muestras de pulmón y tráquea fijadas en formol tamponado al 10% e incluidas en parafina. Dichas muestras fueron cortadas con un microtomo a 4 μm de grosor para, posteriormente, aplicar sobre los cortes tisulares la técnica (protocolo W-S). El CAR-bacillus se visualizó como estructuras bacilares de color negro en la superficie ciliar del epitelio respiratorio. La presencia de CAR-bacillus se valoró como ausencia (-), leve (+), moderada (++), y severa (+++).

3.2.3 Estudio Inmunohistoquímico

Para la detección inmunohistoquímica de los diferentes agentes patógenos se utilizaron tejidos fijados en formol tamponado al 10%, procesados e incluidos en parafina. Dichas muestras se cortaron en un microtomo a 3 μm y se recogieron en portaobjetos tratados con Poly-L-lysina, manteniéndolos, al menos durante 18 horas, en estufa a 37°C para lograr una mejor adherencia del corte, a fin de evitar su desprendimiento durante la realización de la técnica.

La demostración de los antígenos se realizó utilizando la técnica del Complejo Streptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP) (Dako-StreptAB-Complex/HRP, Dako, Glostrup, Dinamarca), siguiendo los métodos básicos descritos anteriormente por otros autores (Halbur et al. 1994; McNeilly et al., 2001).

Previamente al inicio de la técnica, las muestras se desparafinaron y rehidrataron mediante pases sucesivos por xilol y alcoholes de graduación decreciente. La inhibición de la peroxidasa endógena tisular se realizó mediante la inmersión de los cortes en una solución constituida por peróxido de hidrógeno diluido en metanol al 3% durante 30 minutos.

En función del antígeno a detectar, se utilizaron diferentes anticuerpos primarios monoclonales y/o sueros policlonales, y anticuerpos secundarios (Tabla 3.1 y 3.2).

Tabla 3.1. Relación de anticuerpos primarios utilizados en el estudio.

Anticuerpo	Tipo	Especificidad	Pretratamiento	Dilución	Fuente
C2-36A9	Monoclonal	Anti-PCV2	Sin pretratamiento	1/200	Ingenasa
1AC7	Monoclonal	Anti-PRRSV	Pronasa 8 min a 37°C	1/250	Ingenasa
Mh	Policlonal	Anti-Mh	Pronasa 5 min	1/800	Danish Vet. Lab.
E.Aujeszky	Policlonal	Anti-ADV	Sin pretratamiento	1/800	Dr. Poveda
2CF2	Monoclonal	Anti-ADV	Sin pretratamiento	1/10	Ingenasa
<i>Pasteurella</i>	Policlonal	Anti-Pasteurella spp. <i>Mannheimia haemolytica</i> y <i>P. multocida</i>	Pronasa 5 min	1/200	Ball, H.J (Veterinary Research Laboratories, Stormont, Belfast)

Tabla 3.2. Relación de anticuerpos secundarios utilizados en el estudio.

Anticuerpo Secundario	Anticuerpo Primario	Dilución	Fuente
Anti-IgG de ratón biotinado desarrollado en conejo	C2-36A9 (Anti-PCV2)	1/20	Dako, Glostrup, Dinamarca
	1AC7 (Anti-PRRSV)		
	2CF2 (Anti-ADV)		
Anti-IgG de conejo biotinado desarrollado en cerdo	Mh (Anti-Mh)	1/200	Dako, Glostrup, Dinamarca
	E. Aujeszky (Anti-ADV)		
	<i>Pasteurella</i> (Anti-Pasteurella spp.)		

3.2.3.1 Técnica Inmunohistoquímica para la Detección de Antígenos de PCV2

Para la selección del anticuerpo adecuado para la detección antigénica de PCV2 mediante técnicas inmunohistoquímicas, se realizó una estandarización preliminar utilizando 16 anticuerpos monoclonales (C2-34H6, C2-34F3, C2-36G7, C2-34F11, C2-35D11, C2-34C9, C2-31F9, C2-33G1, C2-36A9, C2-35H1, C2-36F1, C2-36A3, C2-37E9, C2-33H4, C2-21H7, C2-23H8) específicos contra este virus, elaborados y cedidos por los laboratorios Ingenasa S.A. (Madrid), quienes solicitaron su valoración para posteriormente ser comercializados.

La técnica empleada fue la Streptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP) y revelado con Diaminobencidina (DAB) (3,3', tetrahidrocloruro de diaminobencidina) (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, EEUU). La dilución del anticuerpo primario fue de 1/1, 1/10, 1/50, 1/100 y 1/200, con y sin pretratamiento para el desenmascaramiento antigénico (recuperación antigénica enzimática con proteasa y tratamiento térmico con buffer citrato). Posteriormente, se empleó suero normal de cabra y de conejo como procedimiento de preincubación, y luego, se utilizó el anticuerpo primario (anti-PCV2) que se incubó 18 horas a 4°C, o durante 4 horas a temperatura ambiente. Las pruebas se realizaron sobre muestras, cedidas por el Dr. Segalés de la Universidad Autónoma de Barcelona, de tonsila y linfonodo de cerdos infectados naturalmente con PCV2, y la infección se confirmó mediante ISH.

El anticuerpo monoclonal seleccionado fue el C2-36A9, a una dilución de 1/200 en suero normal de conejo, sin pretratamiento e incubación de 18 horas a 4°C. Éste fue el procedimiento de elección al presentar los mejores resultados inmunohistoquímicos. La inmunorreacción positiva se detectó como un granulado de color marrón oscuro, localizado principalmente en el citoplasma de células linfocíticas. Dicho anticuerpo fue el utilizado en las muestras problema y se seleccionó como cromógeno el 3-amino-9-aetilcarbazol (AEC) (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, EEUU) para minimizar las interferencias con pigmentos hemáticos (Protocolo PCV2).

La inmunorreacción frente al antígeno de PCV2 en los diferentes tejidos estudiados se valoró como ausencia (-), leve (+) (<15%), moderada (++) (15-50%), y severa (+++) (>50%) (Modificado de Rosell et al., 1999; Quintana et al., 2001; Opriessnig y cols. 2004b).

Para determinar en qué tejido se detectó mayor porcentaje de inmunorreacción frente a PCV2, se asignó un valor (0: ausencia, 1: leve, 2: moderado, 3: severo), y se sumaron los valores de cada tejido en el total de los 25 animales, por lo que la puntuación máxima para un tejido sería 75 (3x25).

3.2.3.2 Criterios de Clasificación de la Severidad de PCV2-SD/PMWS

Los criterios utilizados se basaron en el sistema de puntuación descrito por Opriessnig y colaboradores, (2004b y 2007). En nuestro estudio, se seleccionaron 6 tejidos linfoides (linfonodos inguinal superficial, iliaco, mediastínico y mesentérico, tonsila y bazo). De cada tejido se valora la depleción linfoide, histiocitosis e IHQ de PCV2, dando valores de 0 a 3 para cada uno de dichos parámetros (0: ausencia, 1: leve, 2: moderado, 3: severo), por lo que la máxima puntuación de cada tejido sería 9. La puntuación individual de los 6 tejidos se suma y se divide entre 6. Según el valor obtenido, los animales se dividen en cuatro categorías:

Categoría I 0: normal (sin lesiones asociadas a PCV2)

Categoría II 1-3: leve

Categoría III 4-6: moderado

Categoría IV 7-9: severo

Para diagnosticar enfermedad sistémica asociada a PCV2, es necesario, al menos, demostrar antígeno de PCV2 en más de un tejido linfoide (linfonodo, tonsila, bazo), o en un tejido linfoide y en, al menos, otro sistema (pulmón, hígado, riñón, intestino), o en dos sistemas. Si se asocia abundante cantidad de antígeno de PCV2 sólo con un sistema u órgano específico, debería denominarse enfermedad respiratoria asociada a PCV2, enteritis asociada a PCV2, o fallo reproductivo asociado a PCV2, más que enfermedad sistémica asociada a PCV2. Si hay una cantidad limitada de antígeno de PCV2 y lesiones severas, esto es compatible con PCVD crónica severa. Mediante la combinación de la puntuación de las lesiones y cantidad de antígeno de PCV2, es posible determinar el estadio de la infección (Opriessnig et al., 2004b y 2007) (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Estimación del estadio de infección por PCV2.

	Agudo (7–14 dpi)*	Subagudo (10–21 dpi)	Crónico (21–28 dpi)	Resolución (28–49 dpi)
Depleción	0-1	2-3	3	2-3
Histiocitosis	0-1	1	2-3	2-3
Antígeno PCV2	3	3	2-3	0-1

* dpi: días post-infección con PCV2. Adaptado de Opriessnig y colaboradores, 2007.

3.2.3.3 Técnica Inmunohistoquímica para la Detección de Antígenos de PRRSV

Para la detección de antígeno del virus del síndrome respiratorio y reproductor porcino (PRRSV), se utilizó un anticuerpo monoclonal identificado como 1AC7 suministrado por Ingenasa S.A. (Madrid), a una dilución de 1/250, con pretratamiento (proteasa al 0.1% en PBS) mediante inmersión durante 8 minutos a 37°C, revelado con 3-amino-9-aetilcarbazol (AEC) (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, EEUU) (Protocolo PRRSV).

Como control positivo se utilizaron muestras de pulmón de cerdo infectado experimentalmente con el virus del PRRS y cedidas por el Dr. Segalés de la Universidad Autónoma de Barcelona. En dicho control se observó inmunorreacción granular positiva a PRRSV de color rojo en el citoplasma de células histiocíticas presentes en los septos alveolares y en la luz de las vías aéreas.

La inmunorreacción frente al antígeno de PRRSV en los diferentes tejidos estudiados se valoró como ausencia (-), leve (+) (<15%), moderada (++) (15-50%), y severa (+++) (>50%) (modificado de Narita e Ishii, 2004).

3.2.3.4 Técnica Inmunohistoquímica para la Detección de Antígenos de ADV

Para la detección de antígeno del virus de la Enfermedad de Aujeszky (ADV, Aujeszky Disease Virus) mediante la técnica inmunohistoquímica se utilizó un suero policlonal y un anticuerpo monoclonal.

Suero Policlonal

Se utilizó un suero policlonal creado en conejo contra el virus de la Enfermedad de Aujeszky (antígenos vacunales del ADV), creado por el Dr. Poveda en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba. Este suero policlonal se empleó a una dilución 1/800, sin pretratamiento, y se reveló con diaminobenzidina (DAB) (3,3', tetrahidrocloruro de diaminobencidina) (Sigma Sigma Chemical Company, St. Louis MO, EEUU) (Protocolo ADV).

Como control positivo se utilizó tejido nervioso de un cerdo inoculado experimentalmente con ADV. En dicho control se observó inmunorreacción granular positiva a ADV de color marrón oscuro en el citoplasma y núcleo de neuronas y astrocitos de la corteza cerebral.

Anticuerpo Monoclonal

De forma previa a la aplicación de esta técnica en las muestras problema, se procedió a la selección de un anticuerpo monoclonal suministrado por Ingenasa S.A. (Madrid). Los anticuerpos empleados se identificaron como 2CF2, 2EF1, 2CG6, 2BD1, 2AE11.

Se procedió a la estandarización de los anticuerpos utilizando la técnica SBP, revelando con diaminobenzidina (DAB) (3,3', tetrahidrocloruro de diaminobencidina) (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, EEUU) a una dilución de anticuerpo primario de 1/10, 1/50, 1/100 y 1/200, sin pretratamiento, y con pretratamiento para el desenmascaramiento antigénico (recuperación antigénica enzimática con proteasa al 0,1% en PBS). La técnica se realizó sobre el tejido control positivo descrito anteriormente.

Con el anticuerpo 2CF2, sin pretratamiento, y a una dilución de 1/10, 1/50, 1/100, 1/200, se detectó inmunorreacción positiva, (fino granulado de color marrón) en el citoplasma y, en menor medida en el núcleo de neuronas y astrocitos de la corteza cerebral. La dilución 1/10 mostró una reacción más evidente que el resto de diluciones. No se observó reacción con los demás anticuerpos. Por lo tanto, el anticuerpo 2CF2 a una dilución de 1/10 sin pretratamiento, y revelado con 3-amino-9-aetilcarbazol (AEC) (Sigma Sigma Chemical Company, St. Louis MO, EEUU) fue la técnica seleccionada (Protocolo ADV).

3.2.3.5 Técnica Inmunohistoquímica para la Detección de Antígenos de Mh

Para la detección de antígeno de *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mh) se utilizó un suero policlonal suministrado por Danish Vet. Lab., a una dilución de 1/800 con pretratamiento (recuperación antigénica enzimática con proteasa al 0,1% en PBS) durante 5 minutos y revelado con 3-amino-9-aetilcarbazol (AEC) (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, EEUU) (Protocolo Mh).

Como control positivo se utilizó pulmón de cerdo inoculado experimentalmente con Mh (Tesis doctoral Dr. Lorenzo). En dicho control se observó inmunorreacción granular positiva a Mh con un color rojo en la superficie del epitelio ciliado de bronquios y bronquiolos.

La inmunorreacción frente al antígeno de Mh en pulmón y tráquea se valoró como ausencia (-), leve (+) (<15%), moderada (++) (15-50%), y severa (+++) (>50%) (modificado de Opriessnig et al., 2004b).

3.2.3.6 Técnica Inmunohistoquímica para la Detección de Antígenos de la familia *Pasteurellaceae*

Para la detección de antígeno de la familia *Pasteurellaceae* se utilizaron sueros policlonales suministrados por el Dr. Ball (Veterinary Research Laboratories, Stormont, Belfast), frente a *Pasteurella spp*, *Mannheimia haemolytica* (*Pasteurella haemolytica*), y *Pasteurella multocida* a una dilución de 1/200 con pretratamiento (recuperación antigénica enzimática con proteasa al 0,1% en PBS) durante 5 minutos y revelado con 3-amino-9-aetilcarbazol (AEC) (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, EEUU) (Protocolo Pasteurella).

Como control positivo se utilizaron pulmones de cerdos infectados naturalmente con *Pasteurella spp*, *Mannheimia haemolytica*, y *Pasteurella multocida* cuya presencia se confirmó mediante cultivo microbiológico. En dichos controles se observó reacción positiva de forma bacilar-granular de color rojo, de forma extracelular en el exudado presente en bronquios y bronquiolos, así como en el citoplasma de células histiocíticas.

La inmunorreacción frente a antígenos de *Pasteurella spp.*, *Mannheimia haemolytica* (*P. haemolytica*), y *P. multocida* en pulmón se valoró como ausencia (-), leve (+) (<15%), moderada (++) (15-50%), y severa (+++) (>50%)

3.2.4 Estudio Microbiológico

Muestras de diversos tejidos (pulmón, tonsila, encéfalo, riñón, hígado y linfonodos) y exudados (pericárdico y articular), conservadas a -80°C, procedentes de 20 animales se remitieron al Laboratorio de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, donde se realizó el correspondiente estudio microbiológico.

Para llevar a cabo el mismo, la superficie de las muestras se esterilizó mediante calor y posteriormente se accedió al interior del tejido mediante un corte con bisturí estéril, zona de la que se tomaron muestras mediante un hisopo estéril. Posteriormente, estos hisopos se utilizaron para la siembra, en condiciones de aerobiosis a 37°C durante 24 horas, en un medio de agar Columbia con 5% de sangre de cordero (agar-sangre) (Biomérieux, Madrid, España).

Tras dicho periodo de incubación se procedió a resembrar de nuevo en agar-sangre e incubar a 37°C, durante 24 horas, aquellas colonias de mayor crecimiento o aquellas sospechosas de ser *Streptococcus spp.* y/o *Pasteurella spp.* Las colonias se identificaron mediante pruebas bioquímicas básicas (Gram, oxidasa y catalasa) y galerías API multisustrato (Biomérieux, Madrid, España). Finalmente se procedió a realizar un antibiograma de la bacteria identificada.

Igualmente, se sembró en un medio específico, agar chocolate Polivitex (Biomérieux, Madrid, España), en condiciones de microaerofilia y se incubaron a 37°C durante 48 horas. Transcurrido dicho tiempo, las colonias sospechosas de *Actinobacillus spp.* y/o *Haemophilus spp.* se resembraron en el mismo medio de cultivo y se mantuvieron en las mismas condiciones anteriormente descritas. 48 horas después de su incubación, se procedió a realizar la prueba del CAMP, sembrando las colonias en agar sangre junto con *Staphylococcus aureus* y se incubaron durante 24 horas a 37°C en condiciones de microaerofilia. Cuando esta prueba resultó negativa, la colonia se identificó como *Haemophilus spp.* y, en caso contrario, se

caracterizó como *Actinobacillus spp.* realizándose posteriormente el correspondiente antibiograma.

3.2.5 Estudio mediante Técnicas Moleculares (PCR-ELISA)

Muestras de sangre y tejido conservadas a -80°C , fueron remitidas a los laboratorios Ingenasa S.A. (Madrid, España) para la detección de PCV2 y de PRRSV mediante la técnica de PCR-ELISA (INgen PCV2 11.PCV.K5 e INgen PRRS Universal 11.PRU.K5 respectivamente). Esta técnica consiste en la extracción y amplificación (PCR) del ácido nucleico y el empleo de una sonda específica del fragmento amplificado que detecta el producto de la amplificación fijado en placa. El revelado se realiza mediante un anticuerpo conjugado con peroxidasa (ELISA).

Las muestras utilizadas para la detección de PCV2 fueron sangre entera, pulmón, tonsila, y pool de linfonodos (linfonodo inguinal superficial, iliaco, mediastínico y mesentérico). Mediante la PCR se amplificó un fragmento de 710 pb de ORF2 específico de PCV2. Para la detección de PRRSV se utilizó sangre entera, pulmón y linfonodos mediastínicos. Mediante la PCR se amplificó un fragmento de 700 pb.

Dicha técnica consiste, primero, en una amplificación del material genético mediante una PCR convencional. Posteriormente, el producto de dicha amplificación se añade a placas de ELISA. Dado que los oligonucleótidos empleados en la amplificación han sido previamente marcados con biotina, los productos de dicha amplificación, en caso de producirse, se unirán a la streptavidina que tapiza los pocillos de la placa. Tras la desnaturalización de los fragmentos unidos, se añade una sonda especialmente diseñada de modo complementario a una región interna del fragmento amplificado previamente marcada. La hibridación se producirá en los pocillos donde se procesen muestras positivas y se pondrá de manifiesto al añadir un conjugado peroxidasa (PO), capaz de unir específicamente la sonda marcada, que se revelará al añadir el substrato adecuado a la PO, como se emplea rutinariamente en las técnicas de ELISA.

Los valores de densidad óptica (DO) para cada pocillo se leen en un espectrofotómetro utilizando un filtro de 450 nm. El valor DO para el Control Negativo de ELISA debe ser inferior a 0,220. El valor DO para el Control Positivo de ELISA debe ser superior a 1.

Se consideran positivas, es decir, que contienen material genético del virus, muestras que desarrollen valores de DO superiores en 0,155 unidades al valor de DO del control negativo.

Se consideran negativas, las muestras que desarrollen valores DO por debajo de este valor.

3.2.6 Estudio Serológico

Las muestras de suero fueron utilizadas para la detección, mediante la técnica de ELISA de anticuerpos anti-ADV, anti-MR, anti-PPV, anti-PRRSV, anti-App y anti-Mh, mediante el empleo de los kits comerciales INGEZIM ADV gE 1.1.GE.K.3, INGEZIM Mal Rojo 1.1.MR.K.1, INGEZIM PPV 1.1.PPV.K.1, INGEZIM PRRS Europa 1.1.PRS.K.1.K, CIVTEST SUIS APP y CIVTEST SUIS *Mycoplasma hyopneumoniae*, respectivamente.

El test INGEZIM ADV gE 1.1.GE.K.3 es un ELISA de bloqueo que utiliza un anticuerpo monoclonal específico de la proteína gE del virus de la Enfermedad de Aujeszky y presenta una especificidad del 99,8% y una sensibilidad del 98,9%. Este test establece dos puntos de corte (cut off) positivo y negativo. Las muestras se considerarán positivas cuando su valor de DO (densidad óptica) sea igual o inferior al punto de corte positivo. Las muestras se considerarán negativas cuando su valor de DO sea igual o superior al punto de corte negativo. Las muestras cuyo valor de DO esté entre ambos valores se considerarán dudosas.

Para que el ensayo se considere válido, han de cumplirse las siguientes condiciones:

- El valor de DO del control negativo debe oscilar entre 0,8 y 1,4.
- Control Positivo (CP) / Control Negativo (CN) < 0,3
- El cálculo de los puntos de corte se realiza aplicando la siguiente fórmula:
- Punto de corte Positivo = $CN - [(CN - CP) \times 0,4]$
- Punto de corte Negativo = $CN - [(CN - CP) \times 0,3]$

Las muestras cuya DO sea superior al punto de corte Negativo, deberán considerarse negativas (no contienen anticuerpos específicos frente a gE). Las muestras cuya DO sea inferior al punto de corte Positivo, se considerarán positivas. Las muestras con DO comprendida entre ambos valores, se considerarán dudosas.

El test INGEZIM Mal Rojo 1.1.MR.K.1 está basado en la técnica de ELISA indirecto, que utiliza un anticuerpo monoclonal específico de inmunoglobulinas porcinas. Este test establece dos puntos de corte: positivo y negativo. Las muestras cuyo valor de DO sea igual o superior al punto de corte positivo se considerarán como positivas. Las muestras cuyo valor de DO sea igual o inferior al punto de corte negativo serán consideradas como negativas. Las muestras cuyo valor de DO se encuentre entre ambos puntos de corte se considerarán dudosas.

El test se considerara válido cuando la DO a 450nm del control + sea superior a 1,5 y la DO del control negativo menor de 0,3. El cálculo de los puntos de corte se realiza aplicando la siguiente fórmula:

- Punto de corte Positivo = Media de D.O. (Control -) + 0,2
- Punto de corte Negativo = Media de D.O. (Control -) + 0,1

Las muestras se consideraran positivas cuando el valor que se obtenga sea superior al punto de corte Positivo y negativas cuando sea inferior al punto de corte Negativo. Las muestras que estén entre ambos valores deberán considerarse dudosas.

El test INGEZIM PPV 1.1.PPV.K.1 es un ELISA indirecto que utiliza un anticuerpo monoclonal específico de inmunoglobulinas porcinas, y antígeno recombinante (proteína VP2 de PPV). El test establece un punto de corte. Las muestras con un valor de DO mayor que el punto de corte se considerarán positivas, y las muestras con un valor de DO menor que el punto de corte se considerarán negativas. El título de la muestra será la última dilución de la misma que presente un valor de DO mayor que el punto de corte.

Para que el resultado se considere válido, han de cumplirse las siguientes premisas:

- DO (a 405nm) Control Positivo > 1,500
- DO Control Negativo < 0,200
- El título del control positivo debe estar entre 1/1600 y 1/3200.

El punto de corte Positivo/Negativo equivale a una DO de 0,3. De manera que las muestras con valores de DO superiores a 0.3 se consideraran positivas y por debajo de este valor, se considerarán negativas.

El test INGEZIM PRRS Europa 1.1.PRS.K.1.K está basado en la técnica del ELISA indirecto, que utiliza un anticuerpo monoclonal específico de inmunoglobulinas porcinas, y antígeno recombinante (proteína N de cepas europeas de PRRSV), mostrando una especificidad del 85% y una sensibilidad del 100%.

El test se considera válido cuando el valor de DO a 405nm del control Positivo sea superior a 1,5 y la del control Negativo menor de 0,25. El punto de corte Positivo/Negativo es el 15% de la DO del control Positivo. Las muestras con DO mayor o igual a este valor se consideraran positivas a anticuerpos frente a PRRSV. Las muestras con DO menores de este valor serán consideradas negativas.

El test CIVTEST SUIS APP, se trata de un ELISA indirecto para la detección y cuantificación de anticuerpos específicos frente a la exotoxina Apx I y a la proteína de membrana Tbp2 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (ambas proteínas sólo se expresan en infecciones activas).

El test se considera válido si la media de la DO a 405nm del control Positivo es >0,9 y si es 5 veces la media de la DO del control Negativo.

Para la interpretación de los resultados, es necesario calcular el valor IRPC (índice relativo x100) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{IRPC} = \left(\frac{(\text{DO de la muestra} - \text{DO media del control negativo})}{(\text{DO media del control positivo} - \text{DO media del control negativo})} \right) \times 100$$

Una muestra será negativa si el IRPC es menor o igual a 20, y será positiva si es mayor de 20, siendo del grupo 1 (serotipos menos virulentos) si está entre 20 y 60, y del grupo 2 (serotipos más virulentos) si es mayor de 60.

El test CIVTEST SUIS *Mycoplasma hyopneumoniae* es un ELISA de competición, que utiliza anticuerpos monoclonales frente al epítipo p74 (proteína de 74 KDa) de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Para validar el test se deben cumplir dos condiciones: el porcentaje de inhibición (%INH) del control Positivo deber ser mayor de 60, y la DO (450nm) del control Negativo mayor de 0,800.

Para calcular el porcentaje de inhibición se utiliza la siguiente fórmula:

$$\%INH = \left(\frac{\text{DO del control negativo} - \text{DO de la muestra}}{\text{DO del control negativo}} \right) \times 100$$

Las muestras con un %INH superior a 50 se consideraran positivas, si es inferior a 40, negativas, y si es menor o igual a 50 o mayor o igual a 40, dudosas.

3.3 Preparación de los Reactivos Empleados

Formol tamponado

- 100 ml de formol 40%.
- 4 g de fosfato sódico monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, EEUU).
- 6,5 g fosfato sódico dibásico (Na_2HPO_4) (Panreac, Química S. A., Barcelona, España).
- 900 ml agua destilada.

Fosfato Buffer Salino (PBS) pH 7.2

- 1 litro de H_2O destilada.
- 1,48 g de fosfato sódico dibásico anhidro (Na_2HPO_4) (Panreac, Química S. A., Barcelona, España).
- 0,43 g de fosfato potásico monobásico anhidro (KH_2PO_4) (Panreac, Química S. A., Barcelona, España).
- 7,2 g de cloruro de sodio (NaCl) (Panreac, Química S. A., Barcelona, España).

Poli-L-lysina

- Disolución en agitador magnético de 0,1 g de poli-L-lysina (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, EEUU) en 1000 ml de agua destilada.
- Inmersión de los portaobjetos a tratar en una cestilla durante 5 minutos.
- 2 baños de agua destilada de 5 minutos cada uno.
- Escurrir y dejar secar a temperatura ambiente.

Desenmascaramiento antigénico con proteasa

- Preparación de una solución de proteasa (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, EEUU) al 0,1% en PBS.
- Aplicar la solución preparada sobre las muestras a evaluar. El tiempo de aplicación varía según el anticuerpo primario empleado.
- 2 lavados en PBS de 5 minutos cada uno, en agitación suave.

Tampón Acetato Sódico 0,1 M pH 5,2

- Diluir 1,2 ml de ácido acético (CH_3COOH) (Panreac, Química S. A., Barcelona, España) en 210 ml de agua destilada.
- Diluir 10,75 g de acetato sódico (CH_3COONa) (Panreac, Química S. A., Barcelona, España) en 790 ml de agua destilada.
- Mezclar ambas diluciones.

Solución reveladora 3-amino-9-aetilcarbazol (AEC)

- Diluir 0,025 g de 3-amino-9-aetilcarbazol (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, EEUU) en 5 ml de N,N-dimethylformamide (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, EEUU).
- Añadir 70 ml de tampón acetato sódico 0,1 M pH 5,2 y mezclar.
- Filtrar con doble papel de filtro en oscuridad.
- Añadir 75 μl de peróxido de hidrógeno al 30% (Panreac, Química S. A., Barcelona, España) justo antes de utilizar la solución.

Tris Buffer Salino (TBS) pH 7,6

- 180 ml de suero salino 0,85%: mezclar 8,5 g de cloruro sódico (NaCl) (Panreac, Química S. A., Barcelona, España) en 1000 ml de agua destilada.
- 20 ml de Tris madre: mezclar 60,57 g de Trizma base (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, EEUU) con 500 ml de agua destilada. Añadir 300-400 ml de ácido clorhídrico (ClH) 1N, hasta conseguir un pH de 7,6.

Solución reveladora Diaminobencidina (DAB)

- Diluir 0,07 g de diaminobencidina (DAB) (3,3', tetrahidrocloruro de diaminobencidina) (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, EEUU) en 200 ml de TBS.
- Filtrar con doble papel de filtro en oscuridad.
- Añadir 200 µl de peróxido de hidrógeno (Panreac, Química S. A., Barcelona, España) al 3% justo antes de utilizar la solución.

3.4 Protocolos Empleados

Tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E)

Protocolo de desparafinado

- Poner los cristales en estufa a 100°C, durante 30 minutos, lo que favorece la adhesión del corte de tejido al portaobjetos y el licuado de la parafina circundante.
- 2 pases de 2 minutos por xilol.
- 2 pases de 2 minutos por alcohol de 100°.
- 1 pase de 2 minutos por alcohol de 70°.
- 3 pases de 2 minutos por agua destilada.

Batería de Tinción

- Hematoxilina de Harris (Thermo Electron Corporation, Pittsburg PA, EEUU) durante 15 minutos.
- Aclarado en agua corriente.
- 4 pases rápidos por alcohol clorhídrico.

- Aclarado en agua corriente.
- 15 pases rápidos por agua amoniacal.
- Lavado en agua corriente durante 15 minutos.
- Eosina durante 4 minutos.
- 2 pases de 2 minutos por alcohol de 96°.
- 2 pases de 2 minutos por alcohol de 100°.
- 3 pases de 2 minutos por xilol.
- Montaje con resina DPX (Panreac, Química S. A., Barcelona, España).

Técnica de Warthin-Starry (W-S)

Soluciones utilizadas:

Agua Acidificada:

- 1000 ml de agua bidestilada.
- Añadir una solución de ácido cítrico (Probus, Badalona, España) al 1% (1 mg en 100 ml de agua destilada) hasta pH 4,0.

Nitrato de Plata al 1%:

- 1 g de nitrato de plata (AgNO_3) (Panreac, Química S. A., Barcelona, España).
- 100 ml de agua acidificada.

Nitrato de Plata al 2%:

- 2 g de nitrato de plata (AgNO_3) (Panreac, Química S. A., Barcelona, España).
- 100 ml de agua acidificada.

Gelatina al 5%:

- 5 g de gelatina (Merck, Darmstadt, Alemania).
- 100 ml de agua acidificada.

Solución de Hidroquinona al 0,15%:

- 0,15 g de hidroquinona (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, EEUU).
- 100 ml de agua acidificada.

Procedimiento:

- Desparafinar los cortes.
- Mantener el nitrato de plata al 2%, la gelatina al 5% y la hidroquinona al baño María en estufa a una temperatura de 54°C.
- Simultáneamente colocar en estufa a 43°C, el nitrato de plata al 1% durante 30 minutos, con las preparaciones.

Cumplido el tiempo de incubación de las preparaciones en la estufa, se debe preparar una solución compuesta por los siguientes reactivos a 54°C en las siguientes proporciones y orden de mezcla:

- Nitrato de plata al 2%..... 1,5 ml.
- Solución de Gelatina 5%..... 3,75 ml.
- Hidroquinona al 0,15%..... 2,0 ml.

No es recomendable procesar más de 8 muestras (incluido el control positivo y negativo), con el fin de evitar que en el breve tiempo de quelación de la plata en los tejidos no se sobresature, dificultando posteriormente la visualización microscópica de los bacilos.

El vaso de precipitado en el que se realiza la mezcla se ha de lavar y aclarar con agua destilada si se pretende reutilizar para otra mezcla.

- Impregnar los cortes en esta solución y controlar al microscopio.
- Una vez que en el control positivo se observan las estructuras bacilares en la superficie del epitelio respiratorio, se lavan rápidamente las preparaciones con agua bidestilada a 56°C.
- Contrastar con verde luz al 1% durante 2 minutos.
- Lavar con agua destilada.
- Deshidratar y montar con resina DPX (Panreac, Química S. A., Barcelona, España). Hacer pases rápidos por alcohol de 96° controlando que no se pierde el verde. Los pases por alcohol de 100° y xilol serán de 2 minutos, siguiendo el protocolo normal de deshidratación.

Técnica Inmunohistoquímica PCV2

- Un pase de 10 minutos y 2 pases de 5 minutos en xilol.
- Un pase de 5 minutos en alcohol 100°.
- Tratamiento de inhibición de la peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno (Panreac, Química S. A., Barcelona, España) al 3% en metanol (Panreac, Química S. A., Barcelona, España) durante 30 minutos en agitación suave.
- Un pase de 5 minutos en alcohol 100°.
- Un pase de 5 minutos en alcohol 96°.
- Un pase de 5 minutos en alcohol 70°.
- 2 lavados de 5 minutos en agua destilada.
- 2 lavados de 5 minutos en PBS en agitación suave.
- Incubación en cámara húmeda a temperatura ambiente con suero normal de conejo (Dako, Glostrup, Dinamarca) al 10% en PBS durante 30 minutos.
- Incubación con el anticuerpo primario monoclonal 36A9 a una dilución de 1:200 en suero normal de conejo (Dako, Glostrup, Dinamarca) al 1% en PBS, en cámara húmeda durante 18 horas a 4°C.
- Retirar la cámara húmeda de la nevera 1 hora antes de continuar la técnica para atemperar las muestras.
- 3 lavados de 5 minutos en PBS en agitación suave.
- Incubación con el anticuerpo secundario biotinado, conejo-antiratón (Dako, Glostrup, Dinamarca) a una dilución 1:20 en suero normal de conejo (Dako, Glostrup, Dinamarca) al 1% en PBS, en cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 3 lavados de 5 minutos en PBS en agitación suave.
- Incubación con el Complejo Streptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP) (Dako StreptABComplex/HRP, Dako, Glostrup, Dinamarca), (45 µl de A y 45 µl de B en 5000 µl de PBS), en cámara húmeda y en oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 2 lavados de 5 minutos en PBS en agitación suave.
- Un lavado de 10 minutos en tampón acetato sódico 0,1 M pH 5,2.
- Revelado de la reacción por inmersión en la solución constituida por 0,025 g de 3-amino-9-aetilcarbazol (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, EEUU), 5 ml de N,N-dimethylformamide (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, EEUU), 70 ml de tampón acetato sódico 0,1 M pH 5,2 y 75 µl de peróxido de hidrógeno al 30% (Panreac, Química S. A., Barcelona, España) durante 1-2 minutos observando el control positivo.
- Lavado en agua corriente durante 5 minutos.

- Contratación con Hematoxilina de Mayer (Panreac, Química S. A., Barcelona, España) durante 5 minutos.
- Lavado en agua corriente durante 10 minutos.
- Poner en agua destilada y realizar el montaje en medio acuoso (Immuno-Mount, Thermo Electron Corporation, Pittsburg PA, EEUU).

Técnica Inmunohistoquímica PRRSV

- Un pase de 10 minutos y 2 pases de 5 minutos en xilol.
- Un pase de 5 minutos en alcohol 100°.
- Tratamiento de inhibición de la peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno (Panreac, Química S. A., Barcelona, España) al 3% en metanol (Panreac, Química S. A., Barcelona, España) durante 30 minutos en agitación suave.
- Un pase de 5 minutos en alcohol 100°.
- Un pase de 5 minutos en alcohol 96°.
- Un pase de 5 minutos en alcohol 70°.
- 2 lavados de 5 minutos en agua destilada.
- Un lavado de 5 minutos en PBS en agitación suave.
- Desmascaramiento antigénico con proteasa (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, EEUU) al 0,1% en PBS por inmersión durante 8 minutos a 37°C.
- Un lavado de 5 minutos en PBS en agitación suave.
- Incubación en cámara húmeda a temperatura ambiente con suero normal de cabra (Dako, Glostrup, Dinamarca) al 10% en PBS durante 30 minutos.
- Incubación con el anticuerpo primario monoclonal 1A7 a una dilución de 1:250 en suero normal de cabra (Dako, Glostrup, Dinamarca) al 1% en PBS, en cámara húmeda durante 18 horas a 4°C.
- Retirar la cámara húmeda de la nevera 1 hora antes de continuar la técnica para atemperar las muestras.
- 3 lavados de 5 minutos en PBS en agitación suave.
- Incubación con el anticuerpo secundario biotinado conejo-antirato (Dako, Glostrup, Dinamarca) a una dilución 1:20 en suero normal de cabra (Dako, Glostrup, Dinamarca) al 1% en PBS, en cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 3 lavados de 5 minutos en PBS en agitación suave.
- Incubación con el Complejo Streptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP) (Dako StreptABComplex/HRP, Dako, Glostrup, Dinamarca), (45 µl de A y 45 µl de B en 5000 µl de PBS), en cámara húmeda y en oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente.

- 2 lavados de 5 minutos en PBS en agitación suave.
- Un lavado de 10 minutos en tampón acetato sódico 0,1 M pH 5,2.
- Revelado de la reacción por inmersión en la solución constituida por 0,025 g de 3-amino-9-aetilcarbazol (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, EEUU), 5 ml de N,N-dimethylformamide (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, EEUU), 70 ml de tampón acetato sódico 0,1 M pH 5,2 y 75µl de peróxido de hidrógeno al 30% (Panreac, Química S. A., Barcelona, España), durante 2-3 minutos observando el control positivo.
- Lavado en agua corriente durante 5 minutos.
- Contraintinción con Hematoxilina de Mayer (Panreac, Química S. A., Barcelona, España) durante 5 minutos.
- Lavado en agua corriente durante 10 minutos.
- Poner en agua destilada y realizar el montaje en medio acuoso (Immuno-Mount, Thermo Electron Corporation, Pittsburg PA, EEUU).

Técnica Inmunohistoquímica Mh

- Un pase de 10 minutos y 2 pases de 5 minutos en xilol.
- Un pase de 5 minutos en alcohol 100°
- Tratamiento de inhibición de la peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno (Panreac, Química S. A., Barcelona, España) al 3% en metanol (Panreac, Química S. A., Barcelona, España) durante 30 minutos en agitación suave.
- Un pase de 5 minutos en alcohol 100°
- Un pase de 5 minutos en alcohol 96°
- Un pase de 5 minutos en alcohol 70°
- 2 lavados de 5 minutos en agua destilada.
- Un lavado de 5 minutos en PBS en agitación suave.
- Desenmascaramiento antigénico con proteasa (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, EEUU) al 0,1% en PBS durante 5 minutos.
- Un lavado de 5 minutos en PBS en agitación suave.
- Incubación en cámara húmeda a temperatura ambiente con suero normal de cabra (Dako, Glostrup, Dinamarca) al 10% en PBS durante 30 minutos.
- Incubación con el anticuerpo primario policlonal a una dilución de 1:800 en suero normal de cabra (Dako, Glostrup, Dinamarca) al 1% en PBS, en cámara húmeda durante 18 horas a 4°C.
- Retirar la cámara húmeda de la nevera 1 hora antes de continuar la técnica para atemperar las muestras.

- 3 lavados de 5 minutos en PBS en agitación suave.
- Incubación con el anticuerpo secundario biotinado cerdo-anticonejo (Dako, Glostrup, Dinamarca) a una dilución 1:200 en suero normal de cabra (Dako, Glostrup, Dinamarca) al 1% en PBS, en cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 3 lavados de 5 minutos en PBS en agitación suave.
- Incubación con el Complejo Streptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP) (Dako StreptABComplex/HRP, Dako, Glostrup, Dinamarca), (45 µl de A y 45 µl de B en 5000 µl de PBS), en cámara húmeda y en oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 2 lavados de 5 minutos en PBS en agitación suave.
- Un lavado de 10 minutos en tampón acetato sódico 0,1 M pH 5,2.
- Revelado de la reacción por inmersión en la solución constituida por 0,025 g de 3-amino-9-aetilcarbazol (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, EEUU), 5 ml de N,N-dimethylformamide (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, EEUU), 70 ml de tampón acetato sódico 0,1 M pH 5,2 y 75 µl de peróxido de hidrógeno al 30% (Panreac, Química S. A., Barcelona, España), durante 4 minutos observando el control positivo.
- Lavado en agua corriente durante 5 minutos.
- Contraintinción con Hematoxilina de Mayer (Panreac, Química S. A., Barcelona, España) durante 5 minutos.
- Lavado en agua corriente durante 10 minutos.
- Poner en agua destilada y realizar el montaje en medio acuoso (Immuno-Mount, Thermo Electron Corporation, Pittsburg PA, EEUU).

Técnica Inmunohistoquímica para Suero Policlonal frente a ADV

- Un pase de 10 minutos y 2 pases de 5 minutos en xilol.
- Un pase de 5 minutos en alcohol 100°
- Tratamiento de inhibición de la peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno (Panreac, Química S. A., Barcelona, España) al 3% en metanol (Panreac, Química S. A., Barcelona, España) durante 30 minutos en agitación suave.
- Un pase de 5 minutos en alcohol 100°
- Un pase de 5 minutos en alcohol 96°.
- Un pase de 5 minutos en alcohol 70°.
- 2 lavados de 5 minutos en agua destilada.
- 2 lavados de 5 minutos en PBS en agitación suave.
- Incubación en cámara húmeda a temperatura ambiente con suero normal de cabra (Dako, Glostrup, Dinamarca) al 10% en PBS durante 30 minutos.

- Incubación con el anticuerpo primario policlonal Rabbit anti-Aujeszky a una dilución de 1:800 en suero normal de cabra (Dako, Glostrup, Dinamarca) al 1% en PBS, en cámara húmeda durante 18 horas a 4°C.
- Retirar la cámara húmeda de la nevera 1 hora antes de continuar la técnica para atemperar las muestras.
- 3 lavados de 5 minutos en PBS en agitación suave.
- Incubación con el anticuerpo secundario biotinado cerdo-anticonejo (Dako, Glostrup, Dinamarca) a una dilución 1:200 en suero normal de cabra (Dako, Glostrup, Dinamarca) al 1% en PBS, en cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 3 lavados de 5 minutos en PBS en agitación suave.
- Incubación con el Complejo Streptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP) (Dako StreptABComplex/HRP, Dako, Glostrup, Dinamarca), (45 µl de A y 45 µl de B en 5000 µl de PBS), en cámara húmeda y en oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 2 lavados de 5 minutos en PBS en agitación suave.
- Un lavado de 10 minutos en TBS (Tris Buffer Salino) (1 parte TRIS madre/9 partes suero salino al 0,85%).
- Revelado de la reacción por inmersión, previo filtrado, en una solución constituida por 0,07 g de diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, EEUU), 200 ml de tampón TBS y 200 µl de peróxido de hidrógeno (Panreac, Química S. A., Barcelona, España) al 3%. Se revela durante 5 minutos aproximadamente observando el control positivo.
- Lavado en agua corriente durante 10 minutos.
- Contratación con Hematoxilina de Harris (Thermo Electrón Corporation, Pittsburg PA, EEUU) durante 30 segundos.
- Lavado en agua corriente durante 10 minutos.
- Deshidratar mediante 2 pases de 2 minutos cada uno en alcohol de 96° y 100°.
- Dos pases de 2 minutos en xilol.
- Montaje con resina DPX (Panreac, Química S. A., Barcelona, España).

Técnica Inmunohistoquímica para Anticuerpo Monoclonal frente a ADV

- Un pase de 10 minutos y 2 pases de 5 minutos en xilol.
- Un pase de 5 minutos en alcohol 100°.
- Tratamiento de inhibición de la peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno (Panreac, Química S. A., Barcelona, España) al 3% en metanol (Panreac, Química S. A., Barcelona, España) durante 30 minutos en agitación suave.

- Un pase de 5 minutos en alcohol 100°.
- Un pase de 5 minutos en alcohol 96°.
- Un pase de 5 minutos en alcohol 70°.
- 2 lavados de 5 minutos en agua destilada.
- 2 lavados de 5 minutos en PBS en agitación suave.
- Incubación en cámara húmeda a temperatura ambiente con suero normal de conejo (Dako, Glostrup, Dinamarca) al 10% en PBS durante 30 minutos.
- Incubación con el anticuerpo primario monoclonal 2CF2 a una dilución de 1:10 en suero normal de conejo al 1% en PBS, en cámara húmeda durante 18 horas a 4°C.
- Retirar la cámara húmeda de la nevera 1 hora antes de continuar la técnica para atemperar las muestras.
- 3 lavados de 5 minutos en PBS en agitación suave.
- Incubación con el anticuerpo secundario biotinado conejo-antiratón (Dako, Glostrup, Dinamarca) a una dilución 1:20 en suero normal de conejo al 1% en PBS, en cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 3 lavados de 5 minutos en PBS en agitación suave.
- Incubación con el Complejo Streptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP) (Dako StreptABComplex/HRP, Dako, Glostrup, Dinamarca), (45 µl de A y 45 µl de B en 5000 µl de PBS), en cámara húmeda y en oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 2 lavados de 5 minutos en PBS en agitación suave.
- Un lavado de 10 minutos en tampón acetato sódico 0,1 M pH 5,2.
- Revelado de la reacción por inmersión en la solución constituida por 0,025 g de 3-amino-9-aetilcarbazol (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, EEUU), 5 ml de N,N-dimethylformamide (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, EEUU), 70 ml de tampón acetato sódico 0,1 M pH 5,2 y 75µl de peróxido de hidrógeno al 30% (Panreac, Química S. A., Barcelona, España), durante 5 minutos, observando el control positivo.
- Lavado en agua corriente durante 5 minutos.
- Contraintinción con Hematoxilina de Mayer (Panreac, Química S. A., Barcelona, España) durante 5 minutos.
- Lavado en agua corriente durante 10 minutos.
- Poner en agua destilada y realizar el montaje en medio acuoso (Immuno-Mount, Thermo Electron Corporation, Pittsburg PA, EEUU).

Técnica Inmunohistoquímica frente a *Pasteurella spp*, *Manheimella haemolítica* y *Pasteurella multocida*

- Un pase de 10 minutos y 2 pases de 5 minutos en xilol.
- Un pase de 5 minutos en alcohol 100°.
- Tratamiento de inhibición de la peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno (Panreac, Química S. A., Barcelona, España) al 3% en metanol (Panreac, Química S. A., Barcelona, España) durante 30 minutos en agitación suave.
- Un pase de 5 minutos en alcohol 100°.
- Un pase de 5 minutos en alcohol 96°.
- Un pase de 5 minutos en alcohol 70°.
- 2 lavados de 5 minutos en agua destilada.
- Un lavado de 5 minutos en PBS en agitación suave.
- Desenmascaramiento antigénico con proteasa (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, EEUU) al 0,1% en PBS durante 5 minutos.
- 2 lavados de 5 minutos en PBS en agitación suave.
- Incubación en cámara húmeda a temperatura ambiente con suero normal de cerdo (Dako, Glostrup, Dinamarca) al 10% en PBS durante 30 minutos.
- Incubación con el suero primario policlonal a una dilución de 1:200 en suero normal de cerdo (Dako, Glostrup, Dinamarca) al 1% en PBS, en cámara húmeda durante 18 horas a 4°C.
- Retirar la cámara húmeda de la nevera 1 hora antes de continuar la técnica para atemperar las muestras.
- 3 lavados de 5 minutos en PBS en agitación suave.
- Incubación con el anticuerpo secundario biotinado cerdo-anticonejo (Dako, Glostrup, Dinamarca) a una dilución 1:200 en suero normal de cerdo (Dako, Glostrup, Dinamarca) al 1% en PBS, en cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 3 lavados de 5 minutos en PBS en agitación suave.
- Incubación con el Complejo Streptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP) (Dako StreptABComplex/HRP, Dako, Glostrup, Dinamarca), (45 µl de A y 45 µl de B en 5000 µl de PBS), en cámara húmeda y en oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 2 lavados de 5 minutos en PBS en agitación suave.
- Un lavado de 10 minutos en tampón acetato sódico 0,1 M pH 5,2.

- Revelado de la reacción por inmersión en la solución constituida por 0,025 g de 3-amino-9-aetilcarbazol (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, EEUU), 5 ml de N,N-dimethylformamide (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, EEUU), 70 ml de tampón acetato sódico 0,1 M pH 5,2 y 75 μ l de peróxido de hidrógeno al 30% (Panreac, Química S. A., Barcelona, España) durante 4 minutos observando el control positivo.
- Lavado en agua corriente durante 5 minutos.
- Contraintinción con Hematoxilina de Mayer (Panreac, Química S. A., Barcelona, España) durante 5 minutos.
- Lavado en agua corriente durante 10 minutos.
- Poner en agua destilada y realizar el montaje en medio acuoso (Immuno-Mount, Thermo Electron Corporation, Pittsburg PA, EEUU).

4 RESULTADOS



4.1 Hallazgos Anatomopatológicos Macroscópicos

Las principales lesiones observadas tras la realización de la necropsia fueron el aumento de tamaño de los linfonodos (linfadenomegalia), que se observó en el 84% (21) de los animales, bien de forma generalizada o en alguno de los linfonodos estudiados (Fig. 4.1) (Tabla 4.1). El más afectado fue el iliaco (16 animales, 64%), seguido por el inguinal superficial y mesentérico (ambos en 14 animales, 56%), y por último el mediastínico (11 animales, 44%). Además, se observaron áreas de necrosis en alguno de los linfonodos estudiados en 3 animales (12%).

También fueron llamativas las lesiones a nivel pulmonar. Un total de 14 animales (56%) mostraron lesiones compatibles con una neumonía intersticial, caracterizadas por falta de colapso pulmonar, una textura elástica difusa del parénquima y con una coloración pálida, observándose, en ocasiones, la presencia de impresiones costales sobre el parénquima (Fig. 4.2. A). Nueve animales (36%) presentaron una consolidación craneoventral del parénquima pulmonar, estando estas áreas levemente sobreelevadas y con una coloración que variaba de rosado oscuro a rojo-violáceo, siendo compatibles con una bronconeumonía supurativa (Fig. 4.2. B). También se observaron de forma ocasional lesiones multifocales, firmes, levemente sobreelevadas y de color rojo-negruzca (bronconeumonía necrótico-hemorrágica) (Fig. 4.2. C), un patrón lobulillar multifocal, firme, rosado oscuro dando lugar al llamado patrón en “tablero de ajedrez” (neumonía intersticial), así como edema intersticial caracterizado por el engrosamiento de los septos interlobulillares por material gelatinoso transparente (Fig. 4.2. D).

En 3 (12%) animales se observaron pequeños abscesos (1-2 mm) de distribución multifocal (Fig. 4.2. E), mostrando uno de estos animales, además, un absceso focal de mayor tamaño (2 cm). (Fig. 4.2. F) Otros 4 animales mostraron exudado purulento en las vías áreas al corte del parénquima pulmonar. Así mismo 11 animales (44%) presentaban un moderado-severo depósito de material fibrinoso-fibroso de coloración amarillo-blanquecino en pleura visceral (pleuritis fibrinosa) (Fig. 4.3. A), mostrando 6 (24%) de ellos adherencias a pleura parietal (Fig. 4.3.B). Solo 2 (8%) animales mostraron una leve exudación serosa-serofibrinosa en cavidad torácica.

Un total de 11 (44%) animales presentaban una leve-moderada exudación serosa-serofibrinosa en el saco pericárdico. Ocho (32%) animales mostraron moderada-severa

pericarditis fibrinosa-fibrinopurulenta, caracterizada por el depósito de material fibrinoso-fibrinopurulento de color amarillento en epicardio y pericardio, produciendo, en ocasiones, adherencias (Fig. 4.3. C y D). En 2 (8%) animales se observó atrofia serosa de la grasa pericárdica.

En cuanto a la cavidad abdominal, 6 (24%) animales presentaron de leve a severa ascitis (Fig. 4.3. E), y 9 (36%) de leve a severa peritonitis fibrinosa, caracterizada por la presencia de material fibrinoso amarillento en la serosa de los órganos abdominales (Fig. 4.3. F). A nivel del estómago, en 2 (8%) animales se observaron úlceras subagudas en la región esofágica (porción no glandular). En 7 (28%) animales se observó leve-moderada poliartritis fibrinosa-fibrinopurulenta, con líquido articular de aspecto turbio con fibrina.

El resumen de las principales lesiones macroscópicas observadas en los animales de estudio se recoge en las tablas 4.2 y 4.3.

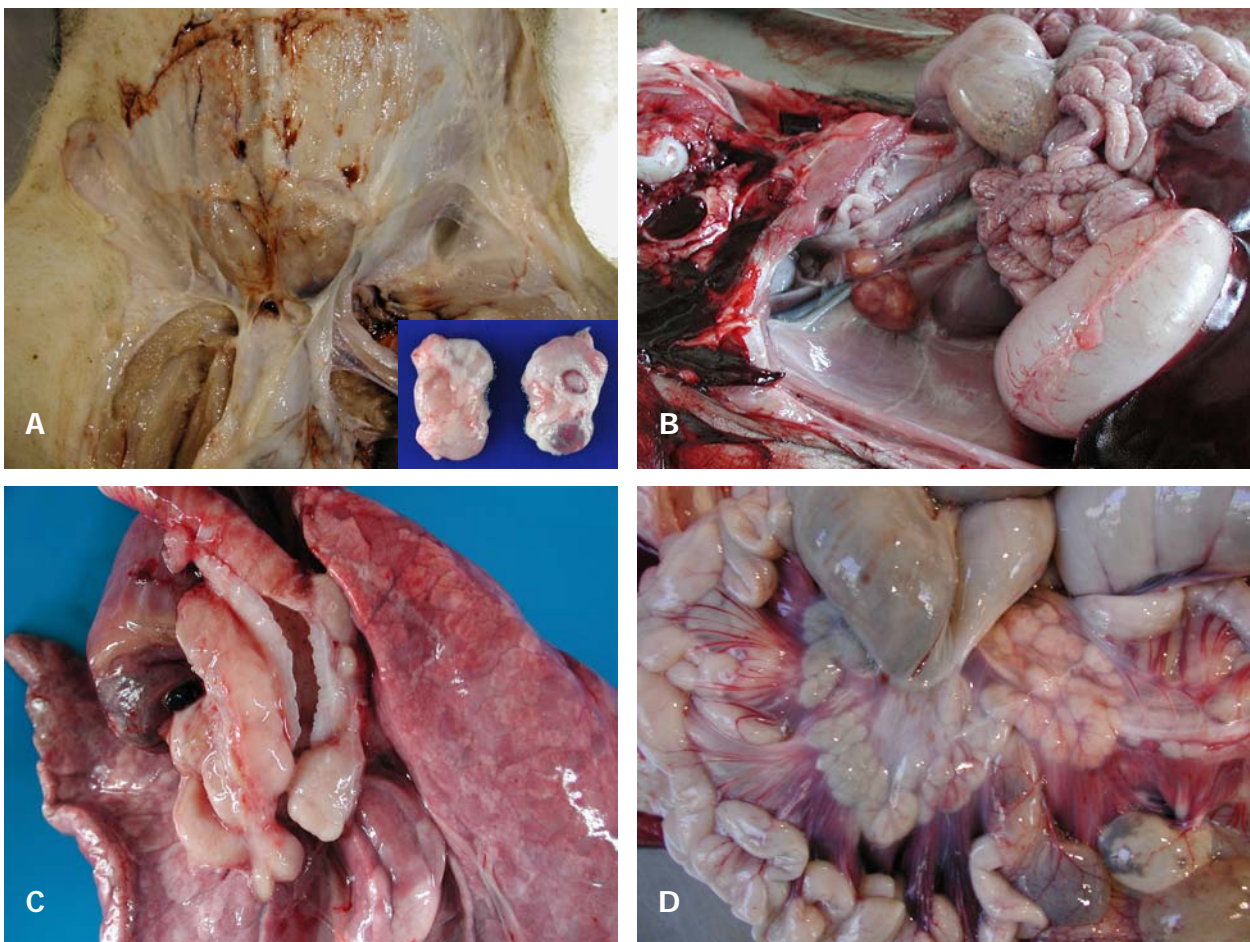


Fig. 4.1. Linfoadenomegalia. A: Inguinales superficiales. Caso 2. B: Iliacos. Caso 9. C: Mediastínicos. Caso 10. D: Mesentéricos. Caso 13.

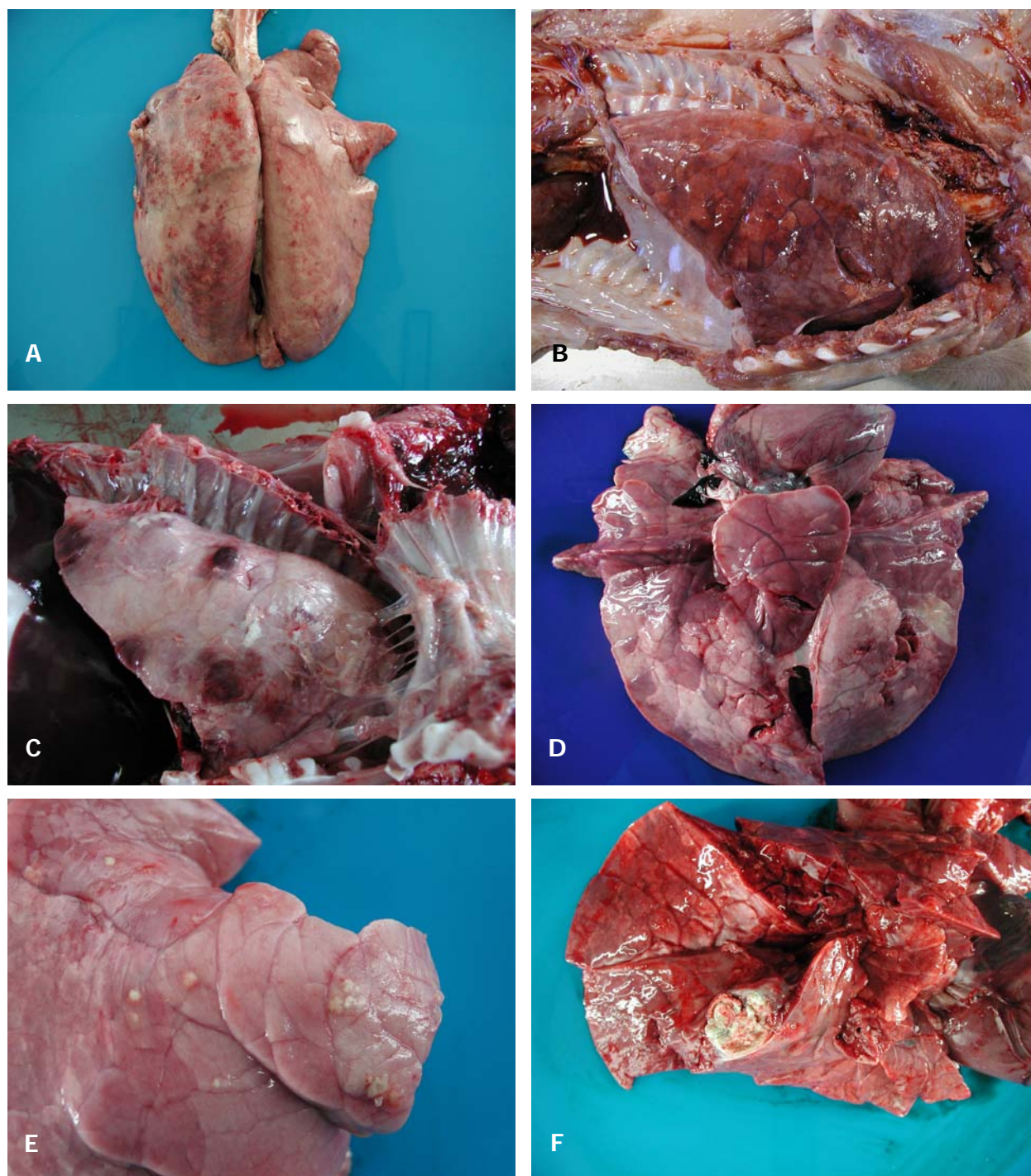


Fig. 4.2. A: Consolidación difusa del parénquima pulmonar con ausencia de colapso (neumonía intersticial). Caso 19. B: Consolidación craneoventral (bronconeumonía) del parénquima pulmonar y edema intersticial. Caso 20. C: Adherencias pleurales a pared costal (pleuritis fibrinosa crónica) con focos necrótico-hemorrágicos. Caso 9. D: Consolidación del parénquima pulmonar con patrón en tablero de ajedrez (neumonía intersticial), y edema intersticial. Caso 2. E: Abscesos multifocales en lóbulos pulmonares craneales. Caso 10. F: Absceso focal en superficie ventrolateral del lóbulo caudal izquierdo. Caso 1.

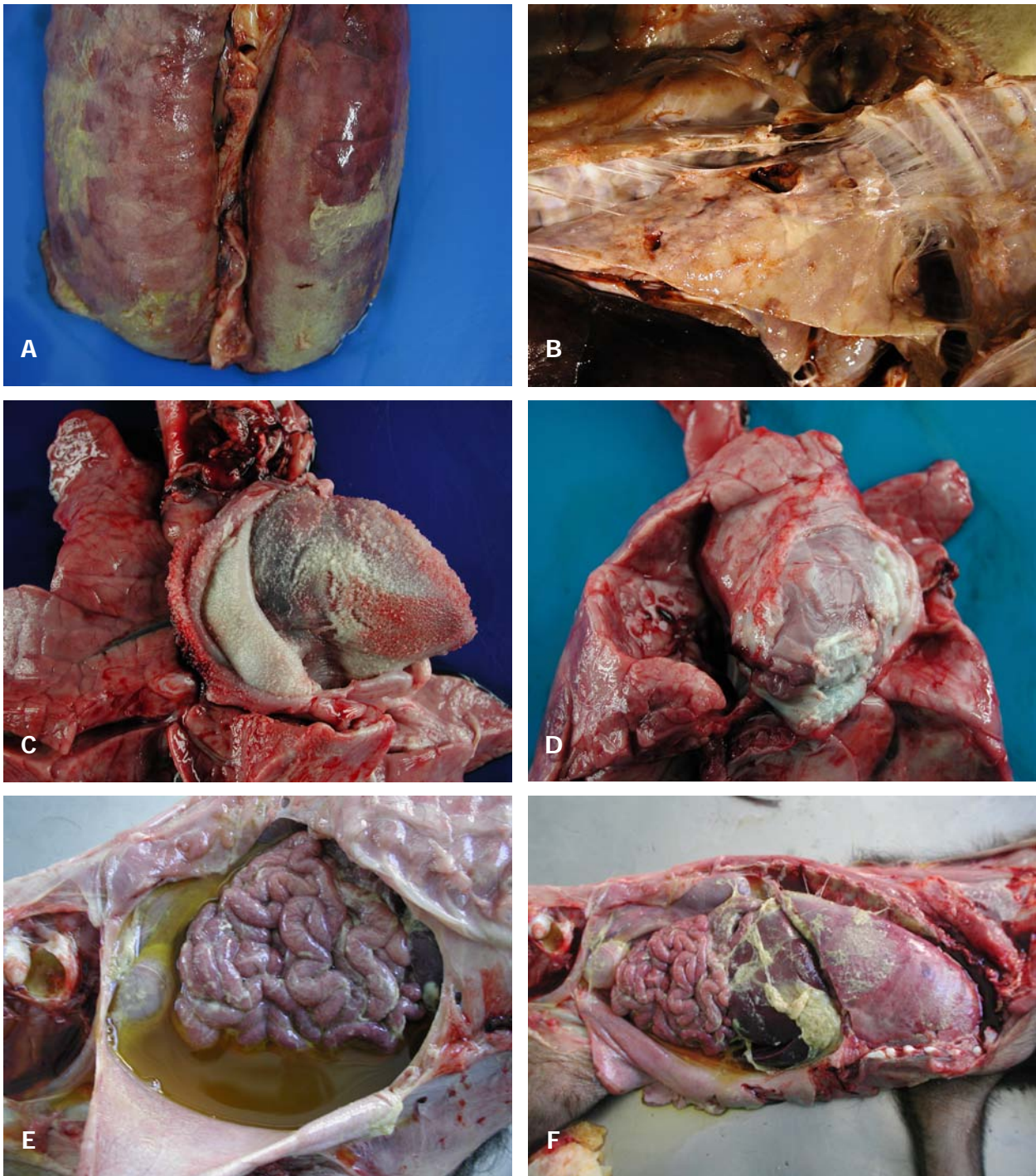


Fig. 4.3. A: Exudado fibrinoso en la superficie pleural (pleuritis fibrinosa). Caso 17. B: Adherencias pleurales a pared costal (pleuritis fibrinosa crónica). Caso 14. C: Exudado fibrinoso en saco pericárdico (pericarditis fibrinosa). Caso 3. D: Exudado fibrinopurulento en saco pericárdico (pericarditis fibrinopurulenta). Caso 12. E: Severa ascitis y peritonitis. Caso 17. F: Poliserositis fibrinosa. Caso 17.

Tabla 4.1. Presencia de linfadenomegalia en los diferentes linfonodos estudiados.

Animal	IS	IL	MD	MS
01	X	X	X	X
02	X	X	X	X
03	X	X	X	X
04	X	X		X
05	X			X
06				
07	X	X	X	X
08	X	X		
09	X	X	X	
10			X	
11	X	X		
12		X		
13		X		X
14		X	X	
15	X	X		X
16				X
17				
18	X	X	X	X
19		X		X
20			X	X
21	X	X	X	X
22				
23				
24	X	X	X	X
25	X			
Total	14	16	11	14

Tabla 4.2. Resumen de las principales lesiones macroscópicas observadas en los animales de estudio.

Lesiones	Nº Animales	%
Linfoadenomegalia	21	84
Linfoadenitis necrotizante	3	12
Consolidación pulmonar difusa	14	56
Consolidación pulmonar craneoventral	9	36
Áreas pulmonares multifocales necrotizantes	1	4
Patrón pulmonar tablero ajedrez	1	4
Abscesos pulmonares	3	12
Exudado vías aéreas	4	16
Pleuritis	11	44
Adherencias con pared costal	6	24
Hidrotórax	2	8
Hidropericardio	11	44
Pericarditis	8	32
Ascitis	6	24
Peritonitis	9	36
Úlceras gástricas	2	8
Poliartritis	7	28

Tabla 4.3. Lesiones macroscópicas más relevantes por animal.

Animal	Linfoadenomegalia	Linfoadenitis purulenta	Consolidación difusa	Consolidación craneoventral	Áreas multifocales necrotizantes	Patrón tablero ajedrez	Abscesos	Exudado vías aéreas	Pleuritis	Adherencias pleurales	Hidrotórax	Hidropericardio	Pericarditis	Ascitis	Peritonitis	Úlceras gástricas	Artritis
01	X	X					X		X	X				X			
02	X					X			X	X				X			
03	X		X						X	X	X	X	X	X	X	X	
04	X		X									X					X
05	X			X				X				X		X	X		X
06		X		X								X			X		X
07	X		X									X					X
08	X		X														
09	X		X		X				X				X				
10	X			X			X					X					
11	X		X					X	X				X				
12	X			X									X				X
13	X			X													
14	X	X					X		X	X					X		
15	X		X									X					
16	X		X						X			X					
17			X					X	X	X		X	X	X	X		X
18	X		X	X					X				X		X	X	X
19	X		X					X			X	X		X			
20	X			X								X					
21	X		X						X				X		X		
22				X													
23				X													
24	X		X												X		
25	X		X						X	X			X		X		
Total	21	3	14	9	1	1	3	4	11	6	2	11	8	6	9	2	7

4.2 Hallazgos Anatomopatológicos Microscópicos

4.2.1 Linfonodos

Las lesiones histológicas observadas a nivel de linfonodos consistieron principalmente y de forma general, en depleción linfoide e histiocitosis y, en menor medida, en la presencia de células gigantes multinucleadas y de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos basófilos y botrioides en células macrofágicas. También se observó, en algunos casos, infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos, así como linfocitosis y focos de necrosis.

La depleción linfoide varió de leve a severa, y se caracterizaba por una pérdida de celularidad a nivel de folículos linfoides y de la zona parafolicular (Fig. 4.4). La histiocitosis consistió en el infiltrado, multifocal a difuso, de células histiocíticas en el parénquima linfoide, variando el grado de leve a severo (Fig. 4.5).

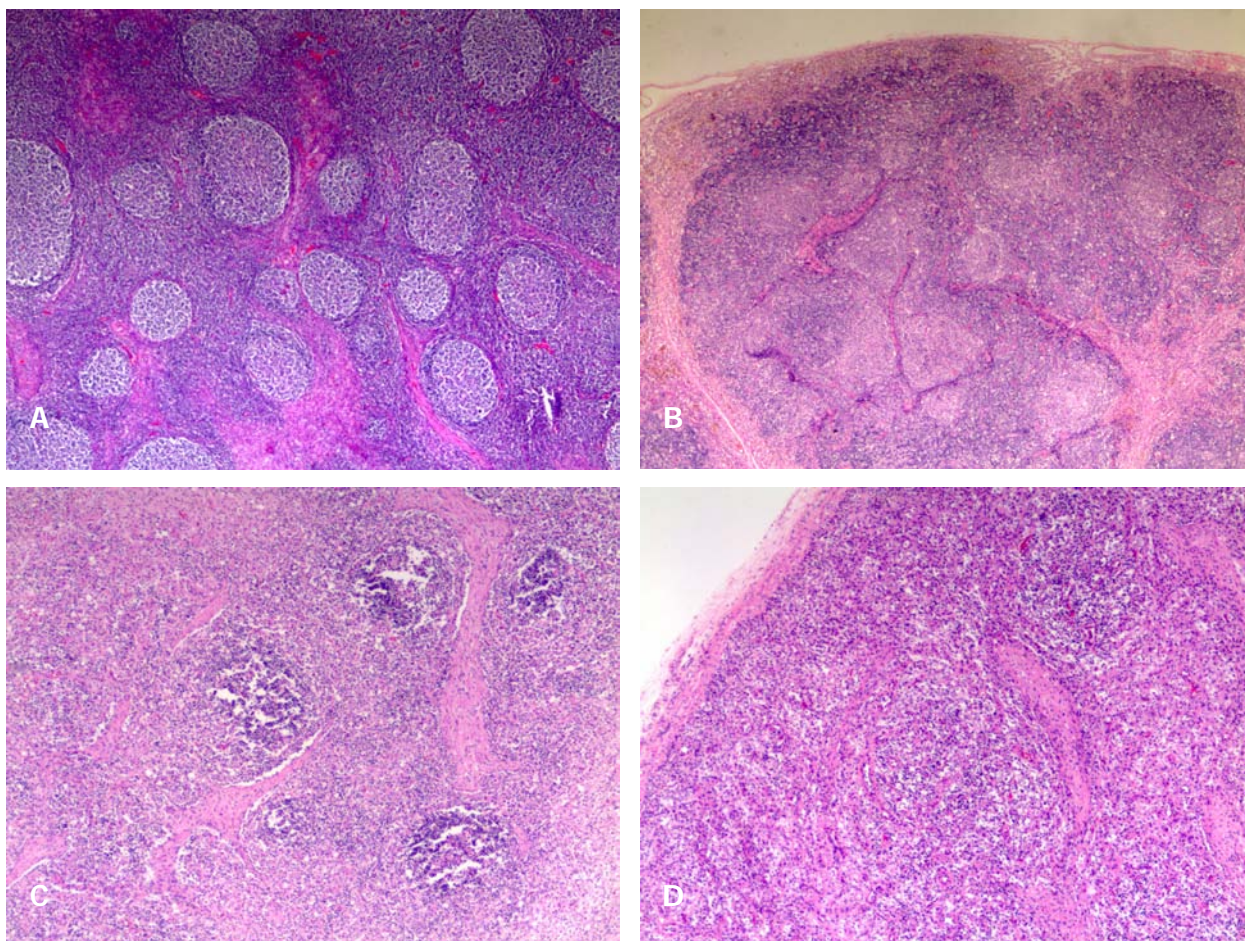


Fig. 4.4. Linfonodos. A: Normal. B, C y D: Depleción linfoide. Pérdida de celularidad con pérdida de folículos y despoblación en la zona parafolicular. B. Inguinal superficial. Caso 7. HE. 2x. C. Iliaco. Caso 15. HE. 4x. D. Mesentérico. Caso 4. HE. 4x.

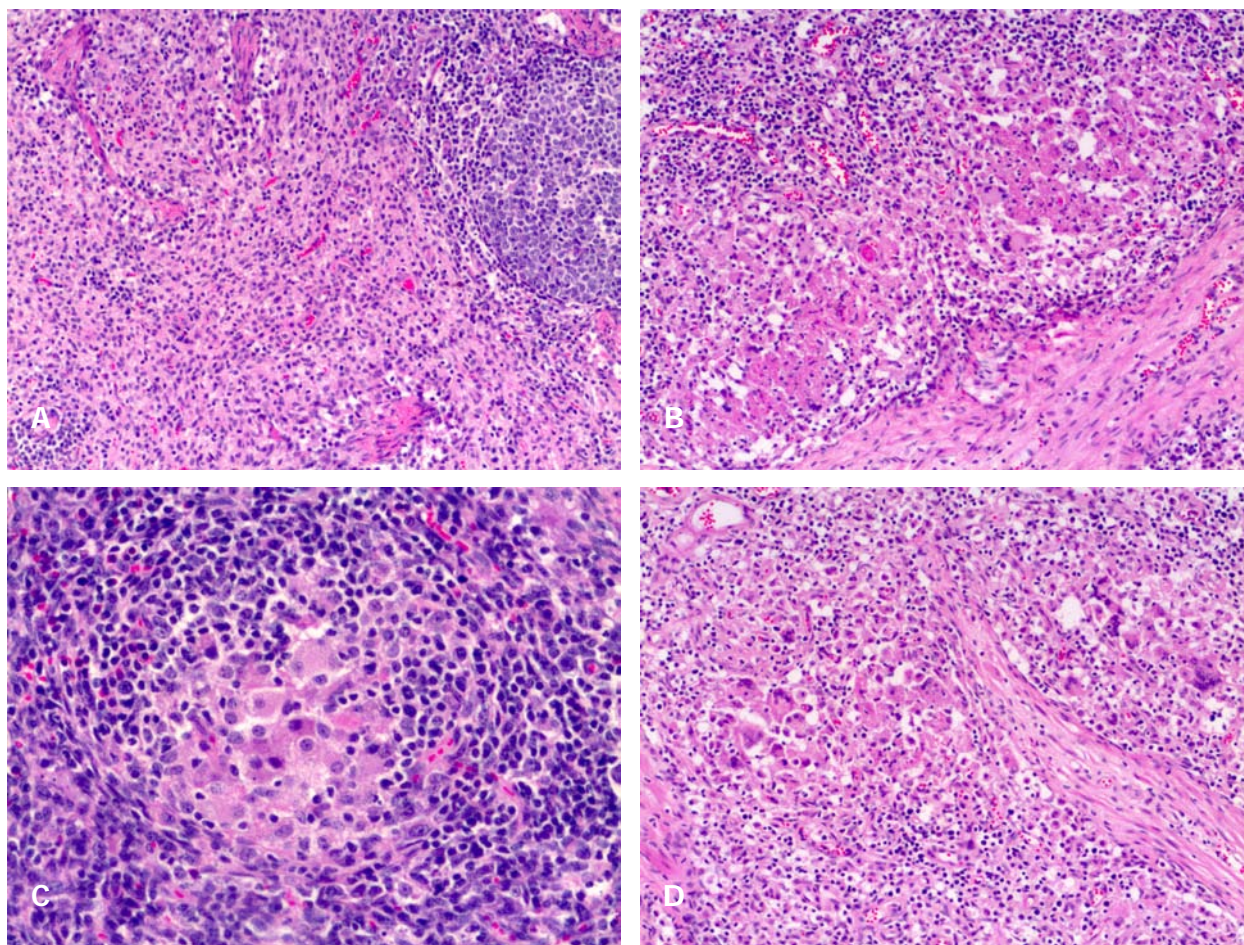


Fig. 4.5. Linfonodos. A y B: Histiocitosis. Infiltrado de células histiocíticas en el parénquima linfoide. A. Iliaco. Caso 10. HE. 10x. B. Inguinal superficial. Caso 17. HE. 10x. **C: Infiltrado de células histiocíticas a nivel centrofolicular.** Iliaco. Caso 11. HE. 20x. **D: Histiocitosis con presencia de células gigantes multinucleadas.** Inguinal superficial. Caso 17. HE. 10x.

En 24 (96%) de los animales analizados, se observó depleción linfoide que variaba de leve (7), moderada (8), a severa (9). Todos los animales presentaron algún grado de histiocitosis, 16 leve, 7 moderada y 2 intensa. En 6 animales (24%) se observaron células gigantes multinucleadas, y en 4 (16%), cuerpos de inclusión (Fig. 4.6. A y B). Así mismo, 15 animales (60%) presentaron infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos en distinto grado, 5 (20%) linfocitosis y 3 (12%) áreas de necrosis (Fig. 4.7).

En cuanto a la presencia de células gigantes multinucleadas (Tabla 4.4), estas se observaron en los cuatro linfonodos estudiados en similar proporción, en 4 (16%) linfonodos inguinales superficiales, y en 3 (12%) iliacos, mediastínicos y mesentéricos.

Se observaron cuerpos de inclusión en 3 (12%) linfonodos inguinales superficiales y en un solo (4%) iliaco y mediastínico (Tabla 4.4).

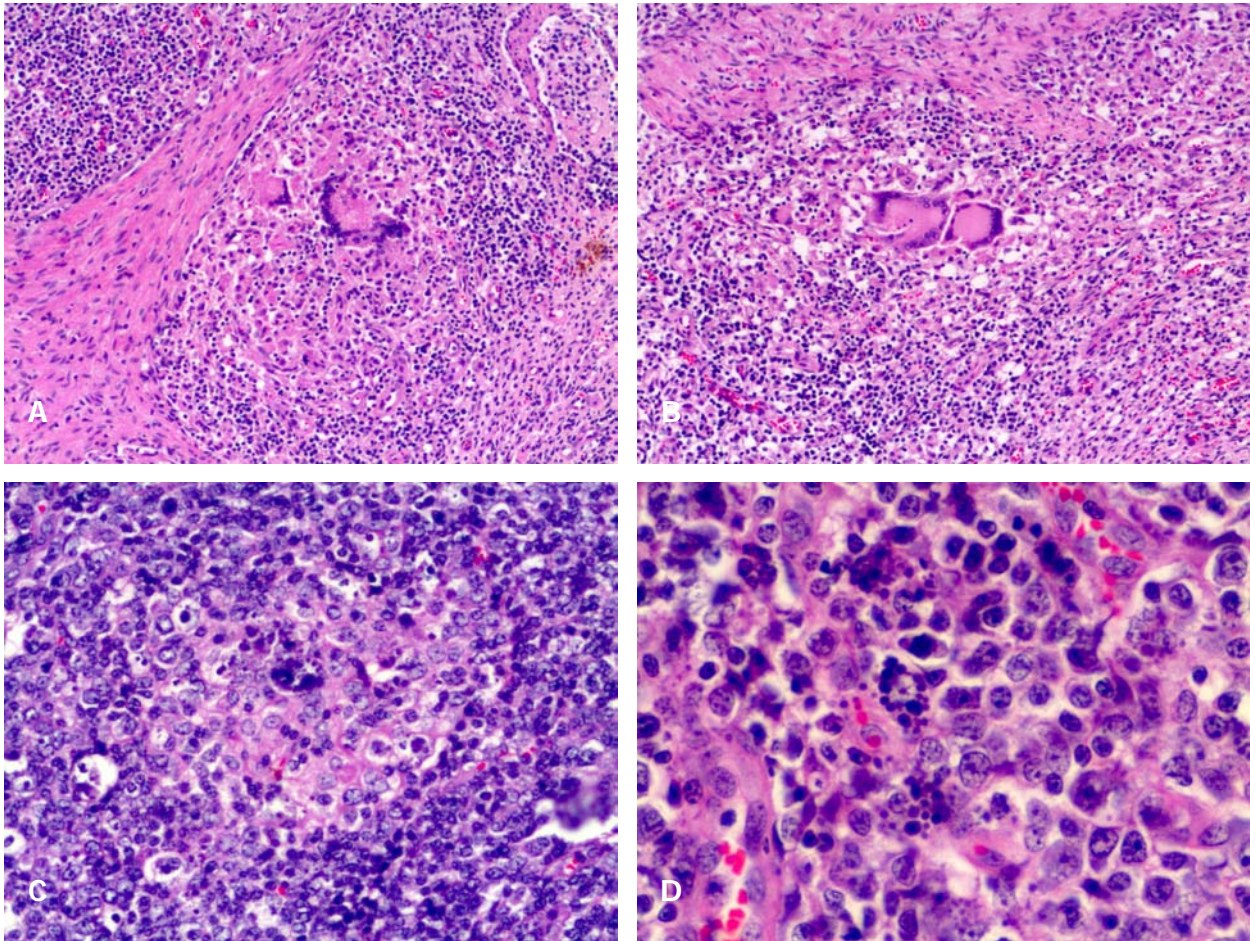


Fig. 4.6. Linfonodos. A y B: Histiocitosis con presencia de células gigantes multinucleadas. A. Iliaco. Caso 17. HE. 10x. **B.** Inguinal superficial. Caso 17. HE. 10x. **C y D: Cuerpos de inclusión.** Presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos basófilos en células histiocíticas. **C.** Iliaco. Caso 7. HE. 20x. **D.** Inguinal superficial. Caso 7. HE. 40x.

Tabla 4.4. Presencia de células gigantes multinucleadas y cuerpos de inclusión en linfonodos/animal.

Animal	IS		IL		MD		MS	
	Cel. gigantes	CI	Cel. gigantes	CI	Cel. gigantes	CI	Cel. gigantes	CI
01	-	-	+	-	-	-	-	-
02	-	-	-	-	-	-	-	-
03	-	-	-	-	-	-	-	-
04	-	-	-	-	-	-	+	-
05	-	+	-	-	-	-	-	-
06	-	-	-	-	-	-	-	-
07	-	+	-	+	-	-	-	-
08	-	-	-	-	-	-	-	-
09	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-
11	+	-	-	-	-	-	+	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-
17	+	+	+	-	+	-	+	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-
19	+	-	-	-	+	+	-	-
20	+	-	+	-	+	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-

IS: Inguinal superficial; IL: Iliaco; MD: Mediastínico; MS: Mesentérico.

CI: cuerpos de inclusión.

+: presencia. -: ausencia.

Un total de 15 animales (60%) mostraron linfadenitis supurativa en alguno de los linfonodos estudiados, caracterizada por un infiltrado, de multifocal a difuso, de polimorfonucleares neutrófilos en el parénquima linfoide. El principal linfonodo afectado fue el mediastínico (14 animales) y en menor medida el inguinal superficial (2 animales) y el iliaco (1 animal), y con una intensidad que variaba de leve (2 animales), moderada (5 animales), a severa (8 animales). También se observaron áreas de necrosis en 3 animales (12%), 2 en linfonodos mediastínicos, y uno en inguinal superficial.

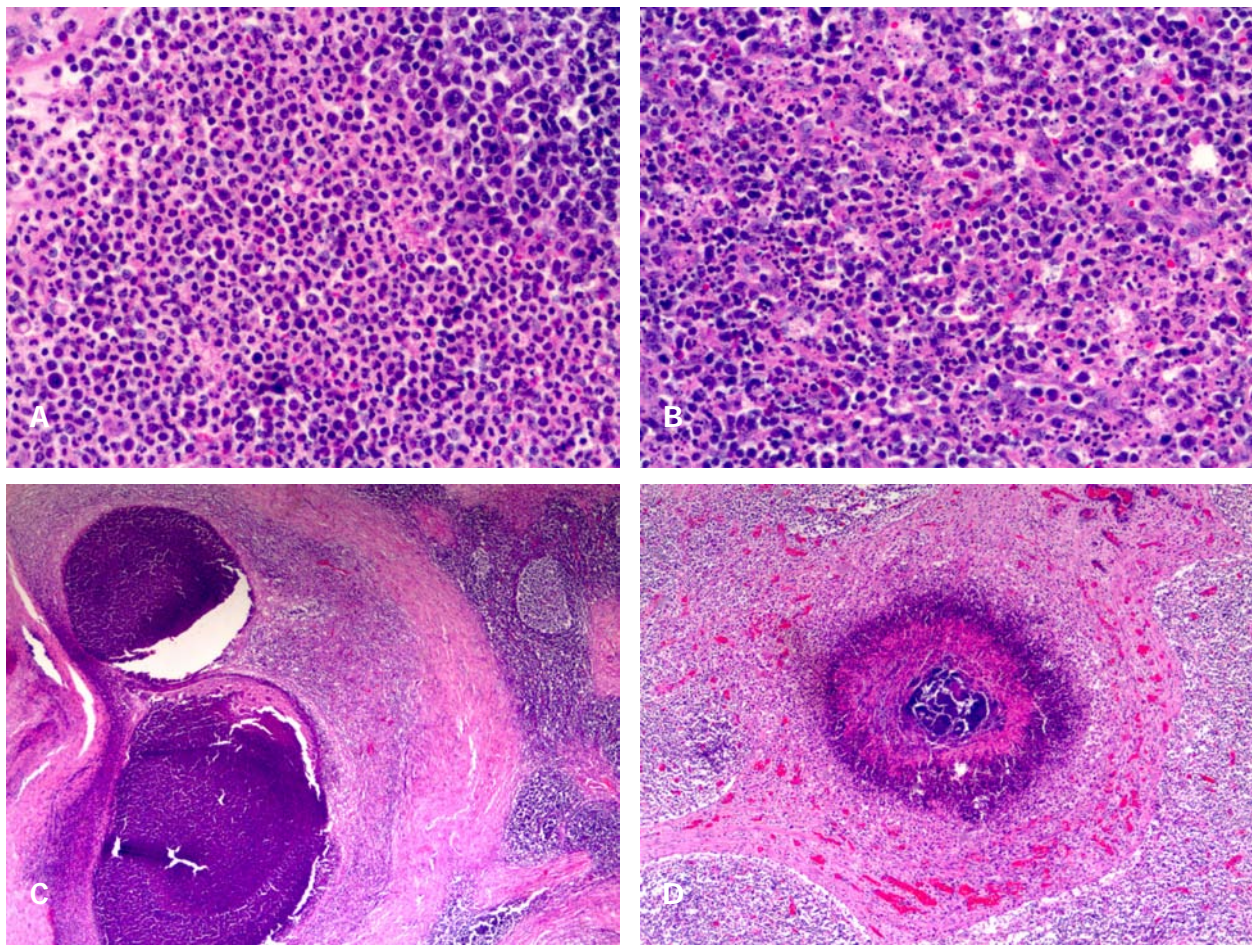


Fig. 4.7. Linfonodos. A: Linfadenitis supurativa. Severo y difuso infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos en el parénquima linfoide. Mediastínico. Caso 9. HE. 20x. **B: Linfocitolisis.** Iliaco. Caso 11. HE. 20x. **C y D: Focos de necrosis del parénquima linfoide.** A. Mediastínico. Caso 1. HE. 2x. B. Mediastínico. Caso 6. HE. 4x.

Otras lesiones observadas en linfonodos fueron la presencia de dilataciones quísticas y vacuolizaciones en los senos subcapsulares, medulares y peritrabeculares, con una reacción granulomatosa asociada, caracterizada por un infiltrado de células macrofágicas junto con células gigantes multinucleadas (Fig. 4.8. A, B y C). En todos los casos se observó un material cristalino refringente, tanto en dichas dilataciones-vacuolizaciones, como en el citoplasma de las células macrofágicas y células gigantes multinucleadas (Fig. 4.8. D, E y F). Dichas lesiones se observaron en 12 animales (48%), 11 en los linfonodos iliacos y solo un caso en los inguinales superficiales (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Presencia de dilataciones quísticas-vacuolizaciones en linfonodos.

Animal	IS	IL
	Dilataciones/Vacuolas	Dilataciones/Vacuolas
07		+++
08		+++
09		+++
10	+++	
11		+++
12		+++
13		+++
15		+++
17		++
19		+++
20		++
24		+++

IS: Inguinal superficial; IL: Iliaco
 +: leve. ++: moderado. +++: severo

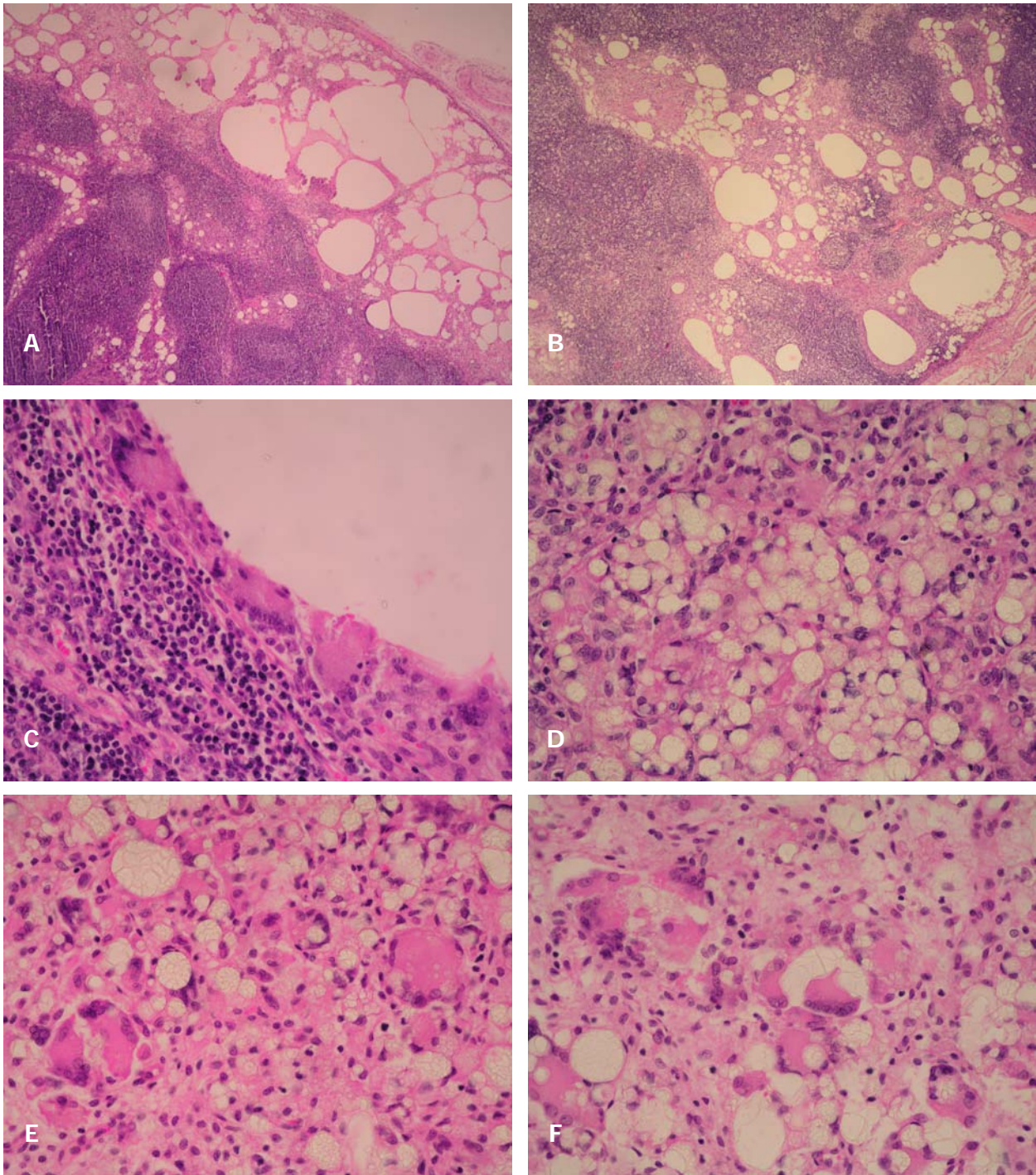


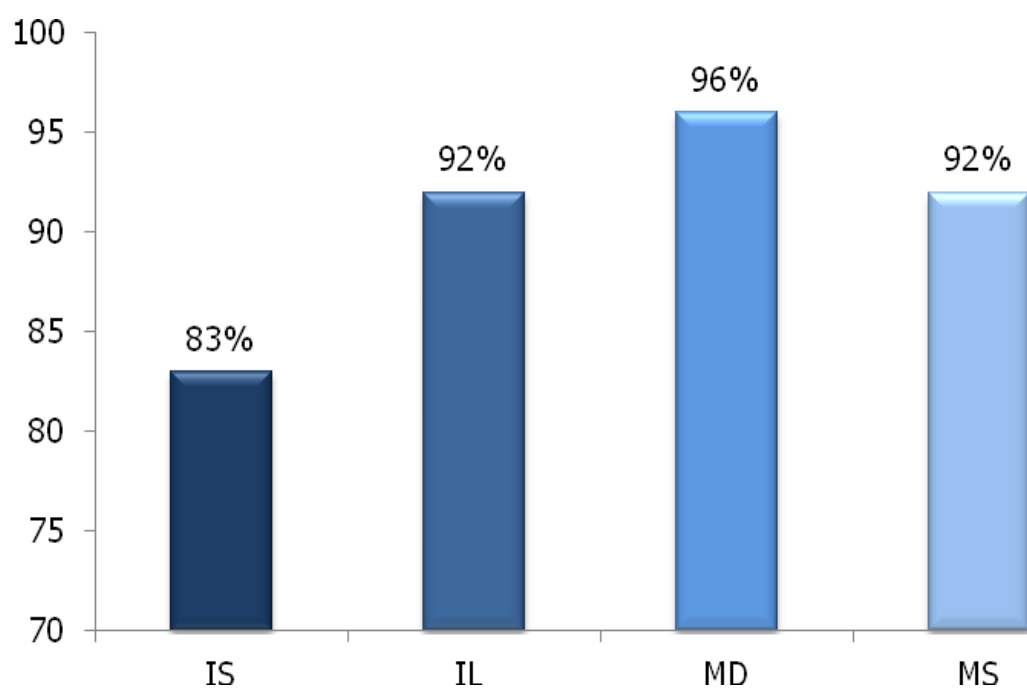
Fig. 4.8. Linfonodos. A y B: Dilataciones quísticas en senos subcapsulares y perituberculares . A. Inguinal superficial. Caso 10. HE. 4x. B. Iliaco. Caso 8. HE. 4x. **C: Presencia de células gigantes multinucleadas en la periferia de una dilatación.** Inguinal superficial. Caso 10. HE. 40x. **D, E y F: Múltiples estructuras cristaloides refringentes intra- y extracelulares, con reacción granulomatosa asociada y presencia de células gigantes multinucleadas.** Iliaco. D. Caso 12. HE. 40x. E y F. Caso 19. HE. 40x.

Valoración de la depleción linfoide

En cuanto a la depleción linfoide, de los 4 linfonodos estudiados, el que presentaba depleción más frecuentemente, independiente del grado, fue el linfonodo mediastínico (23 animales, 96%), seguido por el iliaco y mesentérico (22 animales, 92%), y por último el inguinal superficial (20 animales, 83%) (Gráfica 4.1).

Según el grado de depleción linfoide (Tabla 4.6 y Gráfica 4.2), el iliaco (55) fue el que presentó mayor depleción total seguido por el mediastínico (50), inguinal superficial (47) y mesentérico (41).

Gráfica 4.1. Porcentaje de linfonodos con depleción linfoide independientemente del grado.



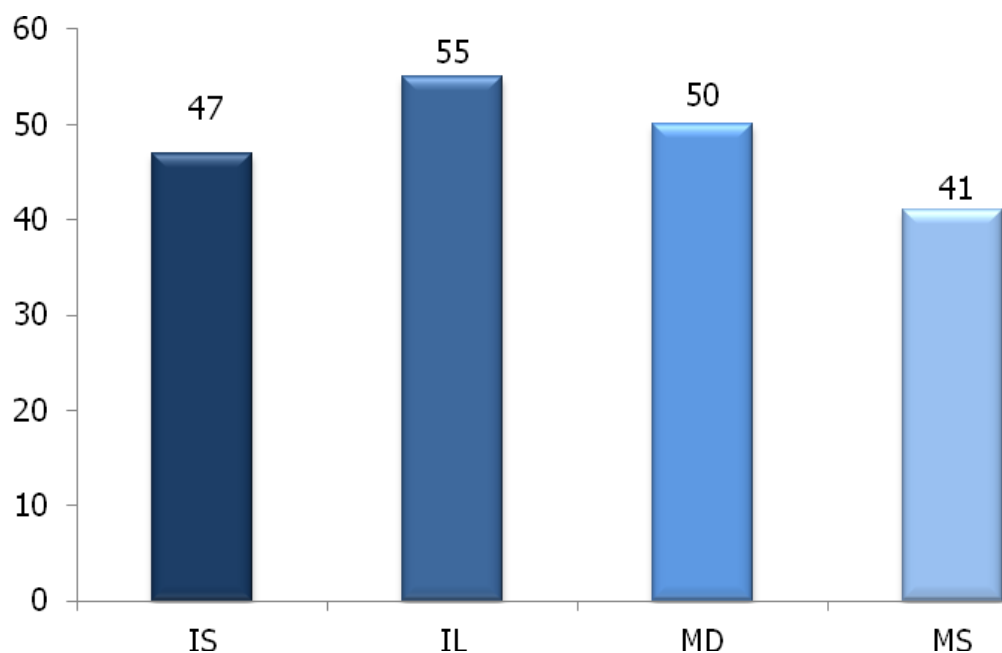
IS: Inguinal Superficial. IL: Iliaco. MD: Mediastínico. MS: Mesentérico.

Tabla 4.6. Grado de depleción linfoide por linfonodo/animal y puntuación.

Animal	IS	IL	MD	MS
01	-	-	+	+
02	+	++	++	+
03	+	+	-	+
04	+++	+++	+++	+++
05	+++	+++	+++	+++
06	+++	+++	+++	+++
07	+++	+++	+	+
08	-	+++	+	-
09	++	++	+++	+
10	+	++	+++	+
11	+++	+++	+++	++
12	-	-	+	+
13	+++	+++	+	+
14	-	++	++	+
15	+++	+++	+++	++
16	+++	+++	+++	+++
17	+++	+++	+++	+++
18	+++	+++	+++	+++
19	+++	+++	+++	+++
20	+++	+++	++	+
21	++	++	++	+++
22	+	++	+	-
23	-	-	-	-
24	+	+	+	+
25	++	++	++	++
Puntuación	47	55	50	41

IS: Inguinal superficial; IL: Iliaco; MD: Mediastínico; MS: Mesentérico.

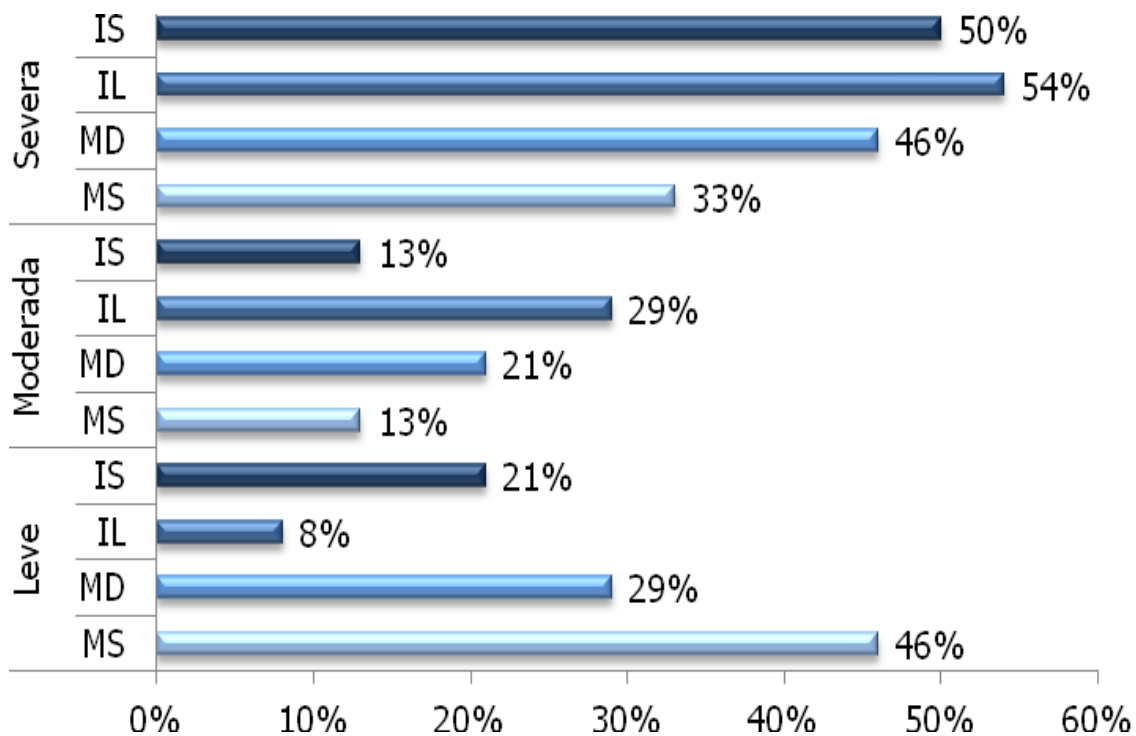
-=0; +=1; ++=2; +++=3. (Modificado de Rosell et al., 1999; Quintana et al., 2001; Opiessnig et al., 2004).

Gráfica 4.2. Puntuación del grado de depleción linfoide por linfonodo.

IS: Inguinal Superficial. IL: Iliaco. MD: Mediastínico. MS: Mesentérico.

Valorando los grados de depleción linfoide en leve, moderada y severa (Gráfica 4.3) se observó mayor porcentaje de depleción severa (+++) en los linfonodos iliacos (54%, 13 animales), seguido por los inguinales superficiales 50% (12/24), mediastínicos 46% (11/24) y mesentéricos 33% (8/24). En cuanto a la depleción linfoide moderada (++), el mayor porcentaje se observó en los linfonodos iliacos 29% (7/24), seguido de los mediastínicos 21% (5/24) y en igual proporción los inguinales superficiales y mesentéricos 13% (3/24). Los linfonodos que en mayor porcentaje tuvieron un grado leve (+) de depleción linfoide fueron los mesentéricos 46% (11/24), seguidos de los mediastínicos 29% (7/24), inguinal superficial 21% (5/24) e iliaco 8% (2/24).

Gráfica 4.3. Clasificación de la depleción linfoide por grado de intensidad y por linfonodo.



IS: Inguinal Superficial. IL: Iliaco. MD: Mediastínico. MS: Mesentérico.

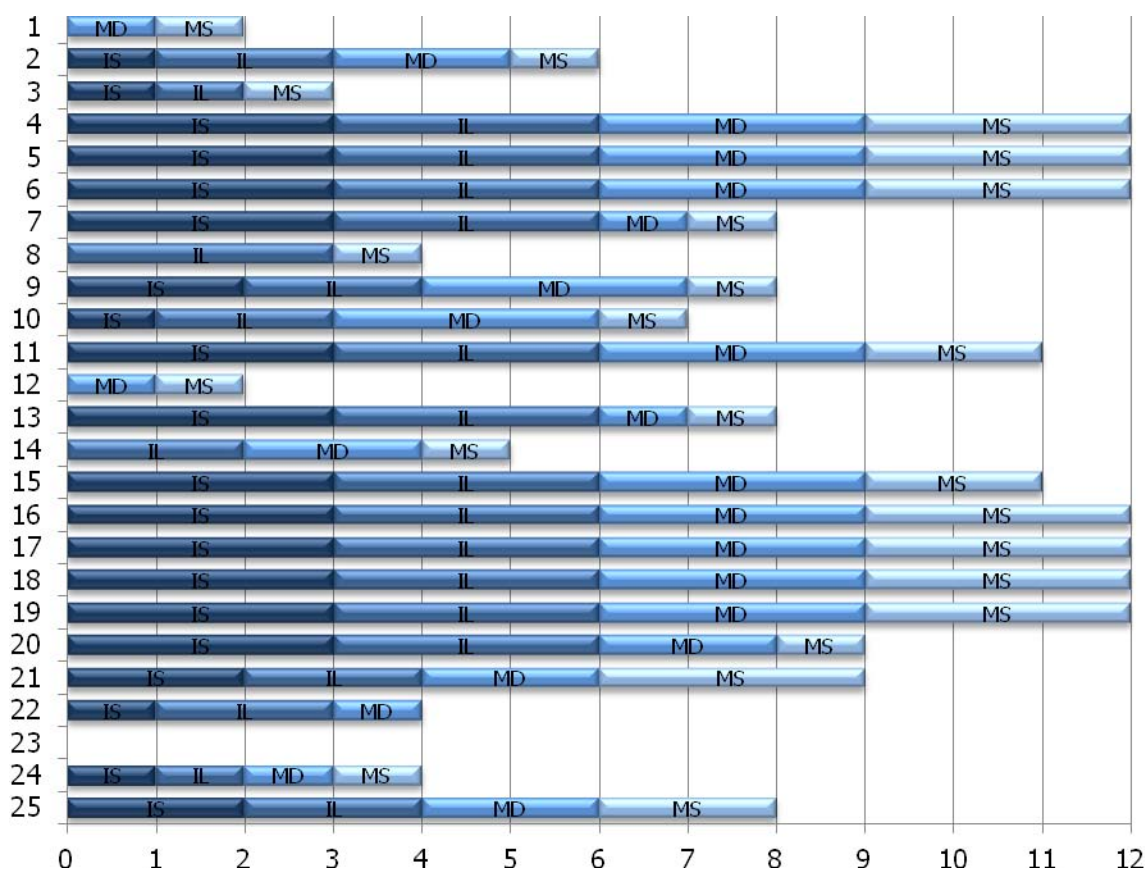
Un 29% de los animales (7/24) (4, 5, 6, 16, 17, 18, 19) presentaron depleción linfoide severa en todos los linfonodos estudiados (inguinales superficiales, iliacos, mesentéricos y mediastínicos), mientras que el 21% (5/24) (7, 11, 13, 15, 20) presentaron depleción linfoide severa en al menos 2 ó 3 de los ganglios valorados, incluyendo de forma constante a los linfonodos inguinal superficial e iliaco.

Un 4% de los animales (1/24) (25) presentaron moderada depleción linfoide en los cuatro linfonodos, así como otro 4% (21) en tres de ellos, siendo un 13% (2, 9, 14) los animales que mostraron dos linfonodos con depleción linfoide moderada incluyendo siempre al iliaco.

En cuanto a los animales que presentaron depleción linfoide leve, un 4% (1/24) (24) presentó depleción linfoide en los cuatro linfonodos, así como otro 4% (3) en tres de ellos. Un 21% (5/24) (1, 8, 10, 12, 22) de los animales presentó uno o dos linfonodos (principalmente mediastínicos y mesentéricos) con depleción linfoide leve conjuntamente con otros grados de depleción linfoide en los otros linfonodos.

En la gráfica 4.4 se representa el grado de depleción linfoide por animal y linfonodo. Teniendo en cuenta que por linfonodo, la depleción leve tiene un valor de 1, la moderada 2, y la severa 3, la máxima puntuación por animal será de 12.

Gráfica 4.4. Grado de depleción linfoide por animal y linfonodo.

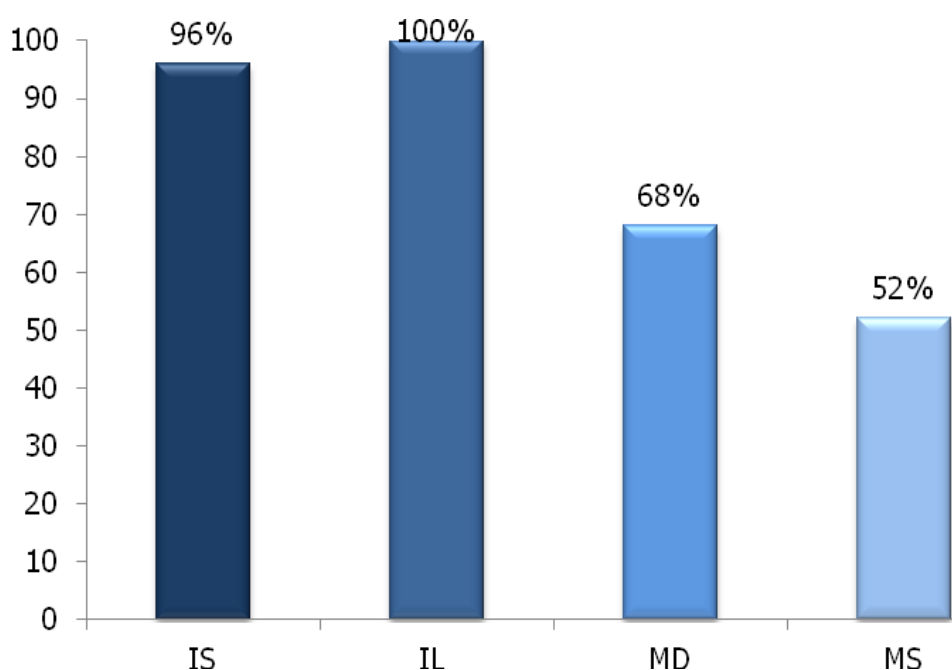


IS: Inguinal Superficial. IL: Iliaco. MD: Mediastínico. MS: Mesentérico.

Valoración de la histiocitosis

En cuanto a la histiocitosis, de los 4 linfonodos estudiados, el más frecuentemente afectado, independiente del grado, fue el linfonodo iliaco (100%, 25 animales) seguido del inguinal superficial (96%, 24 animales), mediastínico (68%, 17 animales) y mesentérico (52%, 13 animales) (Gráfica 4.5).

Gráfica 4.5. Porcentaje de linfonodos con histiocitosis independientemente del grado.



IS: Inguinal Superficial. IL: Iliaco. MD: Mediastínico. MS: Mesentérico.

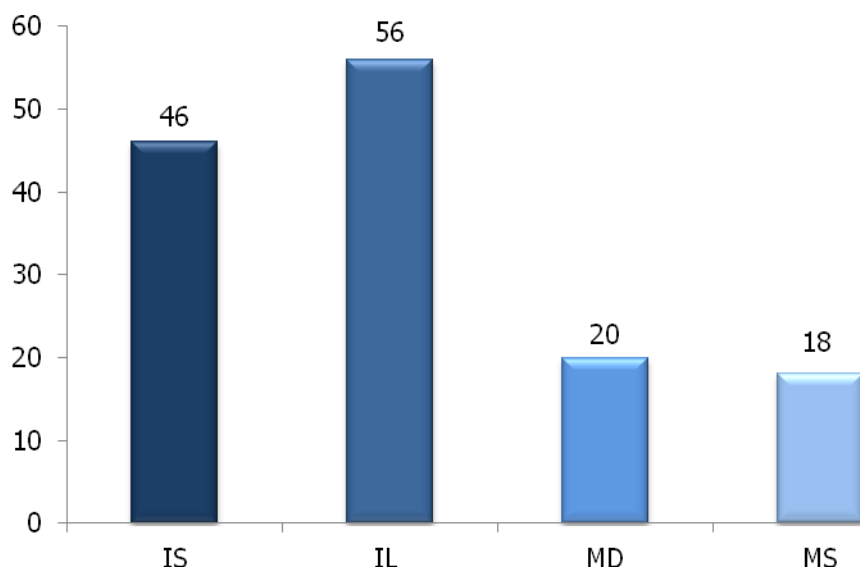
En cuanto al grado de histiocitosis (Tabla 4.7 y Gráfica 4.6), el que presentó mayor severidad fue el iliaco (56), seguido por el inguinal superficial (46), mediastínico (20) y mesentérico (18).

Tabla 4.7. Grado de histiocitosis por linfonodo y puntuación.

Animal	IS	IL	MD	MS
01	++	++	-	-
02	+++	++	+	-
03	+	+	+	+
04	+++	+++	+	+++
05	++	++	+	++
06	+	++	+	+
07	++	++	-	-
08	+	+	-	-
09	+++	+++	+	+
10	++	+++	-	-
11	+++	+++	-	+
12	++	+++	-	-
13	+	+++	-	-
14	-	+++	+	-
15	+++	+++	+	-
16	+	++	+	+
17	++	++	+	+
18	++	++	++	+
19	++	+++	++	+++
20	++	+++	+	+
21	++	++	++	-
22	++	++	+	-
23	+	+	+	+
24	++	++	+	+
25	+	+	-	-
Puntuación	46	56	20	18

IS: Inguinal superficial; IL: Iliaco; MD: Mediastínico; MS: Mesentérico.

-=0; +=1; ++=2; +++=3. (Modificado de Quintana et al., 2001; Opiessnig et al., 2004b).

Gráfica 4.6. Puntuación del grado de histiocitosis por linfonodo.

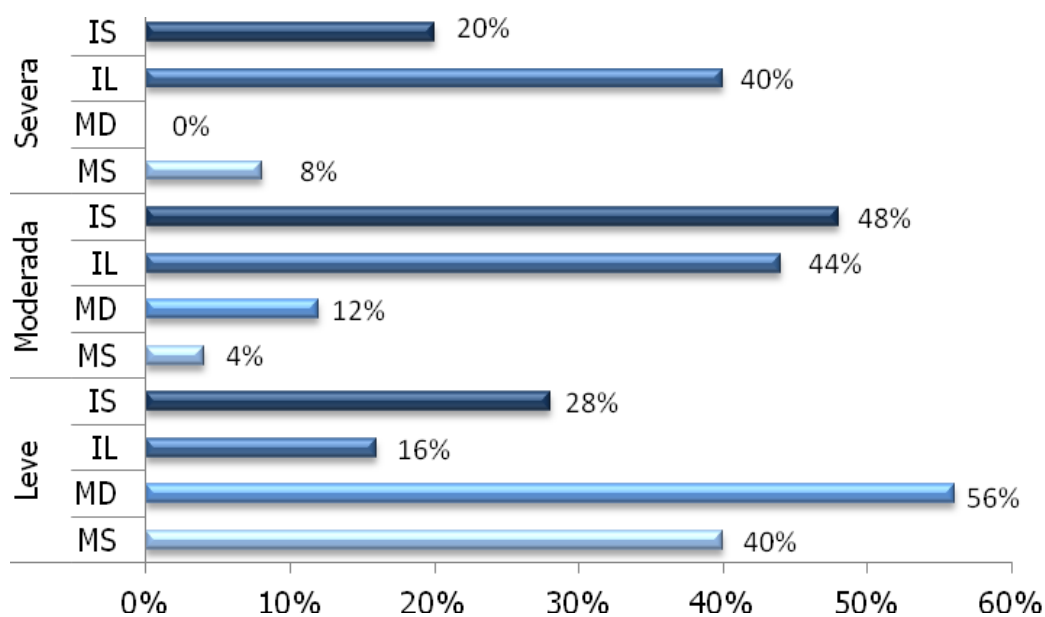
IS: Inguinal superficial; IL: Iliaco; MD: Mediastínico; MS: Mesentérico.

Valorando los grados de histiocitosis en leve, moderada y severa (Gráfica 4.7), se observó severa (+++) histiocitosis en un 40 % (10/25) de los linfonodos iliacos, en un 20% (5/25) de los inguinales superficiales, y en un 8% (2/25) de los linfonodos mesentéricos, no habiéndose observado ningún caso de histiocitosis severa en los linfonodos mediastínicos.

En cuanto a la histiocitosis moderada (++), el mayor porcentaje se observó en los linfonodos inguinales superficiales (48%, 12 animales), seguido por los iliacos (44%, 11 animales), y en menor porcentaje, en los linfonodos mediastínicos (12% 3 animales) y mesentéricos (4%, 1 animal).

Los linfonodos que en mayor porcentaje tuvieron un grado leve (+) de histiocitosis fueron los linfonodos mediastínicos (56%, 14 animales), seguidos de los linfonodos mesentéricos (40%, 10 animales), inguinal superficial (28%, 7 animales) e iliaco (16%, 4 animales).

Gráfica 4.7: Clasificación de la histiocitosis por grado de intensidad y por linfonodo.



IS: Inguinal Superficial. IL: Iliaco. MD: Mediastínico. MS: Mesentérico.

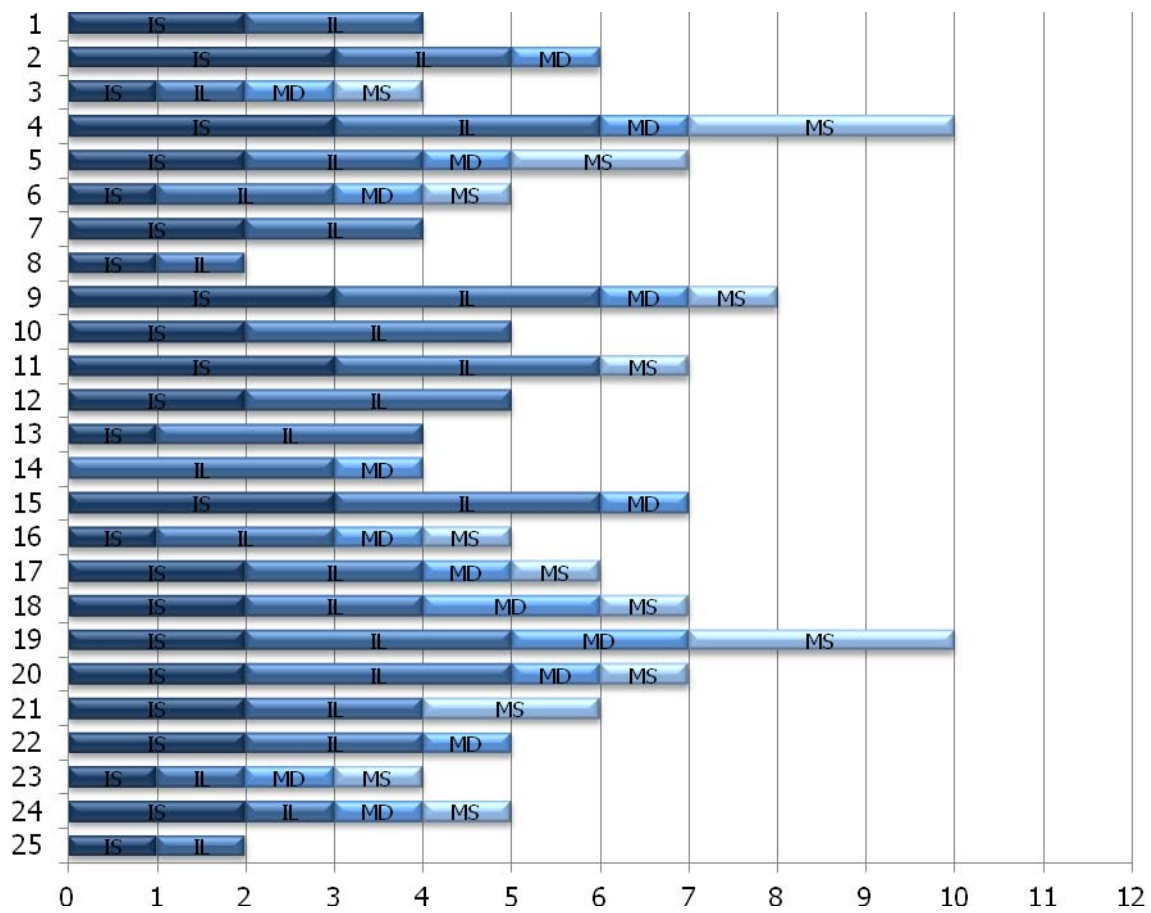
En relación a la histiocitosis intensa, ningún animal mostró dicho grado en los cuatro linfonodos estudiados. Un 4 % (1/25) (4) de los animales lo presentó en tres de los linfonodos valorados, y un 16% (4/25) (9,11, 15, 19) en dos, incluyendo de forma constante al linfonodo iliaco. Por otra parte un 20 % (5/25) (2, 10, 12, 13, 14) de los animales presentó histiocitosis intensa en un solo linfonodo (inguinal superficial ó iliaco) conjuntamente con otros linfonodos con menor grado de histiocitosis.

Un 12 % de los animales (3/25) (5, 18, 21) presentó histiocitosis moderada en tres de los linfonodos, incluyendo de forma constante los linfonodos inguinales superficiales e iliacos. Un 16% (4/25) (1, 7, 17, 22) mostró dicho grado en dos linfonodos incluyendo también de forma constante al inguinal superficial e iliaco. En este caso, tampoco ningún animal presentó histiocitosis moderada en los cuatros linfonodos valorados.

En cuanto a los animales que presentaron histiocitosis leve, un 8% (2/25) (3, 23) presentó este grado en los cuatro linfonodos, así como un 12% (3/25) (6, 16, 24) en tres de ellos incluyendo de forma constante a los linfonodos mediastínicos y mesentéricos. Igualmente, otro 12% (3/25) (8, 20, 25) de los animales presentó dos linfonodos con histiocitosis leve, principalmente inguinal superficial e iliaco.

En la gráfica 4.8 se representa el grado de histiocitosis por animal y linfonodo. Teniendo en cuenta que por linfonodo, la histiocitosis leve tiene un valor de 1, la moderada 2, y la severa 3, la máxima puntuación por animal será de 12.

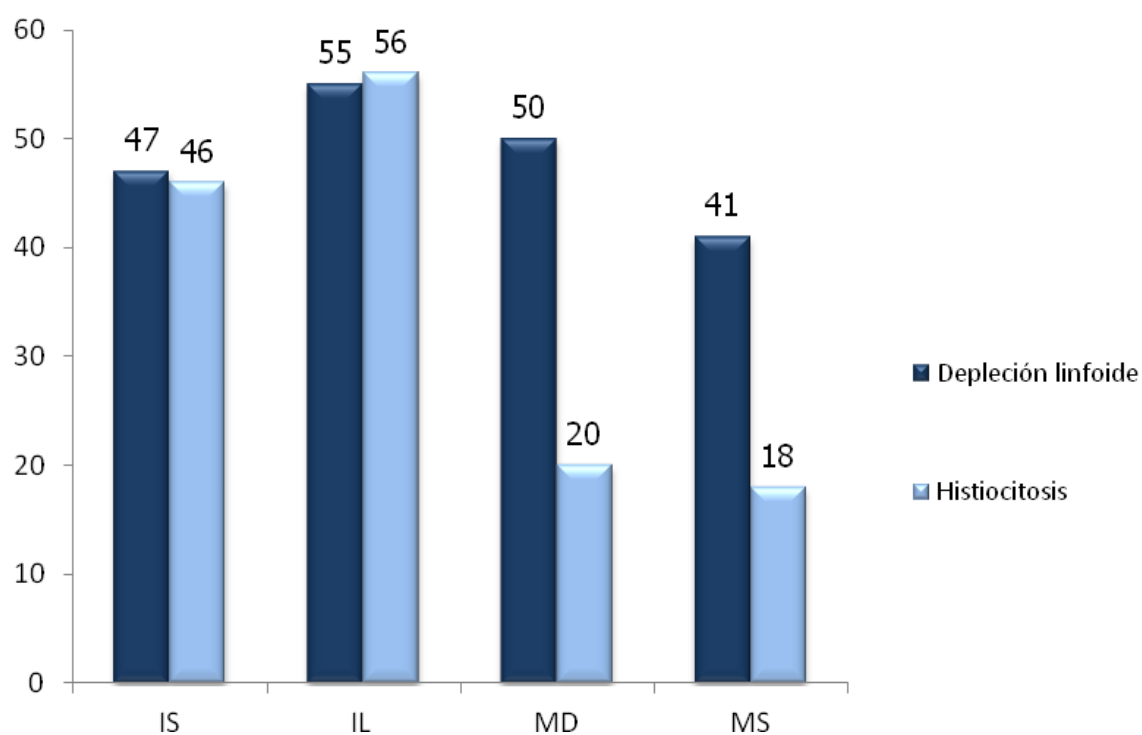
Gráfica 4.8. Grado de histiocitosis por animal y linfonodo.



IS: Inguinal Superficial. IL: Iliaco. MD: Mediastínico. MS: Mesentérico.

En la gráfica 4.9 se presenta de forma conjunta la puntuación del grado de depleción linfoide e histiocitosis por linfonodo.

Gráfica 4.9. Puntuación de depleción linfoide e histiocitosis por linfonodo.

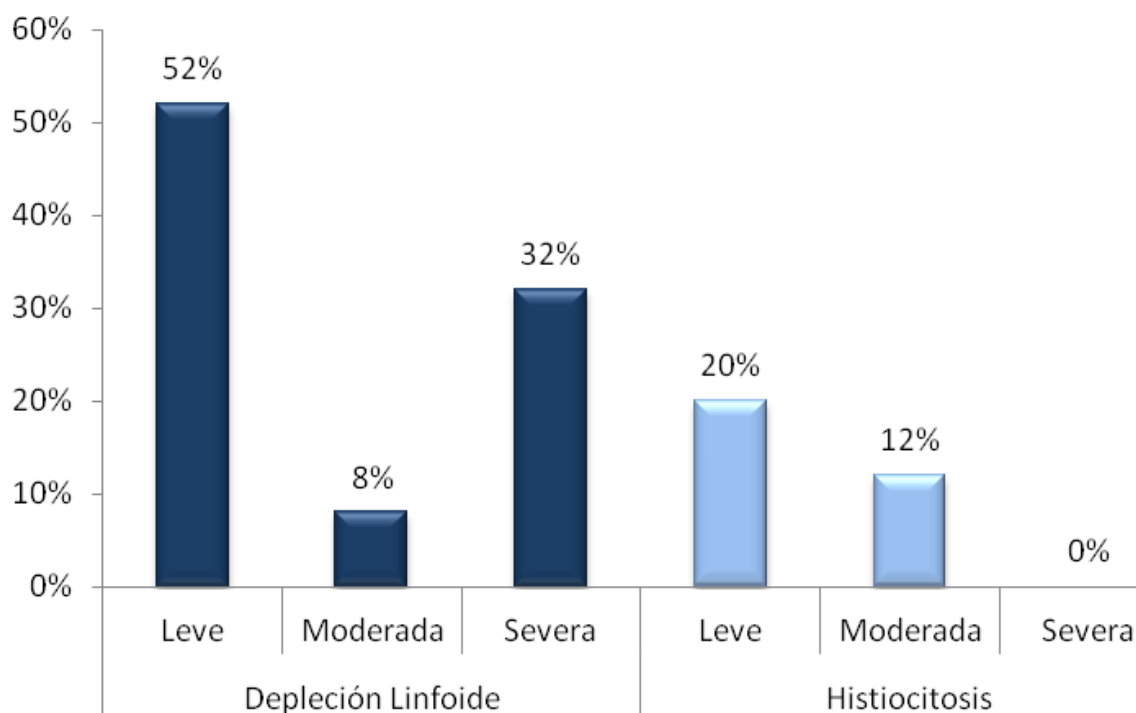


IS: Inguinal superficial; IL: Iliaco; MD: Mediastínico; MS: Mesentérico.

4.2.2 Tonsila

El principal hallazgo fue la depleción linfoide, en grado variable, caracterizada por una pérdida de celularidad a nivel de folículos linfoides y de la zona parafolicular, así como histiocitosis, consistente en un infiltrado, multifocal a difuso, de células histiocíticas en el parénquima linfoide. En ocasiones se observaron células gigantes multinucleadas y cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos basófilos y botrioides, en células macrofágicas, y, en menor medida, linfocitolisis a nivel de centros germinales (Fig. 4.9). En cuanto al número de animales, 23 (92%) presentaron depleción linfoide que variaba de leve (13 animales, 52%), moderada (2, 8%) a severa (8, 32%), y 8 (32%) histiocitosis, leve (5, 20%) y moderada (3, 12%) (Gráfica 4.10). En 3 animales (12%) se observaron células gigantes multinucleadas, y solo en 2 casos (8%) se detectaron cuerpos de inclusión (Tabla 4.8).

Gráfica 4.10. Clasificación de la depleción linfoide e histiocitosis por grado de intensidad en tonsila.



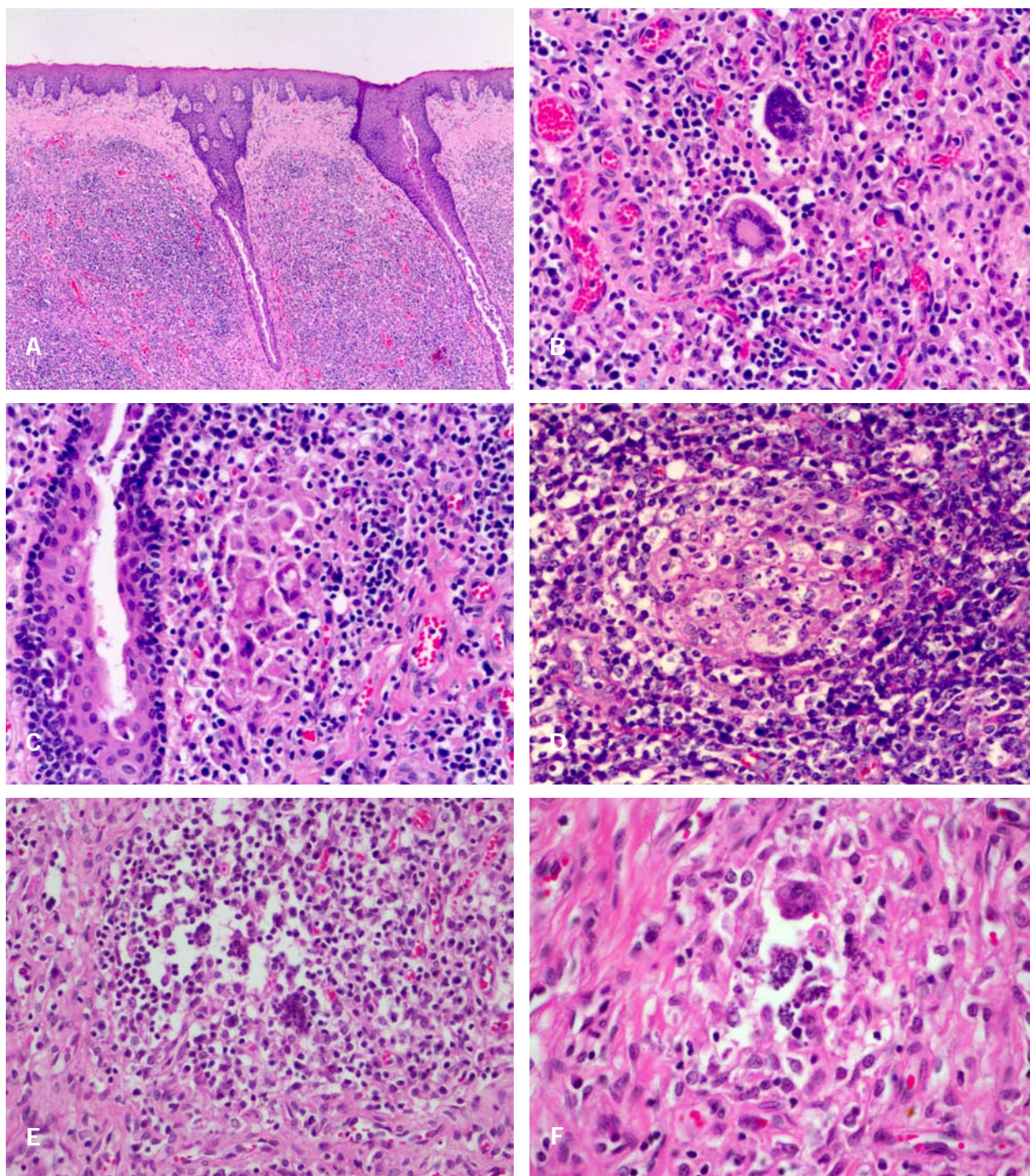


Fig. 4.9 Tonsila. A: Depleción linfoide. Pérdida de celularidad a nivel de folículos linfoides y de la zona parafolicular. Caso 17. HE. 4x. **B: Presencia de células gigantes multinucleadas.** Caso 17. HE. 10x. **C: Histiocitosis.** Infiltrado de células histiocíticas en el parénquima linfoide. Caso 17. HE. 20x. **D: Linfocitosis a nivel centrofolicular.** Caso 7. HE. 20x. **E y F: Cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos en células histiocíticas.** Caso 19. HE. 40x y 60x

Tabla 4.8. Grado de depleción linfoide e histiocitosis y presencia de células gigantes multinucleadas y cuerpos de inclusión en tonsila por animal.

Animal	Depleción	Histiocitosis	Cél. gigantes	CI
01	+	-		
02	+	-		
03	+	-		
04	+++	++		
05	+++	+		
06	+++	-		
07	+	-		
08	+	-		
09	+	-		
10	+	-		
11	+	+	+	
12	+	-		
13	+	-		
14	+	-		
15	+++	+		
16	+++	+		
17	+++	-	+	
18	+++	++		+
19	+++	++	+	+
20	+	-		
21	++	-		
22	+	-		
23	-	-		
24	-	-		
25	++	+		
Puntuación	41	11		

- = 0 (negativo); + = 1 (leve); ++ = 2 (moderado); +++ = 3 (severo).
(Modificado de Quintana et al., 2001; Opriessnig et al., 2004b).

4.2.3 Bazo

A nivel esplénico, la principal lesión observada fue la depleción linfoide, difusa, y de grado leve a severo, caracterizada por una pérdida de celularidad a nivel de folículos linfoides y vainas linfoides periarteriolares. De forma ocasional se observó infiltrado leve y difuso de células histiocíticas, así como leve exudación de fibrina con ocasionales polimorfonucleares neutrófilos y células linfoplasmocitarias en la superficie de la cápsula esplénica (periesplenitis-serositis fibrinosa) (Fig. 4.10).

De los animales del estudio, 22 (88%) presentaron depleción linfoide que variaba de leve (10, 40%), moderada (6, 24%) a severa (6, 24%), 2 animales (8%) presentaron histiocitosis leve, y otros 2 (8%) periesplenitis fibrinosa (Tabla 4.9 y Gráfica 4.11).

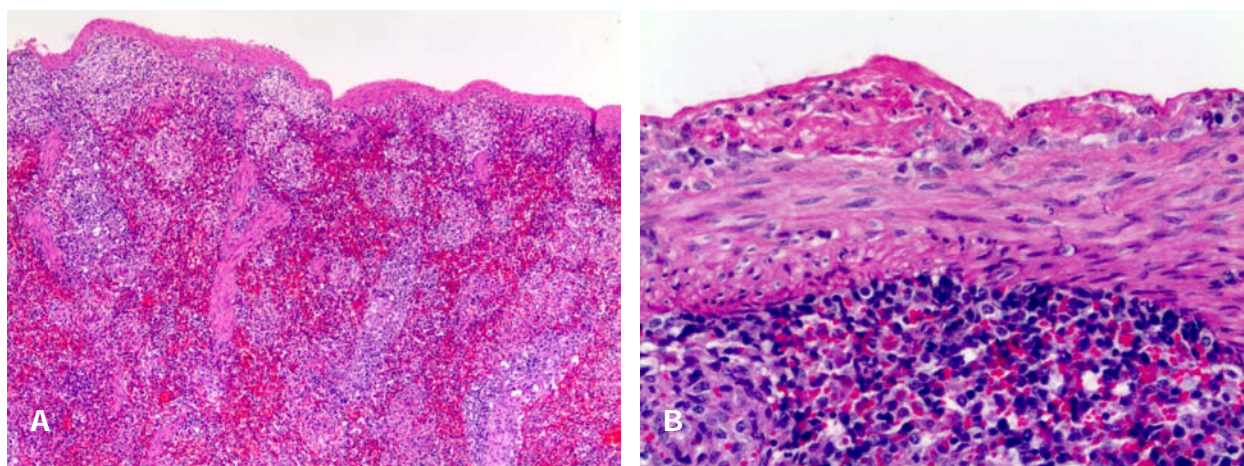


Fig. 4.10. A: Severa depleción linfoide esplénica, con ausencia de folículos linfoides. Caso 4. HE. 4x. **B: Serositis fibrinosa.** Leve exudación de fibrina con ocasionales polimorfonucleares neutrófilos y células linfoplasmocitarias en la superficie de la capsula esplénica. Caso 3. HE. 20x.

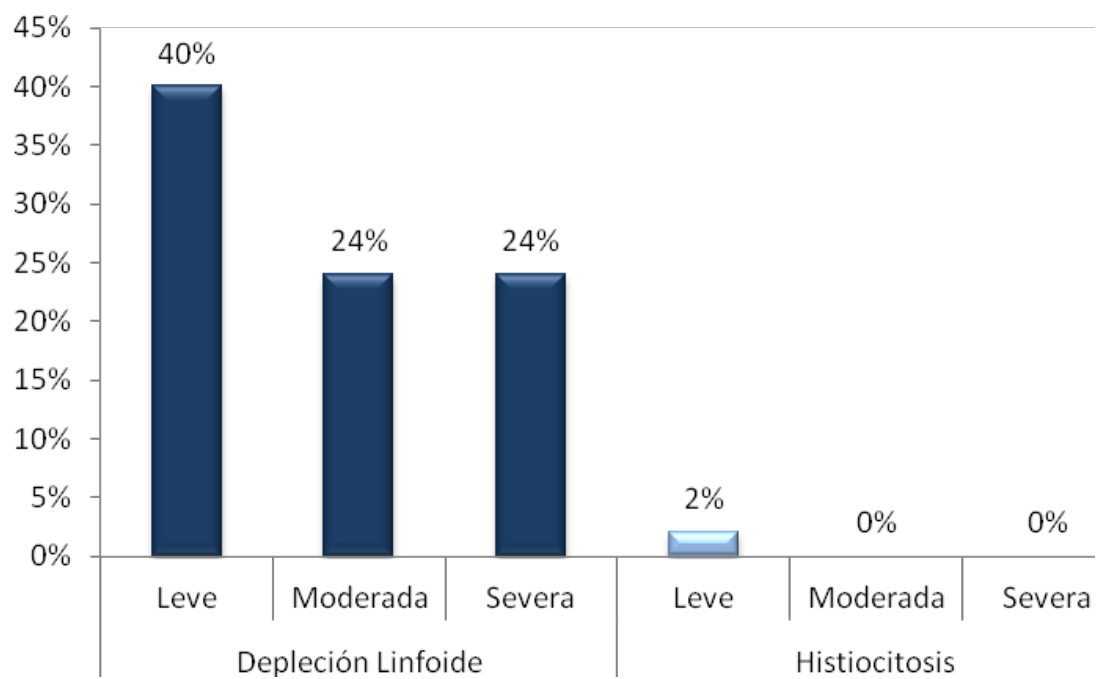
Tabla 4.9. Grado de depleción linfoide e histiocitosis en bazo por animal.

Animal	Depleción	Histiocitosis
01	-	-
02	+	-
03	+	-
04	+++	-
05	+++	+
06	+++	-
07	+	+
08	++	-
09	++	-
10	+	-
11	+	-
12	+	-
13	+	-
14	+	-
15	+	-
16	++	-
17	+++	-
18	+++	-
19	+++	-
20	+	-
21	++	-
22	++	-
23	-	-
24	-	-
25	++	-
Puntuación	40	2

--=0 (negativo); +=1 (leve); ++=2 (moderado); +++=3 (severo).

(Modificado de Quintana et al., 2001; Opriessnig et al., 2004b).

Gráfica 4.11. Clasificación de la depleción linfoide e histiocitosis por grado de intensidad en bazo.



4.2.4 Pulmón

Las principales lesiones en pulmón consistieron en una bronconeumonía purulenta, caracterizada por la presencia de infiltrado inflamatorio en la luz de bronquios, bronquiolos y alveolos, constituido mayoritariamente por polimorfonucleares neutrófilos y, en menor medida, células linfoplasmocitarias y macrófagos, con presencia, en ocasiones, de leucocitos degenerados (células en grano de avena, oat cells), así como exudación de fibrina (Fig. 4.11. A, B, C y D). En algunos casos se observaron colonias bacterianas asociadas a dichas lesiones (Fig. 4.11. E y F).

También se observó, con similar frecuencia, la presencia de neumonía intersticial, con engrosamiento de las paredes alveolares por infiltrado de células linfoplasmocitarias y macrofágicas, e hiperplasia-hipertrofia de neumocitos tipo II, con presencia, en ocasiones, de células gigantes multinucleadas, e infiltrado de macrófagos alveolares espumosos y células linfoplasmocitarias en la luz de los alveolos (Fig. 4.12. A, B, C y D). Así mismo, se observaron lesiones de neumonía intersticial con acúmulo de restos necróticos en luces alveolares, en ocasiones con membranas hialinas y necrosis del epitelio bronquiolar, patrón compatible con neumonía proliferativa necrotizante (PNP) (Fig. 4.12. E y F).

Otros hallazgos fueron hiperplasia del tejido linfoide asociado a bronquios (bronchus-associated lymphoid tissue, BALT) (Fig. 4.13. A y B), fibrosis del parénquima pulmonar (Fig. 4.13. C y D) y áreas de necrosis del parénquima pulmonar con formación de abscesos (Fig. 4.14. A, B y C). También se observó pleuritis fibrinosa-fibrinopurulenta, con exudación de fibrina e infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos con algunas células linfoplasmocitarias y macrófagos, así como restos celulares, en la pleura visceral, produciendo engrosamiento de la misma (Fig. 4.14. D, E y F).

En cuanto a las lesiones por animal, en los 25 animales (100%) se observó bronconeumonía purulenta, de los cuales 22 (88%) presentaban además neumonía intersticial. De igual modo se observaron lesiones compatibles con neumonía proliferativa necrotizante (PNP) en 11 animales. Se detectó hiperplasia del BALT en 6 animales (24%), fibrosis del parénquima pulmonar en 4 (16%), abscesos/áreas de necrosis en 9 animales (36%), edema intersticial en 7 (28%), y células gigantes multinucleadas en 3 animales (12%). En 15 animales (60%) se observó pleuritis fibrinosa-fibrinopurulenta (Tabla 4.12).

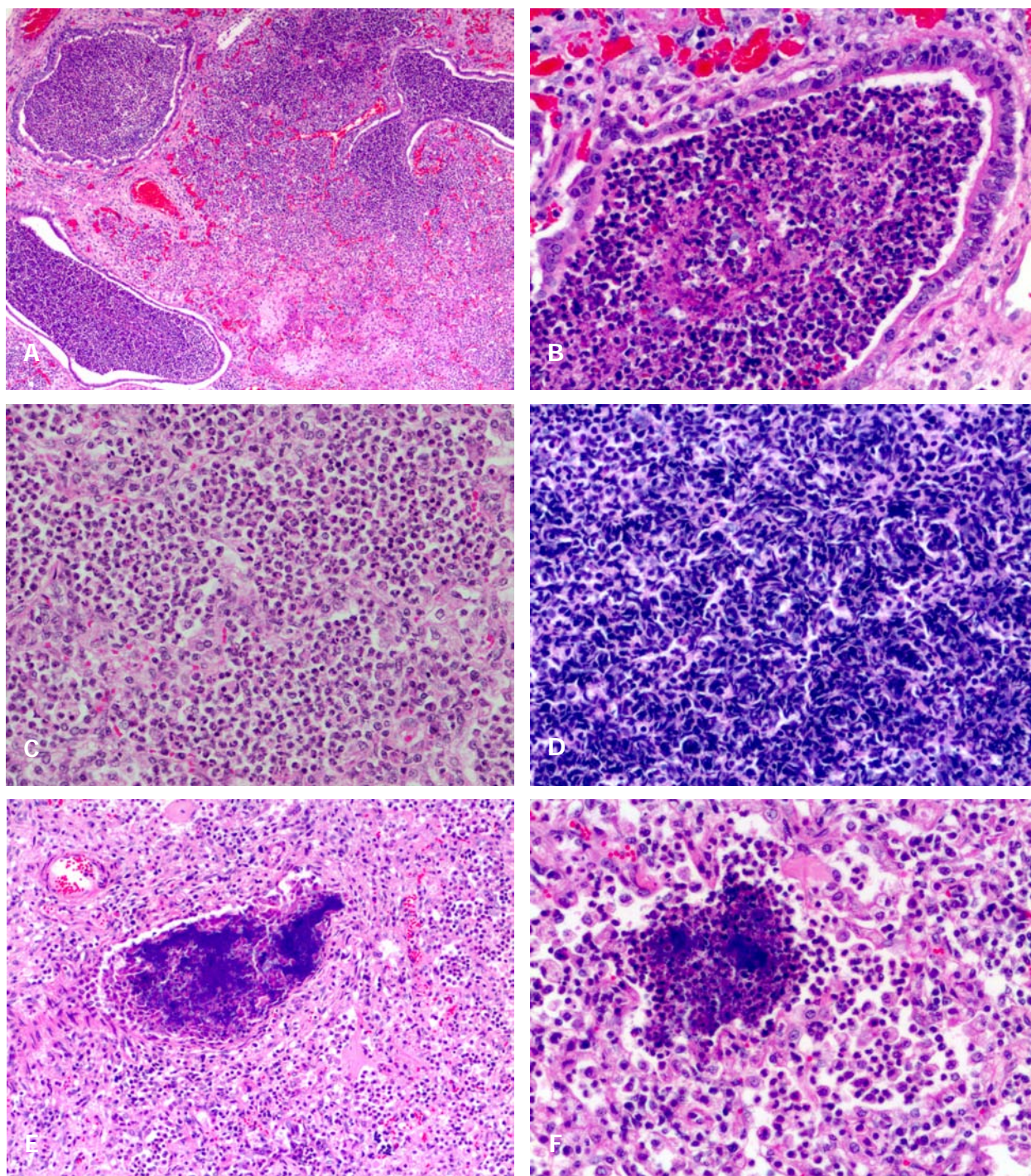


Fig. 4.11. A, B y C: Bronconeumonía purulenta. Severo infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos y, en menor medida, células linfoplasmocitarias y macrófagos en la luz de bronquiolos y alveolos. A. Caso 5. HE. 4x. B. Caso 5. 20x. C. Caso 14. HE. 40x **D: Presencia de células en grano de avena (oat cells).** Caso 25. HE. 20x. **E y F: Presencia de colonias bacterianas en la luz de bronquiolos y alveolos.** E. Caso 6. HE. 10x. F. Caso 6. HE. 20x.

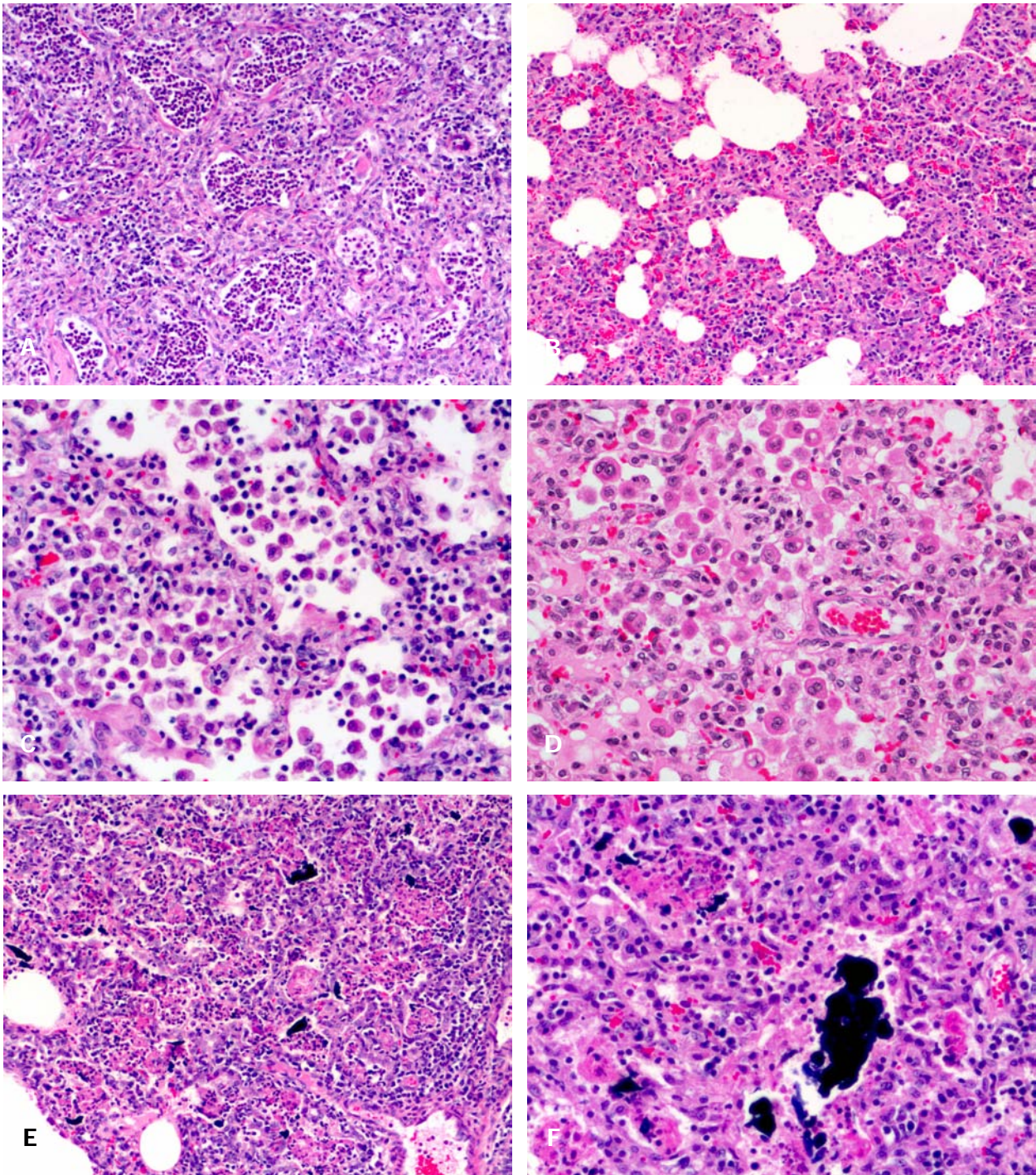


Fig. 4.12. A: Neumonía intersticial y bronconeumonía purulenta. Caso 2. HE. 10x. **B, C y D: Neumonía intersticial.** Engrosamiento de paredes alveolares por infiltrado de células linfoplasmocitarias y macrofágicas e hiperplasia-hipertrofia de neumocitos tipo II, con presencia de macrófagos alveolares espumosos y algunas células linfoplasmocitarias en lucas alveolares. B. Caso 9. HE. 10x. C. Caso 2. HE. 20x. D. Presencia de células binucleadas en lucas alveolares. Caso 14. HE. 40x. **E y F: Neumonía proliferativa necrotizante (PNP).** Engrosamiento de paredes alveolares por infiltrado de macrófagos y células linfoplasmocitarias, con acúmulo de restos necróticos y material amorfo basófilo (cariorexix) en lucas alveolares. E. Caso 8. HE. 10x. F. Caso 15. HE. 20x.

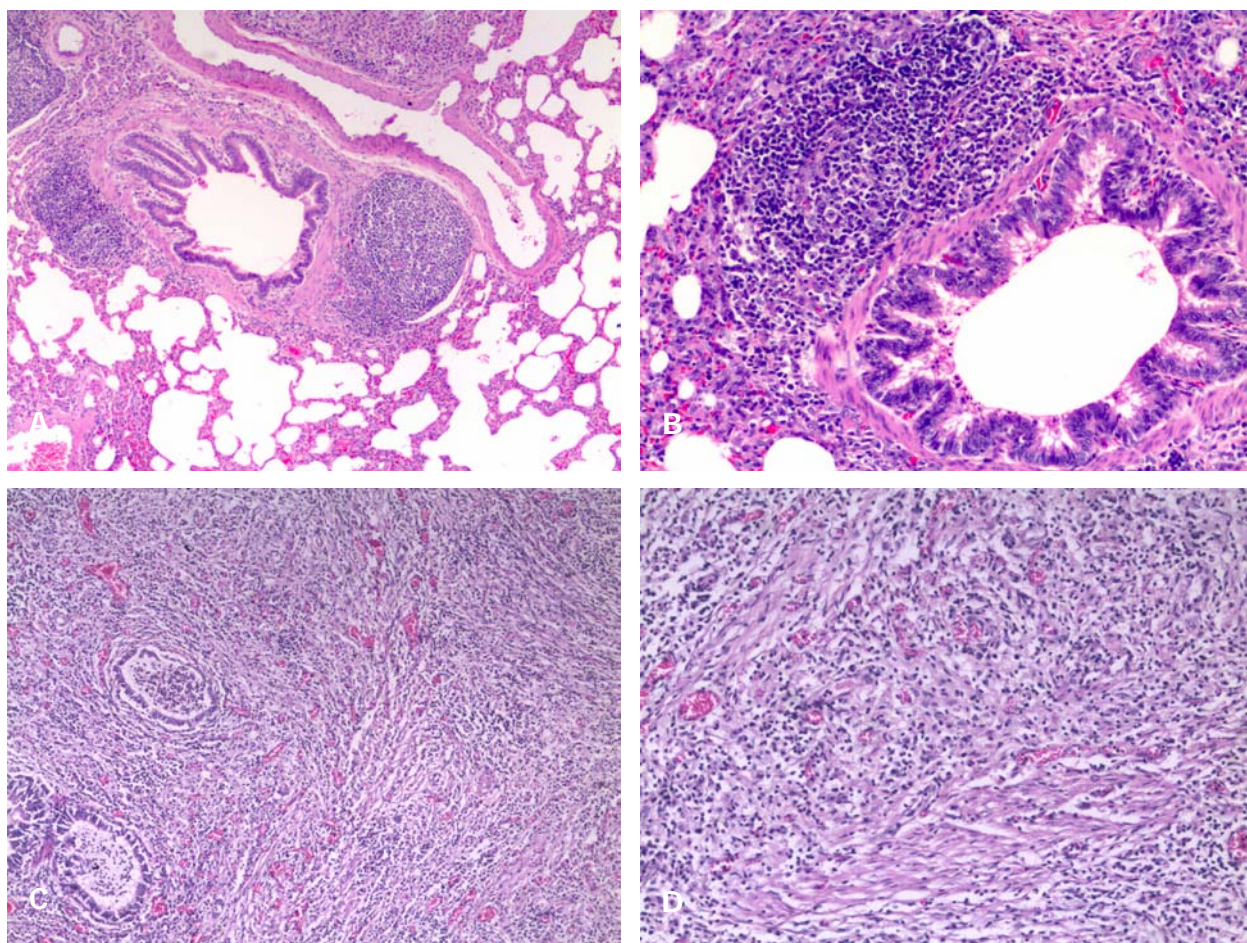


Fig. 4.13. A y B: Hiperplasia del tejido linfoide asociado a bronquios (BALT). A. Caso 14. HE. 4x. B. Caso 8. HE. 10x. **C y D: Fibrosis del parénquima pulmonar.** Caso 21. HE. 10x y 20x.

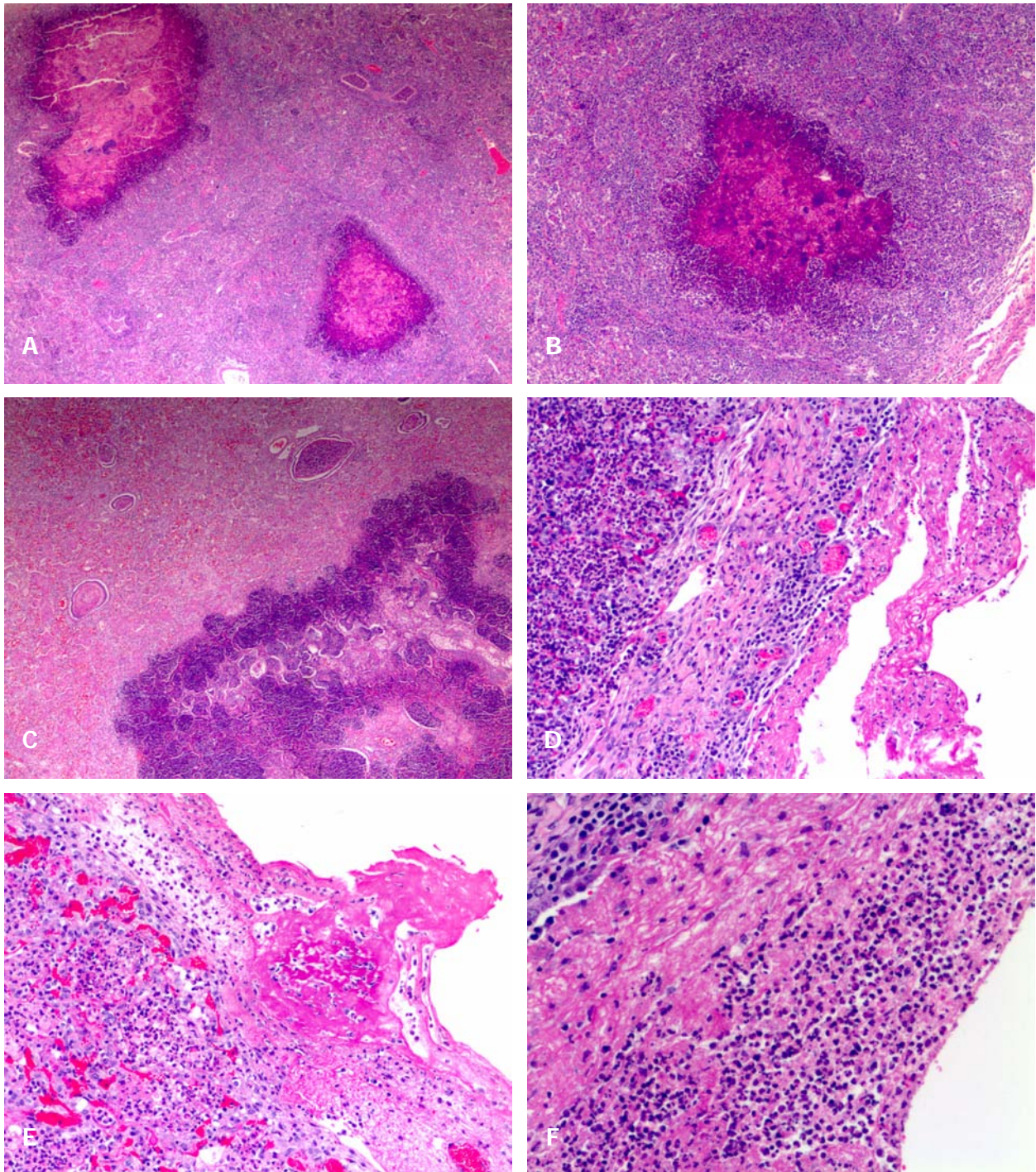


Fig. 4.14. A, B y C: Áreas de necrosis y microabscesos con presencia de colonias bacterianas. A. Caso. 18. HE. 2x. B. Caso 10. HE. 2x. C. Caso 10. HE. 4x. **D, E y F: Pleuritis fibrinopurulenta.** Infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos y fibrina en la pleura visceral. D. Caso 3. HE. 10x. HE. E. Caso 1. HE. 10x. F. Caso 3. HE. 20x.

4.2.5 Corazón

A nivel cardíaco se observó pericarditis fibrinosa-fibrinopurulenta en 8 animales (32%), caracterizada por una moderada-severa y difusa exudación de fibrina junto con infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos, células linfoplasmocitarias y macrófagos, en diferentes proporciones, así como restos necróticos, en el pericardio visceral, produciendo engrosamiento del mismo (Fig. 15. A, B y C). En ocasiones, dicho infiltrado se extendía en profundidad afectando al miocardio subyacente (Fig. 15. D). En 2 animales (8%) se observaron discretos focos de infiltrado linfoplasmocitario en el miocardio (Tabla 4.12).

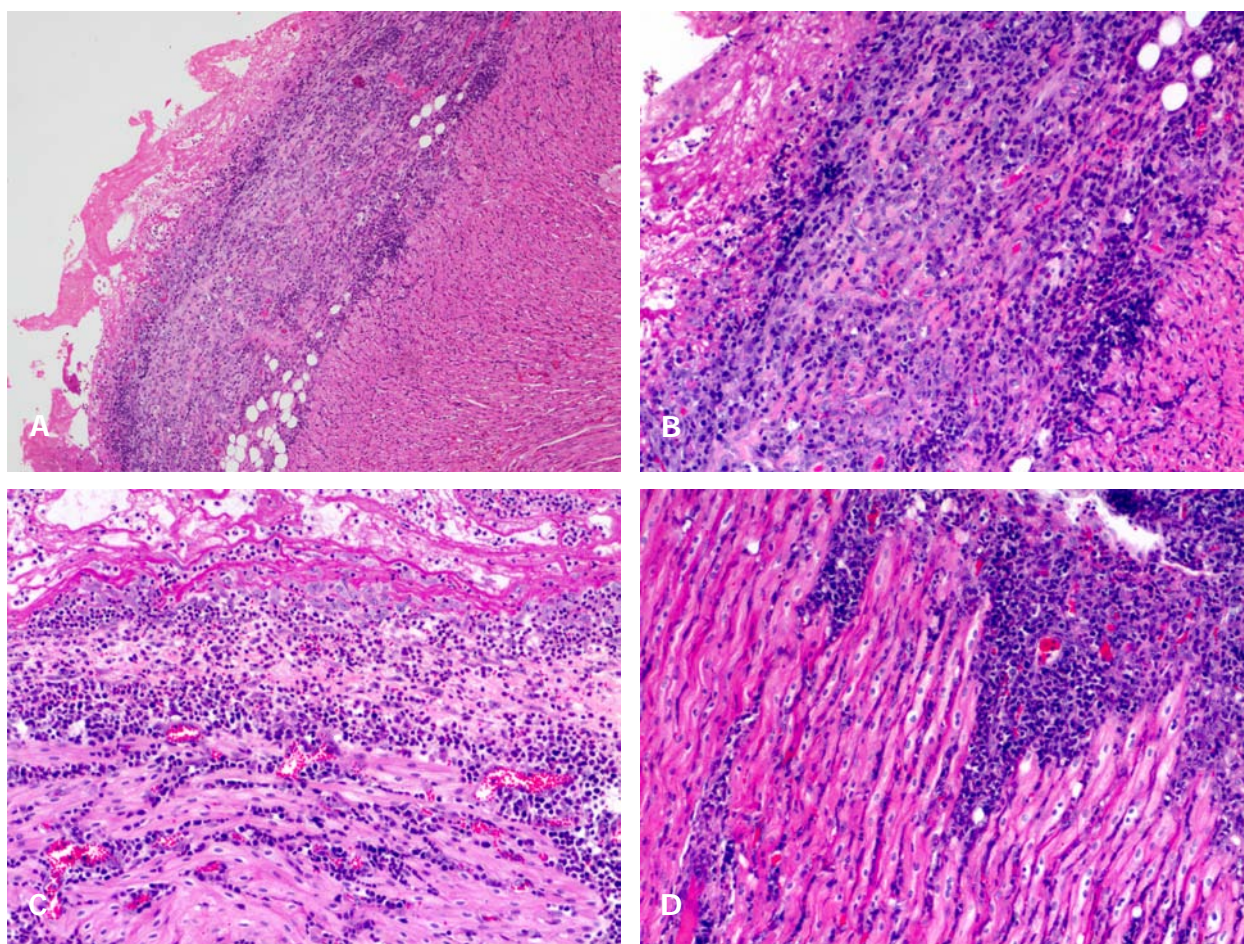


Fig. 4.15. A, B y C: Pericarditis fibrinopurulenta. Severo y difuso engrosamiento del pericardio visceral por infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos con algunas células linfoplasmocitarias y exudación de fibrina. A: Caso 3. HE. 10x. B: Caso 3. HE. 20x. C: Caso 12. HE. 20x. **D: Extensión del infiltrado inflamatorio hacia el miocardio subepicárdico.** Caso 3. HE. 20x.

4.2.6 Hígado

En el hígado se observó principalmente un leve infiltrado inflamatorio multifocal, constituido mayoritariamente por células linfoplasmocitarias con algunos macrófagos, a nivel periportal, y de forma ocasional, en los lobulillos hepáticos (Fig. 16. A). De forma ocasional se observaron discretas áreas de necrosis de hepatocitos con infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos y algunos macrófagos (Fig. 16. B), mientras que un caso mostró moderado-severo infiltrado difuso linfohistiocítico en el parénquima hepático, con necrosis de hepatocitos individuales de manera multifocal (Fig. 16. C y D). También se observó una moderada-severa y difusa exudación de fibrina e infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos con algunas células linfoplasmocitarias y macrófagos, así como restos celulares, en la cápsula hepática, produciendo engrosamiento de la misma (perihepatitis-peritonitis fibrinopurulenta), y extendiéndose, en ocasiones, hacia el parénquima subyacente, produciendo necrosis individual de algunos hepatocitos (Fig. 16. E y F).

En cuanto a las lesiones por animal, 9 (36%) presentaron hepatitis linfoplasmocitaria-linfohistiocítica periportal, 3 (12%) hepatitis linfohistiocítica intersticial, 2 (8%) presentaron hepatitis necrótica multifocal y 4 (16%) perihepatitis fibrinosa-fibrinopurulenta (Tabla 4.10). Según la clasificación de Rosell y colaboradores, del 2000, 9 de los animales de este estudio, presentarían un estadio I, caracterizado por un leve infiltrado linfocítico-histiocítico multifocal en torno a los espacios porta, y uno presentaría un estadio III, con inflamación linfohistiocítica en el parénquima hepático y desorganización de los cordones hepáticos con necrosis de hepatocitos individuales de manera multifocal.

Tabla 4.10. Lesiones hepáticas por animal.

Animal	Hepatitis periportal	Hepatitis intersticial	Necrosis	Perihepatitis
01		X		
03				X
04		X	X	
12	X			
13	X			
14	X			
15	X			
17	X			X
18			X	X
19	X			
20		X		
21	X			
24	X			X
25	X			
	9	3	2	4

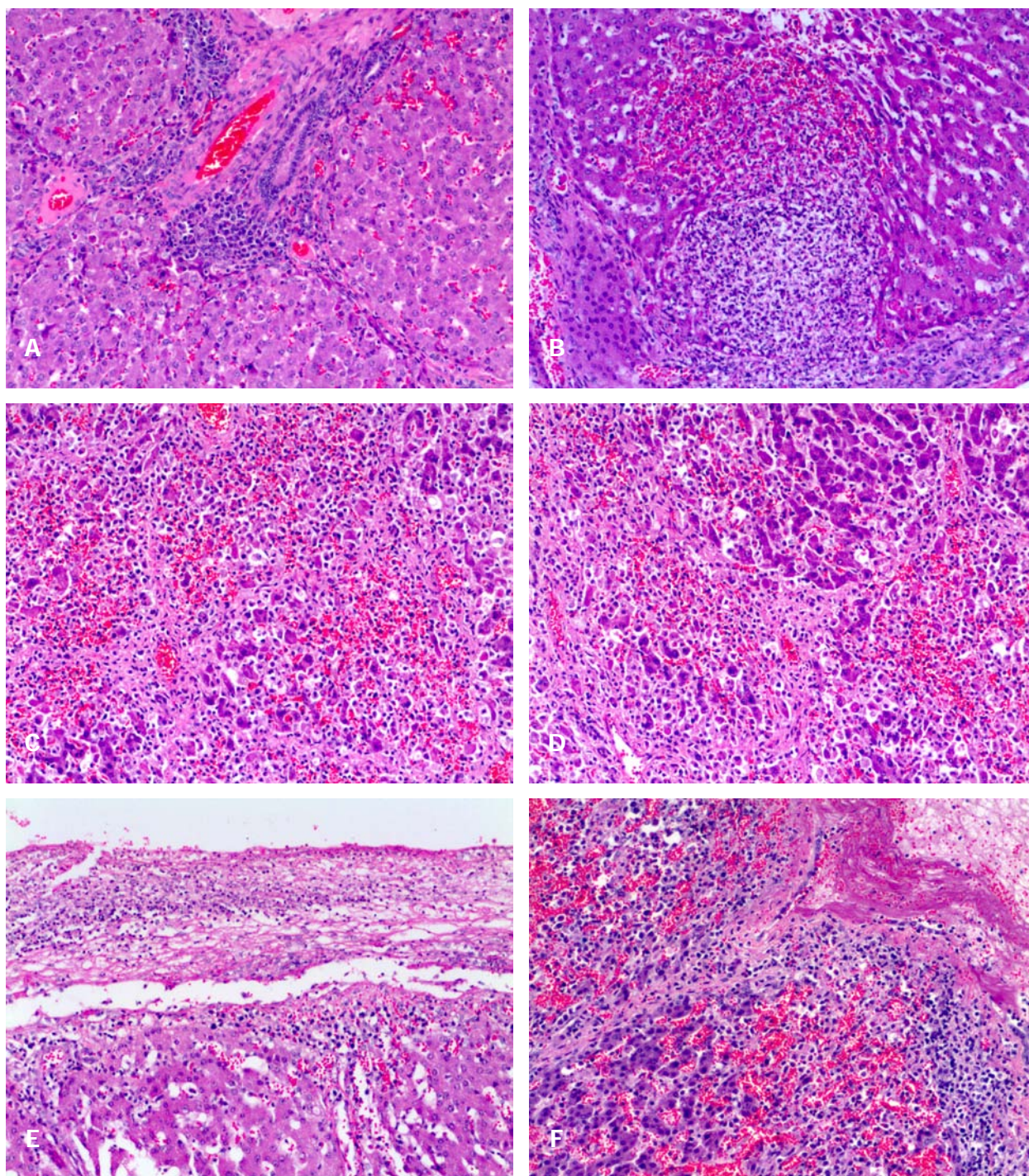


Fig. 4.16. A: Hepatitis linfoplasmocitaria. Infiltrado linfoplasmocitario periportal. Caso 13. HE. 10x. **B: Necrosis hepática.** Foco de necrosis de hepatocitos con infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos y algunos macrófagos. Caso 18. HE. 10x. **C y D: Hepatitis linfohistiocítica.** Infiltrado linfohistiocítico con desorganización de cordones hepáticos y necrosis de hepatocitos individuales. Caso 4. HE. 10x. **E y F: Perihepatitis.** Severa exudación de fibrina con polimorfonucleares neutrófilos y algunas células linfoplasmocitarias en la cápsula hepática extendiéndose al parénquima subyacente. E. Caso 17. HE. 10x. F. Caso 24. HE. 10x.

4.2.7 Aparato Digestivo

A nivel del estómago, las úlceras que macroscópicamente presentaban dos animales, se observaron como pérdida focal de todo el espesor del epitelio con severo infiltrado asociado de polimorfonucleares neutrófilos con algunas células linfoplasmocitarias (Fig. 4.17. A).

A nivel intestinal (intestino delgado y grueso) las principales lesiones consistieron en enteritis, observada en 23 animales (92%), y caracterizada por un leve-moderado infiltrado difuso en la lámina propia de células linfoplasmocitarias, junto con leucocitos globulares y polimorfonucleares eosinófilos, en cantidades variables, siendo más numerosos estos últimos en los casos en los que había presencia de algún parásito (*Balantidium* spp. y/o *Cryptosporidium* spp.). De forma ocasional se observó moderada atrofia segmental y fusión de vellosidades intestinales con pérdida del epitelio de revestimiento de las mismas. Un 8% de los animales presentaron leve infiltrado de macrófagos en la lámina propia y otro 8%, presencia de células gigantes multinucleadas, también en la lámina propia (Fig. 4.17. B).

En cuanto al tejido linfoide asociado a intestino (GALT, gut-associated lymphoid tissue), se observó depleción linfoide en 8 animales (32%), en grado variable, tanto a nivel centrofolicular como en la zona parafolicular, y en menor medida, 3 casos (12%), histiocitosis moderada-severa con distribución multifocal-difusa. También se observó la presencia de células gigantes multinucleadas (8%), y de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos basófilos botrioides en células histiocíticas (8%) (Fig. 4.17. C, D, E y F).

El protozoo *Balantidium* spp. fue observado en 11 animales (44%), en leve-moderada cantidad, siendo muy numeroso en un caso (Fig. 4.18. A y B). También se observó *Cryptosporidium* spp. en dos animales (8%) (Fig. 4.18. C y D). Así mismo, 6 animales (24%) mostraron serositis fibrinosa, con presencia de moderada y difusa exudación de fibrina, con polimorfonucleares neutrófilos junto con células linfoplasmocitarias y macrófagos, así como restos celulares, en la superficie de la serosa intestinal (Fig. 4.18. E y F).

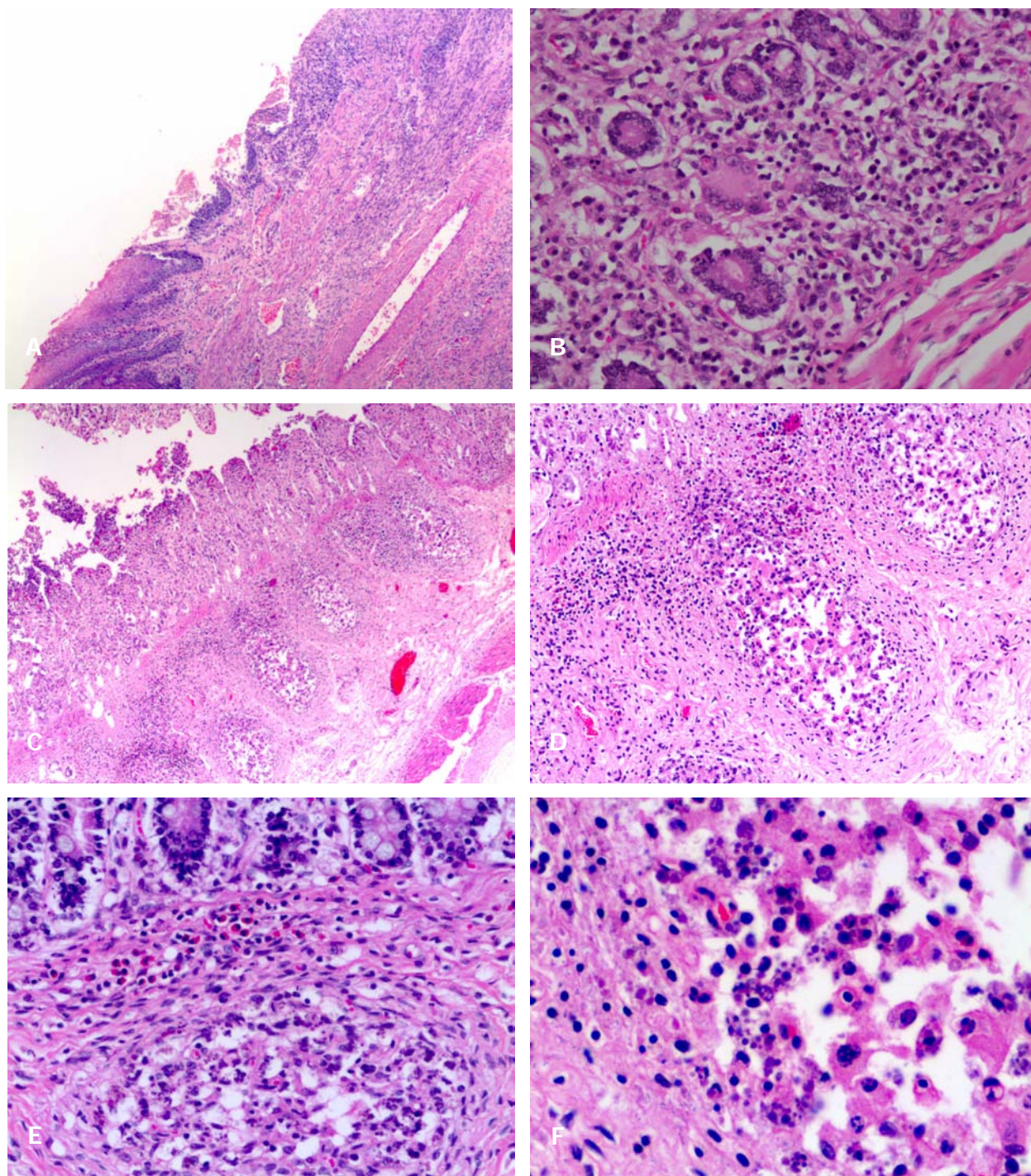


Fig. 4.17. A: Úlcera gástrica en la porción no glandular. Caso 3. HE. 4x. B: Presencia de una célula gigante multinucleada en la lámina propia. Caso 17. HE. 40x. C y D: Depleción linfoide de las placas de Peyer con histiocitosis. Caso 5. HE. 4x y 10x. E y F: Histiocitosis y cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos en células histiocíticas a nivel de las placas de Peyer. E. Caso 18. HE. 20x. F. Caso 1. HE. 40x.

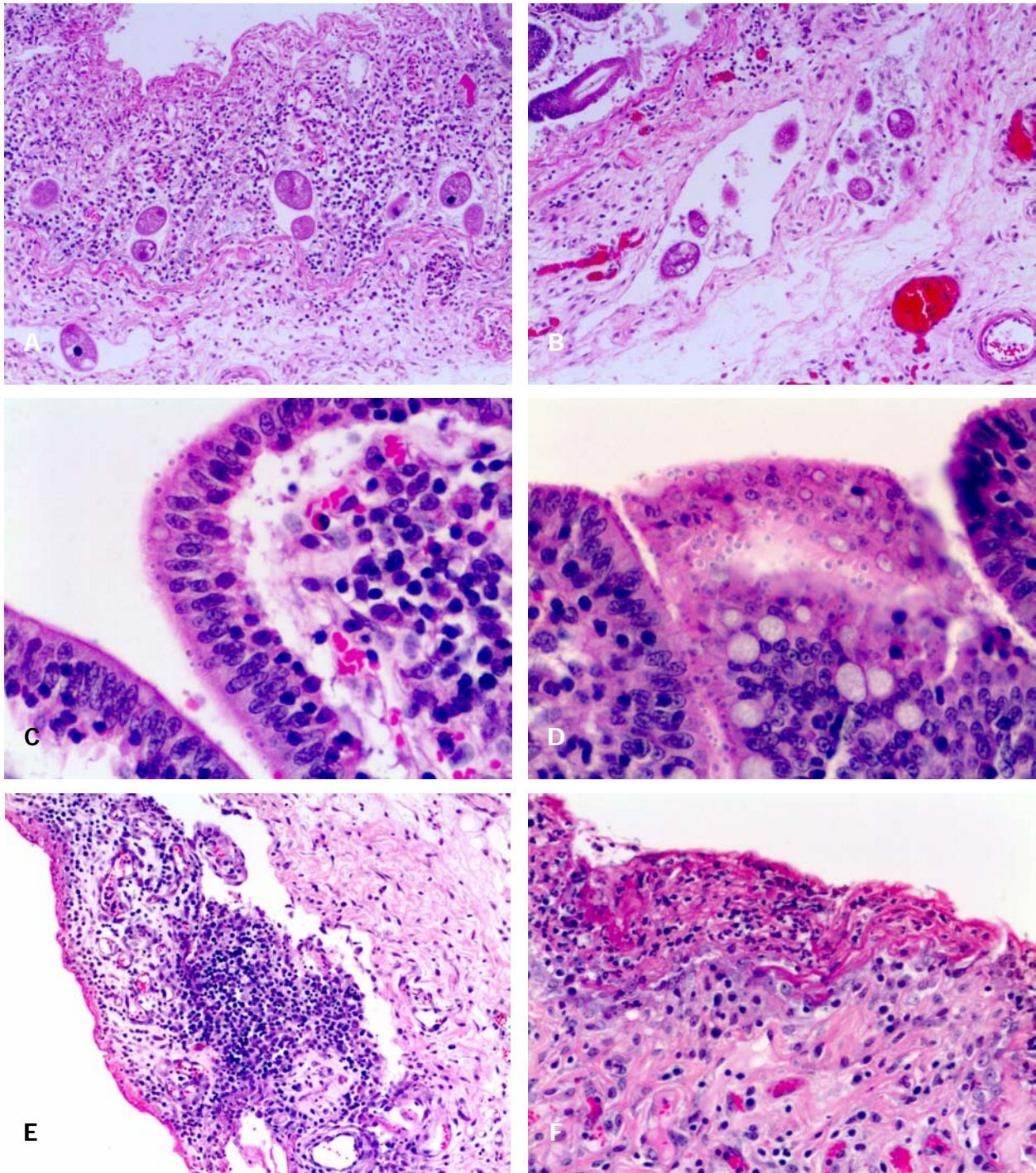


Fig. 4.18. A y B: *Balantidium* spp. Presencia de numerosos *Balantidium* spp. en la lámina propia y en vasos linfáticos. Caso 19. HE. 10x. **C y D: *Cryptosporidium* spp.** Presencia de *Cryptosporidium* spp. en el borde apical de los enterocitos. Caso 13 y 10. HE. 40x. **E y F: Serositis fibrinosa.** Exudación de fibrina e infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos con algunas células linfoplasmocitarias en la serosa. Caso 3. HE. 10x y 20x.

4.2.8 Riñón

La principal lesión observada fue nefritis intersticial (17 animales, 68%), caracterizada por un infiltrado leve-moderado, multifocal-coalescente, de células linfoplasmocitarias a nivel intersticial, predominantemente afectando a la corteza (Fig. 4.19. A y B). También se observó pielonefritis en 3 animales (12%), con moderado-severo, difuso, infiltrado inflamatorio túbulointersticial en papila y médula renal, constituido por polimorfonucleares neutrófilos, y en menor medida, células linfoplasmocitarias, junto con exudación de fibrina y necrosis (Fig. 4.19. C y D).

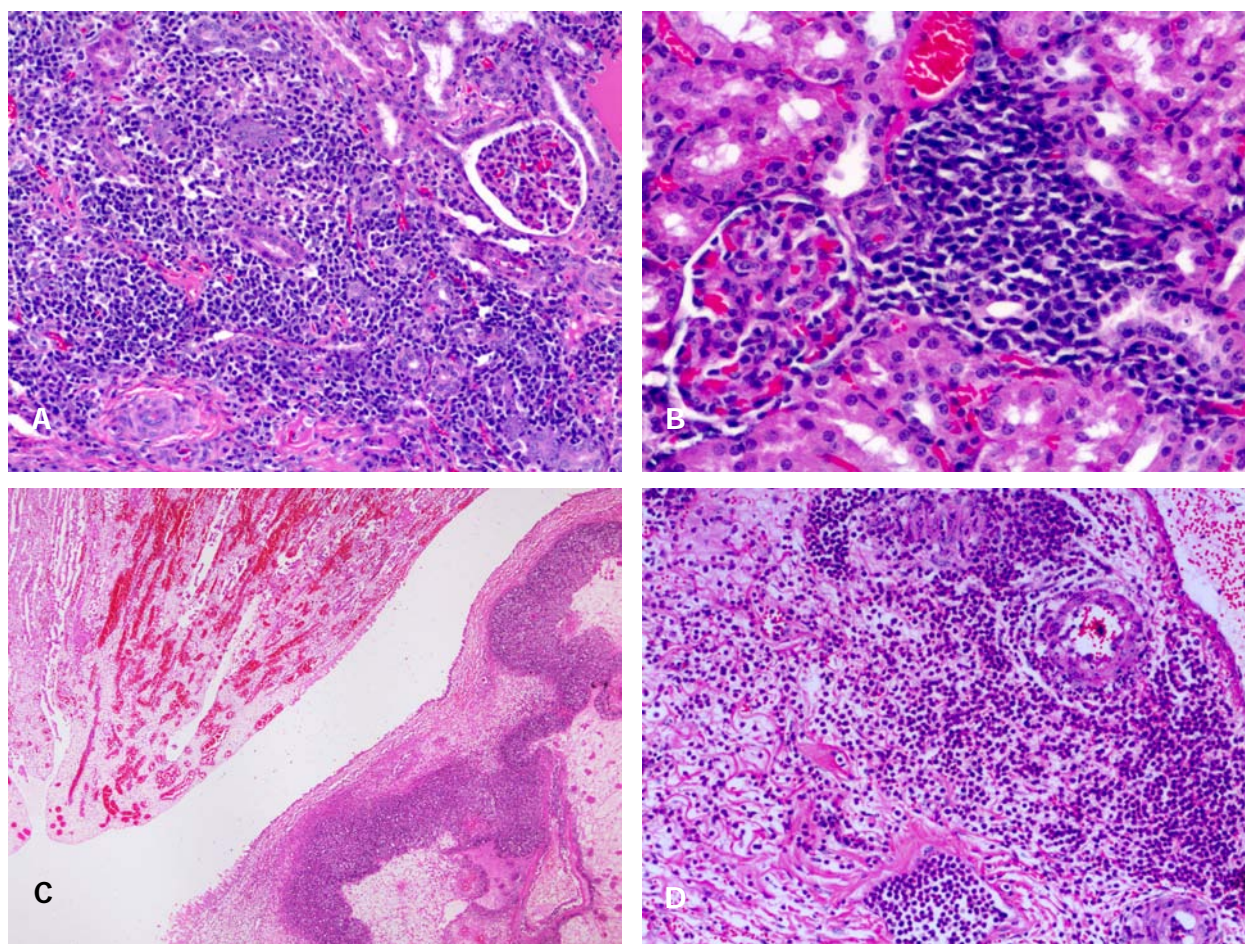


Fig. 4.19. A y B: Nefritis intersticial. Infiltrado intersticial de células linfoplasmocitarias a nivel de corteza renal. A. Caso 13. HE. 10x. B. Caso 13. HE. 20x. **C y D: Pielonefritis.** Severo infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos, con algunas células linfoplasmocitarias, exudación de fibrina, necrosis e hiperémia, en papila y médula renal profunda. C. Caso 18. HE. 2x. D. Caso 18. HE. 10x.

4.2.9 Sistema Nervioso Central

A nivel del encéfalo se observó encefalitis y/o meningitis en un total de 8 animales. Dichas lesiones estaban caracterizadas por un moderado-severo infiltrado inflamatorio constituido por polimorfonucleares neutrófilos y/o células linfoplasmocitarias, y en ocasiones, exudación de fibrina, en proporciones variables. A nivel de leptomeninges, dicho infiltrado presentaba una distribución difusa (Fig. 4.20. A, B, C y D), mientras que a nivel del parénquima nervioso-neuropilo, mostraba una distribución predominantemente perivascular (Fig. 4.20. E y F). Así, 4 animales (16%) presentaron meningoencefalitis supurativa, 3 (12%) meningitis que variaba de no supurativa (2) a supurativa (1), y un solo animal (4%), encefalitis no supurativa (Tabla 4.11).

Tabla 4.11. Lesiones en encéfalo por animal.

Animal	Meningitis	Encefalitis
01	sup	sup
12	no sup	
13	no sup	
14	sup	
16	sup	sup
17		no sup
19	sup	sup
24	sup	sup

sup: supurativa. no sup: no supurativa.

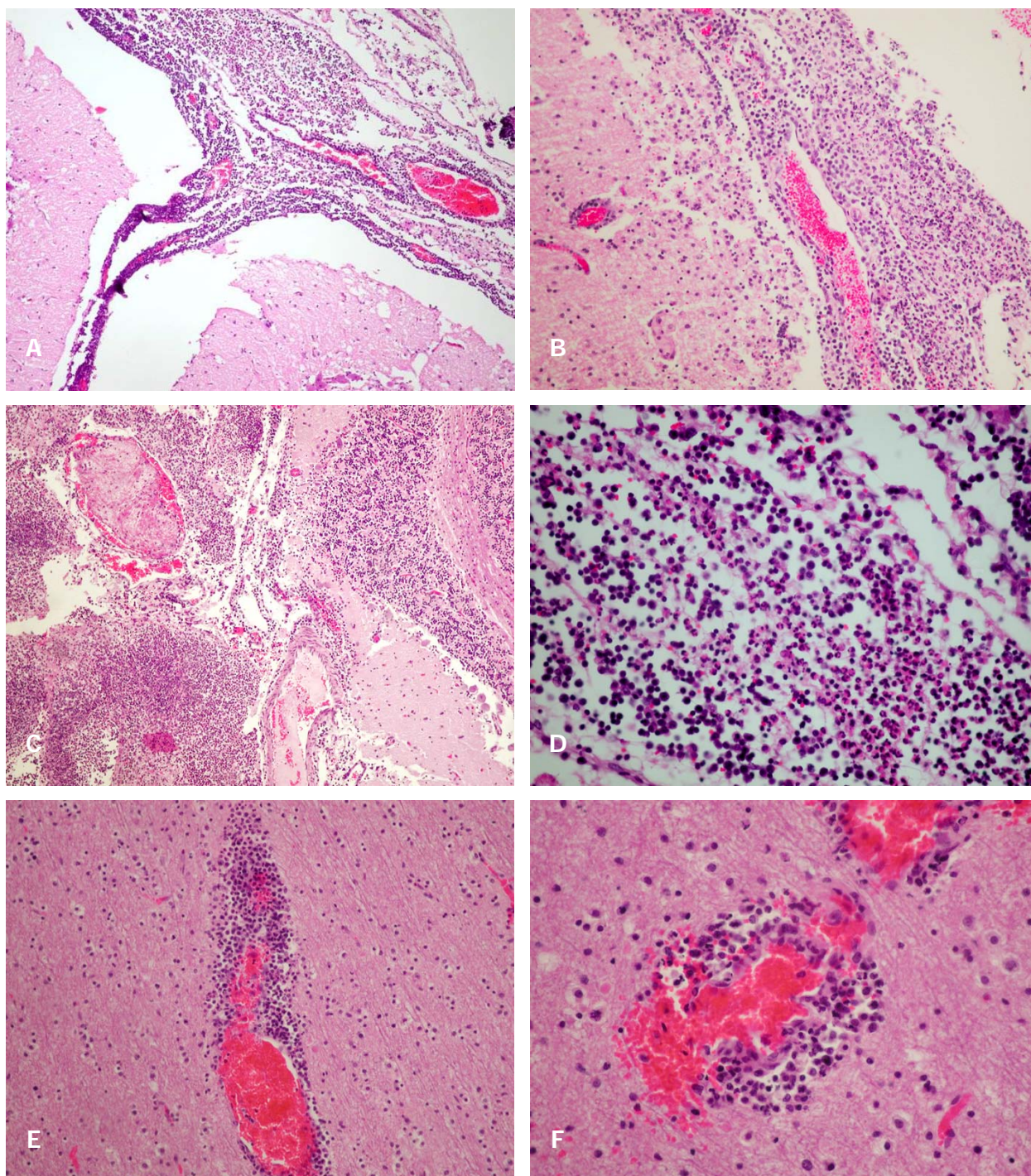


Fig. 4.20. A, B, C y D: Meningitis supurativa. Severo y difuso infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos, con algunas células linfoplasmocitarias, fibrina y trombosis en leptomeninges. A. Caso 1. HE. 10x. B. Caso 24. HE. 20x. C. Caso 24. HE. 10x. D. Caso 1. HE. 40x. **E y F: Encefalitis supurativa.** Moderado-severo infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos con algunas células linfoplasmocitarias a nivel perivascular junto con hemorragias. Caso 24. HE. 20x y 40x.

Tabla 4.12. Resumen de las principales lesiones microscópicas observadas en los animales de estudio.

Lesiones		Nº Animales	%
Linfonodos		25	
Depleción linfoide	Leve	7	28
	Moderada	8	32
	Severa	9	36
Histiocitosis	Leve	16	64
	Moderada	7	28
	Severa	2	8
CGM		6	24
Cuerpos Inclusión		4	16
Infiltrado PMN		15	60
Linfocitosis		5	20
Necrosis		3	12
Dilataciones quísticas/vacuolizaciones		12	48
Tonsila		25	
Depleción linfoide	Leve	13	52
	Moderada	2	8
	Severa	8	32
Histiocitosis	Leve	5	20
	Moderada	3	12
	Severa	0	0
CGM		3	12
Cuerpos Inclusión		2	8
Bazo		25	
Depleción linfoide	Leve	10	40
	Moderada	6	24
	Severa	6	24
Histiocitosis	Leve	2	8
	Moderada	0	0
	Severa	0	0
Pulmón		25	
BNP		25	100
Neumonía intersticial		22	88
PNP		11	44
Hiperplasia BALT		6	24
Fibrosis parénquima		4	16
Abscesos/necrosis		9	36

Edema intersticial		7	28
CGM		3	12
Pleuritis	Fibrinosa-Fibrinopurulenta	15	60
Corazón		25	
Pericarditis	Fibrinosa-Fibrinopurulenta	8	32
Miocarditis	No supurativa	2	8
Hígado		25	
Hepatitis		12	48
Necrosis		2	8
Aparato Digestivo		25	
Úlceras gástricas		2	8
Enteritis		23	92
Histiocitosis LP		2	8
CGM LP		2	8
Depleción GALT	Leve	6	24
	Moderada	1	4
	Severa	1	4
Histiocitosis GALT	Leve	0	0
	Moderada	2	8
	Severa	1	4
CGM GALT		2	8
Cuerpos Inclusión GALT		2	8
<i>Balantidium spp.</i>		11	44
<i>Cryptosporidium spp.</i>		2	8
Peritonitis	Fibrinosa-Fibrinopurulenta	6	24
Riñón		25	
Nefritis intersticial		17	68
Pielonefritis		3	12
SNC		25	
Meningoencefalitis	Supurativa	4	16
Meningitis	No supurativa	2	8
	Supurativa	1	4
Encefalitis	No supurativa	1	4

BALT: tejido linfoide asociado a bronquios. **BNP:** bronconeumonía purulenta. **CGM:** células gigantes multinucleadas. **GALT:** tejido linfoide asociado a intestino. **LP:** Lámina propia. **PMN:** Polimorfonucleares neutrófilos. **PNP:** neumonía proliferativa necrotizante.

4.3 Estudio Histoquímico

Un total de 15 animales (60%) fueron positivos a CAR-bacillus, mediante la técnica de W-S, el cual se visualizó como estructuras bacilares de color negro en la superficie del epitelio respiratorio (Fig. 4.21). En todos ellos se detectó en tráquea, cuya presencia variaba de leve (1 animal), moderada (6) a severa (8). Solo en 3 animales (12%) se detectó en pulmón, uno leve y dos moderada (Tabla 4.13).

Tabla 4.13. Resultados de W-S por animal.

Animal	Pulmón	Tráquea
01	-	+++
02	-	-
03	-	-
04	++	++
05	-	n.v.
06	-	n.v.
07	-	+++
08	+	+++
09	-	+++
10	-	+++
11	-	+++
12	++	++
13	-	++
14	-	++
15	-	n.v.
16	-	n.v.
17	-	++
18	-	+++
19	-	+
20	-	n.v.
21	-	+++
22	-	++
23	-	-
24	-	-
25	-	-

n.v.: no valorable. -: negativo. +: leve. ++: moderado. +++: severo

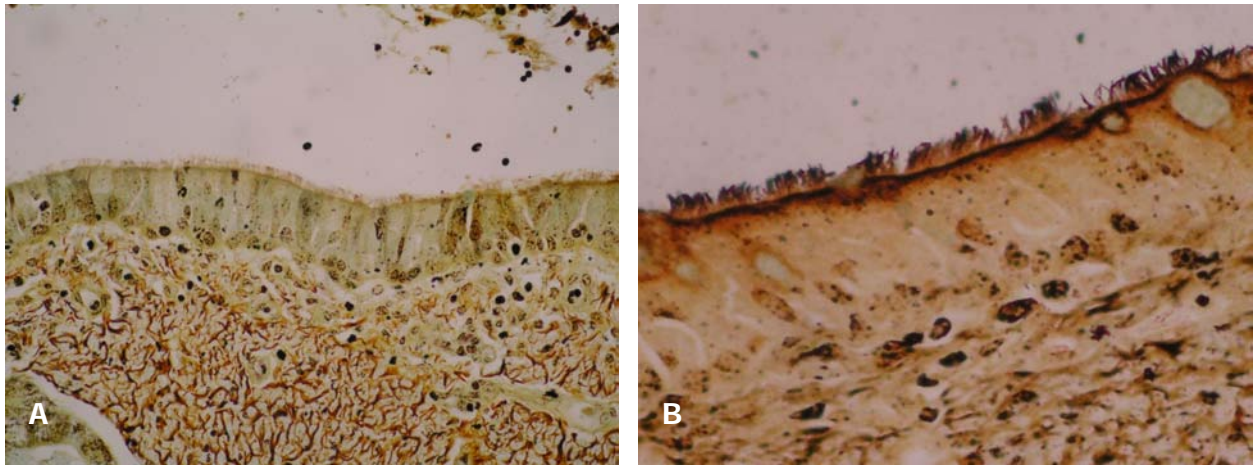


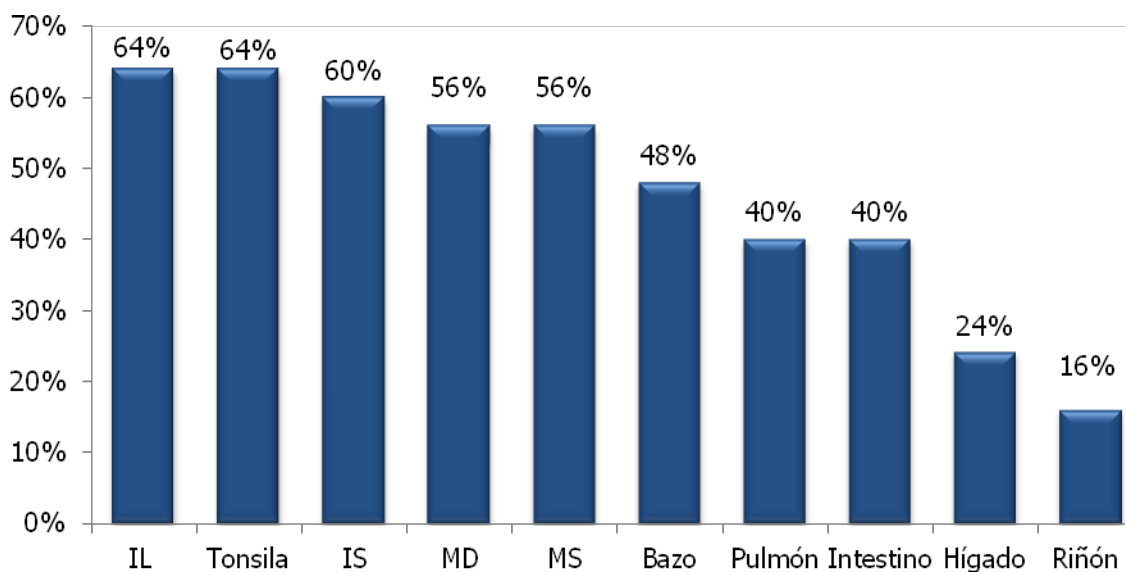
Fig. 4.21. A: Control negativo. B: Presencia de CAR-bacillus en la superficie del epitelio respiratorio de la tráquea. Estos se ven como estructuras bacilares de color negro. Caso 8. W-S. 40x.

4.4 Estudio Inmunohistoquímico

4.4.1 Detección Inmunohistoquímica de Antígenos de PCV2

Un total de 17 animales (68%) fueron positivos a la presencia de antígeno de PCV2 mediante la técnica de inmunohistoquímica. Todos ellos presentaron inmunorreacción en, al menos, un linfonodo, (6 animales marcaje leve, 3 moderado, 8 severo), 16 (64%) en tonsila (6 leve, 5 moderado, 5 severo), 12 (48%) en bazo (3 leve, 4 moderado, 5 severo), 10 (40%) en pulmón (3 leve, 4 moderado, 3 severo), también 10 (40%) en intestino (3 leve, 3 moderado, 4 severo), 6 (24%) en hígado (3 leve, 3 severo), y 4 (16%) en riñón (todos leve). En corazón y encéfalo no se detectó antígeno de PCV2 (Gráfica 4.12 y Tabla 4.14).

Gráfica 4.12. Porcentaje de tejidos positivos a PCV2 mediante IHQ.



IS: Inguinal Superficial. IL: Iliaco. MD: Mediastínico. MS: Mesentérico.

Tabla 4.14. Resultados de IHQ frente a PCV2 en linfonodos, tonsila, corazón, pulmón, hígado, bazo, riñón, intestino y encéfalo.

Animal	Linfonodo*	Tonsila	Corazón	Pulmón	Hígado	Bazo	Riñón	Intestino	SNC
01	-	-	-	-	-	-	-	-	-
02	-	-	-	-	-	-	-	-	-
03	+	+	-	-	-	+	-	-	-
04	+++	+++	-	+++	+++	+++	-	-	-
05	+++	+++	-	++	+	+++	-	+++	-
06	+	+	-	+	-	-	-	-	-
07	+++	++	-	++	-	+++	-	+	-
08	+++	++	-	++	-	++	-	++	-
09	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10	++	+	-	+	+	+	-	-	-
11	+	+	-	-	-	-	-	+	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	+	+	-	-	-	-	+	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	+	++	-	-	-	++	-	-	-
16	+++	++	-	++	-	++	-	++	-
17	+++	+++	-	+	+	++	+	+++	-
18	+++	+++	-	+++	+++	+++	+	+++	-
19	+++	+++	-	+++	+++	+++	+	+++	-
20	++	+	-	-	-	-	-	+	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	++	++	-	-	-	+	-	++	-
Puntuación	36	31	0	20	12	26	4	21	0

-=negativo (0); +=leve (1); +=moderado (2); +++=severo (3) (Modificado de Rosell et al., 1999; Quintana et al., 2001; Opriessnig et al., 2004b).

*Media de los cuatro linfonodos estudiados

En cuanto a la presencia de PCV2 a nivel de linfonodos, este se detectó como una reacción granular de color rojo, principalmente en el citoplasma y, en menor medida, en el núcleo de células de morfología histiocítica y dendrítica y, en ocasiones, en células gigantes multinucleadas y células de naturaleza linfoide, habiendo también marcaje de cuerpos de inclusión. La distribución del antígeno fue principalmente difusa por el parénquima linfoide, seguida por la localización centrofolicular (Fig. 4.22).

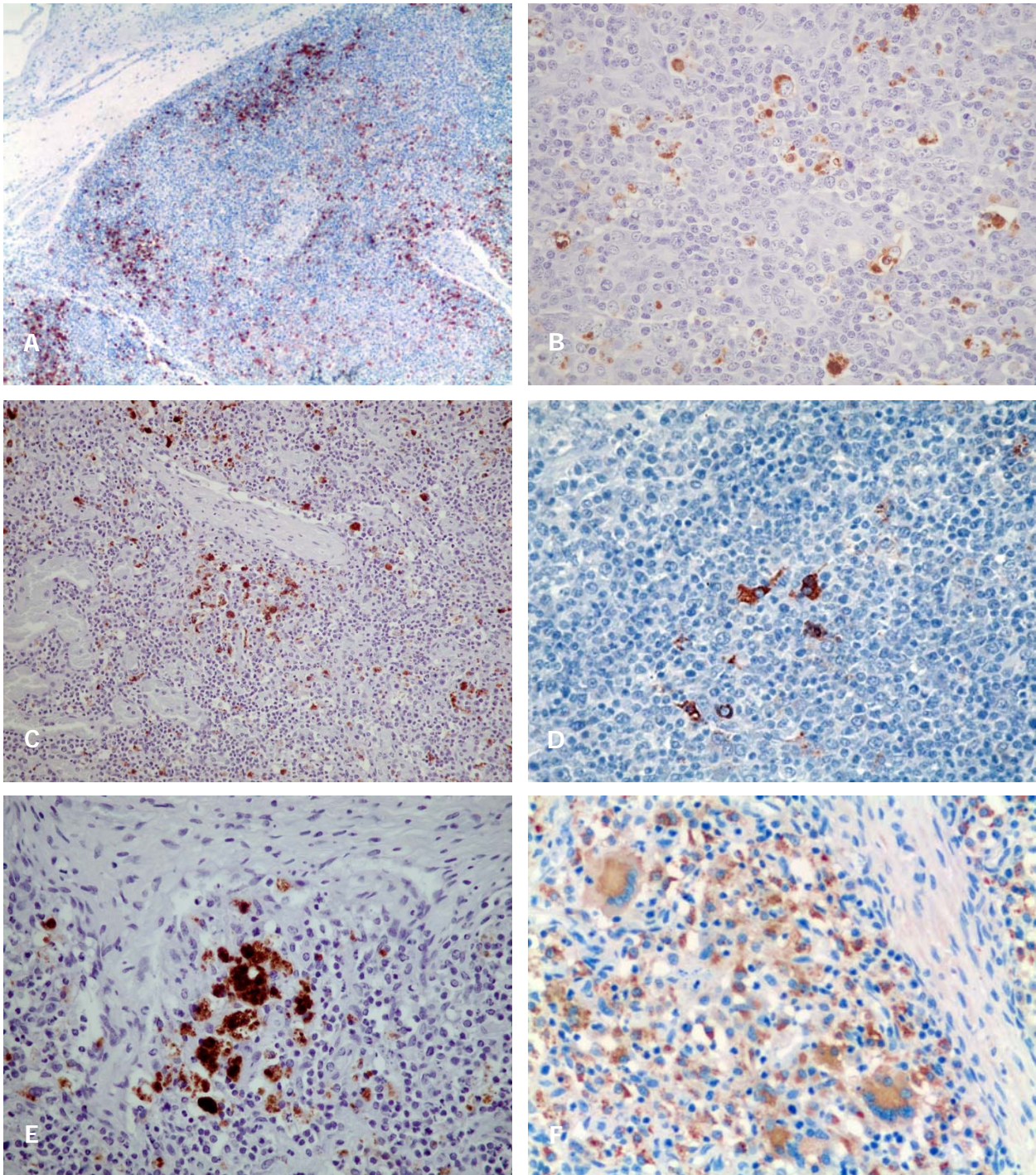


Fig. 4.22. Linfonodos. A: Inmunorreacción positiva frente a PCV2 el parénquima linfoide. Mesentérico. Caso 19. IHQ PCV2. 4x. B y C: Inmunorreacción positiva en citoplasma y núcleo de células histiocíticas y de algunos linfocitos. B. Inguinal superficial. Caso 7. IHQ PCV2. 40x. C. Iliaco. Caso 5. IHQ PCV2. 20x. D: Inmunorreacción positiva en citoplasma de células dendríticas. Mediastínico. Caso 25. IHQ PCV2. 40x. E: Inmunorreacción positiva en citoplasma de células histiocíticas y en cuerpos de inclusión. Inguinal superficial. Caso 5. IHQ PCV2. 40x. F. Inmunorreacción positiva en citoplasma de células gigantes multinucleadas. Inguinal superficial. Caso 17. IHQ PCV2. 40x

A nivel de tonsila, la presencia de antígeno de PCV2 se visualizó mayoritariamente en el citoplasma de células de morfología histiocítica y células gigantes multinucleadas, habiendo también marcaje de cuerpos de inclusión, y de forma ocasional en células de morfología histiocítica presentes en el epitelio de las criptas. La distribución fue principalmente difusa por el parénquima linfoide, así como centrofolicular (Fig. 4.23).

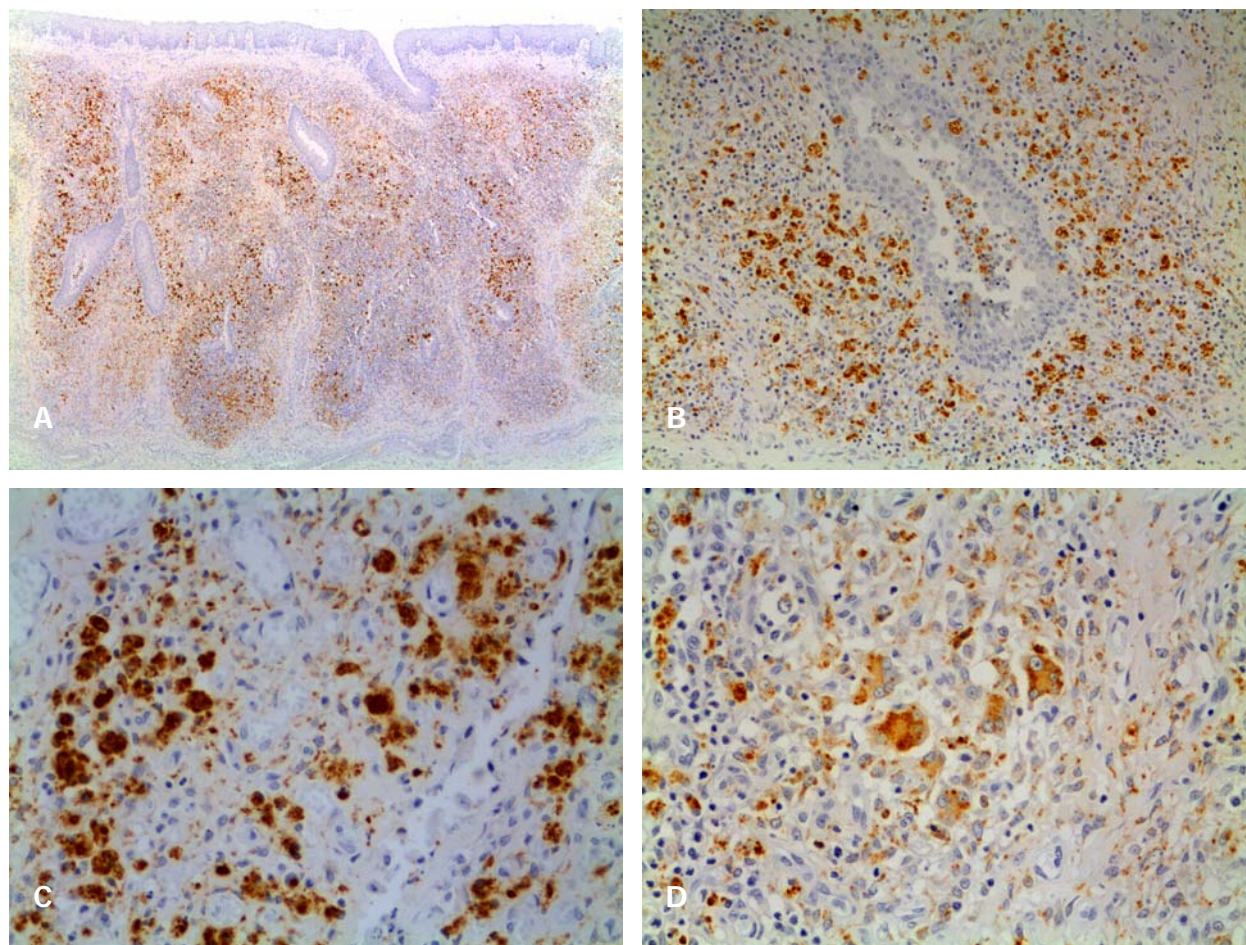


Fig. 4.23. Tonsila. A: Inmunorreacción positiva frente a PCV2 diseminada por el parénquima linfoide. Caso 19. IHQ PCV2. 4x. B: Inmunorreacción positiva en torno a una cripta, en células presentes en el epitelio y en el exudado en la luz de la cripta. Caso 19. IHQ PCV2. 20x. C: Inmunorreacción positiva en el citoplasma y núcleo de células histiocíticas y cuerpos de inclusión. Caso 18. IHQ PCV2. 40x. D: Inmunorreacción positiva en células gigantes multinucleadas. Caso 19. IHQ PCV2. 40x.

A nivel de bazo, el antígeno de PCV2 se detectó principalmente en el citoplasma de células de morfología histiocítica, tanto a nivel de nódulos linfáticos como de vainas linfoides periarteriales, así como de forma ocasional en células histiocíticas presentes en el interior de vasos sanguíneos y en senos peritrabeculares (Fig. 4.24).

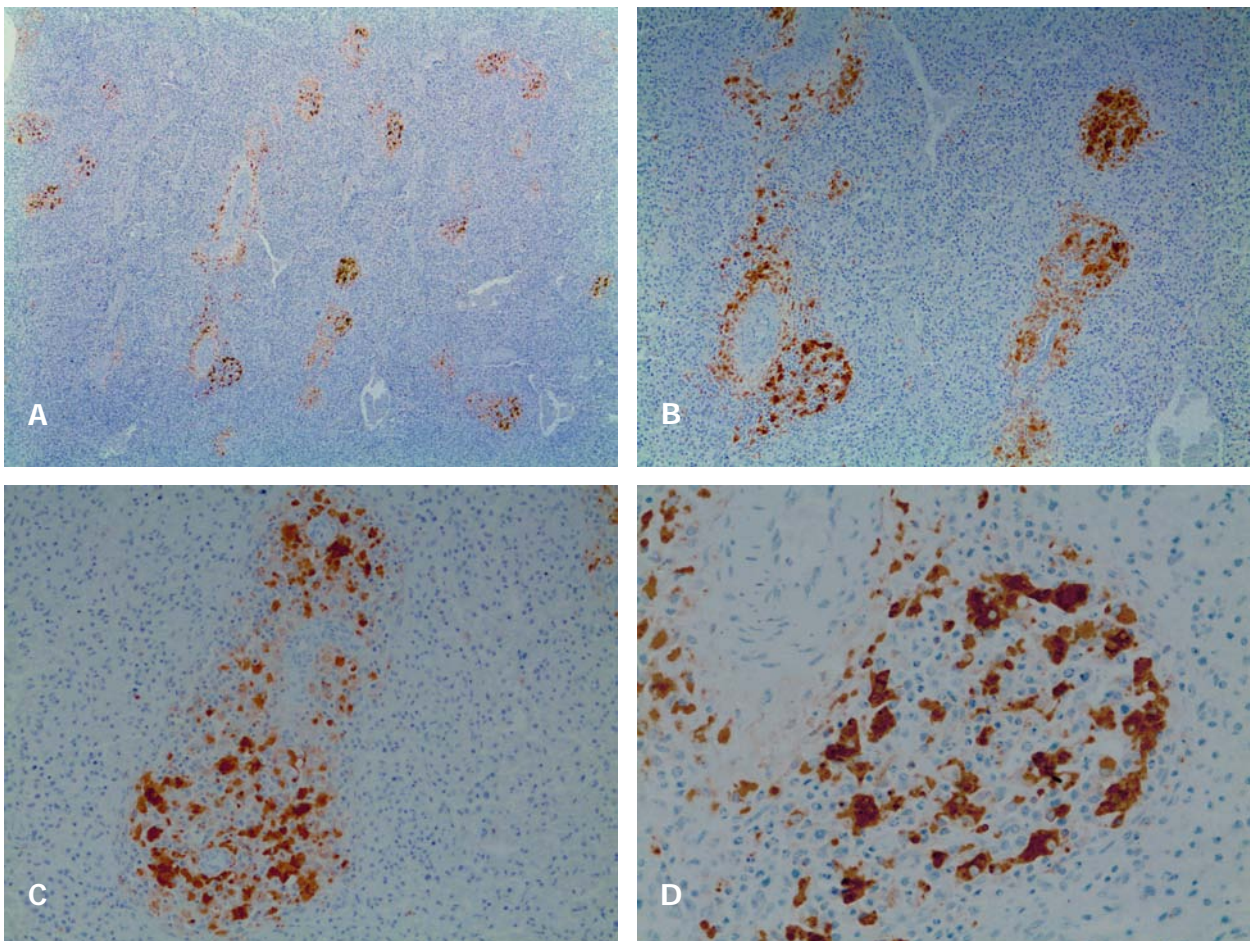


Fig. 4.24. Bazo. A, B, C y D: Inmunorreacción positiva frente a PCV2 en el citoplasma de células de morfología histiocítica y algunas células linfoides, en nódulos linfáticos y vainas linfoides periarteriales. Caso 5. IHQ PCV2. 4x, 10x, 20x, 40x.

En el pulmón, el antígeno de PCV2 se observó en el citoplasma, y ocasionalmente en el núcleo de células de morfología histiocítica presentes en las paredes alveolares, en torno a bronquios y bronquiolos, en el BALT, así como en la luz de algunos bronquiolos y alvéolos. También hubo marcaje de células epiteliales bronquiales y bronquiolares, células de morfología linfoide y de células gigantes multinucleadas. (Fig. 4.25).

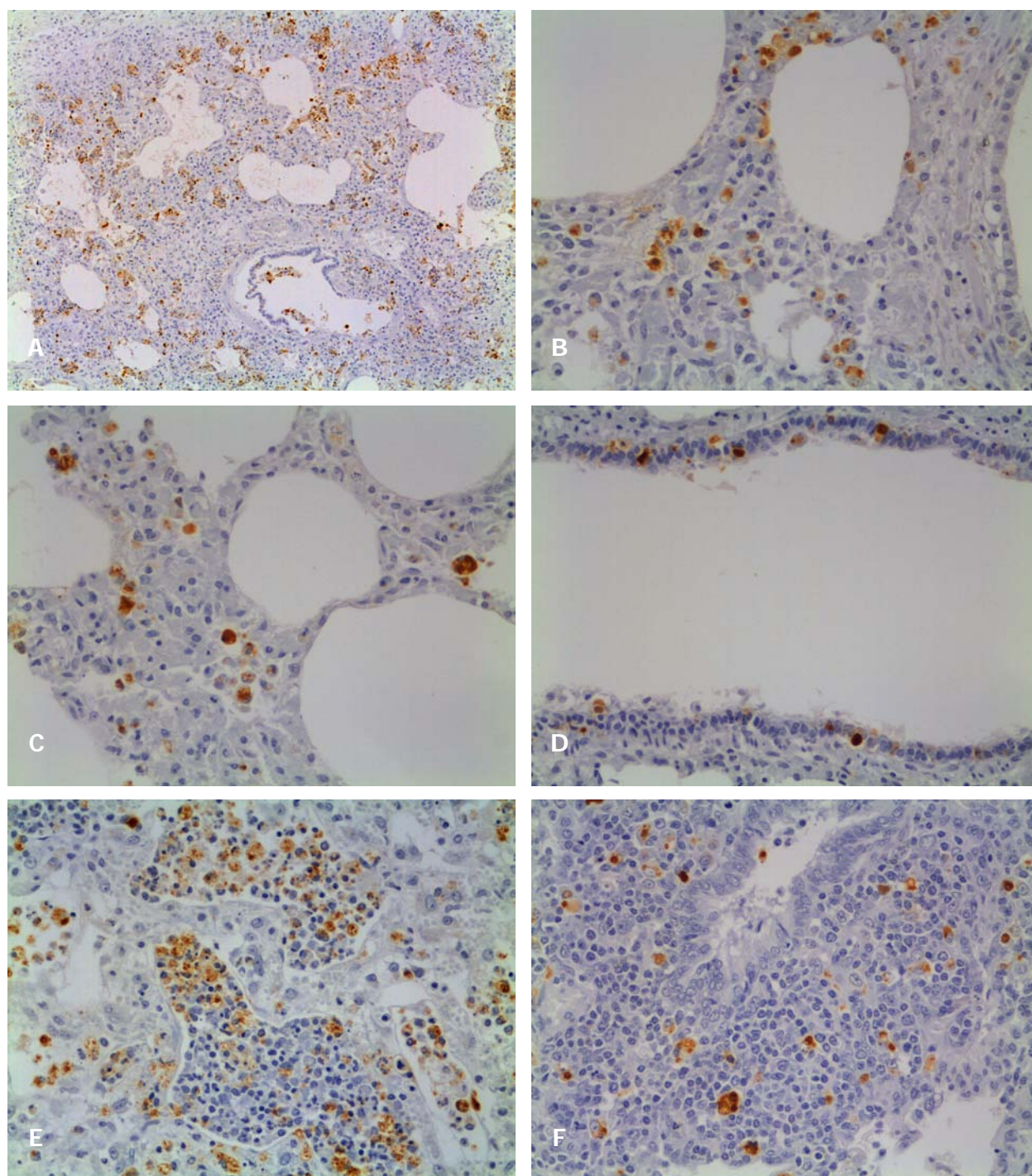


Fig. 4.25. Pulmón. A: Inmunorreacción positiva frente a PCV2 en citoplasma y núcleo de células de morfología histiocítica en las paredes alveolares, y en el exudado de la luz de alveolos y bronquiolos. Caso 18. IHQ PCV2. 10x. B y C: Inmunorreacción positiva en citoplasma y núcleo de células de morfología histiocítica presentes en las paredes alveolares. Caso 4. IHQ PCV2. 40x. D: Inmunorreacción positiva en células epiteliales bronquiolares. Caso 4. IHQ PCV2. 40x. E: Inmunorreacción positiva en células de morfología histiocítica presentes en el exudado en la luz de alveolos. Caso 18. IHQ PCV2. 40x. F: Inmunorreacción positiva en células de morfología histiocítica y escasos linfocitos en el BALT. Caso 8. IHQ PCV2. 40x.

A nivel de hígado, el marcaje frente al antígeno de PCV2 se observó a nivel citoplasmático en células de morfología histiocítica y fusiforme, distribuidas en los sinusoides hepáticos (células de Kupffer) y en células de morfología histiocítica presentes a nivel de los espacios portales y en el infiltrado inflamatorio en los lobulillos hepáticos, y en ocasiones, en el interior de vasos sanguíneos. También se observó en hepatocitos, tanto en citoplasma como en núcleo (Fig. 4.26).

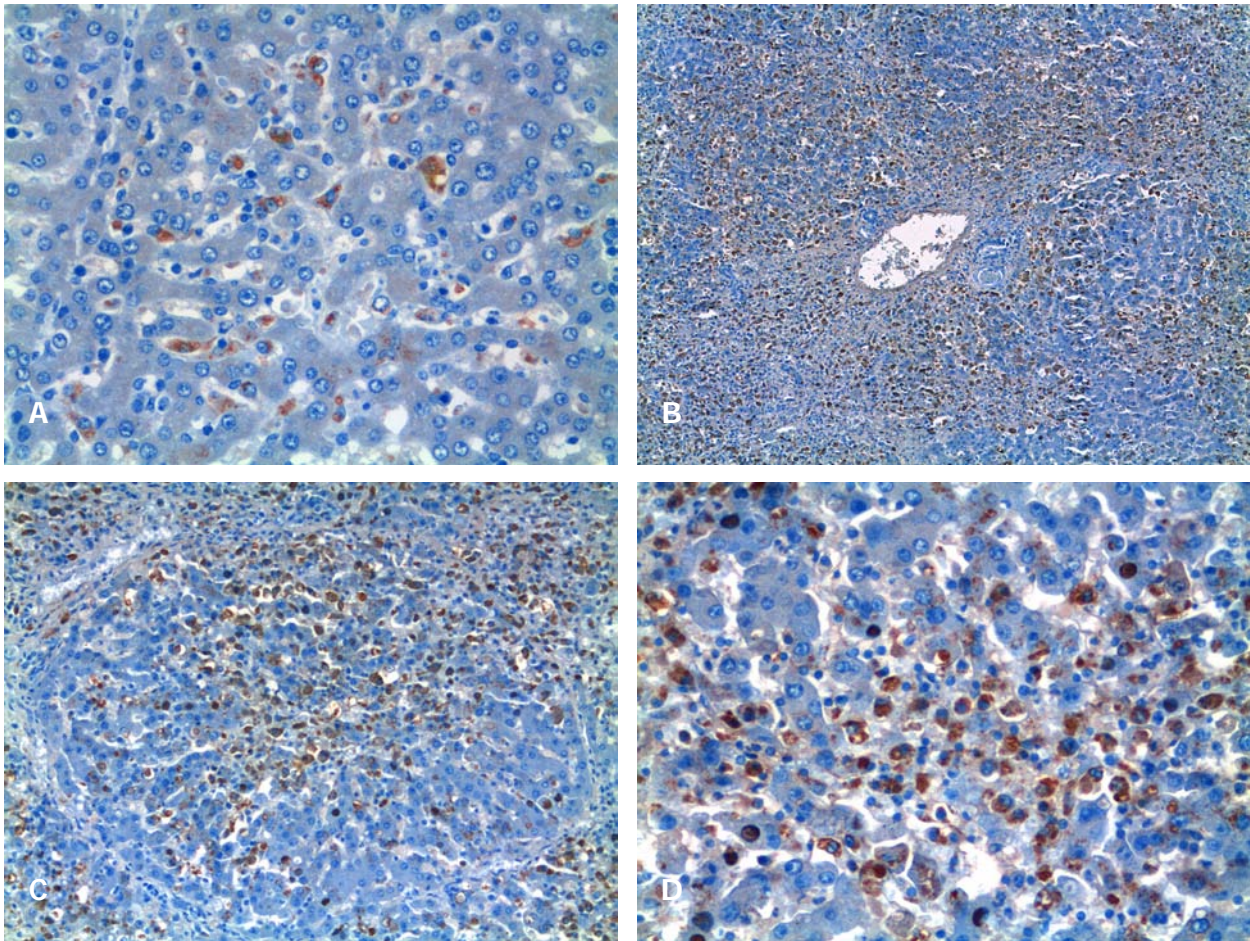


Fig. 4.26. Hígado. A: Inmunorreacción positiva frente a PCV2 en el citoplasma de células de morfología histiocítica y fusiformes (células de Kupffer) en los sinusoides hepáticos. Caso 19. IHQ PCV2. 40x. B y C: Inmunorreacción positiva en el infiltrado inflamatorio constituido por células de morfología histiocítica y células linfoplasmocitarias. Caso 4. IHQ PCV2. 20x y 40x. D: Inmunorreacción positiva en el infiltrado inflamatorio constituido por células de morfología histiocítica y células linfoplasmocitarias, así como en hepatocitos, tanto en el citoplasma como en el núcleo. Caso 4. IHQ PCV2. 40x.

En el riñón, el antígeno de PCV2 se visualizó en células de morfología histiocítica presentes en el infiltrado inflamatorio así como en escasas células epiteliales tubulares (Fig. 4.27).

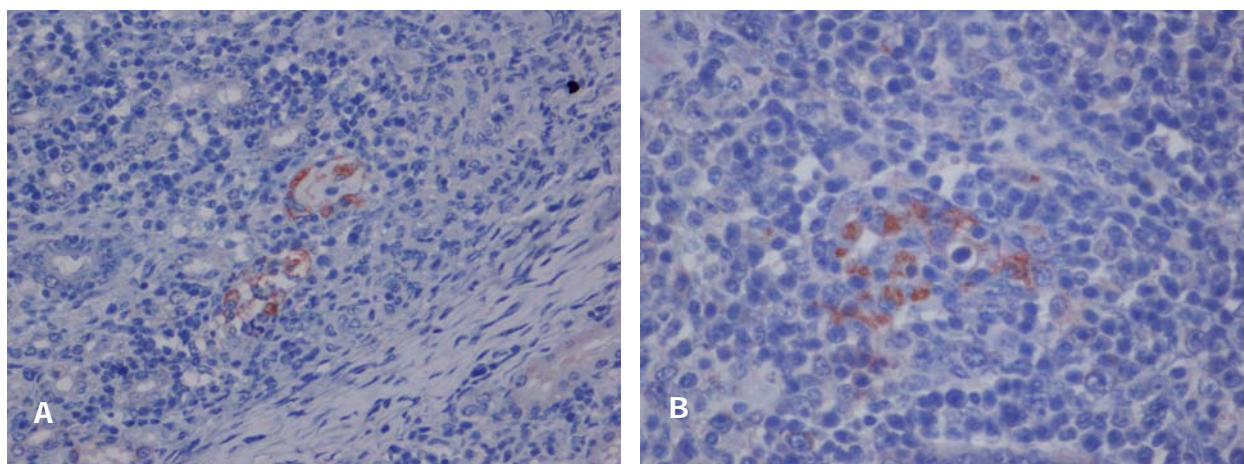


Fig. 4.27. Riñón. Inmunorreacción positiva frente a PCV2 en el citoplasma de células epiteliales tubulares (A) y en células de morfología histiocítica (A y B). A: Caso 17. IHQ PCV2. 40x .B: Caso 2. IHQ PCV2. 60x

A nivel intestinal (delgado y grueso), el antígeno de PCV2 se detectó en un 40% de los casos y se observó principalmente en el citoplasma de células histiocíticas presentes en el tejido linfóide asociado (40%) y en la lámina propia (24%). También hubo marcaje de manera ocasional en células gigantes multinucleadas y cuerpos de inclusión (Fig. 4.28).

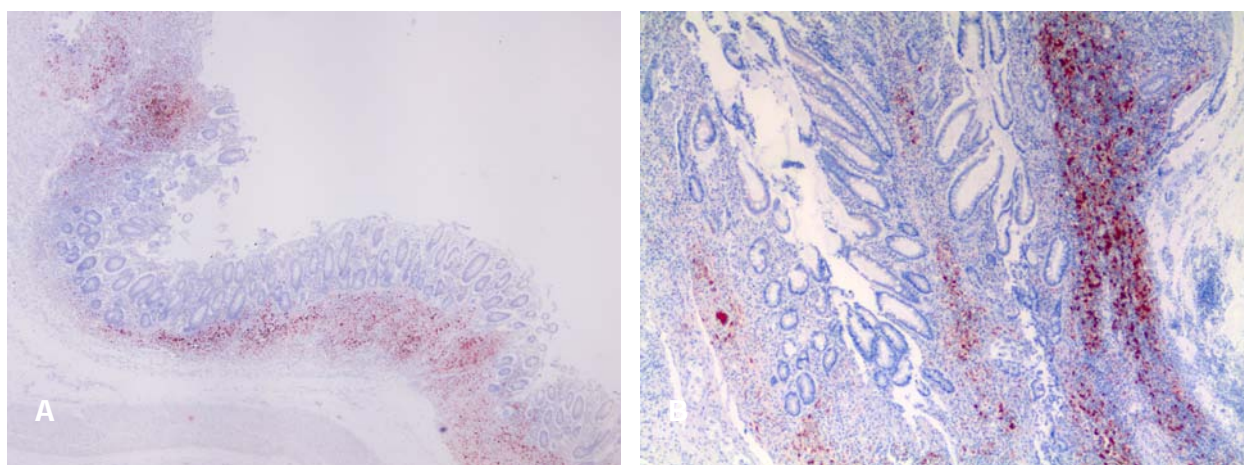


Fig. 4.28. Intestino. A y B: Inmunorreacción positiva frente a PCV2 en el citoplasma de células de morfología histiocítica en el tejido linfóide asociado. A: Caso 19, válvula ileocecal. IHQ PCV2. 4x. B: Caso 17, colon. IHQ PCV2. 4x.

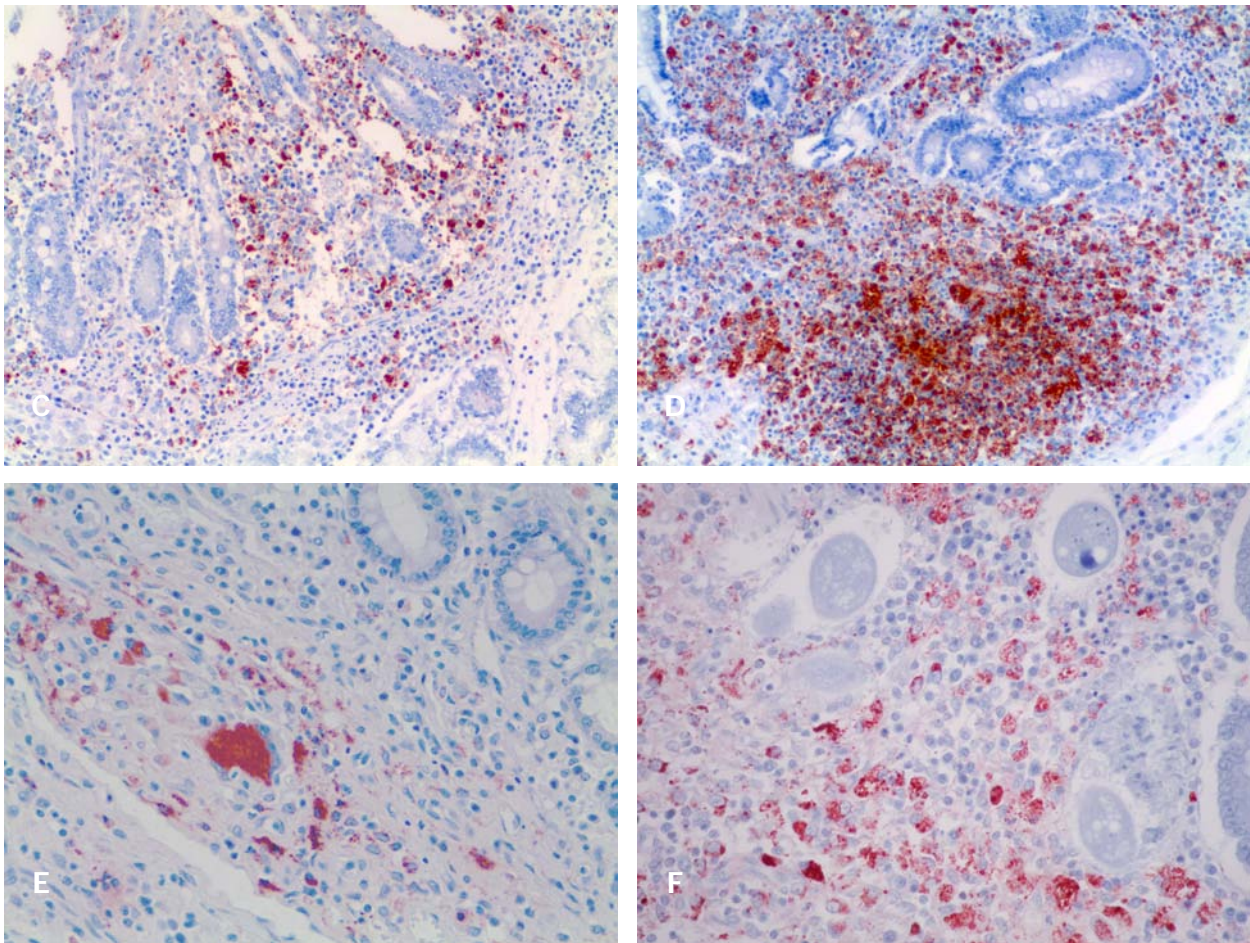


Fig. 4.28 continuación. Intestino. C: Inmunorreacción positiva en el citoplasma de células de morfología histiocítica y linfoplasmocitaria en la lámina propia. Caso 19, duodeno. IHQ PCV2. 10x. D: Inmunorreacción positiva en el citoplasma de células de morfología histiocítica y linfoplasmocitaria presentes en la lámina propia y en el tejido linfoide asociado. Caso 19, válvula ileocecal. IHQ PCV2. 10x. E: Inmunorreacción positiva frente a PCV2 en el citoplasma de una célula gigante multinucleada y en células de morfología histiocítica. Caso 17, colon. IHQ PCV2. 40x. F: Inmunorreacción positiva en el citoplasma de células de morfología histiocítica y linfoplasmocitaria infiltrando la lámina propia con presencia de *Balantidium spp.* Caso 19, válvula ileocecal. IHQ PCV2. 40x.

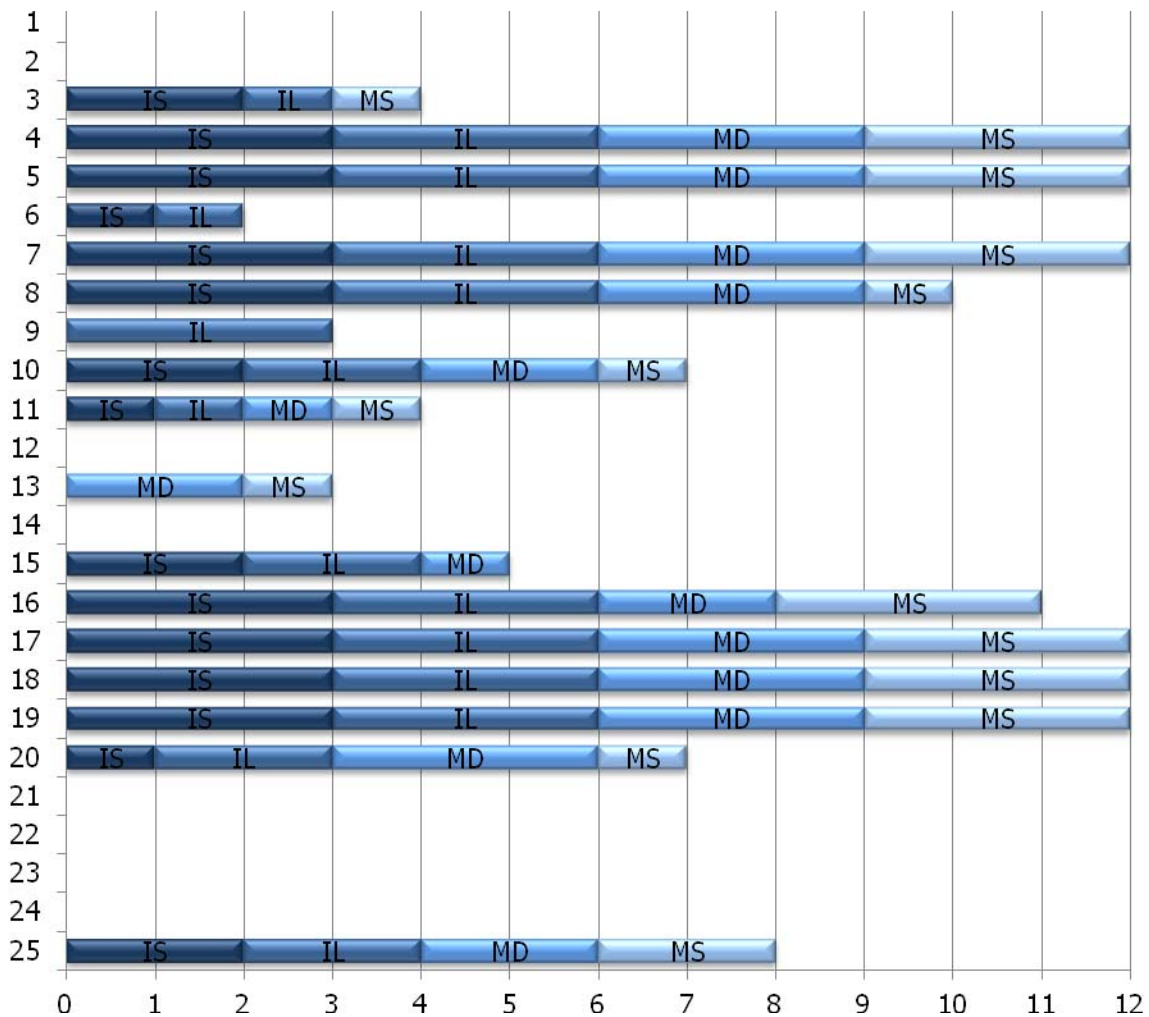
En cuanto a los resultados específicos por linfonodo, 15/25 (60%) animales fueron positivos en inguinal superficial, (3 leve, 4 moderado, 8 severo), 16/25 (64%) en iliaco, (3 leve, 4 moderado, 9 severo), 14/25 (56%) en mediastínico, (2 leve, 4 moderado, 8 severo), y 14/25 (56%) en mesentérico, (6 leve, 1 moderado, 7 severo) (Tabla 4.15 y Gráfica 4.13).

Tabla 4.15. Resultados de IHQ frente a PCV2 en linfonodos.

Animal	Inguinal Superficial	Iliaco	Mediastínico	Mesentérico
01	-	-	-	-
02	-	-	-	-
03	++	+	-	+
04	+++	+++	+++	+++
05	+++	+++	+++	+++
06	+	+	-	-
07	+++	+++	+++	+++
08	+++	+++	+++	+
09	-	+++	-	-
10	++	++	++	+
11	+	+	+	+
12	-	-	-	-
13	-	-	++	+
14	-	-	-	-
15	++	++	+	-
16	+++	+++	++	+++
17	+++	+++	+++	+++
18	+++	+++	+++	+++
19	+++	+++	+++	+++
20	+	++	+++	+
21	-	-	-	-
22	-	-	-	-
23	-	-	-	-
24	-	-	-	-
25	++	++	++	++
Puntuación	35	38	34	29

-=0 (negativo); +=1 (leve); +=2 (moderado); +++=3 (severo). (Modificado de Rosell et al., 1999; Quintana et al., 2001; Opriessnig et al., 2004b).

Gráfica 4.13. Cantidad de antígeno de PCV2 por animal y linfonodo.



IS: Inguinal Superficial. IL: Iliaco. MD: Mediastínico. MS: Mesentérico.
 0= negativo; 1= leve; 2= moderado; 3= severo.

El linfonodo donde el PCV2 se detectó con mayor frecuencia fue el iliaco (64%) seguido del inguinal superficial (60%) y del mediastínico y mesentérico, estos dos últimos en igual porcentaje (56%).

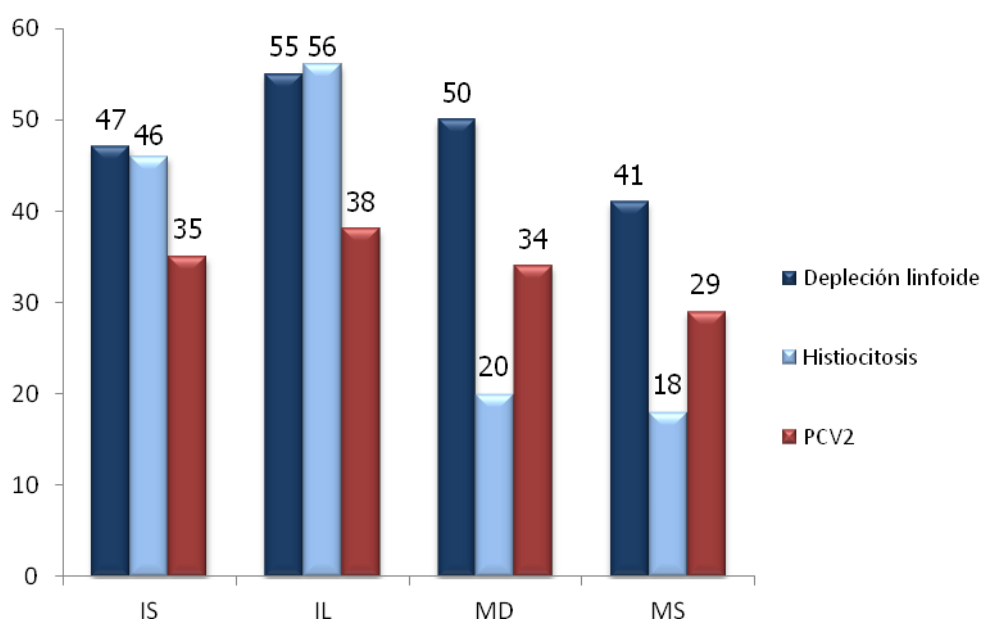
Si tenemos en cuenta todos los tejidos estudiados la relación quedaría: iliaco y tonsila (ambos con un 64%), inguinal superficial (60%), mediastínico y mesentérico (ambos con un 56%), bazo (48%), pulmón (40%), aparato digestivo (32%), hígado (24%), y riñón (16%) (Gráfica 4.12).

Según la cantidad de antígeno de PCV2 presente en los linfonodos, el iliaco fue en el que mayor cantidad se detectó (38/75), seguido del inguinal superficial (35/75), mediastínico (34/75) y mesentérico (29/75) (Gráfica 4.14).

Si tenemos en cuenta los tejidos linfoides estudiados, la relación quedaría: iliaco (38/75), inguinal superficial (35/75), mediastínico (34/75), tonsila (31/75), y mesentérico (29/75) y bazo (26/75).

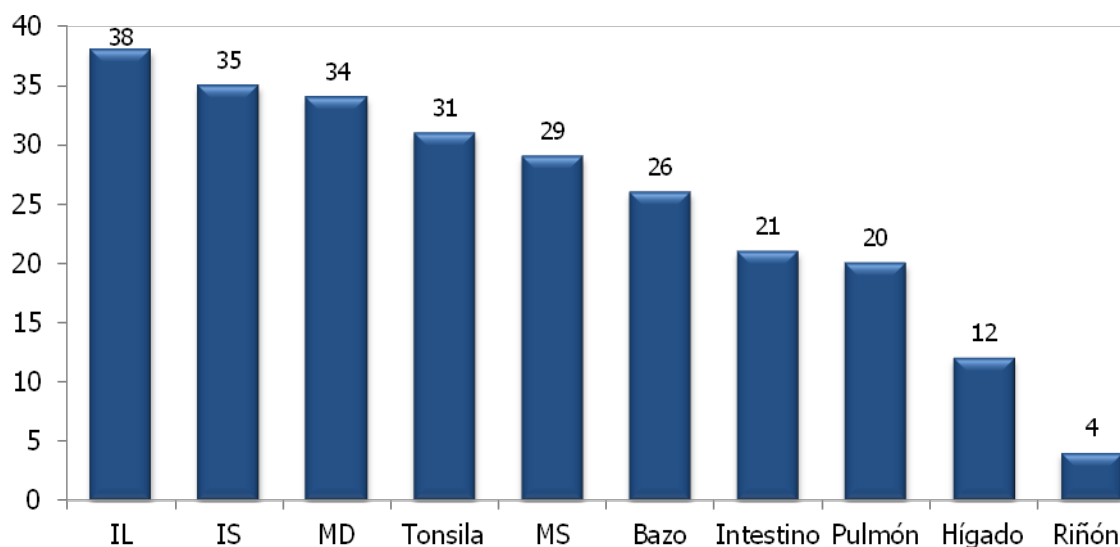
Si a esto le sumamos todos los tejidos estudiados, la relación quedaría: iliaco (38/75), inguinal superficial (35/75), mediastínico (34/75), tonsila (31/75), mesentérico (29/75), bazo (26/75), digestivo (21/75), pulmón (20/75), hígado (12/75) y riñón (4/75) (Gráfica 4.15).

Gráfica 4.14. Puntuación del grado de depleción linfoide, histiocitosis y cantidad de antígeno de PCV2 por linfonodo.



IS: Inguinal Superficial. IL: Iliaco. MD: Mediastínico. MS: Mesentérico.

Gráfica 4.15. Puntuación según la cantidad de antígeno de PCV2 en los diferentes tejidos.



IS: Inguinal Superficial. IL: Iliaco. MD: Mediastínico. MS: Mesentérico.

4.4.2 Detección Inmunohistoquímica de Antígenos de PRRSV

Un total de 14 animales (56%) fueron positivos a la presencia de antígeno de PRRSV mediante la técnica de inmunohistoquímica. Los 14 animales presentaron inmunorreacción en pulmón (4 animales reacción leve, 5 moderada, y 5 severa), 5 en tonsila (4 leve y solo uno moderada), 2 en linfonodos mediastínicos (ambos leve), y 2 en hígado (ambos leve) (Tabla 4.16).

En el pulmón, la presencia de antígeno de PRRSV se detectó como una reacción granular de color rojo en el citoplasma de células de morfología histiocítica presentes en las paredes alveolares así como en el exudado en la luz de vías aéreas (Fig. 4.29. A, B, C y D). A nivel de tonsila, se visualizó en células de morfología histiocítica principalmente en torno a criptas, en nódulos linfoides y, en ocasiones, en células de morfología histiocítica presentes en el epitelio de las criptas (Fig. 4.29. E).

En linfonodos, se pudo ver en células de morfología histiocítica principalmente a nivel centrofolicular y en menor medida en zona perifolicular o paracortical (Fig. 4.29. F). A nivel de hígado, hubo marcaje mayoritariamente en células de morfología histiocítica, fusiforme, dispersas por los sinusoides hepáticos (células de Kupffer) y en algunas células de morfología histiocítica presentes a nivel de los espacios portales y en el infiltrado inflamatorio en los lobulillos hepáticos (Fig. 4.29. G y H).

Tabla 4.16. Resultados de IHQ frente a PRRSV.

Animal	Pulmón	Tonsila	MD	Corazón	Hígado	Bazo	Riñón	SNC
01	-	-	-	-	-	-	-	-
02	-	-	-	-	-	-	-	-
03	+++	-	-	-	-	-	-	-
04	-	-	-	-	-	-	-	-
05	+++	-	-	-	-	-	-	-
06	-	-	-	-	-	-	-	-
07	+++	+	-	-	-	-	-	-
08	++	+	-	-	-	-	-	-
09	++	-	-	-	-	-	-	-
10	+	-	-	-	-	-	-	-
11	+++	-	+	-	+	-	-	-
12	++	+	-	-	-	-	-	-
13	+	-	-	-	-	-	-	-
14	+	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-
16	++	-	-	-	-	-	-	-
17	++	-	-	-	-	-	-	-
18	+++	++	+	-	+	-	-	-
19	+	+	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-

MD: linfonodo Mediastínico. +: Leve, ++: Moderado, +++: Severo

Un total de 6 animales fueron positivos exclusivamente a PRRSV, mientras que solo 2 fueron positivos exclusivamente a PCV2, siendo más frecuente la coinfección PCV2-PRRSV (8 animales) (Gráfica 4.16).

Gráfica 4.16. Resultados de IHQ frente a PRRSV y PCV2 en pulmón.

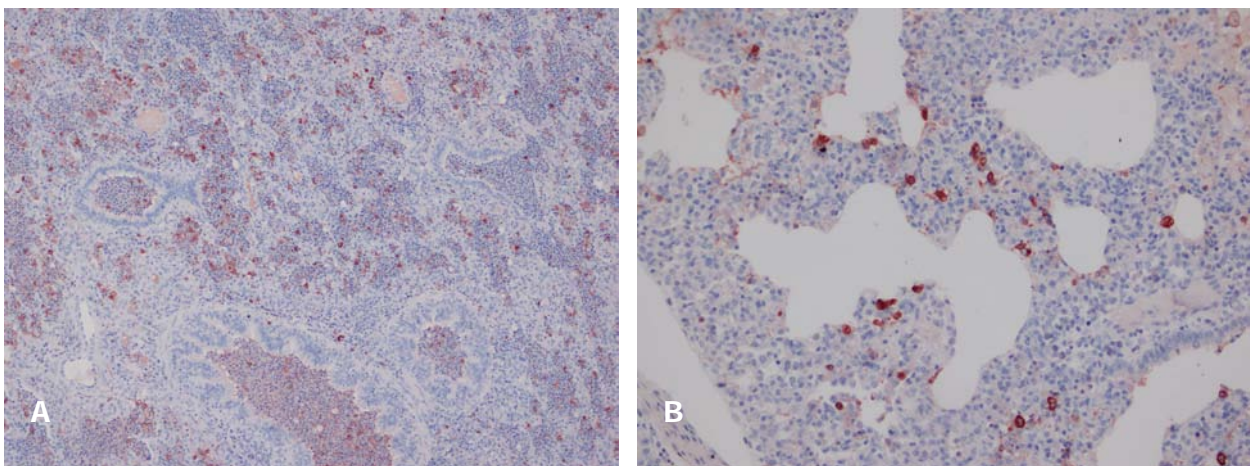
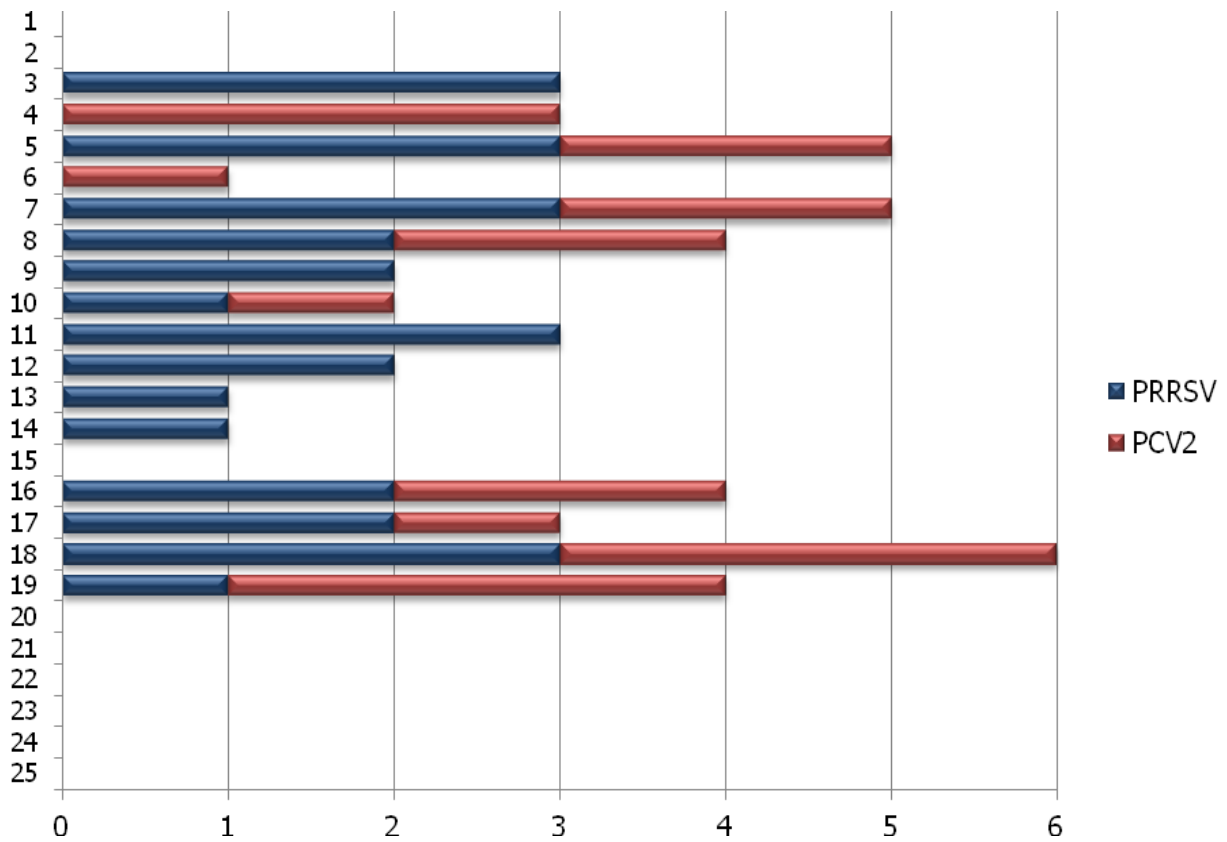


Fig. 4.29. Pulmón. A: Inmunorreacción positiva frente a antígeno de PRRSV en el citoplasma de células de morfología histiocítica presentes en las paredes alveolares así como en el exudado en la luz de vías aéreas. Caso 11. IHQ PRRSV. 10x. B: Inmunorreacción positiva en el citoplasma de células de morfología histiocítica presentes en las paredes alveolares. Caso 7. IHQ PRRSV. 20x.

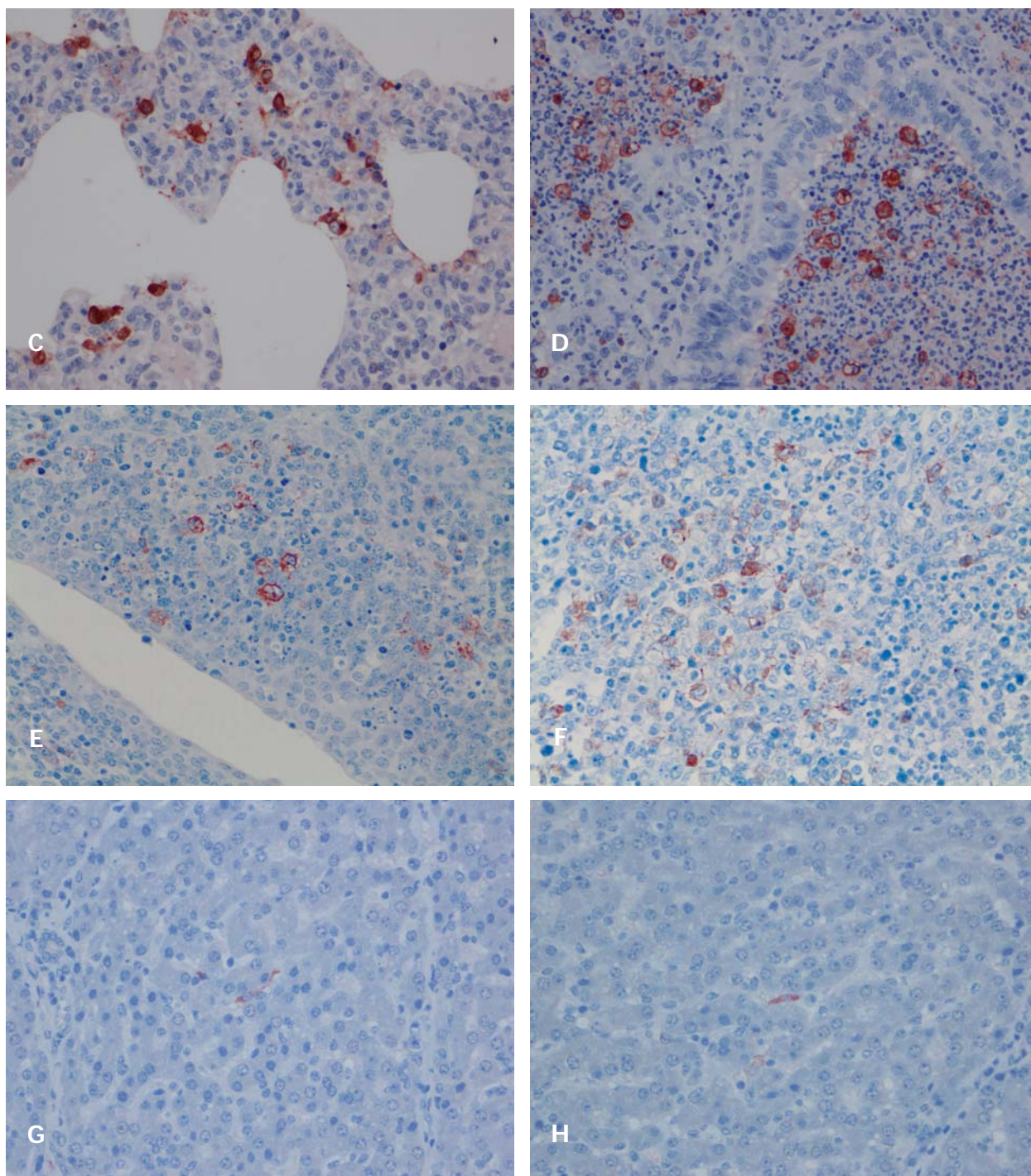


Fig. 4.29 continuación. C y D: Pulmón. Inmunorreacción positiva en citoplasma de células de morfología histiocítica en paredes alveolares (C) y en el exudado en la luz de vías aéreas (D). Caso 7 y 11. IHQ PRRSV. 40x. E: Tonsila. Inmunorreacción positiva en citoplasma de células de morfología histiocíticas en torno a criptas y en epitelio de las mismas. Caso 8. IHQ PRRSV. 40x. F: Linfonodo mediastínico. Inmunorreacción positiva en citoplasma de células de morfología histiocítica. Caso 11. IHQ PRRSV. 40x. G y H: Hígado. Inmunorreacción positiva en citoplasma de escasas células de morfología histiocítica fusiforme, dispersas por los sinusoides hepáticos. Caso 11. IHQ PRRSV. 40x.

4.4.3 Detección Inmunohistoquímica de Antígenos de ADV

En ninguno de los animales incluidos en el estudio se detectó la presencia de antígeno de ADV en SNC ni en pulmón mediante la técnica inmunohistoquímica.

4.4.4 Detección Inmunohistoquímica de Antígenos de Mh

Solo 3 animales (12%) fueron positivos a antígenos de Mh en pulmón mediante la técnica inmunohistoquímica, 2 con marcaje leve (caso 12 y 17) y 1 moderado (caso 7). Mh se detectó como una inmunorreacción granular de color rojo en el ápice de los cilios o entre ellos, del epitelio bronquial y bronquiolar (Fig. 4.30).

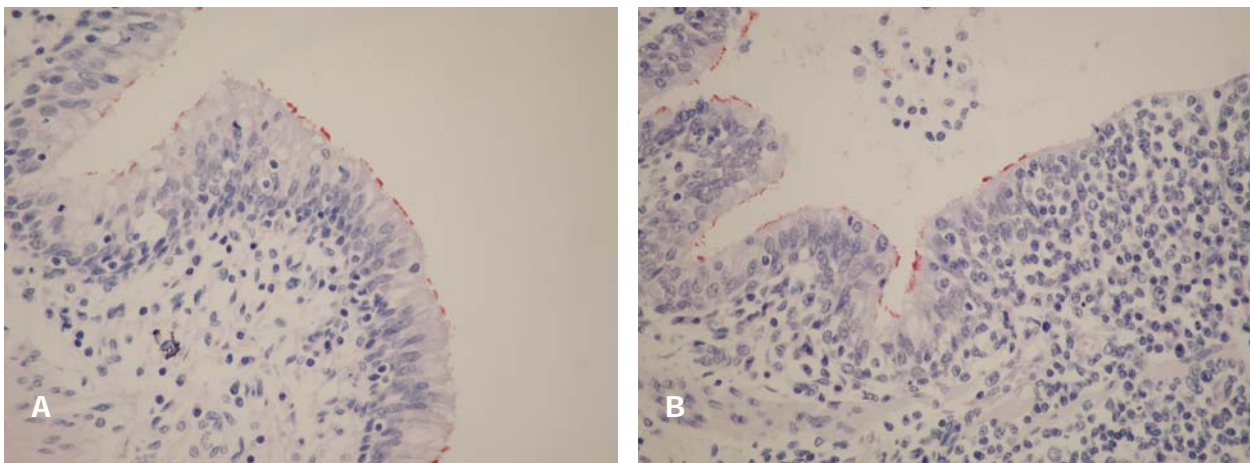


Fig. 4.30: Pulmón. Inmunoreacción positiva frente a Mh en la superficie del epitelio de un bronquiolo. Caso 7. IHQ Mh. 40x.

4.4.5 Detección Inmunohistoquímica de Antígenos de *Pasteurella spp.*

Un total de 15 animales (60%) fueron positivos en pulmón a antígenos de *Pasteurella spp.* mediante la técnica de inmunohistoquímica. De ellos, 7 presentaron inmunorreacción leve, otros 7 moderada, y solo uno severa (Tabla 4.17). La presencia de *Pasteurella spp.* se visualizó como una reacción de forma bacilar-granular de color rojo, tanto de forma extracelular como en el citoplasma de células de morfología histiocítica, en el exudado presente en bronquios, bronquiolos y alvéolos, en paredes alveolares así como en abscesos y focos de necrosis (Fig. 4.31).

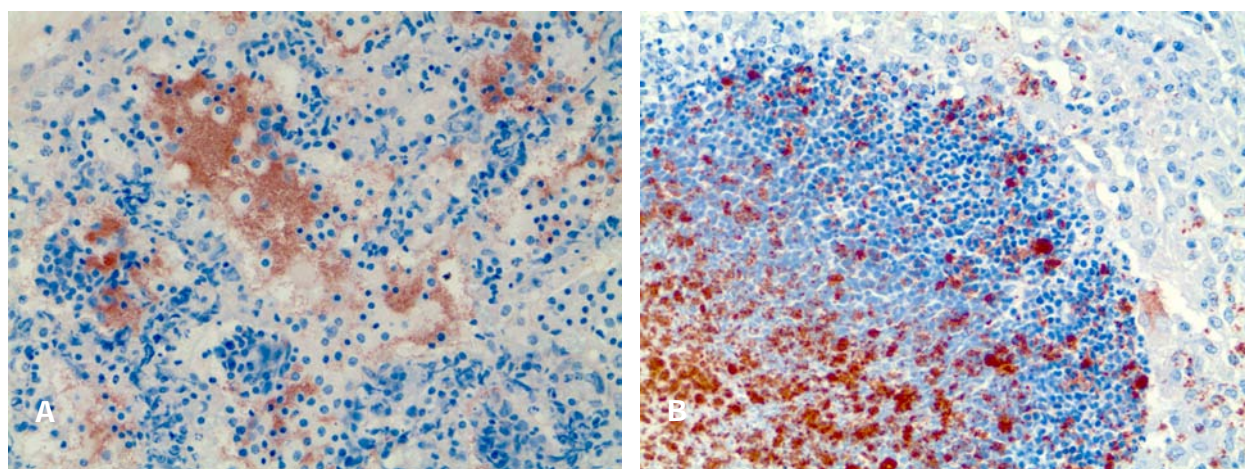


Fig. 4.31. Pulmón. A: Inmunorreacción positiva frente a antígenos de *Pasteurella spp.* de forma extracelular en el exudado en la luz de alveolos. Caso 20. IHQ *Pasteurella spp.* 40x. B: Inmunorreacción positiva frente a *Pasteurella spp.* de forma extracelular y en el citoplasma de células de morfología histiocítica en un foco de necrosis. Caso 14. IHQ *Pasteurella spp.* 40x.

4.4.6 Detección Inmunohistoquímica de Antígenos de *Mannheimia haemolytica*

Un total de 20 animales (80%) fueron positivos en pulmón a antígenos de *Mannheimia haemolytica* mediante la técnica de inmunohistoquímica. De ellos, 2 presentaron inmunorreacción leve, 6 moderada, y 12 severa (Tabla 4.17). La presencia de *Mannheimia haemolytica* se visualizó como una reacción de forma bacilar-granular de color rojo, tanto de forma extracelular como en el citoplasma de células de morfología histiocítica, en el exudado presente en bronquios, bronquiolos y alvéolos, en paredes alveolares así como en abscesos y focos de necrosis (Fig. 4.32).

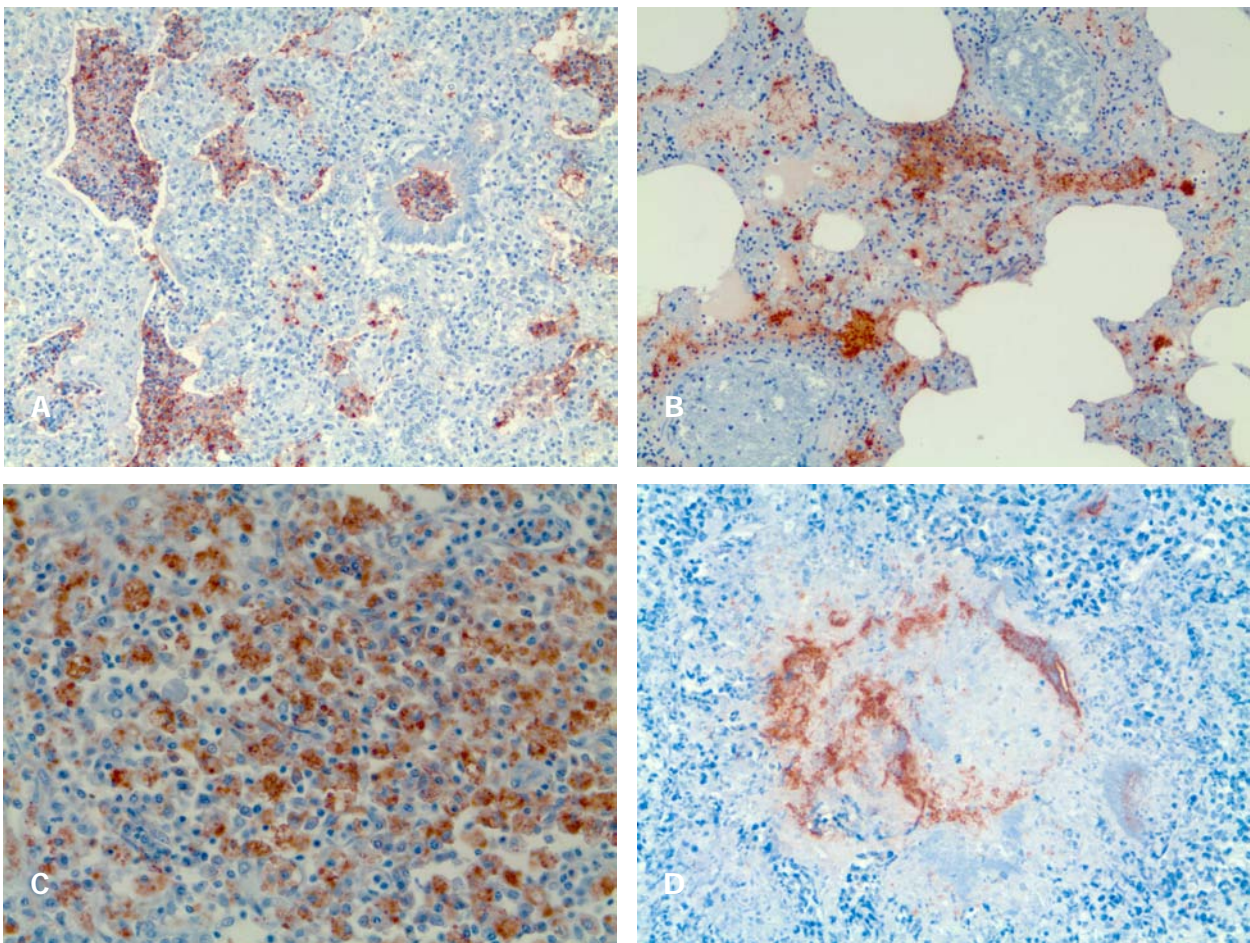


Fig. 4.32. Pulmón. A: Inmunorreacción positiva frente a antígenos de *Mannheimia haemolytica*, de forma extracelular y en el citoplasma de células de morfología histiocítica, en el exudado en la luz bronquiolos y alveolos. Caso 17. IHQ *Mannheimia haemolytica*. 20x. **B:** Inmunorreacción positiva extracelular y en el citoplasma de células de morfología histiocítica en paredes alveolares (**B**). Caso 20. IHQ *Mannheimia haemolytica*. 20x. **C:** Inmunorreacción positiva frente a *Mannheimia haemolytica* en el citoplasma de células de morfología histiocítica. Caso 21. IHQ *Mannheimia haemolytica*. 40x. **D:** Inmunorreacción positiva extracelular en un foco de necrosis. Caso 10. IHQ *Mannheimia haemolytica*. 40x.

4.4.7 Detección Inmunohistoquímica de Antígenos de *Pasteurella multocida*

Un total de 15 animales (60%) fueron positivos en pulmón a antígenos de *Pasteurella multocida* mediante la técnica de inmunohistoquímica. De ellos, 7 presentaron inmunorreacción leve, 4 moderada, y otros 4 severa (Tabla 4.17). La presencia de *Pasteurella multocida* se visualizó como una reacción de forma bacilar-granular de color rojo, tanto de forma extracelular como en el citoplasma de células histiocíticas, en el exudado presente en bronquios, bronquiolos y alvéolos, en paredes alveolares así como en abscesos y focos de necrosis (Fig. 4.33).

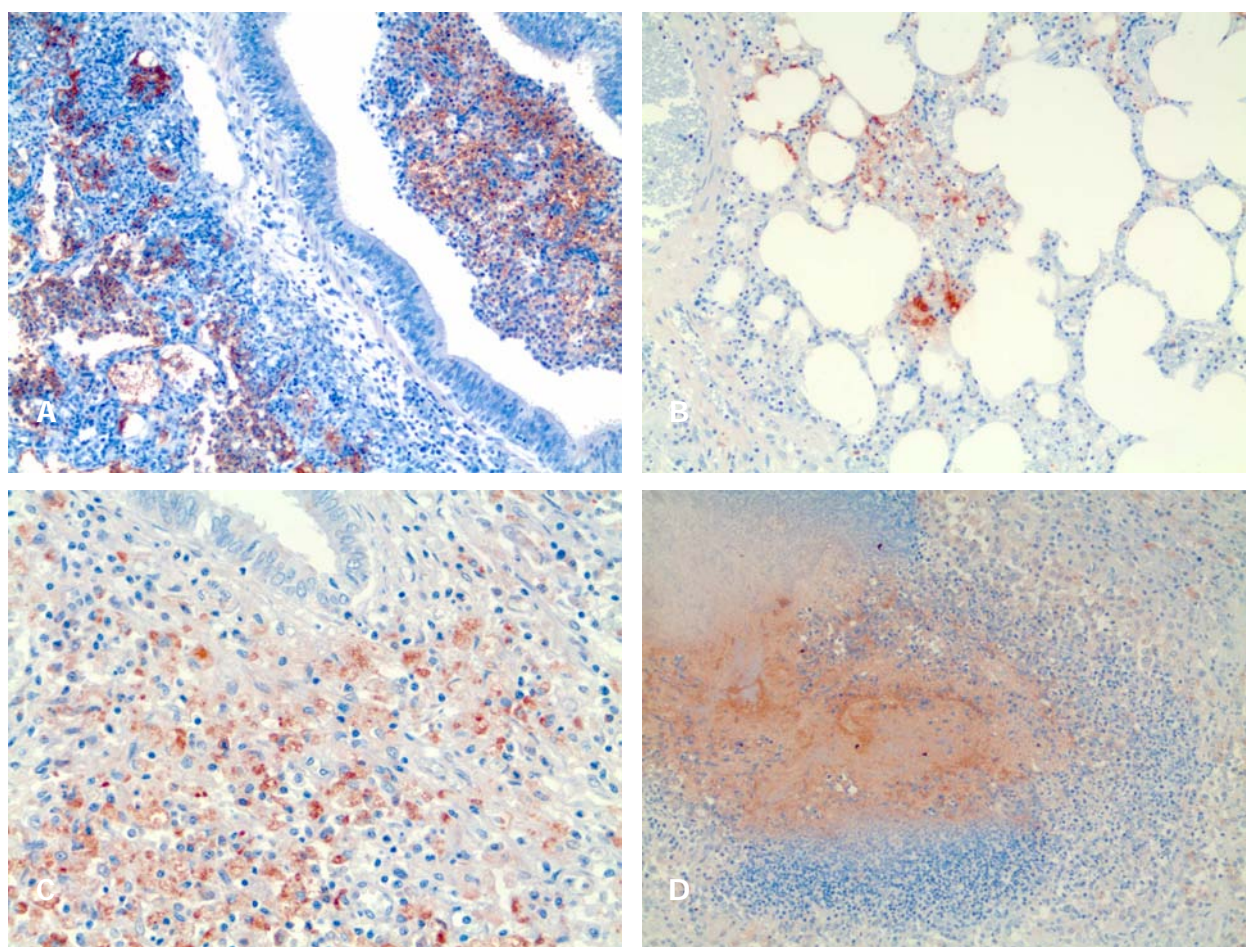


Fig. 4.33. Pulmón. A: Inmunorreacción positiva frente a *P. multocida*, extracelular y en el citoplasma de células de morfología histiocítica, en el exudado en la luz de bronquiolos y alveolos. Caso 11. IHQ *P. multocida*. 20x. **B:** Inmunorreacción positiva extracelular y en el citoplasma de células de morfología histiocítica en paredes alveolares. Caso 16. IHQ *P. multocida*. 20x. **C:** Inmunorreacción positiva en el citoplasma de células de morfología histiocítica (C). Caso 21. IHQ *P. multocida*. 40x. **D:** Inmunorreacción positiva extracelular en un foco de necrosis. Caso 14. IHQ *P. multocida*. 20x.

Tabla 4.17. Resultados de IHQ frente a familia *Pasteurellaceae*.

Animal	<i>Pasteurella</i> <i>spp.</i>	<i>Mannheimia</i> <i>haemolytica</i>	<i>P. multocida</i>
01	++	++	-
02	+	-	-
03	-	++	-
04	-	++	-
05	+	++	++
06	++	+++	+
07	-	+++	-
08	-	-	-
09	-	+++	-
10	++	++	+
11	+	+++	+++
12	-	-	-
13	+	-	++
14	++	+++	+
15	+	++	+
16	++	+++	++
17	-	+++	+
18	++	+++	+++
19	++	+++	+
20	+++	+++	+++
21	+	+++	+++
22	-	-	-
23	-	+	+
24	-	+	-
25	+	+++	++

+: Leve, ++: Moderado, +++: Severo

En cuanto a las coinfecciones por los géneros estudiados de la familia *Pasteurellaceae*, un total de 12 animales fueron positivos a *Pasteurella spp.*, *P. multocida*, y *Mannheimia haemolytica*. Un animal fue positivo a *Pasteurella spp.* y *Mannheimia haemolytica*, uno a *Pasteurella spp.* y *P. multocida*, 2 animales a *P. multocida* y *Mannheimia haemolytica*, uno, sólo a *Pasteurella spp.*, y 5, sólo a *Mannheimia haemolytica* (Tabla 4.18).

Tabla 4.18. Coinfecciones con familia *Pasteurellaceae*.

	N° Animales	Porcentaje
<i>Pasteurella</i> spp.	1	4%
<i>P. multocida</i>	0	0%
<i>Mannheimia haemolytica</i>	5	20%
<i>Pasteurella</i> spp. + <i>P. multocida</i>	1	4%
<i>Pasteurella</i> spp. + <i>M. haemolytica</i>	1	4%
<i>P. multocida</i> + <i>M. haemolytica</i>	2	8%
<i>Pasteurella</i> spp. + <i>P. multocida</i> + <i>M. haemolytica</i>	12	48%
Negativo	3	12%

4.5 Estudio Bacteriológico

El cultivo microbiológico se llevó a cabo en un total de 20 animales, y se realizó sobre diferentes tipos de muestras que incluyeron pulmón, tonsila, encéfalo, riñón, hígado, linfonodos y exudados (pericárdico y articular).

De dichos animales, 5 fueron negativos a cultivo, y en 2, se obtuvo un crecimiento no significativo. En el resto de animales (13) se aisló un total de 13 bacterias diferentes que incluyeron *Arcanobacterium pyogenes*, *Streptococcus suis* tipo II, *Streptococcus acidominimus*, *Streptococcus dysgalactiae equisimilis*, *Pasteurella* spp., *Pasteurella multocida*, *Pasteurella pneumotropica*, *Mannheimia haemolytica* (*Pasteurella haemolytica*), *Haemophilus parasuis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* hemolítico, *Escherichia vulneris*, y *Enterococcus faecalis*.

Los agentes bacterianos aislados en los diferentes animales y tejidos se representan en las tablas 4.19 y 4.20:

Tabla 4.19. Bacterias aisladas por tejido.

Animal	1	3	10	11	12	13	19	20	21	22	23	24	25
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	Pulmón	Líquido pericárdico				Pulmón							
<i>Streptococcus suis</i> tipo II		Pulmón	Pulmón	Tonsila	Tonsila	Pulmón		Pulmón	Pulmón	Pulmón	Linfonodo MD, Pulmón, Hígado, Riñón, Encéfalo		
<i>Streptococcus acidominimus</i>													Tonsila
<i>Streptococcus dysgalactiae equisimilis</i>										Tonsila			
<i>Pasteurella spp.</i>				Pulmón			Pulmón	Pulmón			Tonsila		
<i>Pasteurella multocida</i>										Pulmón			
<i>Pasteurella pneumotropica</i>													Pulmón
<i>Mannheimia haemolytica</i>								Pulmón					
<i>Haemophilus parasuis</i>				Tonsila		Pulmón							Encéfalo
<i>Escherichia coli</i>											Pulmón, Tonsila		
<i>Escherichia coli</i> hemolítico											Encéfalo		
<i>Escherichia vulneris</i>											Pulmón, Tonsila		
<i>Enterococcus faecalis</i>											Encéfalo		

De todas las bacterias, la más frecuentemente aislada fue *Streptococcus suis* tipo II (45%, 9 animales), seguida por *Pasteurella spp.* (20%, 4 animales), y por *Arcanobacterium pyogenes* y *Haemophilus parasuis* (ambas con 15%, 3 animales).

Tabla 4.20. Bacterias aisladas en los diferentes animales.

Animal	1	3	10	11	12	13	19	20	21	22	23	24	25
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	+	+				+							
<i>Streptococcus suis</i> tipo II		+	+	+	+	+		+	+	+	+		
<i>Streptococcus acidominimus</i>													+
<i>Streptococcus dysgalactiae equisimilis</i>									+				
<i>Pasteurella spp.</i>				+			+	+		+			
<i>Pasteurella multocida</i>									+				
<i>Pasteurella pneumotropica</i>													+
<i>Mannheimia haemolytica</i>								+					
<i>Haemophilus parasuis</i>				+		+						+	
<i>Escherichia coli</i>										+			
<i>Escherichia coli</i> hemolítico										+			
<i>Escherichia vulneris</i>										+			
<i>Enterococcus faecalis</i>										+			

Animales 2, 7, 8, 9, 14, 17 y 18: no crecimiento o crecimiento no significativo.

Animales 4, 5, 6, 15 y 16: cultivo no realizado

Teniendo en cuenta solo el pulmón (20 animales), la bacteria más frecuentemente aislada fue *Streptococcus suis* tipo II (35%, 7 animales), seguida de *Pasteurella* spp. (15%, 3 animales), y de *Arcanobacterium pyogenes* (10%, 2 animales) (Tabla 4.21).

Tabla 4.21. Número total y porcentaje de aislamientos en pulmón.

	Nº total	%
<i>Streptococcus suis</i> tipo II	7	35
<i>Pasteurella</i> spp.	3	15
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	2	10
<i>Mannheimia haemolytica</i>	1	5
<i>Pasteurella multocida</i>	1	5
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	1	5
<i>Haemophilus parasuis</i>	1	5
<i>E. coli</i>	1	5
<i>Escherichia vulneris</i>	1	5

Si comparamos la detección inmunohistoquímica de especies de la familia *Pasteurellaceae* (*Pasteurella* spp., *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica*), con el cultivo microbiológico, hubo coincidencia entre las dos técnicas en 5 casos. En 7 casos en los que se detectó alguna especie mediante inmunohistoquímica, el cultivo fue negativo o no significativo (Tabla 4.22).

Tabla 4.22. Comparación entre IHQ de familia *Pasteurellaceae* y Cultivo.

Animal	<i>Pasteurella</i> <i>spp.</i>	<i>Mannheimia</i> <i>haemolytica</i>	<i>Pasteurella</i> <i>multocida</i>	Cultivo
01	++	++	-	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>
02	+	-	-	no crecimiento
03	-	++	-	<i>Streptococcus suis</i>
07	-	+++	-	no crecimiento
08	-	-	-	crecimiento no significativo
09	-	+++	-	crecimiento no significativo
10	++	++	+	<i>Streptococcus suis</i>
11	+	+++	+++	<i>Pasteurella spp.</i>
12	-	-	-	no crecimiento
13	+	-	++	<i>Streptococcus suis</i> , <i>Haemophilus parasuis</i> , <i>Arcanobacterium pyogenes</i>
14	++	+++	+	no crecimiento
17	-	+++	+	no crecimiento
18	++	+++	+++	no crecimiento
19	++	+++	+	<i>Pasteurella spp.</i>
20	+++	+++	+++	<i>Streptococcus suis</i> , <i>Pasteurella</i> <i>spp.</i> , <i>Mannheimia haemolytica</i>
21	+	+++	+++	<i>Streptococcus suis</i> , <i>Pasteurella</i> <i>multocida</i>
22	-	-	-	<i>Streptococcus suis</i> , <i>Escherichia</i> <i>coli</i> , <i>Escherichia vulneris</i>
23	-	+	+	<i>Streptococcus suis</i> tipo II
24	-	+	-	crecimiento polibacteriano no significativo
25	+	+++	++	<i>Pasteurella pneumotropica</i>

4.6 Estudio con Técnicas Moleculares (PCR-ELISA)

Mediante la técnica de PCR-ELISA se determinó la presencia de PCV2 y PRRSV en sangre entera de 14 animales y en muestras tisulares congeladas a -80°C de 11 animales. Para PCV2 se utilizaron muestras de linfonodos (pool de inguinal superficial, iliaco y mediastínico), tonsila y pulmón, y para PRRSV, linfonodos mediastínicos y pulmón.

PCV2 fue detectado en sangre de 12 animales (86%) (Tabla 4.23) y en muestras tisulares de 9 animales (82%), detectándose principalmente en linfonodos (8 animales, 73%) y pulmón (7 animales, 64%), mientras que en la tonsila, solo se detectó en dos animales (18%) (Tabla 4.24).

Tabla 4.23. PCR-ELISA frente a PCV2 en sangre entera.

Animal	D.O.	Interpretación
01	0,816	+
02	0,586	+
03	1,145	+
04	1,906	+
05	1,087	+
06	1,495	+
07	1,997	+
08	1,92	+
09	0,099	-
10	1,299	+
11	2,109	+
12	0,562	+
13	1,107	+
14	0,126	-

Ingenasa INgene PCV2 11.PCV.K5

Amplificación C +: 1,832

C -: 0,071

ELISA C +: 1,02

C -: 0,112

Tabla 4.24. PCR-ELISA frente a PCV2 en tejido.

Animal	Muestra	D.O.	Interpretación
01	Linfonodos	0,087	-
	Pulmón	0,088	-
	Tonsila	0,08	-
02	Linfonodos	0,145	-
	Pulmón	1,815	+
	Tonsila	0,082	-
03	Linfonodos	2,143	+
	Pulmón	1,515	+
	Tonsila	0,076	-
07	Linfonodos	2,032	+
	Pulmón	2,098	+
	Tonsila	0,297	+
08	Linfonodos	2,044	+
	Pulmón	2,015	+
	Tonsila	1,626	+
09	Linfonodos	1,581	+
	Pulmón	1,504	+
	Tonsila	0,085	-
10	Linfonodos	1,708	+
	Pulmón	1,637	+
	Tonsila	0,131	-
11	Linfonodos	1,491	+
	Pulmón		no realizado
	Tonsila		no realizado
12	Linfonodos	0,196	-
	Pulmón		no realizado
	Tonsila		no realizado
13	Linfonodos	0,305	+
	Pulmón	1,118	+
	Tonsila	0,088	-
14	Linfonodos	0,673	+
	Pulmón	0,09	-
	Tonsila	0,094	-

Ingenasa INgene PCV2 11.PCV.K5
Amplificación C +: 1,822
C -: 0,088
ELISA C +: 1,05
C -: 0,104

PRRSV se detectó en la sangre de 9 animales (64%), siendo negativas todas las muestras tisulares (Tabla 4.25 y 4.28).

Tabla 4.25. PCR-ELISA frente a PRRSV en sangre entera.

Animal	D.O.	Interpretación
01	0,085	-
02	0,077	-
03	2,416	+
04	0,428	+
05	0,09	-
06	1,672	+
07	1,321	+
08	1,167	+
09	0,068	-
10	0,774	+
11	1,749	+
12	0,622	+
13	0,866	+
14	0,08	-

Ingenasa Ingene PRRS Universal 11.PRU.K5

Amplificación C +: 2,015

C -: 0,061

ELISA C +: 1,14

C -: 0,059

4.6.1 Resultados de IHQ y PCR-ELISA frente a PCV2

Cuando comparamos las dos técnicas utilizadas para la detección de PCV2, observamos que de los 7 animales que dieron positivo mediante IHQ en linfonodos, todos ellos también fueron positivos mediante PCR-ELISA. De 4 animales que fueron negativos mediante IHQ a PCV2 en linfonodos, 3 también fueron negativos mediante PCR-ELISA. En cuanto a la tonsila, de 7 animales negativos mediante PCR-ELISA, 4 también fueron negativos mediante IHQ, y de los 5 animales positivos mediante IHQ solo 2 lo fueron mediante PCR-ELISA. A nivel pulmonar de los 7 animales positivos mediante PCR-ELISA, 3 también fueron positivos mediante IHQ, mientras que de los 6 animales negativos mediante IHQ, solo dos lo fueron mediante PCR-ELISA.

Si comparamos los resultados por tejidos (Tabla 4.26), a nivel de linfonodos, de 11 animales, 7 (64%) fueron positivos mediante IHQ, y 8 (73%) mediante PCR-ELISA. En cuanto a pulmón, de 9 animales, 3 (33%) fueron positivos mediante IHQ, y 7 (78%) mediante PCR-ELISA. En tonsila, de 9 animales, 5 (56%) fueron positivos mediante IHQ, y solo 2 (22%) mediante PCR-ELISA.

Tabla 4.26. IHQ y PCR-ELISA frente a PCV2 en tejido.

PCV2						
Animal	IHQ	PCR	IHQ	PCR	IHQ	PCR
	Linfonodos	Linfonodos	Pulmón	Pulmón	Tonsila	Tonsila
01	-	-	-	-	-	-
02	-	-	-	+	-	-
03	+	+	-	+	+	-
07	+++	+	++	+	++	+
08	+++	+	++	+	++	+
09	+	+	-	+	-	-
10	++	+	+	+	+	-
11	+	+	-	NR	+	NR
12	-	-	-	NR	-	NR
13	+	+	-	+	+	-
14	-	+	-	-	-	-

NR: no realizado

Teniendo en cuenta los resultados histológicos, inmunohistoquímicos y de biología molecular frente a PCV2, y aplicando los criterios para el diagnóstico y clasificación de PCVD (Opriessnig et al., 2004b y 2007; Segalés 2002; Sorden 2000), de los 25 animales del estudio, 21 (84%) presentaron PCVD en diferentes fases (20% subclínica-inicial, 20% subaguda, 44% crónica-resolución), mientras que un 16% de los animales no presentaron PCVD (Tabla 4.27).

Tabla 4.27. Clasificación de los animales según los resultados histológicos, inmunohistoquímicos y de biología molecular frente a PCV2.

Animal	Fase PCVD	Severidad
01	subclínico-inicial	leve
02	subclínico-inicial	leve
03	subclínico-inicial	leve
04	crónico	severo
05	crónico	severo
06	resolución	moderado
07	subagudo	moderado
08	subagudo	leve-moderado
09	resolución	leve-moderado
10	subagudo	leve-moderado
11	resolución	moderado
12	subclínico-inicial	leve
13	resolución	leve
14	subclínico-inicial	leve
15	resolución	moderado
16	crónico	moderado-severo
17	subagudo	moderado-severo
18	crónico	severo
19	crónico	severo
20	crónico-resolución	moderado
21	no PCVD	no PCVD
22	no PCVD	no PCVD
23	no PCVD	no PCVD
24	no PCVD	no PCVD
25	subagudo	moderado

4.6.2 Resultados de IHQ y PCR-ELISA frente a PRRSV

A nivel de pulmón, los dos animales analizados por PCR, fueron negativos, mientras que por IHQ fueron positivos. Así mismo, todos los linfonodos mediastínicos analizados fueron negativos por PCR, conociendo con los resultados de IHQ, excepto en un caso, que fue positivo por IHQ (Tabla 4.28).

Tabla 4.28. Resultados de IHQ y PCR-ELISA frente a PRRSV en tejido.

Animal	IHQ Pulmón	PCR Pulmón	IHQ MD	PCR MD
01	-	NR	-	-
02	-	NR	-	-
03	+++	NR	-	-
04	-	NR	-	NR
05	+++	NR	-	NR
06	-	NR	-	NR
07	+++	NR	-	-
08	++	NR	-	-
09	++	NR	-	-
10	+	NR	-	-
11	+++	-	+	-
12	++	NR	-	-
13	+	-	-	-
14	+	NR	-	-
15	-	NR	-	NR
16	++	NR	-	NR
17	++	NR	-	NR
18	+++	NR	+	NR
19	+	NR	-	NR
20	-	NR	-	NR
21	-	NR	-	NR
22	-	NR	-	NR
23	-	NR	-	NR
24	-	NR	-	NR
25	-	NR	-	NR

NR.: no realizado.

MD: linfonodo mediastínico.

4.7 Estudio Serológico

El estudio serológico frente a ADV, MR, PPV y PRRSV se realizó sobre un total de 14 animales, mientras que para APP y Mh se realizó sobre 9 animales.

En 6 animales se detectaron anticuerpos anti-ADV, en 13, anticuerpos anti-PRRSV, en 6, anticuerpos anti-Mh, y solo un animal presentó anticuerpos anti-APP.

Todos los animales analizados fueron negativos frente a anticuerpos anti-MR y anti-PPV.

4.7.1 Resultados Serología ADV

De los 14 animales analizados, 6 (43%) resultaron positivos, indicativo de contacto con el virus salvaje de ADV, 3 (21%) dudosos y 5 (36%) negativos (Tabla 4.29 y Gráfica 4.17).

4.7.2 Resultados Serología MR

No se detectaron anticuerpos anti-MR en los animales analizados (Tabla 4.29 y Gráfica 4.17).

4.7.3 Resultados Serología PPV

No se detectaron anticuerpos anti-PPV en los animales analizados (Tabla 4.29 y Gráfica 4.17).

4.7.4 Resultados Serología PRRSV

De los 14 animales analizados, 13 (93%) fueron positivos, y solo uno (7%) negativo (Tabla 4.29 y Gráfica 4.17).

4.7.5 Resultados Serología APP

De los 9 animales analizados, solo uno fue positivo, y dado que el valor está entre 20 y 60, indicaría que es positivo a los serotipos menos virulentos (Tabla 4.29 y Gráfica 4.17).

4.7.6 Resultados Serología Mh

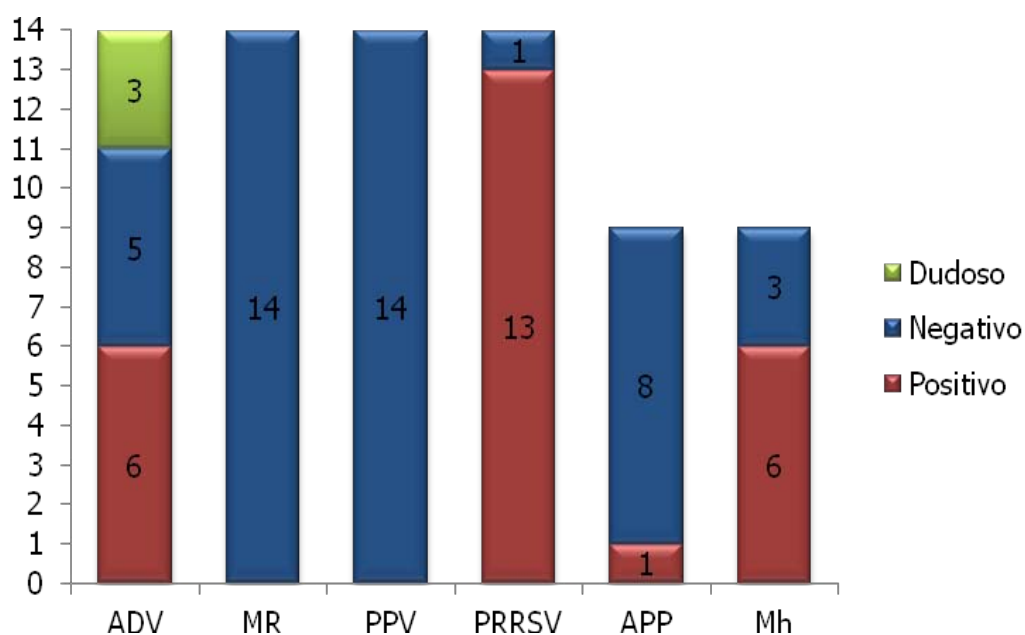
De los 9 animales analizados, 6 (67%) fueron positivos y 3 (33%) negativos (Tabla 4.29 y Gráfica 4.17).

Tabla 4.29. Resultados serología.

Animal	ADV	MR	PPV	PRRSV	APP	Mh
01	-	-	-	+	-	+
02	+	-	-	+	-	+
03	-	-	-	+	-	+
04	+	-	-	+	NR	NR
05	-	-	-	+	NR	NR
06	dudoso	-	-	+	NR	NR
07	+	-	-	+	NR	NR
08	+	-	-	-	-	-
09	+	-	-	+	NR	NR
10	+	-	-	+	+	+
11	dudoso	-	-	+	-	-
12	-	-	-	+	-	+
13	-	-	-	+	-	+
14	dudoso	-	-	+	-	-

NR: no realizado.

Gráfica 4.17. Resultados serología.



5 DISCUSIÓN



5.1 Clínica

El PCV2 es uno de los virus más pequeños que afectan a los mamíferos. Pertenece a la familia *Circoviridae*, género *Circovirus*. Su genoma es circular, con una cadena simple de ADN, y muestra una simetría icosaédrica y ausencia de envoltura (Crowther et al., 2003; Todd et al., 2005). Se le considera el agente casual esencial de un grupo de enfermedades multifactoriales agrupadas bajo el nombre de enfermedades por circovirus porcino (PCVD) (Segalés et al., 2005a). Es uno de los patógenos del ganado porcino más importantes a nivel mundial, causante de grandes pérdidas económicas en la industria porcina (Armstrong y Bishop, 2004; Tucker, 2006; Opriessnig y Langohr, 2013; Segalés et al., 2013).

Estudios retrospectivos han detectado la infección por PCV2 en cerdos desde 1962 (Jacobsen et al., 2009), aunque posiblemente haya estado presente en la población porcina desde mucho antes (Opriessnig y Langohr, 2013). La primera descripción de PMWS/PCV2-SD se realizó en 1991 (Clark, 1996a; Harding, 1996) aunque las lesiones histopatológicas características de este síndrome junto con la presencia de antígeno de PCV2 han sido identificadas retrospectivamente desde 1985 (Jacobsen et al., 2009). Desde entonces, este síndrome ha sido diagnosticado en los 5 continentes (Grau-Roma et al., 2011), considerándose ubicuo en la población porcina. En España, el PMWS fue descrito por primera vez en 1997 (Segalés et al., 1997), y en las Islas Canarias en el 2000 (Andrada et al., 2000). En España, la seroprevalencia está en torno al 70% (Rodríguez-Arrijoja et al., 2003b).

Dentro de las PCVD se incluyen los siguientes síndromes o manifestaciones de la enfermedad: infección subclínica (PCV-2 subclinical infection, PCV2-SI) (Opriessnig et al., 2007; Segalés, 2012), enfermedad sistémica (PCV-2 systemic disease, PCV2-SD), donde se incluiría el PMWS (Opriessnig et al., 2007; Carman et al., 2008; Grau-Roma et al., 2011; Segalés, 2012), enfermedad respiratoria (PCV-2 lung disease, PCV2-LD) donde se incluiría también el complejo de enfermedad respiratoria porcina (porcine respiratory disease complex, PRDC) (Kim et al., 2003d; Wellenberg et al., 2010; Cheng et al., 2011), y la neumonía proliferativa y necrotizante (proliferative and necrotizing pneumonia, PNP), (Drolet et al., 2003; Grau-Roma y Segalés, 2007; Szeredi y Szentirmai, 2008), enteritis (PCV-2 enteric disease, PCV2-ED), (Kim et al., 2004b; Jensen et al., 2006; Opriessnig et al., 2007), fallo reproductivo (PCV2 reproductive disease PCV2-RD), (West et al., 1999; O'Connor et al., 2001; Mateusen et al., 2007; Madson et al., 2009), y síndrome de dermatitis y nefropatía porcina (PDNS), (Allan et al., 2000b; Rosell et al., 2000b; Wellenberg et al., 2004b).

La enfermedad sistémica por PCV2 (PCV2-SD) afecta principalmente a animales de 2 a 4 meses de edad, al final de la transición e inicio del cebo (Harding et al., 1998; Segalés y Domingo, 2002; Harding, 2004). Las tasas de morbilidad en las granjas afectadas por circovirus varían entre 4-30%, con casos excepcionales de 50-60% (Segalés y Domingo, 2002; Segalés et al., 2005a).

La tasa de mortalidad en la granja estudiada, en lechones de 2 meses de edad, superó el valor esperado del 1,5-2%, llegando hasta el 17%. Dicho porcentaje estaría dentro del rango de mortalidad de 4-20% descrito para PCV2-SD (Segalés y Domingo, 2002; Segalés et al., 2005a).

Según el síndrome del que se trate, se han descrito diferentes manifestaciones clínicas. Así, en la infección subclínica (PCV2-SI), no se observan signos clínicos evidentes aunque hay una disminución de la ganancia media diaria. También se ha descrito que la eficacia vacunal frente a diversos agentes (peste porcina clásica, PRRSV) puede verse disminuida (Opriessnig et al., 2006e; Huang et al., 2011). Esto puede ser debido al retraso en el desarrollo de la inmunidad humoral y celular (Steiner et al., 2009), y/o a la alteración de la actividad de las células dendríticas (Kekarainen et al., 2010). Si bien la reducción del rendimiento por animal es menor en la infección subclínica, a nivel global y desde una perspectiva económica, es posible que el impacto de PCV2-SI sea de mayor importancia para la industria porcina que los efectos de la enfermedad clínica (Maes, 2012; Alarcon et al., 2013).

El PCV2-SD/PMWS se caracteriza clínicamente por adelgazamiento o pérdida de peso, palidez de la piel, pelo hirsuto, distrés respiratorio, diarrea y, en ocasiones, ictericia (Harding y Clark, 1997; Rosell et al, 1999; Krakowka et al., 2000). También es frecuente observar, principalmente en los primeros estadios de la enfermedad, un aumento de tamaño de los linfonodos subcutáneos, en especial, los inguinales superficiales (Harding y Clark, 1997; Rosell et al, 1999).

En la enfermedad respiratoria (PCV2-LD) el principal signo clínico es el distrés respiratorio, así como tos, estornudos, disnea, descarga nasal, fiebre, y reducción de la ganancia media diaria (Harms et al., 2002; Kim et al., 2003d; Opriessnig y Langohr, 2013). La neumonía proliferativa y necrotizante (PNP), afecta a animales entre los 15 días y los 4 meses de edad, con un pico entre las 4 y 10 semanas. Clínicamente se caracteriza por fiebre, disnea,

respiración abdominal y ocasionalmente tos. Los animales que sobreviven muestran adelgazamiento y retraso en el crecimiento (Morin et al., 1990; Szeredi y Szentirmai, 2008).

La enteritis (PCV2-ED) es una de las manifestaciones clínicas menos comúnmente reconocidas. Puede darse en cualquier momento en la fase de crecimiento-cebo, siendo más frecuente entre las 8 y 16 semanas de edad, y se caracteriza casi exclusivamente por la diarrea, (Kim et al., 2004b; Jensen et al., 2006; Oppriessnig et al., 2007 y 2011). Es posible cierto solapamiento diagnóstico con PCV2-SD/PMWS dado que en esta última también puede haber diarrea (Segalés, 2012).

El fallo reproductivo (PCV2-RD) se considera poco frecuente y por tanto con escasa repercusión económica (Pensaert et al., 2004; Oppriessnig et al., 2007 y 2013). Suele afectar a hembras primerizas o de nueva introducción, a granjas nuevas con alto número de hembras, o incluso granjas serológicamente negativas a PCV-2 (Togashi et al., 2011). Clínicamente se caracteriza por abortos así como momificaciones fetales, mortinatos, y un aumento de la mortalidad predestete (West et al., 1999; Ladekjær-Mikkelsen et al., 2001; O'Connor et al., 2001; Brunborg et al., 2007; Mateusen et al., 2007; Pittman, 2008; Madson et al., 2009).

El síndrome de dermatitis y nefropatía porcina (PDNS) se caracteriza por la presencia de máculas y pápulas de color rojo oscuro en la piel, afectando principalmente a extremidades posteriores y área perineal, teniendo, en algunos casos, una distribución generalizada (Segalés et al., 1998; Thibault et al., 1998; Drolet et al., 1999). Los animales afectados también presentan anorexia, depresión, postración, dificultad y/o reluctancia al movimiento, con temperatura corporal normal o leve pirexia (Segalés et al., 1998; Drolet et al., 1999).

La sintomatología de los animales analizados en el presente estudio era retraso en el crecimiento, adelgazamiento, taquipnea, disnea y, en algunos casos, diarrea. Estos signos se correspondían mejor con la presentación de PCV2-SD, ya que la sintomatología respiratoria no era tan marcada como cabría esperar en la PCV2-LD o PNP. Además, el cuadro digestivo (diarrea) afectaba a un bajo porcentaje de animales, con lo que clínicamente no reflejaría la PCV2-ED exclusivamente. Tampoco podrían descartarse otros agentes víricos o bacterianos que cursan con una sintomatología similar, (p.ej. PRRSV, Mh, *Pasteurella* spp.).

5.2 Hallazgos Anatomopatológicos Macroscópicos

Las lesiones macroscópicas descritas en el PCV2-SD/PMWS son la falta de colapso pulmonar, consolidación craneoventral, áreas multifocales de consolidación rojo oscuras, o una consistencia elástica de distribución difusa. Hay linfadenomegalia, principalmente de los linfonodos inguinales superficiales, mediastínicos y mesentéricos, pudiendo haber focos de necrosis. Los riñones muestran un punteado blanquecino multifocal de tamaño variable. El hígado puede estar aumentado o disminuido de tamaño, pálido, y con una superficie finamente granular. También puede haber úlceras gástricas a nivel de la *pars oesophagea*, atrofia serosa de la grasa y serositis. En el caso de PCV2-LD y PNP, las lesiones se limitan a los pulmones con falta de colapso pulmonar y consolidación del parénquima de distribución aleatoria.

En el PCV2-ED se observa engrosamiento de la mucosa intestinal, y linfadenomegalia mesentérica. El PDNS se caracteriza por la presencia de máculas y pápulas de morfología irregular y color rojo a localizadas principalmente en las extremidades posteriores y zona perineal, con tendencia a coalescer, pudiendo tener una distribución generalizada en los animales afectados de manera más severa, con hemorragia y edema subcutáneo en las áreas afectadas. Los riñones están aumentados de tamaño, pálidos, con hemorragias petequiales corticales y edema en pelvis. Los linfonodos renales e inguinales superficiales pueden estar aumentados de tamaño (Morin et al., 1990; Rosell et al., 2000a; Segalés et al., 2004b y 2005a; Opriessnig et al., 2007 y 2011; Segalés, 2012).

En los animales estudiados, los hallazgos macroscópicos durante la realización de la necropsia fueron diversos y numerosos. Lo más frecuente fue la linfadenomegalia, bien de forma generalizada o de alguno de los linfonodos estudiados, junto con la consolidación difusa del parénquima pulmonar. También se observaron abscesos pulmonares, pleuritis, pericarditis, artritis, serositis, hidropericardio, hidrotórax, ascitis y úlceras gástricas, entre otros hallazgos, lesiones, la mayoría, descritas en casos de PCV2-SD (Segalés y Domingo, 2002; Segalés et al., 2004b). Aunque el mayor número de lesiones se localizaron a nivel pulmonar, se descartó un cuadro de PCV2-LD dado que la mayoría de los animales presentaron también lesiones en otros órganos, y en el caso de PCV2-LD las lesiones se limitan a los pulmones con falta de colapso pulmonar y consolidación del parénquima de distribución aleatoria (Segalés, 2012). Por ello, el PCV2-SD fue el diagnóstico presuntivo más probable.

Así mismo, 15 animales mostraron serositis-poliserositis, indicativo de un cuadro de etiología bacteriana (infección por *Streptococcus suis* tipo 2, *Haemophilus parasuis* (enfermedad de Glässer) o *Mycoplasma hyorhinis*) (Brown et al., 2007) que podría ser independiente de PCV2-SD/PMWS o una complicación bacteriana secundaria dentro del mismo.

5.3 Hallazgos Anatomopatológicos Microscópicos

Durante el estudio histológico, las principales lesiones observadas a nivel de linfonodos, tonsila y placas de Peyer fueron la depleción linfoide y el infiltrado histiocítico, seguido por la presencia de células gigantes multinucleadas y de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos botrioides y basófilos. En el bazo se detectó depleción linfoide y en menor medida infiltrado histiocítico. Solo en el caso de los linfonodos se detectaron focos de necrosis. Dichos hallazgos coinciden con las lesiones histológicas descritas de PCVD, donde se consideran lesiones características del tejido linfoide (linfonodos, tonsila, bazo y placas de Peyer) la depleción linfoide en grado variable, con pérdida de la arquitectura folicular, infiltrado histiocítico, y presencia de células gigantes multinucleadas. También se han descrito, en los macrófagos, cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos botrioides, basófilos, esféricos y bien delimitados, así como, de forma ocasional, necrosis de dicho tejido linfoide (Clark, 1997; Rosell et al., 1999; Allan y Ellis, 2000; Allan et al., 2000a; Sorden, 2000).

Cuando evaluamos el grado de depleción linfoide, el linfonodo iliaco fue el más afectado seguido por el mediastínico, inguinal superficial y mesentérico. En cuanto al infiltrado histiocítico, el que presentó mayor cantidad fue el iliaco, seguido por el inguinal superficial, mediastínico y mesentérico. Las células gigantes multinucleadas se observaron en los 4 linfonodos estudiados en casi igual proporción. Los cuerpos de inclusión se identificaron mayoritariamente en el inguinal superficial seguido por el iliaco y mediastínico, no detectándose en el mesentérico. Según estos resultados, los linfonodos inguinales superficiales e iliacos son los más afectados, y serían por tanto linfonodos de elección para la detección de PCV2-SD/PMWS, sugeridos también por otros autores (Calsamiglia et al., 2002; Kim et al., 2003c; Chae, 2004). Esto difiere con los resultados de Muñoz y colaboradores, 2003, según los cuales los linfonodos mesentéricos junto con la placa de Peyer ileocecal serían las muestras de elección, si bien, estas muestras parecen solo válidas para el diagnóstico de PCV-ED, y no para el resto de PCVD.

De forma paralela, 12 animales mostraron en los linfonodos iliacos (11) y superficiales (1) dilataciones quísticas y vacuolas de posible naturaleza lipídica en los senos subcapsulares, medulares y peritrabeculares, con inflamación granulomatosa asociada. En todos ellos se observó un material cristalino refringente, tanto extra como intracelular. Dichas lesiones serían consecuencia de la reacción frente al adyuvante de alguna vacuna u otro producto terapéutico suministrado a los animales. El hecho de que se localicen en esos linfonodos se debe a que drenan el miembro pelviano (Saar y Getty, 2002), lugar habitual de inoculación en lechones. Estas lesiones coinciden con las descritas por Krakowka y colaboradores en 2001, en los linfonodos preescapular e inguinal superficial de lechones, los cuales drenaban los puntos donde inocularon adyuvante incompleto de Freund, observando dicha reacción a los 10 y 30 días postinoculación, y las descritas también por Grasland y colaboradores, en 2005, a los 32 días postinoculación.

A nivel pulmonar, las lesiones observadas consistieron principalmente en bronconeumonía purulenta, seguida por neumonía intersticial. Así mismo, también se observaron lesiones indicativas de PNP. Estas lesiones han sido descritas previamente en casos de PCVD, donde se incluyen neumonía intersticial o broncointersticial, fibrosis peribronquiolar, bronquiolitis obliterante, bronconeumonía fibrinopurulenta o catarral-purulenta, y PNP (Magar et al., 2000a; Bolin et al., 2001; Segalés y Domingo, 2002; Segalés et al., 2005a; Szeredi y Szentirmai, 2008; Cheng et al., 2011).

Otros hallazgos fueron pleuritis, fibrosis de paredes alveolares, hiperplasia del tejido linfoide asociado a bronquios (BALT), y formación de abscesos con necrosis del parénquima pulmonar. Si bien la neumonía intersticial puede ser debida a PCV2, existen otros agentes etiológicos capaces de producir este tipo de lesiones (p. ej. PRRSV, SIV, coronavirus respiratorio porcino) (Segalés et al., 2004b; Opriessnig y Langohr, 2013). Así mismo, los casos de bronconeumonía purulenta y abscesos se asocian a complicaciones bacterianas secundarias (Segalés et al., 2004b) y la hiperplasia del BALT a coinfección con Mh (Opriessnig et al., 2004b).

En cuanto al corazón, solo un bajo porcentaje (8%) de los animales mostraron lesiones, consistentes en miocarditis no supurativa y pericarditis fibrinosa-fibrinopurulenta. La pericarditis es indicativa de un proceso bacteriano, mientras que la miocarditis se describe en infecciones víricas como PCV2 (Ellis et al., 1999b; West et al., 1999; O'Connor et al., 2001; Kawashima et al., 2003; Mikami et al., 2005; Brunborg et al., 2007), PRRSV (Halbur et al., 1995; Rossow,

1998; Harms et al., 2001), o parvovirus porcino (Bolt et al., 1997). En el caso de PCVD, las lesiones a nivel cardíaco se observan principalmente en fetos, nacidos muertos o neonatos, siendo el órgano de elección en el caso de PCV2-RD (Sánchez et al., 2001a; Brunborg et al., 2007; Madson et al., 2009; Opriessnig y Langohr, 2013), y consisten en degeneración y necrosis de cardiomiocitos, fibrosis, e infiltrado linfohistiocítico (West et al., 1999; O'Connor et al., 2001; Pescador et al., 2007; Madson et al., 2009). Los animales de nuestro caso que presentaban lesiones en miocardio tenían dos meses de edad, lo cual difiere con varios autores, aunque también se ha descrito en lechones de 4 a 7 semanas de edad infectados naturalmente (Opriessnig et al., 2006c). El proceso observado de miocarditis no supurativa puede deberse a otros agentes etiológicos, principalmente virales.

En cuanto a las lesiones hepáticas, consistieron principalmente en infiltrado linfohistiocítico y, en menor medida, focos discretos de necrosis de hepatocitos y perihepatitis fibrinopurulenta. Las lesiones producidas por PCV2 a nivel del hígado, se caracterizan por infiltrado linfohistiocítico periportal o intersticial, desorganización de los cordones hepáticos, vacuolización y necrosis de hepatocitos, cuerpos apoptóticos, y fibrosis perilobulillar (Clark, 1997; Harding y Clark, 1997; Harms et al., 2001; Krakowka et al., 2001; Grasland et al., 2005). Este espectro de lesiones ha permitido establecer cuatro estadios en función de su distribución e intensidad (Rosell et al., 2000). Según esta clasificación, un 44% de los hígados evaluados presentaron un estadio I, que se caracterizó por la presencia de un leve infiltrado linfohistiocítico multifocal periportal. En uno de los animales (4) se observó una severa necrosis de hepatocitos individuales diseminada, con inflamación linfohistiocítica en el parénquima y desorganización de los cordones hepáticos, quedando clasificado en el estadio III. Otro animal (18) presentó algunos focos de necrosis de hepatocitos, con infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos, macrófagos y células linfoplasmocitarias, lo cual podría estar asociado más con infecciones de origen bacteriano (Stalker y Hayes, 2007).

A nivel intestinal, la mayoría de los animales mostraron una enteritis linfoplasmocitaria, mientras que dos ellos presentaron un infiltrado histiocítico junto con células gigantes multinucleadas, en la lámina propia. También se detectó depleción linfoide e histiocitosis en el GALT, junto con presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos. Dichas lesiones se asemejan a las descritas asociadas a PCV2, caracterizadas por un infiltrado linfohistiocítico, con presencia ocasional de células gigantes multinucleadas, en la mucosa y submucosa, atrofia y fusión de vellosidades, junto con depleción linfoide e infiltrado histiocítico en el GALT (Allan y Ellis, 2000; Carrasco et al., 2000; Núñez et al., 2003; Kim et al., 2004b; Zlotowski et al., 2008).

Así mismo, en dos animales se observó parasitación por *Cryptosporidium* spp. cuya infección junto con PCV2 ha sido descrita por Núñez y colaboradores, en 2003, y en 11 animales por *Balantidium* spp., protozoo muy común en el cerdo, presente normalmente como comensal en la luz de ciego y colon, pero que puede invadir tejidos dañados por otras enfermedades como disentería o salmonelosis (Brown et al., 2007).

La principal lesión observada a nivel renal fue nefritis intersticial linfoplasmocitaria, y en menor medida, pielonefritis. La nefritis intersticial también es la lesión renal más frecuente asociada a PCV2, excluyendo los casos descritos como PDNS, con un infiltrado inflamatorio que puede variar de linfoplasmocitario a granulomatoso (Rosell et al., 1999; Segalés y Domingo, 2002; Sarli et al., 2008). También se ha descrito, principalmente en el caso de animales infectados experimentalmente, pielitis, necrosis del epitelio tubular, hemorragia, y cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos en epitelio tubular y macrófagos intersticiales (Kennedy et al., 2000; Huang et al., 2008).

En un 32% de los casos se observaron lesiones a nivel del encéfalo que incluían meningoencefalitis supurativa, meningitis supurativa, meningitis linfoplasmocitaria, y encefalitis no supurativa. En el caso de las lesiones supurativas, éstas estarían asociadas a procesos de etiología bacteriana (Maxie y Youssef, 2007). Las lesiones no supurativas han sido descritas en diferentes infecciones víricas como ADV, PRRSV o PCV2 (Corrêa et al., 2007). Las lesiones por PCV2 se consideran que ocurren de manera muy ocasional (Rosell et al., 1999), e incluyen leptomeningitis, meningoencefalitis y encefalitis (Rosell et al., 1999; Fenaux et al., 2002; Corrêa et al., 2007), pudiéndose observar infiltrado linfohistiocítico, vasculitis y hemorragias (Corrêa et al., 2007; Seeliger et al., 2007). También se ha descrito meningoencefalomielitis linfohistiocítica-granulomatosa con formación de células gigantes multinucleadas (Drolet et al., 2011).

5.4 Estudio Inmunohistoquímico

La inmunohistoquímica (IHQ) ha demostrado ser un método de diagnóstico altamente específico y sensible, y es especialmente ventajosa como herramienta diagnóstica en las enfermedades infecciosas. La IHQ permite la localización del antígeno en la lesión, aumentando la precisión diagnóstica y la comprensión de la patogenia (Ramos-Vara et al., 2008). El principal objetivo de la estandarización es determinar las condiciones óptimas (tiempo y temperatura de incubación, diluciones, controles, buffers, etc.) para obtener resultados reproducibles y

consistentes dentro del mismo laboratorio y resultados comparables entre diferentes laboratorios (Ramos-Vara et al., 2008).

En nuestro estudio, se procedió a estandarizar la técnica IHQ para diversos anticuerpos monoclonales específicos anti-PCV2 y anti-ADV, elaborados por los laboratorios Ingenasa S.A., Madrid, y seleccionar aquellos que mejor resultado dieron con el objetivo de proceder a su comercialización, así como a su aplicación en este estudio.

En el protocolo de IHQ, se utilizaron diferentes diluciones de los anticuerpos primarios monoclonales, así como diferentes tipos de desenmascaramiento antigénico y condiciones de incubación, siguiendo las recomendaciones para la estandarización de técnicas de IHQ (Taylor et al., 2002). En cuanto a los anticuerpos anti-PCV2, los mejores resultados se obtuvieron utilizando una dilución de 1/200 del anticuerpo primario monoclonal C2-36A9 en suero normal de conejo, sin desenmascaramiento antigénico, y una incubación de 18 horas a 4°C. En relación a los anticuerpos anti-ADV, la inmunorreacción positiva más evidente se logró con el anticuerpo primario monoclonal 2CF2 a una dilución de 1/10 en suero normal de conejo, sin desenmascaramiento antigénico, y una incubación de 18 horas a 4°C. Ambos anticuerpos fueron posteriormente comercializados recomendando los protocolos anteriormente descritos.

El diagnóstico de PCVD requiere la presencia de las lesiones histológicas características junto con la presencia de antígeno o ácido nucleico de PCV2 en dichas lesiones (Sorden, 2000). Esta asociación puede llevarse a cabo mediante la IHQ, considerada junto con la ISH como "gold standard" en el diagnóstico de PCVD (Sorden, 2000; Segalés et al., 2003a; Kim y Chae, 2004a; Ghebremariam y Gruys, 2005), utilizando sueros policlonales o anticuerpos monoclonales para la detección de antígenos de PCV2, existiendo una alta correlación entre la severidad de las lesiones microscópicas y la cantidad de antígeno detectado (Rosell et al., 1999; Calsamiglia et al., 2002; Chianini et al., 2003; Opriessnig et al., 2004b; Krakowka et al., 2005). También es posible encontrar lesiones microscópicas leves y abundante cantidad de antígeno así como lesiones severas y escasa cantidad de antígeno, dependiendo del estadio en que se encuentre el animal (infección aguda, o fase de resolución respectivamente) (Opriessnig et al., 2007).

Inicialmente, para la detección del PCV-2 se han utilizado sueros policlonales, siendo McNeilly y colaboradores, en 2001, quienes describieron en detalle la producción de anticuerpos monoclonales específicos contra PCV2 sin reacción cruzada con PCV1. Aun así, hoy en día se

utilizan tanto sueros policlonales (Gagnon et al., 2008; Opriessnig et al., 2009; Harding et al., 2010; Kim et al., 2011b; Oh et al., 2012) como anticuerpos monoclonales (Jensen et al., 2006; Krakowka et al., 2007; Harding et al., 2008; Hansen et al., 2010a).

Un alto porcentaje de los anticuerpos primarios anti-PCV2 (policlonales y/o monoclonales) han sido creados por los propios grupos de investigación (Allan et al., 1994a; Rosell et al., 1999; Sorden et al., 1999; Ellis et al., 2000a; McNeilly et al., 2001; O'Connor et al., 2001; Kawashima et al., 2003; Wellenberg et al., 2004b; Mikami et al., 2005) o cedidos por otros grupos (Kim y Chae 2004a; Ostanello et al., 2005; Jensen et al., 2006; Harding et al., 2008; Hansen et al., 2010a), no especificándose en algunos de estos casos el protocolo completo utilizado, (Kennedy et al., 2003; Krakowka et al., 2004; Jensen et al., 2006) ni el anticuerpo empleado (Kim y Chae, 2005). Así mismo también se utilizan anticuerpos monoclonales comerciales (Drew et al., 2004; Grierson et al., 2004a) incluido el anticuerpo estandarizado y empleado en el presente trabajo (Seeliger et al., 2007; Szeredi et al., 2012).

Aplicando el protocolo anteriormente descrito en material y métodos, se detectó antígeno de PCV2 en linfonodos (68%), tonsila (64%) y bazo (48%), donde se observó mayoritariamente en el citoplasma, y en menor medida, en el núcleo de células de morfología histiocítica y dendrítica y, en ocasiones, en células gigantes multinucleadas y cuerpos de inclusión, habiendo también marcaje de células de naturaleza linfoide. La distribución del antígeno en los linfonodos y tonsila fue principalmente difusa por el parénquima linfoide, seguida por la localización centrofolicular, mientras que en el bazo se localizó tanto en los nódulos linfáticos como en las vainas linfoides periarteriales.

En el pulmón hubo inmunoreacción positiva en un 40% de los casos, localizándose el marcaje en el citoplasma, y ocasionalmente en el núcleo de células de morfología histiocítica presentes en las paredes alveolares, en torno a bronquios y bronquiolos, en el BALT, así como en la luz de algunos bronquiolos y alvéolos, en células de morfología linfoide y células gigantes multinucleadas, y en algunas células epiteliales bronquiales y bronquiolares.

A nivel intestinal (40%) la inmunorreacción se observó en el citoplasma de células histiocíticas presentes en el tejido linfoide asociado (40%) y en la lámina propia (24%), así como en células gigantes multinucleadas y cuerpos de inclusión. En el hígado, la inmunoreacción se detectó en un 24%, con marcaje citoplasmático en células de morfología histiocítica fusiforme (células de Kupffer) y en células de morfología histiocítica presentes en el

infiltrado inflamatorio. También se observó, en menor medida, en el citoplasma y núcleo de los hepatocitos. A nivel renal, en el 16% de los casos se observó inmunorreacción en células de morfología histiocítica presentes en el infiltrado inflamatorio así como en algunas células epiteliales tubulares.

Dichas localizaciones coinciden con las descritas en casos de infecciones naturales (Ellis et al., 1998; McNeilly et al., 1999; Rosell et al., 1999; Choi et al., 2000b; Sato et al., 2000; Saoulidis et al., 2002; Chianini et al., 2003; Kim y Chae, 2004a; Haruna et al., 2006; Harding et al., 2008; Hansen et al., 2010b; Szeredi et al. 2012) y experimentales (Allan et al., 1999a; Ellis et al., 1999b; Allan et al., 2000d; Kennedy et al., 2000; Magar et al., 2000a; Harms et al., 2001; Fenaux et al., 2002; Kim y Chae, 2004a; Hasslung et al., 2005) por PCV2, donde también se ha localizado, aunque en menor medida, en células musculares lisas vasculares y bronquiales, y en células endoteliales en el pulmón, células epiteliales de las glándulas submucosas bronquiales, células acinares y ductales pancreáticas, epitelio biliar, células musculares lisas de las trabéculas esplénicas, células musculares lisas de la túnica muscular de la mucosa y epitelio de las vellosidades intestinales, células endoteliales de los capilares de glándula adrenal y encéfalo, células epiteliales germinales testiculares. Las variaciones en la localización del virus podrían deberse a diversas causas como el estadio de la enfermedad en que se encuentren los animales o la cepa de PCV2 (Sato et al., 2000).

Así mismo, las principales células donde se detectó inmunorreacción fueron las de la línea monocito/macrofágica, al igual que lo observado por otros autores (Choi et al., 2000b; Sato et al., 2000; Chianini et al., 2003; Kim y Chae, 2004a) lo que apoyaría la afirmación de que son las principales células que contienen PCV2.

El antígeno de PCV2 se detectó con más frecuencia en el tejido linfoide, como cabría esperar dado que es donde se producen las lesiones más frecuentes y características (Rosell et al., 1999; Segalés y Domingo, 2002; Kim y Chae, 2004a; Hansen et al., 2010b) seguido de pulmón, intestino e hígado.

La intensidad y frecuencia de la detección fue muy similar en los linfonodos estudiados, siendo levemente mayor en el IL y menor en el MS. En la mayoría de los trabajos publicados no se comparan las lesiones o cantidad de antígeno por linfonodo, incluso no se identifican los linfonodos estudiados (McNeilly et al., 1999; Ellis et al., 2000a), sino que se estima una media (Harding et al., 2008; Opriessnig et al., 2006b; Fenaux et al., 2003; Harms et al., 2001;

Ostanello et al., 2005). En los escasos trabajos que especifican los hallazgos por linfonodo, los resultados son variables, observándose una cantidad similar de Ag en ellos (Kawashima et al., 2003), levemente mayor en el linfonodo mesentérico que en el inguinal (Allan et al., 2000a, medido por inmunofluorescencia; Rosell et al., 1999, medido por ISH) o levemente mayor en el inguinal que en el mesentérico (Rovira et al., 2002, medido por ISH). Si bien, en la mayoría de las ocasiones suele utilizarse el IS, por ser una de las muestras más representativas (Ha et al., 2008; Calsamiglia et al., 2002; Kim et al., 2003c; Chae, 2004; Lin et al., 2011).

5.5 Estudios con Técnicas Moleculares (PCR- ELISA)

La PCR es considerada como la técnica más sensible así como específica y rápida (Larochelle et al., 1999a; Hamel et al., 2000; Calsamiglia et al., 2002; McNeilly et al., 2002; Pogranichniy et al., 2002), que puede detectar ADN de PCV2 en muestras de tejidos, así como en diversos fluidos corporales (sangre, heces, orina, hisopos nasales, oculares y tonsilares, semen) de animales vivos (Shibata et al., 2003; Krakowka et al., 2000; Larochelle et al., 2000; Magar et al., 2000a). Para la detección de PCV2 mediante PCR convencional, se han amplificado fragmentos de diversa longitud que pueden variar desde 260 a 1154 pb (Johnson et al., 2002; Raye et al., 2005), siendo en nuestro caso, un fragmento de 710pb.

La detección de PCV2 por PCR no confirma necesariamente un diagnóstico de PCVD, dada la alta prevalencia del virus en cerdos sanos (Larochelle et al., 1999b; Kim y Chae, 2003a; Allan y Ellis, 2000; Sorden, 2000; Segalés y Domingo, 2002; Pogranichniy et al., 2002; Quintana et al., 2001; Rodríguez-Arrijoja et al., 2000; Opriessnig et al., 2007). Por ello, un resultado positivo en cerdos clínicamente sanos o en enfermos sin PCVD, debe ser interpretado con cautela ya que no implica PCVD clínico, solo infección (Sorden, 2000; McNeilly et al., 2002; Chae, 2004; Opriessnig et al., 2007), y la infección subclínica por PCV2 con viremia ocurre en la mayoría de las granjas (Segalés y Domingo, 2002; Caprioli et al., 2006).

La detección de ADN de PCV2 por PCR solo es diagnóstica de PCVD si se interpreta junto con las lesiones histológicas características, por lo que la PCR podría ser una herramienta de diagnóstico alternativa para la confirmación de PCVD (Kiatipattanasakul-Banlunara et al., 2002; Chae, 2004; Kim y Chae, 2004a). Por otra parte, se ha observado que se detecta ADN de PCV2 con más frecuencia en el suero y plasma de cerdos con evidencias virológicas y patológicas de PCVD, por lo que la PCR realizada en dichas muestras podría ser una

herramienta útil para el diagnóstico precoz de PCVD en animales vivos. Sin embargo, no se ha detectado diferencia significativa entre afectados y no afectados cuando se utiliza sangre entera (Caprioli et al., 2006). Por ello, se han propuesto métodos cuantitativos (real-time PCR), por medio de los cuales se observa que la carga viral en sangre es mayor en cerdos con PCVD (Ladekjaer-Mikkelsen et al., 2002; Brunborg et al., 2004; Olvera et al., 2004), aunque en ocasiones, se ha encontrado la misma carga viral en suero en animales con PCVD que en sanos, lo que llevaría a especular que el PCV2 es necesario pero no siempre suficiente para producir PCVD (Liu et al., 2000).

De los 25 animales, 12 cumplen los 3 criterios necesarios para diagnosticarlos de PCVD (sintomatología, lesiones histológicas compatibles, presencia de PCV2) (Sorden, 2000). Los 13 animales restantes, cumplen los dos primeros criterios pero en ellos se ha detectado escasa cantidad (3, 6, 9, 11, 13), o no se ha detectado antígeno de PCV2 asociado a las lesiones (1, 2, 12, 14, 21, 22, 23, 24). Atendiendo de forma conjunta a los resultados de la IHQ y de PCR-ELISA tenemos que 3 animales fueron negativos a la IHQ, pero detectándose ADN de PCV2 en sangre (1, 2, 12), lo que indicaría que están en fase virémica, siendo uno de ellos positivo también en pulmón (2). Otro animal, negativo mediante IHQ, fue positivo mediante PCR-ELISA solo en linfonodos (14). La explicación a la presencia de animales con escasa cantidad de antígeno o negativos a IHQ en los que se detectó ADN de PCV2 (en sangre y/o tejido) podría ser a que se encontraban en una fase muy inicial, en fase de resolución-convalecencia, o subclínica (Segalés et al., 2003a; Opressnig et al., 2007; Segalés, 2012).

Aquellos animales en los que no se detectó antígeno ni ADN, podrían padecer un cuadro no relacionado con PCV2, ya que la depleción linfoide e histiocitosis no son específicos de la infección por PCV2, pudiendo estar causados por diferentes factores infecciosos y no infecciosos como malestar físico, factores nutricional, micobacterias, Mh, o PPV, entre otros (Kawashima et al., 2007; Hansen et al., 2010b). Tres animales (3, 10 y 13) fueron positivos en tonsila mediante IHQ pero negativos por PCR, aunque estos casos tenían escaso número de células positivas a PCV2-Ag. Casos similares de discrepancia (PCR-negativos/IHQ positivos, PCR-negativos/ISH-positivos en el mismo animal) han sido descritos por varios autores (Ellis et al., 2000a; Maldonado et al., 2004; Lusic, 2006) no pudiéndose determinar las posibles causas de estas diferencias. En este caso, los resultados negativos a PCR-ELISA podrían ser consecuencia de un bajo número de copias de viriones o por degradación del ADN (Greer et al., 1994; Golenberg et al., 1996; Bogdan et al., 2001).

En todos los animales analizados, excepto en dos (9, 14), se detectó PCV2 en sangre mediante PCR. Uno de estos casos negativos (9), tenía lesiones histológicas en linfonodos con presencia de antígeno de PCV2, por lo que una posible explicación es que estuviera en fase de resolución, sin viremia. El otro caso negativo (14) que tenía lesiones histológicas en linfonodos, los cuales fueron IHQ negativos pero PCR positivos, podría estar en fase subclínica o inicial, y por tanto, con baja cantidad de PCV2, que sí podría ser detectada por PCR y no por IHQ, dada la mayor sensibilidad de la PCR respecto a la IHQ (McNeilly et al., 2002; Kim y Chae, 2004a;).

Resultados similares se observaron a nivel pulmonar, donde 4 animales negativos mediante IHQ (2, 3, 9, 13), fueron positivos por PCR, siendo 3 de ellos también positivos en sangre y uno, negativo (9). Estos datos nos indican la coexistencia de animales en diferentes estadios de la enfermedad, tal y como ha sido observado por otros autores (Olvera et al., 2004).

Según la clasificación de Opriessnig y colaboradores, en 2007, mediante la combinación de la puntuación de las lesiones y la cantidad de antígeno de PCV2, es posible determinar el estadio de la infección en la que se encuentran los animales. Siguiendo dicha clasificación, de los 25 animales analizados, 19 presentarían PCVD en alguna de sus fases (subclínica, aguda, crónica, o resolución-convalecencia), mientras que los 4 animales restantes (21, 22, 23, 24) tendrían un cuadro no relacionado con PCV2. Se obtuvieron algunas combinaciones que no permitían clasificarlos en ninguna de las propuestas, y que debido a la escasa cantidad o ausencia de antígeno y las leves lesiones histopatológicas, se clasificaron como casos subclínicos o en fase inicial. Esto puede ser debido a que dicha clasificación se realizó con animales inoculados experimentalmente, y por lo tanto sin tantos factores variables (edad, coinfecciones, manejo, etc.), que hacen que los casos naturales sean más heterogéneos y difíciles de categorizar siguiendo los criterios de estudios experimentales.

5.6 Coinfecciones

5.6.1 PRRSV

El Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, PRRS) se considera endémico en la mayoría de los países productores de porcino (Rossow, 1998, Cho y Dee, 2006). Se ha determinado la existencia de dos grandes genotipos

de PRRSV, la cepa Europea (Lelystad virus) y la cepa Norteamericana (VR-2332), presentando, además, una amplia variabilidad genética dentro de cada una de ellas debido a la alta tasa de mutación y recombinación intragénica (Murtaugh et al., 1995; Nelsen et al., 1999; Meng et al., 1995; Kapur et al., 1996). Los signos clínicos, de forma general, incluyen fallos reproductivos, enfermedad respiratoria severa, retraso en el crecimiento, disminución del rendimiento y aumento de la mortalidad (Keffaber, 1989; Rossow, 1998), y varían ampliamente dependiendo de la edad, el momento de la gestación en que se encuentren, del estado inmunitario del animal y de la cepa.

Macroscópicamente, los hallazgos pulmonares varían desde ausencia o lesiones mínimas, a ausencia de colapso pulmonar y consolidación multifocal o difusa del parénquima (Halbur et al., 1994 y 1996b, Rossow, 1998). También es frecuente observar linfadenomegalia generalizada, mostrando en ocasiones estructuras quísticas (Halbur et al., 1995 y 1996b; Rossow, 1998).

Histológicamente, las lesiones pulmonares se caracterizan por una neumonía intersticial con hipertrofia-hiperplasia de neumocitos tipo II, infiltrado de células mononucleares en septos alveolares, restos celulares necróticos en luces alveolares con macrófagos y, de forma ocasional, células sincitiales, hiperplasia del tejido linfoide peribronquial, e infiltrado linfoplasmocitario perivascular (Halbur, et al., 1994 y 1995; Rossow et al., 1995; Rossow, 1998).

Las lesiones en tejido linfoide se caracterizan por hiperplasia e hipertrofia de los centros germinativos, en ocasiones con necrosis, y espacios quísticos con policariocitos (Rossow et al., 1994 y 1995; Halbur et al., 1995; Rossow, 1998) siendo estos dos últimos hallazgos poco frecuentes en las infecciones naturales, posiblemente como resultado del número de linfonodos examinados, el tiempo postinfección y el tipo de virus (Rossow et al., 1995; Rossow, 1998).

En el presente trabajo, se detectó antígeno de PRRSV en un total de 14 animales (56%), mostrando todos ellos inmunorreacción positiva en pulmón, 5 (20%) en tonsila, 2 (8%) en linfonodos mediastínicos, y 2 (8%) en hígado. La inmunorreacción frente a PRRSV se detectó en el citoplasma de células de morfología histiocítica, lo que coincide con lo descrito por otros autores (Halburg et al., 1994 y 1996a; Rossow et al., 1996), dado que este virus se replica principalmente en la células de la línea monocito/macrofágica, siendo los macrófagos alveolares porcinos y los macrófagos intravasculares pulmonares, su principal célula diana (Wensvoort et al., 1991; Voicu et al., 1994; Rossow et al., 1995 y 1996, Thanawongnuwech et al., 2000). La mayor cantidad de antígeno se detectó en pulmón, y levemente en el resto de tejidos

analizados, lo que coincide con lo observado tanto en infecciones naturales (Segalés et al., 2002), como experimentales (Rossow et al., 1996; Rovira et al., 2002).

Teniendo en cuenta todos los tejidos analizados, 12 animales (48%) presentaron coinfección PRRSV- PCV2, 5 (20%) solo PCV2, 2 (8%) solo PRRSV, mientras que los 6 animales restantes (24%) fueron negativos a ambos virus.

En el pulmón, fue más frecuente encontrar coinfección PRRSV-PCV2 (8 animales) o solo PRRSV (6), que solo PCV2 (2), aunque la cantidad de antígeno de PCV2 y PRRSV fue similar en todos los casos. Si tenemos en cuenta también los resultados de PCR en sangre, 3 animales serían positivos a PCV2 y 9 a ambos, no habiéndose detectado ningún animal positivo solo a PRRSV.

Se observó la coexistencia de antígeno de PRRSV y PCV2 en 4 animales a nivel de tonsila, en 2 en linfonodo mediastínico, y en uno a nivel hepático, no detectándose mayor cantidad de PCV2-Ag asociado a la presencia de PRRSV. En general, la severidad de las lesiones en órganos linfoides y la detección de PCV2-Ag también fueron similares en todos los casos (coinfección PCV2-PRRSV o solo PCV2). Por ello, no es posible afirmar en nuestro estudio que PRRSV potencie la acción de PCV2, tal y como describen otros autores (Allan et al., 2000a; Harms et al., 2001; Rovira et al., 2002), aunque si es más frecuente la coinfección (50%), lo que coincide con otras observaciones de campo donde se observa un porcentaje que varía del 20 al 83% (Sorden et al., 1998; Allan y Ellis, 2000; Pallarés et al., 2002; Segalés y Domingo, 2002; Segalés et al., 2002; Wellenberg et al., 2004a; Ramamoorthy y Meng, 2009).

En cuanto a la severidad de las lesiones por PCV2, tampoco se han encontrado diferencias entre animales positivos o negativos a PRRSV en condiciones naturales (Larochelle et al., 2003). El que la mayor cantidad de PRRS-Ag se haya observado en pulmón, unido a su escasa detección en el resto de tejidos sugiere que el PRRSV contribuye principalmente a las lesiones pulmonares, no estando asociado a las lesiones en tejidos linfoides características de PCVD (Harms et al., 2001; Segalés et al., 2002; Chae, 2004).

De los 14 animales analizados, 9 (64%) fueron positivos en sangre por PCR-ELISA, indicando que eran virémicos. De ellos, solo uno (8) fue seronegativo a PRRSV. La explicación para este resultado negativo podría ser la formación de complejos antígeno-anticuerpo por exceso de virus circulantes que lleve a títulos bajos de anticuerpos; que sea un animal

persistentemente infectado que ha seronegativizado (Wills et al., 2003) o a un fallo en la técnica de detección (falso negativo). Otra posibilidad es que estuviera inmunosuprimido debido a la infección por PCV2 (Segalés et al., 2001 y 2004a; Rovira et al., 2002), pero dado que fue positivo a ADV, esta opción podría descartarse.

5.6.2 ADV

La enfermedad de Aujeszky, cuyo agente etiológico es el Herpesvirus porcino tipo 1, también conocido como el virus de la enfermedad de Aujeszky (Aujeszky disease virus, ADV) (Lee y Wilson, 1979) es una enfermedad de declaración obligatoria. Puede afectar a diversos mamíferos como rumiantes, carnívoros y roedores, aunque se considera que los miembros de la familia *Suidae* son los únicos hospedadores naturales (Müller et al., 2011). El ADV se replica en el tracto respiratorio, sistema nervioso central y órganos reproductores, causando por tanto alteraciones respiratorias, nerviosas y reproductivas (Nauwynck et al., 2007). El cerdo muestra una marcada resistencia dependiente de la edad frente al ADV, siendo los animales más jóvenes los más susceptibles y mostrando una sintomatología nerviosa, siendo la mortalidad cercana al 100% (Pomeranz et al., 2005; Mettenleiter et al., 2012).

En los animales destetados, la sintomatología incluye anorexia, pérdida de peso, fiebre, descarga nasal, estornudos, tos y dificultad respiratoria (Pomeranz et al., 2005).

Macroscópicamente, las lesiones son inespecíficas e incluyen focos de necrosis en hígado, bazo, tonsila, adrenales, linfonodos, así como en pulmón, donde también puede haber edema, hemorragia y consolidación, principalmente craneoventral, del parénquima pulmonar (Lee y Wilson, 1979; Mettenleiter et al., 2012).

Histológicamente, las lesiones en el sistema nervioso central se caracterizan por una meningoencefalomielitis no supurativa. A nivel pulmonar produce necrosis de bronquios, bronquiolos y neumocitos, con infiltrado de linfocitos, macrófagos, y en menor medida, células plasmáticas y neutrófilos, en espacios alveolares (Mettenleiter et al., 2012). También se ha asociado al desarrollo de neumonía proliferativa necrotizante en el caso de coinfecciones con otros virus como PCV2, PRRS o SIV (Grau-Roma y Segalés, 2007; Morandi et al., 2010).

En este estudio, no se detectó antígeno de ADV mediante IHQ, ni en pulmón ni en cerebro, por lo que no se podría confirmar su participación en las lesiones observadas y compatibles con dicha enfermedad. En cambio, mediante serología, de los 14 animales analizados, 6 (43%) resultaron positivos frente a gE y 3 (21%) dudosos. Esto implica que han tenido contacto con el virus salvaje, y por lo tanto estar en un estadio temprano de la infección o presentar una infección latente, ya que ninguno de los animales positivos o dudosos mostró lesiones histológicas a nivel del encéfalo. De los animales positivos, 5 también son positivos a PCV2 mediante IHQ en linfonodos u otros tejidos, lo que podría sugerir que los animales con PCVD son más susceptibles a otras infecciones (Rodríguez-Arriola et al., 1999). Otros autores han encontrado animales positivos a PCV2 mediante ISH y serológicamente positivos a ADV pero sin detectar antígeno de ADV en las lesiones que presentaban los animales (Quintana et al., 2001). En el presente caso no se puede determinar el papel exacto que juega ADV.

5.6.3 PPV

El parvovirus porcino (PPV) perteneciente al género *Parvovirus*, es, si no el más importante, uno de los principales agentes etiológicos causantes de fallos reproductivos en el ganado porcino (van Leengoed et al., 1983). Da lugar a infertilidad, retraso en el retorno al estro, muerte embrionaria y fetal con reabsorción, momificación, camadas de pequeño tamaño, muerte neonatal, y abortos (van Leengoed et al., 1983; Truyen y Streck, 2012). El PPV se considera, entre otros, uno de los cofactores necesarios para el desarrollo y/o aumento de la severidad de PCVD, tanto natural como experimentalmente (Allan et al., 1999a; Ellis et al., 1999b; Allan et al., 2000d; Choi y Chae 2000a; Ellis et al., 2000a; Kennedy et al., 2000; Krakowka et al., 2000; Opriessnig et al., 2004a; Cao et al., 2005; Ha et al., 2008).

Sin embargo, otros autores no han encontrado un aumento del riesgo de desarrollo de PCVD asociado a PPV (Pogranichniy et al., 2002) y dado que la coinfección PCV2-PPV en campo es esporádica, no explicaría la mayoría de los casos naturales de PCVD (Segalés y Domingo, 2002). En nuestro caso, todos los animales fueron serológicamente negativos a PPV, por lo que se puede descartar la participación de dicho virus en el desarrollo de PCVD en este estudio.

5.6.4 Mh

Mycoplasma hyopneumoniae (Mh) es el agente etiológico primario de la neumonía enzoótica porcina (Goodwin et al., 1965; Maré y Switzer, 1966) caracterizada por alta morbilidad y baja mortalidad (Kwon et al., 2002). La neumonía enzoótica no suele observarse en animales menores de 6 semanas de edad, siendo la prevalencia particularmente alta hacia la mitad-final del cebo (Sibila et al., 2009), y la severidad del cuadro clínico va a depender de la cepa implicada, la presión de infección, la presencia de infecciones secundarias y las condiciones ambientales (Sibila et al., 2009).

La sintomatología clínica, en caso de que no esté complicada con patógenos concomitantes, se limita a tos no productiva, reducción de la ganancia media diaria y del índice de conversión. Cuando hay patógenos secundarios implicados, los signos clínicos incluyen dificultad respiratoria, fiebre, y en algunos casos, muerte (Maes et al., 1996). Macroscópicamente, la neumonía enzoótica porcina se caracteriza por la consolidación de las porciones craneoventrales del parénquima pulmonar, con una coloración de varía de rojo-violáceo a grisáceo dependiendo de si está en fase aguda o crónica, respectivamente (Strasser et al., 1992; Sørensen et al., 1997).

Mh coloniza la superficie luminal de las células epiteliales de bronquios y bronquiolos sin llegar a invadir dichas células (Amanfu et al., 1984; Kwon et al., 2002; Sarradell et al., 2003). La lesión histológica característica asociada a Mh es la hiperplasia del tejido linfoide asociado a bronquios (bronchus-associated lymphoid tissue, BALT), ya que Mh tiene un efecto mitogénico en los linfocitos (Messier y Ross, 1991), aunque no se ha detectado antígeno ni ácido nucleico de Mh en el BALT hiperplásico, (Kwon et al., 2002; Sarradell et al., 2003). Sin embargo, sí se ha detectado antígeno de PCV2 en casos de coinfección experimental con Mh, en el BALT (Opriessnig et al., 2004b), donde también hay células dendríticas y macrófagos (Sarradell et al., 2003). Algunos autores describen que Mh incrementa la severidad de las lesiones así como la cantidad de PCV2-Ag en pulmón y en órganos linfoides producidas por PCV2 (Opriessnig et al., 2004b) mientras que otros no han observado este efecto sinérgico (Sibila et al., 2012).

Del total de 25 animales, 6 (7, 8, 9, 10, 12, 14) presentaron leve-moderada hiperplasia del BALT, detectándose antígeno de Mh solo en 3 de ellos (7, 12, 17), visualizándose principalmente en la superficie luminal del epitelio de bronquios y bronquiolos, lo que coincide con lo descrito tanto en infecciones experimentales (Kwon et al., 2002; Opriessnig et al., 2004b) como naturales (Kwon y Chae, 1999). En tres casos (7, 8, 10) se detectó PCV2 en el BALT, lo que también ha sido descrito por otros autores (Opriessnig et al., 2004b), siendo solo

uno de ellos (7) positivo a Mh mediante IHQ. En el estudio serológico, de los 9 animales analizados, 6 fueron positivos (1, 2, 3, 10, 12, 13), y 3 negativos (8, 11, 14).

El que haya más animales positivos por serología que por IHQ puede deberse a que los anticuerpos detectados sean vacunales y/o por infección, más que maternos, ya que la vida media de estos últimos es de 16 días, llegando hasta los 63 días cuando los títulos iniciales son altos (Sibila et al., 2009). Mediante serología es muy difícil diferenciar entre animales vacunados e infectados (Sibila et al., 2009). La vacunación reduce las lesiones y la presión de infección, pero no protege frente a la infección por Mh (Maes et al., 1996; Haesebrouck et al., 2004). Esto podría explicar el bajo número de animales con lesiones compatibles y la escasa severidad de las mismas, así como una baja carga de Mh que no sería detectable mediante IHQ.

La presencia de dos animales seronegativos con lesiones compatibles con Mh y negativos mediante IHQ podría deberse a que dichas lesiones no están asociadas a infección por Mh, si bien no puede excluirse que sea un falso negativo por IHQ o que los animales no hayan desarrollado una respuesta inmune.

El bajo número y escasa severidad de las lesiones unido a la escasa detección de Mh-Ag sugiere una baja importancia y/o participación de este patógeno en el presente caso, no observándose efecto sinérgico importante entre Mh y PCV2.

5.6.5 CAR-Bacillus

El bacilo respiratorio asociado a cilios (Cilia-associated respiratory bacillus CAR-bacillus) es una bacteria filamentosa gram-negativa que coloniza el epitelio respiratorio ciliado, y ha sido descrita en ratas (van Zwieten et al., 1980; MacKenzie et al., 1981), ratones (Griffith et al., 1988; Matsushita et al., 1989), conejos (Kurusu et al., 1990; Cundiff et al., 1994; Caniatti et al., 1998), ganado vacuno (Hastie et al., 1993; Pravettoni et al., 2001), caprino (Fernández et al., 1996), porcino (Nietfeld et al., 1995), ciervos rojos, rebecos y corzos (Bergottini et al., 2005). El CAR-bacillus es difícil de detectar mediante la técnica de rutina de hematoxilina-eosina, visualizándose más fácilmente utilizando técnicas de tinción de plata como el Warthin Starry (W-S) (Van Zwieten et al., 1980; Kurusu et al., 1990; Nietfeld et al., 1995; Fernández et al., 1996).

La infección por CAR-bacillus, en ratas y ratones, se asocia a enfermedad respiratoria crónica, caracterizada por bronquitis supurativa crónica y bronquiolitis (Percy y Barthold, 2007).

En conejos produce hiperplasia del epitelio de laringe, tráquea y bronquios, pérdida de cilios e hiperplasia del BALT (Caniatti et al., 1998). En bovino y caprino, con pérdida de cilios y traqueítis (Hastie et al., 1993; Orós et al., 1997; Pravettoni et al., 2001). En el ganado porcino, se ha detectado en casos de pérdida de cilios, traqueítis y neumonía, (Nietfeld et al., 1995; Hafner y Latimer, 1998), aunque en infecciones experimentales no ha producido lesiones histológicas (Nietfeld et al., 1999). Si bien el CAR-bacillus no se considera un patógeno primario, si puede tener un efecto adverso sobre los cilios, reduciendo el aclaramiento mucociliar y predisponiendo y potenciando la acción de otros agentes patógenos como *Pasteurella multocida* o *Mycoplasma* spp. (Nietfeld et al., 1995 y 1999; Hafner y Latimer, 1998). CAR-Bacillus se ha observado en ganado caprino infectado natural y experimentalmente con *Mycoplasma mycoides* (Fernández et al., 1996; Orós et al., 1997), y en ganado porcino con infección natural por Mh (Andrada, 2001).

En nuestro estudio y utilizando la técnica de W-S, el CAR-bacillus se visualizó como estructuras bacilares-filamentosas de color negro en la superficie del epitelio respiratorio, tal y como describen otros autores (Hafner y Latimer, 1998; Nietfeld et al., 1995 y 1999). De los 20 animales analizados, 15 (75%) fueron positivos a CAR-bacillus en la tráquea, y de ellos, 3 (15%) también en pulmón, siendo la prevalencia mayor que el 46.6% descrito por Nietfeld y colaboradores en 1995. El CAR-bacillus fue detectado en tráqueas con lesiones histológicas de traqueítis (infiltrado linfoplasmocitario en la lámina propia y/o descamación del epitelio), y en menor medida en tráqueas sin lesiones. Esto puede indicar un papel de dicho agente en el desarrollo de traqueítis en el ganado porcino. Su elevada detección a nivel de la tráquea junto con la importante presencia de patógenos pulmonares, tanto víricos como bacterianos, sugiere que este agente puede predisponer y potenciar otras infecciones tal y como describen otros autores (Nietfeld et al., 1995 y 1999; Hafner y Latimer, 1998; Andrada, 2001), por su efecto adverso sobre los cilios y el aclaramiento mucociliar.

5.6.6 Bacterias

Mediante el uso de diferentes técnicas diagnósticas (cultivo microbiológico, inmunohistoquímica y serología), se detectaron diversos tipos de bacterias en los animales del presente estudio. Mediante cultivo microbiológico se detectaron varios tipos de bacterias (*Arcanobacterium pyogenes*, *Streptococcus suis*, *Pasteurella* spp., *Haemophilus parasuis*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae*

equisimilis, *Escherichia vulneris*, *Enterococcus faecalis*, *Pasteurella pneumotropica* y *Streptococcus acidominimus*) en diferentes tejidos de 13 animales de los 20 analizados (65%). Un total de 22 animales (88%) fueron positivos mediante IHQ a la familia *Pasteurellaceae*, mientras que por serología, solo un animal (10) fue positivo a APP.

Muchas de estas bacterias (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*), son conocidos agentes primarios causantes de enfermedad en el ganado porcino o son consideradas patógenos potenciales o secundarios que pueden aislarse de individuos sanos. En el caso de coinfecciones u otras causas que comprometan el estado inmunitario del animal, pueden dar lugar a procesos sistémicos o agravar las lesiones causadas por otros agentes (Ross, 2006; VanAlstine, 2012; Pors et al., 2013).

La mayoría de estas bacterias se han descrito en casos de PCVD (Sato et al., 2000; Kim et al., 2002; Pallarés et al., 2002; Segalés y Domingo, 2002; Wellenberg et al., 2004a; Corrêa et al., 2007; McEwen et al., 2007; Opriessnig et al., 2007; Gagnon et al., 2008; Opriessnig y Halbur, 2012), llegándose a detectar coinfección con alguna de estas bacterias en el 67% de los casos (Gagnon et al., 2008). Las bacterias más frecuentemente detectadas varían según los estudios, siendo principalmente *Pasteurella multocida* (Pallarés et al., 2002; Opriessnig y Halbur, 2012), *Streptococcus suis* (Sato et al., 2000; Pallarés et al., 2002; McEwen et al., 2007; Gagnon et al., 2008; Opriessnig y Halbur, 2012), y *Haemophilus parasuis* (Kim et al., 2002).

Se considera que la coinfección con bacterias, principalmente gram-negativas, puede ser un importante factor promotor de la replicación de PCV2 y ser uno de los cofactores importantes que contribuyen al desarrollo de PCVD (Chang et al., 2006).

En nuestro caso, la bacteria más frecuentemente aislada fue *Streptococcus suis* tipo II (45%, 9 animales), seguida por *Pasteurella* spp. (20%, 4 animales), y por *Arcanobacterium pyogenes* y *Haemophilus parasuis* (ambas con 15%, 3 animales). La bacteria más frecuentemente aislada en pulmón fue *Streptococcus suis* tipo II (37%, 7 animales), seguida de *Pasteurella* spp. (16%, 3 animales), y de *Arcanobacterium pyogenes* (11%, 2 animales). Mediante IHQ se detectó alguna especie de la familia *Pasteurellaceae* (*Pasteurella* spp., *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica*) en el pulmón de 22 animales (88%), por lo que éstas serían las más frecuentes en las muestras de pulmón.

Teniendo en cuenta los animales que tienen cultivo e IHQ en pulmón (19 en total), 16 (84%) fueron positivos mediante IHQ a alguna especie de la familia *Pasteurellaceae* (10 (53%) a *Pasteurella* spp., 10 (53%) a *Pasteurella multocida*, y 14 (74%) a *Mannheimia haemolytica*) mientras que solo 6 (32%) fueron positivos mediante cultivo, 3 (16%) a *Pasteurella* spp., 1 (5%) a *Pasteurella multocida*, 1 (5%) a *Mannheimia haemolytica* y 1 (5%) a *Pasteurella pneumotropica*.

Por lo tanto, la combinación de diferentes técnicas, en este caso, cultivo microbiológico e IHQ, incrementa la detección de casos positivos. El hecho de que se detecten más casos positivos mediante IHQ que por cultivo, puede deberse a la utilización de antibióticos, que disminuiría o inhibiría el crecimiento bacteriano, no así la detección de antígenos (Langohr et al., 2012). Esto también podría explicar que animales con poliserositis fueran negativos a cultivo, aunque no puede descartarse la participación de agentes que requieren medios de cultivo específicos como *Mycoplasma hyorhinis* o *Mycoplasma* spp. *Mannheimia haemolytica* es uno de los principales causantes de bronconeumonía en rumiantes (Caswell y Williams, 2007), siendo escasa su descripción en porcino.

El hecho de que en nuestro caso se haya detectado mediante IHQ en un número relativamente alto (14 animales), puede deberse a la existencia de epitopos capsulares comunes entre diferentes especies dentro de la familia *Pasteurellaceae* (Angen et al., 1999), lo que unido a la utilización de sueros policlonales, ha llevado a la detección de un género o especie diferente a *Mannheimia haemolytica*. Por ello, dichos resultados deben interpretarse con cautela.

5.6.7 *Cryptosporidium* spp.

La criptosporidiosis porcina está causada por la infección por *Cryptosporidium* spp., protozoo intracelular que se localiza en las microvellosidades de la superficie apical de los enterocitos (Kennedy et al., 1977; Núñez et al., 2003; Lindsay et al., 2012). La infección se observa normalmente en cerdos entre 1-6 meses de edad, siendo poco frecuente en animales menores de 1 mes y en adultos (Lindsay et al., 2012). La prevalencia varía, según los estudios, desde un 8.3% hasta un 44.3% (Hamnes et al., 2007; Farzan et al., 2011).

La infección es generalmente subclínica y no se considera un gran problema en la producción porcina (Kennedy et al., 1977; Núñez et al., 2003; Lindsay et al., 2012), aunque la coinfección con otros patógenos puede aumentar la severidad de la enfermedad (Núñez et al., 2003; Lindsay et al., 2012). Se ha descrito un caso de coinfección con PCV2 en un cerdo de 3 meses con historial de diarrea, donde se observó una masiva parasitación por *Cryptosporidium parvum* junto con la presencia de antígeno de PCV2 en la lámina propia del intestino y en el tejido linfoide asociado, lo que apoyaría la hipótesis de que los animales con PCVD presentan un aumento de la susceptibilidad a infecciones secundarias como resultado de un estado de inmunosupresión (Núñez et al., 2003). En nuestro caso, se observó la presencia de *Cryptosporidium* spp. en dos animales (8%) (10 y 13), en ninguno de los cuales se detectó PCV2-Ag a nivel intestinal, y leve cantidad en linfonodos mesentéricos. Por lo tanto, su prevalencia es levemente inferior a lo descrito, y en este caso, se puede considerar que no es relevante en PCVD.

5.6.8 *Balantidium* spp.

Balantidium spp. es un protozoo ciliado de distribución mundial, que tiene una amplia variedad de hospedadores, siendo el cerdo uno de los principales reservorios para la infección en humanos (Nakauchi, 1999). Su prevalencia en porcino puede llegar hasta casi el 100% (Hindsbo et al., 2000). Se considera un comensal del ciego y colon de los cerdos, y aunque la mayoría de las infecciones son subclínicas, determinadas circunstancias (estado nutricional, flora bacteriana intestinal, carga parasitaria, otras enfermedades crónicas, etc.) pueden afectar a la severidad de la enfermedad y causar diarrea y colitis, llegando a producir lesiones ulcerativas e incluso la perforación de la pared intestinal (Nakauchi, 1999; Headley et al., 2008; Schuster y Ramirez-Avila, 2008; Lindsay et al., 2012).

En las muestras analizadas, se identificó la presencia de *Balantidium* spp. en 11 animales (44%). En uno de los casos (19), se observó gran cantidad de *Balantidium* spp. en la mucosa, submucosa y vasos linfáticos de la válvula ileocecal y ciego, junto con un severo marcaje frente a PCV2-Ag en la lámina propia y tejido linfoide asociado, a ese nivel. Aunque esta coexistencia puede ser circunstancial, también podría apoyar la hipótesis de que los animales con PCVD son más susceptibles a infecciones secundarias resultado de un estado de inmunosupresión. Por tanto, es probable que la exacerbación de esta parasitación pueda ser debida una inmunosupresión causada por PCV2, similar a lo descrito en humanos, donde la

balantidiasis se ha asociado también a pacientes inmunocomprometidos (Barsoum, 2004; Yazar et al., 2004).

5.7 Integración de Resultados

En el presente estudio, de los 25 animales analizados, 21 presentarían PCVD en alguna de sus fases (subclínica, aguda, crónica, o resolución-convalecencia), mientras que los 4 animales restantes (21, 22, 23, 24) tendrían un cuadro no relacionado con PCV2, utilizando para esta caracterización los criterios de clasificación desarrollados en modelos experimentales (Opriessnig et al., 2004b y 2007). Estos datos indican la coexistencia de animales en diferentes estadios de la enfermedad, variando las lesiones histológicas y la cantidad de antígeno detectado, en función del estadio en que se encuentren (Quintana et al., 2001; Olvera et al., 2004; Opriessnig et al., 2007).

Las principales lesiones observadas en el tejido linfoide fueron depleción linfoide, infiltrado histiocítico, y en menor medida presencia de células gigantes multinucleadas y cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos botrioides, basófilos, en macrófagos. El tejido linfoide fue donde se detectó antígeno de PCV2 con más frecuencia, como cabría esperar dado que es donde se producen las lesiones más frecuentes y características (Rosell et al., 1999; Segalés y Domingo, 2002; Kim y Chae, 2004a; Hansen et al., 2010b), principalmente en linfonodos (68%), seguido de tonsila (64%) y de bazo (48%). También se detectó PCV2-ag en pulmón (40%) e intestino (40%, incluido tejido linfoide asociado y mucosa) y en menor proporción en hígado (24%) y riñón (16%). Estos resultados confirman que el tejido linfoide es el principal tejido diana de PCV2.

En el pulmón, el órgano más afectado en nuestro caso, las principales lesiones fueron bronconeumonía purulenta, y neumonía intersticial, observándose también casos compatibles con PNP. Sin embargo, solo se detectó PCV2 (mediante IHQ y/o PCR) en 3 animales (12%), solo PRRSV-Ag también en 3 animales (12%), habiendo coinfección PCV2-PRRSV en 11 casos (44%). También se detectó Mh-Ag en 3 animales (12%), uno de los cuales era positivo a PRRSV, y los otros dos eran positivos a PCV2 y PRRSV.

En general, la intensidad de las lesiones en órganos linfoides y pulmón y la detección de PCV2-Ag fue similar en todos los casos (coinfección PCV2-PRRSV-Mh, o solo PCV2), no observándose efecto sinérgico, lo que coincide con otros estudios (Larochelle et al., 2003; Sibila

et al., 2012). La coinfección PCV2-PRRSV, fue la más frecuentemente observada y si bien no puede demostrarse que dichas coinfecciones sean necesarias para el desarrollo de PCVD, si juegan un importante papel, principalmente PRRSV, empeorando el cuadro clínico general (Allan et al., 2000a; Harms et al., 2001; Rovira et al., 2002).

La seroconversión frente a la proteína gE de ADV demuestra que los animales habían tenido contacto con el virus salvaje. Aunque no se detectó ADV-Ag ni en pulmón ni en encéfalo, no se puede descartar que estuvieran en un estadio temprano de la infección. Si bien es posible que la inmunidad pasiva les proteja del desarrollo de la enfermedad, no puede determinarse el papel exacto que juega este virus en este caso. En 10 animales (40%) se observó a nivel pulmonar lesiones compatibles con PNP. De ellos, 2 fueron positivos a PRRSV, 7 a PCV2-PRRSV y uno negativo a ambos virus. Además 8 también fueron positivos a bacterias de la familia *Pasteurellaceae*. Esto sugiere que, en nuestro caso, PNP parece estar más relacionado con PRRSV que con PCV2, pero en especial con la coinfección por ambos virus, lo que coincide con lo descrito por otros autores (Pesch et al., 2000; Morandi et al., 2010). Estaríamos pues, ante un cuadro lesional multifactorial, en el que pueden estar implicados diferentes agentes etiológicos que dan lugar a unas mismas lesiones morfológicas. Estas diferencias en la etiología podrían deberse a diferencias en la patogenicidad de los agentes implicados, contexto epidemiológico, susceptibilidad del hospedador y factores ambientales o de manejo.

Mediante el uso de diferentes técnicas diagnósticas (serología, inmunohistoquímica y cultivo microbiológico), se detectaron diversos tipos de bacterias, siendo *Streptococcus suis* tipo II la más frecuentemente aislada de forma general, mientras que la familia *Pasteurellaceae* fue la más detectada en pulmón. Estos resultados corroboran los hallazgos macroscópicos e histológicos observados, como poliserositis, bronconeumonía purulenta, abscesos, linfadenitis supurativa, etc., que son lesiones asociadas principalmente a infecciones bacterianas. Muchas de estas bacterias son consideradas patógenos potenciales o secundarios que en el caso de coinfecciones, como puede ser PCV2, que comprometan el estado inmunitario del animal, pueden dar lugar a procesos sistémicos o agravar las lesiones causadas por otros agentes. Al mismo tiempo, se considera que la coinfección con bacterias, puede ser uno de los cofactores importantes que contribuyen al desarrollo de PCVD (Chang et al., 2006).

En cuanto a CAR-bacillus, no se considera un patógeno primario, pero puede predisponer y potenciar la acción de otros agentes patógenos como *Pasteurella multocida* o

Mycoplasma spp. En nuestro caso, de 15 animales positivos, 13 también lo fueron a algún tipo de bacteria, y de los 5 negativos a CAR-bacillus, los 5 fueron positivos a algún tipo de bacteria. Respecto a la parasitaciones, en nuestro estudio, la más frecuente fue la balantidiasis, observándose en uno de los casos una severa parasitación asociada con un severo marcaje frente a PCV2 en el intestino, por lo que es posible que la infección por PCV2 a ese nivel exacerbara la parasitación.

Tomando todo en conjunto, este estudio refleja las complejas interacciones existentes entre múltiples y diversos patógenos, (principalmente PCV2, PRRSV y diversas bacterias) y sus diferentes efectos en el desarrollo de PCVD, no siendo posible determinar la contribución patogénica individual de cada agente en el cuadro general. En este caso, el PCV2 puede considerarse el agente etiológico principal dando lugar a PCVD-SD, en asociación con otros virus y bacterias, principalmente PRRSV, que han contribuido de forma variable al desarrollo de PCVD y al aumento de mortalidad en la granja.

6 CONCLUSIONES



1. La estandarización de diversos anticuerpos monoclonales específicos anti-PCV2 y anti-ADV, elaborados por los laboratorios Ingenasa S.A., permitió determinar las condiciones óptimas para obtener resultados reproducibles y consistentes. Los mejores resultados se obtuvieron con los anticuerpos monoclonales anti-PCV2 (36A9) y anti-ADV (2CF2) en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina.
2. Las principales células donde se detectó inmunorreacción frente a PCV2 fueron las de la línea histiocítica. El antígeno de PCV2 se detectó con más frecuencia en el tejido linfoide, donde se produjeron las lesiones más características (histiocitosis, depleción linfoide, presencia de cuerpos de inclusión y células gigantes multinucleadas) seguido de pulmón, intestino, hígado y riñón, no habiéndose detectado en corazón ni tejido nervioso.
3. La detección de PCV2 en sangre permitió identificar animales virémicos en un alto porcentaje (84%). El uso combinado de IHQ y de PCR-ELISA mejoró la caracterización del estadio de la enfermedad, permitiendo clasificar a los animales en diferentes fases: subclínica-inicial, subaguda y crónica-resolución.
4. Mediante la combinación de la graduación (leve, moderada y severa) de las lesiones histológicas (depleción linfoide e histiocitosis) y de la cantidad de antígeno de PCV2 detectado en linfonodos, tonsila y bazo, se pudo definir el estadio de la infección en la que se encontraban los animales aplicando una clasificación basada en modelos experimentales.
5. La mayor severidad de lesiones histológicas se observó en el linfonodo ilíaco. La detección inmunohistoquímica de PCV2 fue muy similar en los linfonodos estudiados, aunque levemente mayor en el linfonodo ilíaco, lo que indica que el tejido linfoide es el tejido diana para PCV2. La detección de antígeno de PCV2 en pulmón e intestino y en menor medida en hígado, junto con la presencia de lesiones histológicas características contribuyó al diagnóstico de PCVD.

6. La utilización de diferentes métodos de diagnóstico para la detección de PRRSV, permitió identificar animales virémicos. Fue el agente vírico más frecuentemente asociado a PCV2 a nivel pulmonar, si bien no pudo demostrarse un efecto sinérgico entre ambos virus.
7. La presencia de animales seropositivos a ADV gE indicaría el contacto con el virus salvaje, pudiendo estar en un estadio temprano de la infección o con una infección latente, ya que ninguno de ellos mostró lesiones histológicas compatibles con ADV.
8. Mediante análisis microbiológico e inmunohistoquímico se detectaron diversos tipos de bacterias, siendo *Streptococcus suis* tipo II la más frecuentemente aislada, mientras que géneros de la familia *Pasteurellaceae* fueron los más frecuentemente detectados en pulmón. Muchas de las bacterias detectadas son consideradas patógenos potenciales o secundarios en el caso de coinfecciones que comprometan el estado inmunitario del animal, como PCV2, desarrollando lesiones de poliserositis, bronconeumonía purulenta, abscesos o linfadenitis supurativa.
9. La presencia de *Balantidium* spp. en un elevado porcentaje, junto con un severo marcaje frente a antígeno de PCV2 en la mucosa intestinal y tejido linfoide asociado, apoyaría la hipótesis de que los animales con PCVD son más susceptibles a infecciones secundarias resultado de un estado de inmunosupresión, aunque esta coexistencia podría ser circunstancial dada la alta prevalencia de este parásito en el ganado porcino.
10. Este estudio refleja las complejas interacciones existentes entre múltiples y diversos patógenos (principalmente PCV2, PRRSV y diversas bacterias) en el desarrollo de un amplio espectro de lesiones, no siendo posible determinar en infección natural la contribución individual de cada agente en el cuadro general. En este caso, el PCV2 fue el agente etiológico más frecuente y con mayor cantidad de antígeno presente en las lesiones, dando lugar a PCVD-SD, en asociación con otros virus y bacterias, principalmente PRRSV, que han contribuido de forma variable al desarrollo clínico de PCVD y al aumento de la mortalidad en la granja.

7 RESUMEN



El circovirus porcino tipo 2 (PCV2), perteneciente a la familia *Circoviridae*, es considerado el agente causal esencial de un grupo de enfermedades multifactoriales agrupadas bajo el nombre de enfermedades por circovirus porcino (PCVD) entre las que destaca el Síndrome Multisistémico de Adelgazamiento Postdestete (PMWS, Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome) también denominado enfermedad sistémica por circovirus (PCV2-SD, PCV-2 systemic disease). Es uno de los patógenos del ganado porcino más importantes a nivel mundial, causante de grandes pérdidas económicas en dicha industria.

Las principales lesiones histológicas de PCVD tienen lugar en los tejidos linfoides y consisten en depleción linfocitaria e histiocitosis, sugiriendo un estado de inmunosupresión en los cerdos enfermos.

Los criterios de diagnóstico de PCV2-SD/PMWS están muy bien definidos e incluyen la presencia de signos clínicos tales como retraso del crecimiento y adelgazamiento, frecuentemente con disnea, presencia de lesiones histológicas características en los tejidos linfoides y detección de moderada a elevada cantidad de PCV2 en las lesiones en los tejidos linfoides y otros tejidos de los cerdos afectados.

Esto no excluye la presencia concomitante de otras enfermedades o coinfecciones con PCV2-SD/PMWS, las cuales juegan un importante papel en el desarrollo de PCVD, tanto a nivel experimental como en infecciones naturales, teniendo un efecto potenciador. Diferentes estudios realizados indican que el diagnóstico y control de otros agentes infecciosos encontrados en cerdos con PCVD disminuyen la gravedad del cuadro clínico-lesional.

En el presente trabajo se estudiaron las posibles causas del aumento de la tasa de mortalidad en una granja de porcino, que afectaba a lechones de dos meses de edad. Los principales signos clínicos observados fueron retraso en el crecimiento, adelgazamiento, taquipnea, disnea y, en algunos casos, diarrea. Se analizaron un total de 25 animales, realizando la necropsia reglada y toma muestras de diversos tejidos así como de sangre para su estudio histopatológico, histoquímico, inmunohistoquímico, molecular, microbiológico y serológico.

Se utilizó la técnica de inmunohistoquímica para la detección de PCV2, PRRSV, ADV, Mh, *Pasteurella* spp., *M. haemolítica* y *P. multocida*, y la técnica de PCR-ELISA para la determinar la presencia de PCV2 y PRRSV. Mediante serología se analizó la existencia de anticuerpos frente a ADV, MR, PPV, PRRSV, App y Mh. Además, se determinó la presencia del CAR-bacillus mediante la técnica histoquímica de Warthin-Starry (W-S).

Se evaluó el grado de depleción linfoide, el grado de infiltrado histiocítico y la cantidad de antígeno de PCV2 en los linfonodos inguinales superficiales, ilíacos, mediastínicos y mesentéricos, tonsila y bazo para determinar el estadio de la infección y severidad de PMWS/PCV2-SD en la que se encontraban los animales, aplicando una clasificación basada en modelos experimentales. Así, 21 animales presentaron PCVD en alguna de sus fases (subclínica, aguda, crónica o resolución-convalecencia), mientras que los 4 animales restantes tuvieron un cuadro no relacionado con PCV2.

Las principales lesiones observadas en el tejido linfoide fueron depleción linfoide, infiltrado histiocítico y, en menor medida, presencia de células gigantes multinucleadas y cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos botrioides, basófilos, en macrófagos. El tejido linfoide fue donde más frecuentemente se detectó antígeno de PCV2. También se detectó antígeno de PCV2 en pulmón e intestino y, en menor proporción, en hígado y riñón.

En el pulmón, las principales lesiones observadas fueron bronconeumonía purulenta y neumonía intersticial, detectándose PCV2, PRRSV y Mh de forma individual, siendo más frecuente la coinfección PCV2-PRRSV. También se detectó CAR-bacillus, principalmente en tráquea, así como otros tipos de bacterias, siendo *Streptococcus suis* tipo II la más frecuentemente aislada de forma general, mientras que la familia *Pasteurellaceae* fue la más detectada en pulmón. Así mismo se detectaron anticuerpos frente a Mh, PRRSV, ADV y APP.

Este estudio refleja las complejas interacciones existentes entre múltiples y diversos patógenos (principalmente PCV2, PRRSV y diversas bacterias) en el desarrollo de un amplio espectro de lesiones, no siendo posible determinar en infección natural la contribución individual de cada agente en el cuadro general. En este caso, el PCV2 fue el agente etiológico más frecuente y con mayor cantidad de antígeno presente en las lesiones, dando lugar a PCVD-SD, en asociación con otros virus, principalmente PRRSV, y bacterias, que han contribuido de forma variable al desarrollo clínico de PCVD y al aumento de la mortalidad en la granja.

8 SUMMARY



The porcine circovirus type 2 (PCV 2), member of the Circoviridae family, is considered the main causative agent of a group of multifactor diseases, referred as "porcine circovirus diseases" (PCVD). Diseases such as the Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS), also known as PCV-2 systemic disease (PCV2-SD), are included in this large group. PCV2 is one of the major porcine pathogens worldwide, causing enormous economical losses in the swine industry.

The main lesions observed in PCVD occur in lymphoid tissues, causing lymphoid depletion and histiocytosis, suggesting an immunosuppressive status in the affected animals.

The PCV2-SD/PMWS diagnostic criteria are well established and include the presence of clinical signs such as stunting, decreased rate of weight gain, anorexia and often dyspnea. Furthermore, characteristic histological lesions in lymphoid tissue and a moderate to elevated PCV2 detection in tissues are taken as diagnostic.

This does not exclude the presence of concomitant pathogens or coinfection with PCV2-SD/PMWS, which may play an important role and aggravate the in PCVD evolution. Detection and control of other agents has proven to decrease severity of the clinical symptoms.

This study aimed to evaluate the causes of an increased mortality rate in 2-month-old piglets in a pig farm. The main observed clinical signs were stunting, anorexia, tachypnea, dyspnea and occasionally, diarrhea. Twenty five animals were necropsied and samples from various tissues and blood were collected for histopathological, histochemical, immunohistochemical, molecular, microbiological and serological assays.

Immunohistochemistry was performed to detect PCV2, PRRSV, ADV, Mh, *Pasteurella* spp., *Mannheimia haemolytica* and *P. multocida*. Furthermore, PCR-ELISA was used to determine PCV2 and PRRSV and serology to identify antibodies against ADV, MR, PPV, PRRSV, App and Mh. The presence of Cilia Associated respiratory Bacillus (CAR-bacillus) was observed through the Warthin-Starry (W-S) histochemistry technique.

The extent and severity of lymphoid depletion, histiocytic infiltration and amount of PCV2 antigen were evaluated in the superficial inguinal, iliac, mediastinal and mesenteric lymph nodes, as well as tonsil and spleen, to determine the severity of PMWS/PCV2-SD. Twenty one individuals presented some form of PCVD (subclinic, acute, chronic, or resolution-convalescence), while the remaining 4 had a non-related PCV2 disease.

The main lymphoid lesions observed were lymphoid depletion, histiocytic infiltration and, less commonly, the presence of multinucleated giant cells and basophilic botrioid, intracitoplasmatic inclusion bodies in macrophages. PCV2 antigen was most frequently detected in lymphoid tissue although it was also observed in lung, intestines and, more rarely, liver and kidney.

In the lung, the main lesions observed were purulent bronchopneumonia, interstitial pneumonia, with a low PCV2, PRRSV and Mh as single infection, but being PCV2-PRRSV coinfection more common. CAR-bacillus was mostly found in trachea, as well as various bacteria, being generally *Streptococcus* type II the most common, while the *Pasteurellaceae* family was the most frequently detected in lung. Likewise, antibodies against Mh, PRRSV, ADV and APP were identified.

This study shows the complex interactions between various pathogens (mainly PCV2, PRRSV and multiple bacteria), and the wide range of lesions presented. In natural infection this hinders the possibility to determine each agent's contribution to the general state. In this case, PCV2 was the most consistent and frequently detected etiologic agent in the lesions, causing PCVD-SD. This agent, along with other virus, mainly PRRSV, and bacteria have variably contributed in PCVD development and in a higher mortality rate in the farm.

9 ABREVIATURAS



µm: micrómetro.

µl.: microlitro

Ac: anticuerpo.

ADV: Aujeszky disease virus, virus de la enfermedad de Aujeszky.

AEC: 3-amino-9-etilcarbazol.

Ag: antígeno.

App: *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

AV: aislamiento vírico.

BALT: bronchus-associated lymphoid tissue, tejido linfoide asociado a bronquios.

BFDV: Beak and Feather Disease Virus, virus de la enfermedad del pico y las plumas.

CAR-bacillus: Cilia-Associated Respiratory Bacillus.

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

CT: congenital tremor, temblor congénito.

DAB: diamobenzidina.

DC: dendritic cell, célula dendrítica.

DO: densidad óptica

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Inmunoensayo ligado a enzima.

g: gramo

GALT: gut-associated lymphoid tissue, tejido linfoide asociado a intestino.

H-E: Hematoxilina-Eosina.

IF: inmunofluorescencia.

IFA: indirect immunofluorescence antibody assay, inmunofluorescencia indirecta.

IHQ: inmunohistoquímica.

IL: linfonodo iliaco.

IS: linfonodo inguinal superficial.

ISH: in situ hybridization, hibridación in situ.

IPMA: indirect immunoperoxidase monolayer assay, ensayo de inmunoperoxidasa en monocapa.

Kb: kilobase

kDa: kilodalton

Mh: *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Min: minuto

MD: linfonodo mediastínico.

ml: mililitro.

mg: miligramo

MR: Mal rojo.

MS: linfonodo mesentérico.

NIPC: natural interferon-producing cells, células productoras de interferón natural.

nm: nanómetro

°C: Grado centígrado.

ORF: open reading frame, marco de lectura abierta.

Pb: pares de bases.

PBMC: peripheral blood mononuclear cells, células mononucleares de la sangre periférica.

PBS: fosfato buffer salino.

PCR: polymerase chain reaction, reacción de polimerasa en cadena

PCV: porcine circovirus, circovirus porcino.

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

PCV2-ED: PCV2 enteric disease, enteritis por PCV2.

PCV2-LD: PCV2 lung disease, enfermedad respiratoria por PCV2.

PCV2-RD: PCV2 reproductive disease, fallo reproductivo por PCV2.

PCV2-SD: PCV2 systemic disease, enfermedad sistémica por PCV2.

PCV2-SI: PCV2 subclinical infection, infección subclínica por PCV2.

PCVD: porcine circovirus diseases, enfermedades por circovirus.

pH: menos logaritmo de la concentración de protones.

PDNS: porcine dermatitis and nephropathy syndrome, síndrome de dermatitis y nefropatía porcina.

PMWS: postweaning multisystemic wasting syndrome, síndrome multisistémico de adelgazamiento postdestete.

PNP: proliferative and necrotizing pneumonia, neumonía proliferativa y necrotizante.

PO: peroxidasa.

PPV: porcine parvovirus, parvovirus porcino.

PRDC: porcine respiratory disease complex, complejo de enfermedad respiratoria porcina.

PRRS: porcine reproductive and respiratory syndrome, síndrome respiratorio y reproductor porcino.

PRRSV: porcine reproductive and respiratory syndrome virus, virus del síndrome respiratorio y reproductor porcino.

RFLP: restriction fraction length polymorphism, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción.

rpm: revoluciones por minuto.

SBP: Complejo Streptavidina-Biotina-Peroxidasa.

SIV: swine influenza virus, virus de la influenza porcina.

SNC: Sistema nervioso central.

SPF: specific pathogen free, libre de patógenos específicos.

Spp: Especies.

TBE: Tris Borate EDTA

V: voltio.

W-S: Warthin Starry.

10 AGRADECIMIENTOS



Creo que es bien sabido que una tesis no es trabajo de uno solo sino que es fruto del esfuerzo, buen hacer y empeño de numerosas personas.

Por ello quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a la Dr. Marisa Andrada, directora de esta tesis, por haber creído en mi más que yo mismo, y por haber confiado en el buen fin de todo este trabajo.

Al Prof. Dr. Antonio Fernández por haberme dado la oportunidad de entrar en este mundo de la Anatomía Patológica Veterinaria y haber tenido la paciencia necesaria para ver finalizada esta tesis.

A los Profs. Drs. Antonio Espinosa de los Monteros, Pedro Herráez y Francisco Rodríguez, por sus enseñanzas. Les debo gran parte de mi formación.

Así mismo quisiera agradecer a mi familia y a todas esas personas que ha estado a mi lado en uno u otro momento, tanto a nivel profesional como personal, que me han ayudado, apoyado, animado, soportado y sufrido. Sabéis quienes sois.

A ninguno nombro y a ninguno olvido.

11 BIBLIOGRAFÍA



Alarcon P, Rushton J, Wieland B. 2013. Cost of post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type-2 subclinical infection in England - An economic disease model. *Prev Vet Med.* 2013. 110(2): 88-102.

Albina E., Cariolet R., Eveno E., Hutet E., Madec F. 1996. Premiers Resultats du Cneva Sur de Deperissement Fatal du Porcelet en Fin De Post-Sevrage. *La semaine vétérinaire des filières (Suppl Sem Vet).* 834: 1-2.

Alexopoulos C, Kritas SK, Kyriakis CS, Tzika E, Kyriakis SC .2005. Sow performance in an endemically porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)-infected farm after sow vaccination with an attenuated PRRS vaccine. *Vet Microbiol.* 111(3-4):151–157.

Allan GM, Mackie DP, McNair J, Adair BM, McNulty MS. 1994a. Production, preliminary characterisation and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus. *Vet Immunol Immunopathol.* 43(4): 357-371.

Allan GM, McNeilly F, Foster JC, Adair BM. 1994b. Infection of leucocyte cell cultures derived from different species with pig circovirus. *Vet Microbiol.* 41(3): 267-279.

Allan GM, Phenix KV, Todd D, McNulty MS. 1994c. Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. *J Vet Med B.* 41(1): 17-26.

Allan GM, McNeilly F, Cassidy JP, Reilly GAC, Adair B, Ellis WA, McNulty MS. 1995. Pathogenesis of porcine circovirus: experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. *Vet Microbiol.* 44(1): 49-64.

Allan GM, McNeilly F, Kennedy S, Daft B, Clarke EG, Ellis JA, Haines DM, Meehan BM, Adair BM. 1998a. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J Vet Diagn Invest.* 10(1): 3-10.

Allan GM, Meehan B, Todd D, Kennedy S, McNeilly F, Ellis J, Clark EG, Harding J, España E, Botner A, Charreyre C. 1998b. Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. *Vet Rec.* 142(17): 467-468.

Allan GM, Kennedy S, McNeilly F, Foster JC, Ellis JA, Krakowka SJ, Meehan BM, Adair BM. 1999a. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J Comp Pathol.* 121(1): 1-11.

Allan GM, McNeilly F, Meehan BM, Kennedy S, Mackie DP, Ellis JA, Clark EG, España E, Saubi N, Riera P, Botner A, Charreyre CE. 1999b. Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. *Vet Microbiol.* 66(2): 115-123.

Allan GM, Ellis JA. 2000. Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest.* 12(1): 3-14.

Allan GM, McNeilly F, Ellis J, Krakowka S, Meehan B, McNair I, Walker I, Kennedy S. 2000a. Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. *Arch Virol.* 145: 2421-2429.

Allan GM, McNeilly E, Kennedy S, Meehan B, Moffett D, Malone F, Ellis J, Krakowka S. 2000b. PCV-2-associated PDNS in Northern Ireland in 1990. *Vet Rec.* 146(24): 711-712.

Allan GM, McNeilly F, McNair I, Curran MD, Walker I, Ellis J, Konoby C, Kennedy S, Meehan B. 2000c. Absence of evidence for porcine circovirus type 2 in cattle and humans, and lack of seroconversion or lesions in experimentally infected sheep. *Arch Virol.* 145: 853-857.

Allan GM, McNeilly F, Meehan BM, Ellis JA, Connor TJ, McNair I, Krakowka S, Kennedy S. 2000d. A sequential study of experimental infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus: immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J Vet Med B.* 47: 81-94.

Allan GM, McNeilly F, McNair I, O'Connor M, Meehan B, Gilpin D, Ellis J, Townsend H, Lasagna C, Boriosi G, Krakowka S. 2001. Neonatal vaccination for *Mycoplasma hyopneumoniae* and post-weaning multisystemic wasting syndrome: a field trial. *Pig J.* 48: 34-41.

Allan GM, Krakowka S, Ellis J. 2002a. PCV2; ticking time bomb?. *Pig Progress.* 18: 14-15.

Allan G, McNeilly F, McNair I, Meehan B, Marshall M, Ellis J, Lasagna C, Boriosi G, Krakowka S, Reynaud G, Boeuf-Tedeschi L, Bublot M and Charreyre C. 2002b. Passive transfer of maternal antibodies to PCV2 protects against development of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): experimental infections and a field study. *Pig Journal.* 50: 59-67.

Allan G, McNeilly F, Meehan B, McNair I, Ellis J, Krakowka S, Fossum C, Watrang E, Wallgren P, Adair B. 2003. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs experimentally inoculated with a Swedish porcine circovirus 2 isolate. *J Vet Diagn Invest.* 15(6): 553-560.

Amanfu W, Weng CN, Ross RF, Barnes HJ. 1984. Diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine: sequential study by direct immunofluorescence. *Am J Vet Res.* 45: 1349-1352.

An SF, Fleming KA. 1991. Removal of inhibitor(s) of the polymerase chain reaction from formalin fixed, paraffin wax embedded tissues. *J Clin Pathol.* 44(11): 924-927.

Andrada M, Sarradell J, Ramírez AS, Segalés J, Rodríguez F, Fernández A. 2000. First report of porcine circovirus associated with porcine respiratory reproductive syndrome in the Canary Islands. *Proceedings of the 18th European Society of Veterinary Pathology (ESPV).* p.251.

Andrada, M. 2001. Estudio etiopatogénico de la neumonía enzoótica porcina (NEP). Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

- Angen O, Quirie M, Donachie W, Bisgaard M. 1999. Investigations on the species specificity of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* serotyping. *Vet Microbiol.* 65(4): 283-290.
- Armstrong D and Bishop SC. 2004. Does genetics or litter effect influence mortality in PMWS. In: Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress, p. 809.
- Baekbo P, Hassing AG, Olsen P, Lorenzen B, Wachmann H, Lauridsen C. 2004. Vitamin E and postweaning mortality in PMWS affected herds. In: Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress. p. 62.
- Balasz M, Segalés J, Rosell C, Domingo M, Mankertz A, Urniza A, Plana-Durán J. 1999. Experimental Inoculation of Conventional Pigs with Tissue Homogenates from Pigs with Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome. *J Comp Path.* 121(2): 139-148.
- Barsoum RS. 2004. Parasitic Infections in Organ Transplantation. *Exp Clin Transplant.* 2(2): 258-267.
- Bascuñana CR, Belák K. 1996. Detection and identification of mycobacteria in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by nested PCR and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* 34(10): 2351-2355.
- Bassaganya-Riera J, Pogranichniy RM, Jobgen SC, Halbur PG, Yoon KJ, O'Shea M, Mohede I, Hontecillas R. 2003. Conjugated linoleic acid ameliorates viral infectivity in a pig model of virally induced immunosuppression. *J Nutr.* 133(10): 3204-3214.
- Bassami MR, Berryman D, Wilcox GE, Raidal SR. 1988. Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses, and chicken anaemia virus. *Virology.* 249(2): 453-459.
- Ben-Ezra J, Johnson DA, Rossi J, Cook N, Wu A. 1991. Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. *J Histochem Cytochem.* 39(3): 351-354.
- Bergottini R, Mattiello S, Crippa L, Scanziani E. 2005. Cilia-associated respiratory (CAR) bacillus infection in adult red deer, chamois, and roe deer. *J Wildl Dis.* 41(2): 459-462.
- Blanchard P, Mahé D, Cariolet R, Truong C, Le Dimna M, Arnauld C, Rose N, Eveno E, Albina E, Madec F and Jestin A. 2003. An ORF2 protein-based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Microbiol.* 94: 183-194.
- Bogdan J, West K, Clark E, Konoby C, Haines D, Allan G, McNeilly F, Meehan B, Krakowka S, Ellis JA. 2001. Association of porcine circovirus 2 with reproductive failure in pigs: a retrospective study, 1995-1998. *Can Vet J.* 42(7): 548-550.

- Bolin SR, Stoffregen WC, Nayar GP, Hamel AL. 2001. Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrum-deprived piglets with type 2 porcine circovirus. *J Vet Diagn Invest.* 13(3): 185-194.
- Bolt DM, Häni H, Müller E, Waldvogel AS. 1997. Non-suppurative myocarditis in piglets associated with porcine parvovirus infection. *J Comp Pathol.* 117(2): 107-118.
- Borel N, Bürgi E, Kuipel M, Stevenson GW, Mittal SK, Pospischil A, Sydler T. 2001. Three cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) due to porcine circovirus type 2 (PCV2) in Switzerland. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde.* 143: 249-255.
- Brown CC, Baker DC, Barker IK. 2007. Alimentary system. In: Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals 5th Edition. Vol 2. pp.1-296. Elsevier Saunders. New York, NY.
- Brunborg IM, Moldal T, Jonassen CM. 2004. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based realtime PCR. *J Virol Methods.* 122(2): 171-178.
- Brunborg IM, Jonassen CM, 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(4): 368-375.
- Bukovsky C, Schmoll F, Revilla-Fernández S, Weissenböck H. 2007. Studies on the aetiology of non-suppurative encephalitis in pigs. *Vet Rec.* 161(16): 552-558.
- Burch, D. 2007. Costs of PCV2 Infection in Finishing Pigs and Potential Benefits of Vaccination. *Pig Clinical Pharmacological Swine.* <http://www.octagon-services.co.uk/articles/PCV2costs.htm>
- 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(5): 1848-1850.
- Calsamiglia M, Fraile L, Espinal A, Cuxart A, Seminati C, Martín M, Mateu E, Domingo M, Segalés J. 2007. Sow porcine circovirus type 2 (PCV2) status effect on litter mortality in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Res Vet Sci.* 82(3): 299-304.
- Caniatti M, Crippa L, Giusti M, Mattiello S, Grilli G, Orsenigo R, Scanziani E. 1998. Cilia-associated respiratory (CAR) bacillus infection in conventionally reared rabbits. *J Vet Med B.* 45(6): 363-371.
- Cao S, Chen H, Zhao J, Lü J, Xiao S, Jin M, Guo A, Wu B, He Q. 2005. Detection of porcine circovirus type 2, porcine parvovirus and porcine pseudorabies virus from

pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome by multiplex PCR. *Vet Res Commun.* 29(3): 263-269.

Caprioli A, McNeilly F, McNair I, Lagan-Tregaskis P, Ellis J, Krakowka S, McKillen J, Ostanello F, Allan G. 2006. PCR detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in blood, tonsillar and faecal swabs from experimentally infected pigs. *Res Vet Sci.* 81(2): 287-292.

Carman S, McEwen B, DeLay J, van Dreumel T, Lusi P, Cai H, Fairles J. 2006. Porcine circovirus-2 associated disease in swine in Ontario (2004 to 2005). *Can. Vet. J.* 47: 761-762.

Carman S, Cai HY, DeLay J, Youssef SA, McEwen BJ, Gagnon CA, Tremblay D, Hazlett M, Lusi P, Fairles J, Alexander HS, van Dreumel T. 2008. The emergence of a new strain of porcine circovirus-2 in Ontario and Quebec swine and its association with severe porcine circovirus associated disease--2004-2006. *Can J Vet Res.* 72(3): 259-268.

Carrasco L, Segalés J, Bautista MJ, Gómez-Villamandos JC, Rosell C, Ruiz-Villamor E, Sierra MA. 2000. Intestinal chlamydial infection concurrent with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Vet Rec.* 146: 21-23.

Castro AM, Cortez A, Ruiz VL, Leomil H, Moreno AM, Doto DS, Richtzenhain LJ. 2004. Detection and differentiation of porcine circoviruses in Brazilian pigs. *Vet Rec.* 154(23): 728-729.

Caswell JL, Williams KJ. 2007. Respiratory system. In: Jubb, Kennedy & Palmer's *Pathology of Domestic Animals* 5th Edition. Vol 2. pp.523-653. Elsevier Saunders. New York, NY.

Celer Jr. V, Carasova P. 2002. First evidence of porcine circovirus type 2 (PCV-2) infection of pigs in the Czech Republic by seminested PCR. *J Vet Med B.* 49(3): 155-159.

Cha SH, Chang CC, Yoon KJ. 2004. Instability of the restriction fragment length polymorphism pattern of open reading frame 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during sequential pig-to-pig passages. *J Clin Microbiol.* 42(10): 4462-4467.

Chae C. 2004. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. *Vet J.* 168(1): 41-49.

Chae, C. 2005. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet J.* 169(3): 326-336.

Chang HW, Pang VF, Chen LJ, Chia MY, Tsai YC, Jeng CR. 2006. Bacterial lipopolysaccharid induces porcine circovirus type 2 replication in swine alveolar macrophages. *Vet Microbiol.* 2006. 115(4): 311-319.

- Chen SP, Weng YJ, Tsai CP, Chang WF, Li NJ, Tsai CE, Chiou MT. 2001. Identification of pathogenic porcine circovirus in pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome in Taiwan. *J. Chin. Soc. Vet. Sci.* 27: 251-255.
- Cheng CC, Lee YF, Lin NN, Wu CL, Tung KC, Chiu YT. 2011. Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia in Swine associated with porcine circovirus type 2 infection. *J Biomed Biotechnol.* 2011: 245728.
- Cheung AK, Lager KM, Kohutyuk OI, Vincent AL, Henry SC, Baker RB, Rowland RR, Dunham AG. 2007. Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. *Arch Virol* 152: 1035-1044.
- Chianini F, Majó N, Segalés J, Domínguez J, Domingo M. 2003. Immunohistochemical characterisation of PCV2 associate lesions in lymphoid and non-lymphoid tissues of pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol.* 94(1-2): 63-75.
- Cho JG, Dee SA. 2006. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology.* 66(3): 655-662
- Choi C, Chae C. 1999. In-situ Hybridization for the Detection of Porcine Circovirus in Pigs with Postweaning Multisystemic Wasting Síndrome. *J Comp Path.* 121: 265-270.
- Choi C, Chae C. 2000a. Distribution of porcine parvovirus in porcine circovirus 2-infected pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome as shown by in-situ hybridization. *J Comp Pathol* 123: 302-305.
- Choi C, Chae C, Clark EG. 2000b. Porcine postweaning multisystemic wasting syndrome in Korean pig: detection of porcine circovirus 2 infection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest.* 12(2): 151-153.
- Choi C, Chae C. 2001. Colocalization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2 in porcine dermatitis and nephrology syndrome by double-labeling technique. *Vet Pathol.* 38(4): 436-441.
- Choi J, Stevenson GW, Kiupel M, Harrach B, Anothayanontha L, Kanitz CL, Mittal SK. 2002. Sequence analysis of old and new strains of porcine circovirus associated with congenital tremors in pigs and their comparison with strains involved with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res.* 66(4): 217-224.
- Choi YK, Goyal SM, Joo HS. 2003. Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs. *Can Vet J.* 44(9): 735-737.
- Chung WB, Chan WH, Chaung HC, Lien Y, Wu CC, Huang YL. 2005. Real-time PCR for quantitation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 in naturally-infected and challenged pigs. *J Virol Methods.* 124(1-2): 11-19.
- Clark E. 1996a. Post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Proc Western Can Assoc Swine Pract.* pp.19-20.

Clark E. 1996b. Pathology of the post-weaning multisystemic wasting syndrome of pigs. *Proc West Can Assoc Swine Pract.* pp.22-25.

Clark EG. 1997. Postweaning multisystemic wasting syndrome. *Proc Am Assoc Swine Pract.* pp.499-501.

Corrêa AM, Zlotowski P, de Barcellos DES, da Cruz CE, Driemeier D. 2007. Brain lesions in pigs affected with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Vet Diagn Invest.* 19(1): 109-112.

Corrégé I, Pirouelle D, Gaudré D, LeTiran MH. 2001. La Maladie de l'Amaigrissement du Porcelet (MAP): influence de différents paramètres zootechniques sur son incidence dans un élevage expérimental (A study on the influence of various animal husbandry criteria on the occurrence of PMWS in an experimental pig farm). *Journées de la Recherche Porcine de France.* 33: 283-290.

Cortey M, Olvera A, Grau-Roma L, Segalés J. 2011. Further comments on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and nomenclature. *Vet Microbiol.* 149(3-4): 522-523.

Cottrell TS, Friendship RM, Dewey CE, Josephson G, Allan G, McNeilly F, Walker I. 1999. Epidemiology of Post-weaning Multi-systemic Wasting Syndrome in Ontario. *Proc Am Assoc Swine Pract.* 1999: 389-390.

Crowther RA, Berriman JA, Curran WL, Allan GM, Todd D. 2003. Comparison of the structures of three circoviruses: chicken anemia virus, porcine circovirus type 2, and beak and feather disease virus. *J Virol.* 77: 13036-13041.

Csághola A, Cadar D, Tuboly T. 2008. Replication and transmission of porcine circovirus type 2 in mice. *Acta Vet Hung.* 56(3): 421-427.

Cundiff DD, Besch-Williford CL, Hook RR Jr, Franklin CL, Riley LK. 1994. Characterization of cilia-associated respiratory bacillus isolates from rats and rabbits. *Lab Anim Sci.* 44(4): 305-312.

Daft D, Nordhausen RW, Latimer KS, Niagro FD. 1996. Interstitial pneumonia and lymphadenopathy associated with circoviral infection in a 6-week-old pig. *Proc Am Assoc of Vet Lab Diagn.* 39: 32.

Darwich L, Segalés J, Domingo M, Mateu E. 2002. Changes in CD4(+), CD8(+), CD4(+) CD8(+), and immunoglobulin M-positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age-matched uninfected wasted and healthy pigs correlate with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9(2): 236-242.

Darwich L, Balasch M, Plana-Durán J, Segalés J, Domingo M, Mateu E. 2003a. Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in response to mitogen, superantigen or recall viral antigens. *J Gen Virol.* 84(12): 3453-3457.

Darwich L, Pie S, Rovira A, Segalés J, Domingo M, Oswald IP, Mateu E. 2003b. Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Gen Virol.* 84: 2117-2125.

Darwich L, Segalés J, Mateu E. 2004. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: An immune riddle. *Arch Virol.* 149(5): 857-874.

De Boisséson C, Béven V, Bigarré L, Thiéry R, Rose N, Eveno E, Madec F, Jestin A. 2004. Molecular characterization of Porcine circovirus type 2 isolates from postweaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs. *J Gen Virol.* 85(Pt 2): 293-304.

DeLay J, McEwen B, Carman S, van Dreumel T, Fairles J. 2005. Porcine circovirus type 2-associated disease is increasing. *AHL Newsletter.* 9: 22.

Dewey CE, Johnston WT, Gould L, Whiting TL. 2006. Postweaning mortality in Manitoba swine. *Can J Vet Res.* 70(3): 161-167.

Donadeu M, Waddilove J, Marco E. 2003. European management strategies to control postweaning multisystemic wasting syndrome. In: *Proceedings of the Allen D. Lemman Swine Conference.* pp. 136–142.

Drew TW, Grierson SS, King DP, Hicks D, Done S, Naser JA, Evans DP, Grimbeek P, Banks M. 2004. Genetic similarity between porcine circovirus type 2 isolated from the first reported case of PMWS in South Africa and North American isolates. *Vet Rec.* 155(5): 149-151.

Drolet R, Thibault S, D'Allaire S, Thomson JR, Done SH. 1999. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS): an overview of the disease. *J Swine Health Prod.* 7(6): 283-285.

Drolet R, Larochelle R, Morin M, Delisle B, Magar R. 2003. Detection rates of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, Porcine Circovirus Type 2, and Swine Influenza Virus in Porcine Proliferative and Necrotizing Pneumonia. *Vet Pathol.* 40: 143-148.

Drolet R, Cardinal F, Houde A, Gagnon CA. 2011. Unusual central nervous system lesions in slaughter-weight pigs with porcine circovirus type 2 systemic infection. *Can Vet J.* 52(4): 394-397.

Dulac GC, and Afshar A. 1989. Porcine Circovirus Antigens in PK-15 Cell Line (ATCC CCL-33) and Evidence of Antibodies to Circovirus in Canadian Pigs. *Can J Vet Res.* 53:431-433.

Dupont K, Nielsen EO, Bækbo P and Larsen LE. 2008. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Vet Microbiol.* 128: 56-64.

Edwards S, Sands JJ. 1994. Evidence of circovirus infection in British pigs. *Vet Rec.* 134(26): 680-681.

Ellis J, Hassard L, Clark E, Harding J, Allan G, Willson P, Strokappe J, Martin K, McNeilly F, Meehan B, Todd D, Haines D. 1998. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can Vet J.* 39: 44-51.

Ellis J, Krakowka S, Allan G, Clark E, Kennedy S. 1999a. The Clinical Scope of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection has Expanded Since 1987: An Alternative Perspective. *Vet Pathol.* 36(3): 262-265.

Ellis J, Krakowka S, Lairmore M, Haines D, Bratanich A, Clark E, Allan G, Konoby C, Hassard L, Meehan B, Martin K, Harding J, Kennedy S, McNeilly F. 1999b. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *J Vet Diagn Invest.* 11(1): 3-14.

Ellis JA, Bratanich A, Clark EG, Allan G, Meehan B, Haines DM, Harding J, West KH, Krakowka S, Konoby C, Hassard L, Martin K, McNeilly F. 2000a. Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Vet Diagn Invest.* 12(1): 21-27.

Ellis JA, Wiseman BM, Allan G, Konoby C, Krakowka S, Meehan BM, McNeilly F. 2000b. Analysis of seroconversion to porcine circovirus 2 among veterinarians from the United States and Canada. *J Am Vet Med Assoc.* 217(11): 1645-1646.

Ellis JA, Konoby C, West KH, Allan GM, Krakowka S, McNeilly F, Meehan B, Walker I. 2001. Lack of antibodies to porcine circovirus type 2 virus in beef and dairy cattle and horses in western Canada. *Can Vet J.* 42: 461-464.

Ellis J, Spinato M, Yong C, West K, McNeilly F, Meehan B, Kennedy S, Clark E, Krakowka S, Allan G. 2003. Porcine circovirus 2-associated disease in Eurasian wild boar. *J Vet Diagn Invest.* 15(4): 364-368.

Ellis J, Clark E, Haines D, West K, Krakowka S, Kennedy S, Allan GM. 2004. Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. *Vet Microbiol.* 98: 159-163.

Fachinger V, Bischoff R, Jedidia SB, Saalmüller A, Elbers K. 2008. The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex. *Vaccine.* 26(11): 1488-1499.

Farzan A, Parrington L, Coklin T, Cook A, Pintar K, Pollari F, Friendship R, Farber J, Dixon B. 2011. Detection and characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. on swine farms in Ontario, Canada. *Foodborne Pathog Dis.* 8(11): 1207-1213.

Fenaux M, Halbur PG, Gill M, Toth TE, Meng XJ. 2000. Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2. *J Clin Microbiol.* 38(7): 2494-2503.

Fenaux M, Halbur PG, Haqshenas G, Royer R, Thomas P, Nawagitgul P, Gill M, Toth TE, Meng XJ. 2002. Cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus is infectious when injected directly into the liver and lymph nodes of pigs: characterization of clinical disease, virus distribution, and pathologic lesions. *J Virol.* 76(2): 541-551.

Fenaux M, Opriessnig T, Halbur PG, Meng XJ. 2003. Immunogenicity and pathogenicity of chimeric infectious DNA clones of pathogenic porcine circovirus type 2 (PCV2) and nonpathogenic PCV1 in weanling pigs. *J Virol.* 77(20): 11232–11243.

Fenaux M, Opriessnig T, Halbur PG, Elvinger F, Meng XJ. 2004a. A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs. *J Virol.* 78(12):6297–6303.

Fenaux M, Opriessnig T, Halbur PG, Elvinger F, Meng XJ. 2004b. Two amino acid mutations in the capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) enhanced PCV2 replication in vitro and attenuated the virus in vivo. *J Virol.* 78: 13440-13446.

Fernández A, Orós J, Rodríguez JL, King J, Poveda JB. 1996. Morphological evidence of a filamentous cilia-associated respiratory (CAR) bacillus in goats. *Vet Pathol.* 33(4): 445-447.

Ferreira D, Sansot B, Laval A. 2001. Attempt to use serotherapy to control mortality in PMWS. In: *Proceedings of the ssDNA Viruses Plants, Birds, Pigs and Primates (ESVV) Meeting.* p. 144.

Fitzgerald-Bocarsly P. 2002. Natural interferon-alpha producing cells: the plasmacytoid dendritic cells. *Biotechniques.* (Suppl.) 16-20,22,24-29: 16-19.

Fonteneau JF, Larsson M, Beignon AS, McKenna K, Dasilva I, Amara A, Liu YJ, Lifson JD, Littman DR, Bhardwaj N. 2004. Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells. *J Virol.* 78(10): 5223-5232.

Fort M, Olvera A, Sibila M, Segalés J, Mateu E. 2007. Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs. *Vet Microbiol.* 125(3-4): 244-255.

Fort M, Sibila M, Allepuz A, Mateu E, Roerink F, Segalés J. 2008. Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins. *Vaccine.* 26(8): 1063-1071.

Fort M, Sibila M, Pérez-Martín E, Nofrarías M, Mateu E, Segalés J. 2009. One dose of a porcine circovirus 2 (PCV2) sub-unit vaccine administered to 3-week-old conventional piglets elicits cell-mediated immunity and significantly reduces PCV2 viremia in an experimental model. *Vaccine.* 27(30): 4031-4037.

Fruergaard, M, Bækbo, P, Enøe, C, Busch, ME, Jensen, K. 2006. Effect of acetylsalicylic acid on mortality and disease prevalence in a PMWS affected herd. In: *Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress.* p 98.

Gagnon CA, Tremblay D, Tijssen P, Venne MH, Houde A, Elahi SM. 2007. The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. *Can Vet J.* 48(8): 811-819.

Gagnon CA, del Castillo JR, Music N, Fontaine G, Harel J, Tremblay D. 2008. Development and use of a multiplex real-time quantitative polymerase chain

reaction assay for detection and differentiation of Porcine circovirus-2 genotypes 2a and 2b in an epidemiological survey. *J Vet Diagn Invest.* 20(5): 545-558.

Ghebremariam MK, Gruys E. 2005. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs with particular emphasis on the causative agent, the mode of transmission, the diagnostic tools and the control measures. A review. *Vet Q.* 27(3): 105-116.

Giammarioli M, Pellegrini C, Casciari C, De Mia GM. 2008. Development of a novel hot-start multiplex PCR for simultaneous detection of classical swine fever virus, African swine fever virus, porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine parvovirus. *Vet Res Commun.* 32(3): 255-262.

Gibbs MJ, Weiller GF. 1999. Evidence that a plant virus switched hosts to infect a vertebrate and then recombined with a vertebrate-infecting virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96(14): 8022-8027.

Gilpin DF, Stevenson LS, McCullough K, Krakowka S, Meehan BM, McNeilly F, Foster C, Adair B, Welsh M, Allan BM. 2001. Studies on the in vitro and in vivo effect of porcine circovirus type 2 infection of porcine monocytic cells. In: *Proceedings of the ssDNA Viruses Plants, Birds, Pigs and Primates (ESVV) Meeting*, p. 97.

Gilpin DF, McCullough K, Meehan BM, McNeilly F, McNair I, Stevenson LS, Foster JC, Ellis JA, Krakowka S, Adair BM, Allan GM. 2003. In vitro studies on the infection and replication of porcine circovirus type 2 in cells of the porcine immune system. *Vet Immunol Immunopathol.* 94(3-4): 149-161.

Gillespie J, Opriessnig T, Meng XJ, Pelzer K, Buechner-Maxwell V. 2009. Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. *J Vet Intern Med.* 23(6): 1151-1163.

Girard C, Morin M, El Azhary Y. 1992. Experimentally induced porcine proliferative and necrotising pneumonia with an influenza A virus. *Vet Rec.* 130(10):206-207.

Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B. 1985. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 130(1): 118-126.

Golenberg EM, Bickel A, Weihs P. 1996. Effect of highly fragmented DNA on PCR. *Nucleic Acids Res.* 24(24): 5026-5033.

Goodwin RFW, Pomeroy AP, Whittlestone P. 1965. Production of enzootic pneumonia in pigs with a mycoplasma. *Vet Rec.* 77(42): 1247-1249.

Grasland B, Loizel C, Blanchard P, Oger A, Nignol AC, Bigarré L, Morvan H, Cariolet R, Jestin A. 2005. Reproduction of PMWS in immunostimulated SPF piglets transfected with infectious cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus. *Vet Res.* 36: 685-697.

Grau-Roma L, Segalés J. 2007. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, swine influenza virus and Aujeszky's

disease virus in cases of porcine proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) in Spain. *Vet Microbiol.* 119(2-4): 144-151.

Grau-Roma L, Crisci E, Sibila M, López-Soria S, Nofrarias M, Cortey M, Fraile L, Olvera A, Segalés J. 2008. A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. *Vet Microbiol.* 128(1-2):23-35. Erratum in: *Vet Microbiol.* 2010. 141(1-2): 194-195.

Grau-Roma L, Hjulsgaard CK, Sibila M, Kristensen CS, López-Soria S, Enøe C, Casal J, Bøtner A, Nofrarias M, Bille-Hansen V, Fraile L, Baekbo P, Segalés J, Larsen LE. 2009. Infection, excretion and seroconversion dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and Denmark. *Vet Microbiol.* 135(3-4): 272-282.

Grau-Roma L, Fraile L, Segalés J. 2011. Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. *Vet J.* 187(1): 23-32.

Greer CE, Lund JK, Manos MM. 1991a. PCR amplification from paraffin-embedded tissues: recommendations on fixatives for long-term storage and prospective studies. *PCR Methods Appl.* 1(1): 46-50.

Greer CE, Peterson SL, Kiviat NB, Manos MM. 1991b. PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time. *Am J Clin Pathol.* 95(2): 117-124.

Greer CE, Wheeler CM, Manos MM. 1994. Sample preparation and PCR amplification from paraffin-embedded tissues. *PCR Methods Appl.* 3(6): S113-122.

Gresham A, Jackson G, Giles N, Allan G, McNeilly F, Kennedy S. 2000. PMWS and porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Great Britain. *Vet Rec.* 146(5):143.

Grierson SS, King DP, Sandvik T, Hicks D, Spencer Y, Drew TW, Banks M. 2004a. Detection and genetic typing of type 2 porcine circoviruses in archived pig tissues from the UK. *Arch Virol.* 149(6):1171-1183.

Grierson SS, King DP, Wellenberg GJ, Banks M. 2004b. Genome sequence analysis of 10 Dutch porcine circovirus type 2 (PCV-2) isolates from a PMWS case-control study. *Res Vet Sci.* 77: 265-268.

Griffith JW, White WJ, Danneman PJ, Lang CM. 1988. Cilia-associated respiratory (CAR) bacillus infection of obese mice. *Vet Pathol.* 25(1): 72-76.

Guilmoto H and Wessel-Robert S. 2000. Control of PMWS in Brittany: a mainly zootechnical approach. In: *PMWS: a New Emerging Disease of Swine*. Meril Symposium, Melbourne, Australia. pp. 45-55.

Ha Y, Jung K, Chae C. 2005. Lack of evidence of porcine circovirus type 1 and type 2 infection in piglets with congenital tremors in Korea. *Vet Rec.* 156(12): 383-384.

- Ha Y, Lee YH, Ahn KK, Kim B, Chae C. 2008. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by prenatal porcine circovirus 2 infection and postnatal porcine parvovirus infection or immunostimulation. *Vet Pathol.* 45(6): 842-848.
- Haesebrouck F, Pasmans F, Chiers K, Maes D, Ducatelle R, Decostere A. 2004. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect?. *Vet Microbiol.* 100(3-4): 255-268.
- Hafner S, Latimer K. 1998. Cilia-associated respiratory bacillus infection and pneumonia in a pig. *J Vet Diagn Invest.* 10(4): 373-375.
- Halbur PG, Andrews JJ, Huffman EL, Paul PS, Meng XJ, Niyo Y. 1994. Development of a streptavidin-biotin immunoperoxidase procedure for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen in porcine lung. *J Vet Diagn Invest.* 16(2): 254-257.
- Halbur PG, Paul PS, Frey ML, Landgraf J, Eernisse K, Meng XJ, Lum MA, Andrews JJ, Rathje JA. 1995. Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet Pathol.* 32(6): 648-660.
- Halbur PG, Paul PS, Frey ML, Landgraf J, Eernisse K, Meng XJ, Andrews JJ, Lum MA, Rathje JA. 1996a. Comparison of the antigen distribution of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet Pathol.* 33(2): 159-170.
- Halbur PG, Paul PS, Meng XJ, Lum MA, Andrews JJ, Rathje JA. 1996b. Comparative pathogenicity of nine US porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in a five-week-old cesarean-derived, colostrum-deprived pig model. *J Vet Diagn Invest.* 8(1): 11-20.
- Halbur PG. 2001. PRRS virus and co-infections: research summaries and their practical implications. *Proceedings of the Swine Disease Conference for Swine Practitioners.* Vol. 9, pp. 162-166.
- Halbur PG, Rapp-Gabrielson V, Hoover T, Sornsen S, Yu S, Opriessnig T, Strait E, Kesl L, Taylor L, Jolie R, Thacker E. 2006. Evaluation of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination in a *M.hyopneumoniae*/Porcine Circovirus type 2 co-infection model. *Proc 19th International Pig Veterinary Society Congress*, p.271.
- Hamel AL, Lin LL, Nayar GP. 1998. Nucleotide Sequence of Porcine Circovirus Associated with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in Pigs. *J Virol.* 72(6): 5262-5267.
- Hamel AL, Lin LL, Sachvie C, Grudeski E, Nayar GP. 2000. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *Can J Vet Res.* 64(1): 44-52.
- Hamnes IS, Gjerde BK, Forberg T, Robertson LJ. 2007. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in suckling piglets in Norway. *Vet Parasitol.* 144(3-4): 222-233.

Hansen MS, Hjulsager CK, Bille-Hansen V, Haugegaard S, Dupont K, Høgedal P, Kunstmann L, Larsen LE. 2010a. Selection of method is crucial for the diagnosis of porcine circovirus type 2 associated reproductive failures. *Vet Microbiol.* 144(1-2): 203-209.

Hansen MS, Pors SE, Bille-Hansen V, Kjerulff SK, Nielsen OL. 2010b. Occurrence and tissue distribution of porcine circovirus type 2 identified by immunohistochemistry in Danish finishing pigs at slaughter. *J Comp Pathol.* 142(2-3): 109-121

Hansen MS, Pors SE, Jensen HE, Bille-Hansen V, Bisgaard M, Flachs EM, Nielsen OL. 2010c. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. *J Comp Pathol.* 143(2-3): 120-131.

Harder TC, Huebert P. 2004. Development and application of a nonaplex RT-PCR for simultaneous detection of mycoplasmal and viral agents associated with the porcine respiratory disease complex. *Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society Congress.* Vol 1. p 341.

Harding JC. 1996. Postweaning multisystemic wasting syndrome: preliminary epidemiology and clinical findings. *Proc Western Can Assoc Swine Pract.* p.21.

Harding J. 1997. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): Preliminary epidemiology and clinical presentation. *Proc Am Assoc Swine Pract.* p.503.

Harding JC, Clark EG. 1997. Recognition and diagnosing postweaning mutisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health Prod.* 5(5): 201-203.

Harding JC, Clark EG, Strokappe JH, Willson PI, Ellis JA. 1998. Postweaning multisystemic wasting syndrome: Epidemiology and clinical presentation. *Swine Health Prod.* 6(6): 249-254.

Harding JC. 2004. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. *Vet Microbiol.* 98(2):131-135.

Harding JC, Baker CD, Tumber A, McIntosh KA, Parker SE, Middleton DM, Hill JE, Ellis JA, Krakowka S. 2008. Porcine circovirus-2 DNA concentration distinguishes wasting from nonwasting pigs and is correlated with lesion distribution, severity, and nucleocapsid staining intensity. *J Vet Diagn Invest.* 20(3): 274-282.

Harding JC, Ellis JA, McIntosh KA, Krakowka S. 2010 Dual heterologous porcine circovirus genogroup 2a/2b infection induces severe disease in germ-free pigs. *Vet Microbiol.* 145(3-4): 209-219.

Harms PA, Sorden SD, Halbur PG, Bolin SR, Lager KM, Morozov I, Paul PS. 2001. Experimental Reproduction of Severe Disease in CD/CD Pigs Concurrently Infected with Type 2 Porcine Circovirus and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Vet Pathol* 38(5): 528-539.

Harms PA, Halbur PG, Sorden SD. 2002. Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. *J Swine Health Prod.* 10: 33-38.

Haruna J, Hanna P, Hurnik D, Ikede B, Miller L, Yason C. 2006. The role of immunostimulation in the development of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs under field conditions. *Can J Vet Res.* 70(4): 269-276.

Hassing AG, Kristensen CS, Baebko P, Wachmann H. 2004. Effect of sow on the mortality of pigs after weaning in PMWS herds. In: *Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress.* p. 76.

Hassing AG, Wachmann H, Bækbo P, Bøtner A, Nielsen J, Vigre H, Feenstra A. 2006. Effect of PMWS pig serum and PCV2 specific serum on mortality and weight gain in pmws affected herds. In: *Proceedings of the 19th International Pig Veterinary Society Congress.* Vol. 1. p.157.

Hasslung FC, Berg M, Allan GM, Meehan BM, McNeilly F, Fossum C. 2003. Identification of a sequence from the genome of porcine circovirus type 2 with an inhibitory effect on IFN-alpha production by porcine PBMCs. *J Gen Virol.* 84(11): 2937-2945.

Hasslung F, Wallgren P, Ladekjær-Hansen AS, Bøtner A, Nielsen J, Watrang E, Allan GM, McNeilly F, Ellis J, Timmusk S, Belák K, Segall T, Melin L, Berg M, Fossum C. 2005. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in Sweden and Denmark with a Swedish isolate of porcine circovirus type 2. *Vet Microbiol.* 106(1-2): 49-60.

Hastie AT, Evans LP, Allen AM. 1993. Two types of bacteria adherent to bovine respiratory tract ciliated epithelium. *Vet Pathol* 30(1):12-19.

Headley SA, Kummala E, Sukura A. 2008. *Balantidium coli*-infection in a Finnish horse. *Vet Parasitol.* 158(1-2): 129-132.

Helie P, Drolet R, Germain MC, Bourgault A. 1995. Systemic necrotizing vasculitis and glomerulonephritis in grower pigs in southwestern Quebec. *Can Vet J.* 36(3): 150-154.

Hindsbo O, Nielsen CV, Andreassen J, Willingham AL, Bendixen M, Nielsen MA, Nielsen NO. 2000. Age-dependent occurrence of the intestinal ciliate *Balantidium coli* in pigs at a Danish research farm. *Acta Vet Scand.* 41(1): 79-83.

Hines RK and Lukert PD. 1994. Porcine Circovirus as a cause of congenital tremors in newborn pigs. In: *Proceedings of the American Association Of Swine Practitioners.* pp.344-345.

Hines RK and Lukert PD. 1995. Porcine circovirus: a serological survey of swine in the United States. *J Swine Health Prod.* 3: 71-73.

- Hirai T, Nunoya T, Ihara T, Kusanagi K, Shibuya K. 2001. Dual infection with PCV-2 and porcine epidemic diarrhoea virus in neonatal piglets. *Vet Rec.* 148(15): 482-484.
- Hinrichs U, Ohlinger VF, Pesch S, Wang L, Tegeler R, Delbeck F, Wendt M. 1999. First report of porcine circovirus type 2 infection in Germany. *Tierärztl Umsch.* 54: 255-258.
- Hoogland MJ, Opriessnig T, Halbur PG. 2006. Effects of adjuvants on porcine circovirus type 2-associated lesions. *J Swine Health Prod.* 14:133-139.
- Horlen KP, Dritz SS, Nietfeld JC, Henry SC, Hesse RA, Oberst R, Hays M, Anderson J, Rowland RR. 2008. A field evaluation of mortality rate and growth performance in pigs vaccinated against porcine circovirus type 2. *J Am Vet Med Assoc.* 232(6): 906-912.
- Horner G. 1991. Pig circovirus antibodies present in New Zealand pigs. *Surveil Wellington.* 18:23.
- Huang C, Hung JJ, Wu CY, Chien MS. 2004. Multiplex PCR for rapid detection of pseudorabies virus, porcine parvovirus and porcine circoviruses. *Vet Microbiol.* 101(3): 209-214.
- Huang YY, Walther I, Martinson SA, López A, Yason C, Godson DL, Clark EG, Simko E. 2008. Porcine circovirus 2 inclusion bodies in pulmonary and renal epithelial cells. *Vet Pathol.* 45(5): 640-644.
- Huang YL, Pang VF, Lin CM, Tsai YC, Chia MY, Deng MC, Chang CY, Jeng CR. 2011. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infection decreases the efficacy of an attenuated classical swine fever virus (CSFV) vaccine. *Vet Res.* 42(1): 115.
- Jacobsen B, Krueger L, Seeliger F, Bruegmann M, Segalés J, Baumgaertner W. 2009. Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany. *Vet Microbiol.* 138(1-2): 27-33.
- Jaros P, McIntyre LH, Morris RS, Johnstone AC, Garkavenko O, Neumann E. 2006. Experimental evidence that an agent other than PCV2 is a necessary cause of PMWS. *Proc 19th International Pig Veterinary Society Congress*, p.168.
- Jensen TK, Vigre H, Svensmark B, Bille-Hansen V. 2006. Distinction between porcine circovirus type 2 enteritis and porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *J Comp Pathol.* 135(4): 176-182.
- Jiang Y, Shang H, Xu H, Zhu L, Chen W, Zhao L, Fang L. 2010. Simultaneous detection of porcine circovirus type 2, classical swine fever virus, porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs by multiplex polymerase chain reaction. *Vet J.* 183(2): 172-175.
- Johnson CS, Joo HS, Direksin K, Yoon KJ, Choi YK: 2002, Experimental in utero inoculation of late-term swine fetuses with porcine circovirus type 2. *J Vet Diagn Invest.* 14: 507-512.

Joisel F, Brune A, Schade A, Longo S, Charreyre C. 2007a. Results of the vaccination against PCV2 diseases with Circovac[®] in 233 German sow herds: decrease in mortality. In: Proceedings of the 5th international symposium on emerging and re-emerging pig diseases. p. 126.

Joisel F, Brune A, Schade A, Longo S, Charreyre C. 2007b. Results of the vaccination against pcv2 diseases with Circovac[®] in 233 German sow herds: improvement of pig growth and decrease in antibiotic treatments. In: Proceedings of the 5th international symposium on emerging and re-emerging pig diseases. p. 127.

Kapur V, Elam MR, Pawlovich TM, Murtaugh MP. 1996. Genetic variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the Midwestern United States. *J Gen Virol.* 77(6): 1271-1276.

Karuppannan AK, Jong MH, Lee SH, Zhu Y, Selvaraj M, Lau J, Jia Q, Kwang J. 2009. Attenuation of porcine circovirus 2 in SPF piglets by abrogation of ORF3 function. *Virology.* 383(2): 338-347.

Kawashima K, Tsunemitsu H, Horino R, Katsuda K, Onodera T, Shoji T, Kubo M, Haritani M, Murakami Y. 2003. Effects of dexamethasone on the pathogenesis of porcine circovirus type 2 infection in piglets. *J Comp Pathol.* 129: 294-302.

Kawashima K, Katsuda K, Tsunemitsu H. 2007. Epidemiological investigation of the prevalence and features of postweaning multisystemic wasting syndrome in Japan. *J Vet Diagn Invest.* 19: 60-68.

Keffaber KK. 1989. Reproductive failure of unknown etiology. *Am Assoc Swine Pract Newa.* 1: 1-10.

Kekarainen T, McCullough K, Fort M, Fossum C, Segalés J, Allan GM. 2010. Immune responses and vaccine-induced immunity against Porcine circovirus type 2. *Vet Immunol Immunopathol.* 136(3-4): 185-193.

Kennedy GA, Kreitner GL, Strafuss AC. 1977. Cryptosporidiosis in three pigs. *J Am Vet Med Assoc.* 170(3): 348-350.

Kennedy S, Allan GM, McNeilly F, Adair BM, Hedges A, Spillane P. 1998. Porcine circovirus infection in Northern Ireland. *Vet Rec.* 142(18): 495-496.

Kennedy S, Moffett D, McNeilly F, Meehan B, Ellis J, Krakowka S, Allan GM. 2000. Reproduction of Lesions of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome by Infection of Conventional Pigs with Porcine Circovirus Type 2 Alone or in Combination with Porcine Parvovirus. *J Comp Path.* 122(1): 9-24.

Kennedy S, Segalés J, Rovira A, Scholes S, Domingo M, Moffett D, Meehan B, O'Neill R, McNeilly F, Allan G. 2003. Absence of evidence of porcine circovirus infection in piglets with congenital tremors. *J Vet Diagn Invest.* 15(2): 151-156.

- Kiatipattanasakul-Banlunara W, Tantilertcharoen R, Suzuki K, Albarenque SM, Thanawongnuwech R, Nakayama H, Doi K. 2002. Detection of porcine circovirus 2 (PCV-2) DNA by nested PCR from formalin-fixed tissues of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) pigs in Thailand. *J Vet Med Sci.* 64(5): 449-452.
- Kim J, Chae C. 2001a. Differentiation of porcine circovirus 1 and 2 in formalin-fixed, paraffin-wax-embedded tissues from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome by in-situ hybridisation. *Res Vet Sci.* 70(3): 265–269.
- Kim J, Chae C. 2001b. 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(2): 105-111.
- Kim J, Choi C, Han DU, Chae C. 2001c. Simultaneous detection of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in pigs with PMWS by multiplex PCR. *Vet Rec.* 149(10): 304-305.
- Kim J, Han DU, Choi C, Chae C. 2001d. Differentiation of porcine circovirus (PCV)-1 and PCV-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. *J Virol Methods.* 98(1): 25-31.
- Kim J, Chae C. 2002. Simultaneous detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in naturally and experimentally coinfecting pigs by double in situ hybridization. *J Vet Diagn Invest.* 4(3): 236-240.
- Kim J, Chung HK, Jung T, Cho WS, Choi C, Chae C. 2002. Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms. *J Vet Med Sci.* 64(1): 57-62.
- Kim JH, Lyoo YS. 2002. Genetic characterization of porcine circovirus-2 field isolates from PMWS pigs. *J Vet Sci.* 3(1): 31-39.
- Kim J, Chae C. 2003a. Multiplex nested PCR compared with in situ hybridization for the differentiation of porcine circoviruses and porcine parvovirus from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res.* 67(2): 133-137.
- Kim J, Chae C. 2003b. Optimal enhancement of in situ hybridization for the detection of porcine circovirus 2 in formalin-fixed, paraffin-wax-embedded tissues using a combined pretreatment of thermocycler and proteinase K. *Res Vet Sci.* 74(3): 235-240.
- Kim J, Choi C, Chae C. 2003c. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome reproduced by co-infection with Korean isolates of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *J Comp Pathol.* 128(1): 52-59.
- Kim J, Chung HK, Chae C. 2003d. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *Vet J.* 166: 251-256.
- Kim J, Han DU, Choi C, Chae C. 2003e. Simultaneous detection and differentiation between porcine circovirus and porcine parvovirus in boar semen by multiplex seminested polymerase chain reaction. *J Vet Med Sci.* 65: 741-744.

- Kim J, Chae C. 2004a. A comparison of virus isolation, polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and in situ hybridization for the detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in experimentally and naturally coinfecting pigs. *J Vet Diagn Invest.* 16(1): 45-50.
- Kim J, Ha Y, Jung K, Choi C, Chae C. 2004b. Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs. *Can J Vet Res.* 68(3):218-221.
- Kim J, Chae C. 2005. Necrotising lymphadenitis associated with porcine circovirus type 2 in pigs. *Vet Rec.* 156: 177-178.
- Kim D, Ha Y, Oh Y, Chae C. 2011a. Prevalence of porcine circovirus types 2a and b in pigs with and without post-weaning multi-systemic wasting syndrome. *Vet J.* 188(1): 115-117.
- Kim D, Kim CH, Han K, Seo HW, Oh Y, Park C, Kang I, Chae C. 2011b. Comparative efficacy of commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus 2 (PCV2) vaccines in pigs experimentally infected with *M. hyopneumoniae* and PCV2. *Vaccine.* 29(17): 3206-3212.
- King JM, Dodd DC, Newson ME, Roth L. 1989. *The Necropsy Book.* New York State College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, New York, USA.
- Kiss I, Kecskemeti S, Tuboly T, Bajmocy E, Tanyi J. 2000. New pig disease in Hungary: Postweaning multisystemic wasting syndrome caused by circovirus. *Acta Vet Hung.* 48: 469-475.
- Kiupel M, Stevenson GW, Mittal SK, Clark EG, and Haines DM. 1998. Circovirus-like Viral Associated Disease in Weaned Pigs in Indiana. *Vet Pathol.* 35: 303-307.
- Kiupel M, Stevenson GW, Choi J, Latimer KS, Kanitz CL, Mittal SK. 2001. Viral Replication and Lesions in BALB/c Mice Experimentally Inoculated with Porcine Circovirus Isolated from a Pig with Postweaning Multisystemic Wasting Disease. *Vet Pathol.* 38(1): 74-82.
- Kixmüller M, Ritzmann M, Eddicks M, Saalmüller A, Elbers K, Fachinger V. 2008. Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine.* 26(27-28): 3443-3451.
- Krakovka S, Ellis JA, Meehan B, Kennedy S, Mcneilly F, Allan G. 2000. Viral Wasting Syndrome of Swine: Experimental Reproduction of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in Gnotobiotic Swine by Coinfection with Porcine Circovirus 2 and Porcine Parvovirus. *Vet Pathol.* 37: 254-263.
- Krakovka S, Ellis JA, McNeilly F, Ringler S, Rings DM, Allan G. 2001. Activation of the Immune System is the Pivotal Event in the Production of Wasting Disease in Pigs Infected with Porcine Circovirus-2 (PCV-2). *Vet Pathol.* 38(1): 31-42.

Krakovka S, Ellis JA, McNeilly F, Gilpin D, Meehan B, McCullough K, Allan G. 2002. Immunologic features of porcine circovirus type 2 infection. *Viral Immunol.* 15(4): 567-582.

Krakovka S, Ellis J, McNeilly F, Meehan B, Oglesbee M, Alldinger S, Allan G. 2004. Features of cell degeneration and death in hepatic failure and systemic lymphoid depletion characteristic of porcine circovirus-2-associated postweaning multisystemic wasting disease. *Vet Pathol.* 41(5): 471-481.

Krakovka S, Ellis J, McNeilly F, Waldner C, Allan G. 2005. Features of porcine circovirus-2 disease: correlations between lesions, amount and distribution of virus, and clinical outcome. *J Vet Diagn Invest.* 17(3): 213-222.

Krakovka S, Ellis J, McNeilly F, Waldner C, Rings DM, Allan G. 2007. *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins and porcine circovirus type 2 (PCV2) infection: induction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in the gnotobiotic swine model of PCV2-associated disease. *Can Vet J.* 48(7): 716-724.

Krakovka S, Hartunian C, Hamberg A, Shoup D, Rings M, Zhang Y, Allan G, Ellis JA. 2008. Evaluation of induction of porcine dermatitis and nephropathy syndrome in gnotobiotic pigs with negative results for porcine circovirus type 2. *Am J Vet Res.* 69(12): 1615-1622.

Kritas SK, Alexopoulos C, Kyriakis CS, Tzika E, Kyriakis SC. 2007. Performance of fattening pigs in a farm infected with both porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and porcine circovirus type 2 following sow and piglet vaccination with an attenuated PRRS vaccine. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 54(6): 287-291.

Kurusu K, Kyo S, Shiimoto Y, Matsushita S. 1990. Cilia-associated respiratory bacillus infection in rabbits. *Lab Anim Sci.* 40(4): 413-415.

Kwon D, Chae C. 1999. Detection and localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA in lungs from naturally infected pigs by in situ hybridization using a digoxigenin-labeled probe. *Vet Pathol.* 36(4): 308-313.

Kwon D, Choi C, Chae C. 2002. Chronologic localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs. *Vet Pathol.* 39(5): 584-587.

Kyriakis SC, Saoulidis K, Lekkas S, Miliotis ChC, Papoutsis PA, Kennedy S. 2002. The effects of immuno-modulation on the clinical and pathological expression of postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Comp Pathol.* 126: 38-46.

Ladekjær-Mikkelsen A-S, Nielsen J, Storgaard T, Bøtner A, Allan G, McNeilly F. 2001. Transplacental infection with PCV2 associated with reproductive failure in a gilt. *Vet Rec.* 148(24): 759-760.

Ladekjær-Mikkelsen A-S, Nielsen J, Stadejek T, Storgaard T, Krakowka S, Ellis J, McNeilly F, Allan G, Bøtner A. 2002. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in immunostimulated and non-immunostimulated 3-week-old piglets experimentally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Vet Microbiol.* 89(2-3): 97-114.

- Lainson FA, Aitchison KD, Donachie W, Thomson JR. 2002. Typing of *Pasteurella multocida* isolated from pigs with and without porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *J Clin Microbiol.* 40(2):588-593.
- Langohr IM, Stevenson GW, Nelson EA, Lenz SD, Wei H, Pogradichny RM. 2012. Experimental co-infection of pigs with Bovine viral diarrhoea virus 1 and Porcine circovirus-2. *J Vet Diagn Invest.* 24(1): 51-64.
- Larochelle R, Sauvageau R, Magar R. 1994. Immunohistochemical detection of swine influenza virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia cases from Quebec. *Can Vet J.* 35(8): 513-515.
- Larochelle R, Antaya M, Morin M, Magar R. 1999a. Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. *J Virol Methods.* 80: 69-75.
- Larochelle R, Morin M, Antaya M, Magar R. 1999b. Identification and incidence of porcine circovirus in routine field cases in Quebec as determined by PCR. *Vet Rec.* 145(5): 140-142.
- Larochelle R, Bielanski A, Müller P, Magar R. 2000. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. *J Clin Microbiol.* 38(12): 4629-4632.
- Larochelle R, Magar R, D'Allaire S. 2002. Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions. *Virus Res.* 90: 101-112.
- Larochelle R, Magar R, D'Allaire S. 2003. Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res.* 67(2): 114-120.
- Lawton DEB, Rawdon T, Bastianello SS, Johnstone AC, Morris RS. 2004. PMWS in New Zealand part I: Diagnosis and investigation. *Proc 18th Int Pig Vet Soc Cong.* Vol.1, p.10.
- LeCann P, Albina E, Madec F, Cariolet R, Jestin A. 1997. Piglet wasting disease. *Vet Rec.* 141(25): 660.
- Lee JY, Wilson MR. 1979. A review of pseudorabies (Aujeszky's disease) in pigs. *Can Vet J.* 20(3): 65-69.
- Lin CM, Jeng CR, Hsiao SH, Liu JP, Chang CC, Chiou MT, Tsai YC, Chia MY, Pang VF. 2011. Immunopathological characterization of porcine circovirus type 2 infection-associated follicular changes in inguinal lymph nodes using high-throughput tissue microarray. *Vet Microbiol.* 149(1-2): 72-84.
- Lindsay DS, Dubey JP, Santín-Durán M, Fayer R. 2012. Coccidia and other Protozoa, p.895-907. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramírez A, Schwartz KJ, Stevenson GW (ed.), *Diseases of Swine*, 10th ed. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa.

- Liu C, Ihara T, Nunoya T, Ueda S. 2004. Development of an ELISA based on the baculovirus-expressed capsid protein of porcine circovirus type 2 as antigen. *Journal of Veterinary Medical Science*. 66(3): 237-242.
- Liu Q, Wang L, Willson P, Babiuk LA. 2000. Quantitative, competitive PCR analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol*. 38(9): 3474-3477.
- Liu YJ. 2004. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol*. 23: 275-306.
- Liu J, Chen I, Kwang J. 2005. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *J Virol*. 79(13): 8262-8274.
- Liu J, Chen I, Du Q, Chua H, Kwang J. 2006. The ORF3 Protein of Porcine Circovirus Type 2 Is Involved in Viral Pathogenesis In Vivo. *J Virol*. 80(10): 5065-5073.
- López P, Guilloso S, Deshaies E, Brajon N, Bestul K, Leterme, S. 2005. Porcine circovirus type 2: enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antigen and antibodies in feces. *Proc International Conference on Animal Circoviruses and Associated Diseases, European Society for Veterinary Virology*. p. 91.
- López-Soria S, Segalés J, Nofrarias M, Calsamiglia M, Ramírez H, Mínguez A, Serrano IM, Marín O, Callén A. 2004. Genetic influence on the expression of PCV disease. *Vet Rec*. 155(16): 504.
- López-Soria S, Segalés J, Rose N, Viñas MJ, Blanchard P, Madec F, Jestin A, Casal J, Domingo M. 2005. An exploratory study on risk factors for postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain. *Prev Vet Med*. 69(1-2): 97-107.
- Lorenzo H. 2006. Estudio de las principales citoquinas que participant en la infección natural y experimental por *Mycoplasma hyopneumoniae*. Tesis doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- Luis P. 2006. Interpreting Porcine circovirus 2 pathology reports AHL Newsletter. 10(1): 6.
- MacKenzie WF, Magill LS, Hulse M. 1981. A filamentous bacterium associated with respiratory disease in wild rats. *Vet Pathol*. 18(6): 836-839.
- Madec F, Eveno E, Morvan P, Hamon L, Morvan H, Albina E, Truong C, Hutet E, Cariolet R, Arnaud C, Jestin A. 1999. La maladie de l'amaigrissement du porcelet (MAP) en France 1—aspects descriptifs, impact en élevage [Porcine wasting disease (PWD) in France: 1—description of the disease and impact in affected herds]. *Journées Recherche en Porcine France*. 31: 347-354.
- Madec F, Eveno E, Morvan P, Hamon L, Blanchard P, Cariolet R, Amenna N, Morvan H, Truong C, Mahé D, Albina E, Jestin A. 2000. Post-weaning multisystemic

wastingsyndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. *Livestock Production Science*. 63: 223-233.

Madson DM, Patterson AR, Ramamoorthy S, Pal N, Meng XJ, Opriessnig T. 2009. Reproductive failure experimentally induced in sows via artificial insemination with semen spiked with porcine circovirus type 2. *Vet Pathol*. 46(4): 707-716.

Madson DM, Opriessnig T. 2011. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection on reproduction: disease, vertical transmission, diagnostics and vaccination. *Anim Health Res Rev*. 12(1): 47-65.

Maes D, Verdonck M, Deluyker H, de Kruif A. 1996. Enzootic pneumonia in pigs. *Vet Q*. 18(3): 104-109.

Maes D. 2012. Subclinical porcine circovirus infection: what lies beneath. *Vet J*. 194(1): 9.

Magar R, Larochelle R, Thibault S, Lamontagne L. 2000a. Experimental Transmission of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) in Weaned Pigs: a Sequential Study. *J Comp Path*. 123(4): 258-269.

Magar R, Müller P, Larochelle R. 2000b. Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2. *Can J Vet Res*. 64: 184-186.

Mahé D, Blanchard P, Truong C, Arnauld C, Le Cann P, Cariolet R, Madec F, Albina E, and Jestin A. 2000. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *J Gen Virol*. 81: 1815-1824.

Maldonado J, Ségales J, Calsamiglia M, Llopart D, Sibila M, Lopus Z, Riera P, Artigas C. 2004. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in the Philippines: porcine circovirus type 2 (PCV2) detection and characterization. *J Vet Med Sci*. 66(5): 533-537.

Mandrioli L, Sarli G, Panarese S, Baldoni S and Marcato PS. 2004. Apoptosis and proliferative activity in lymph node reaction in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol*. 97: 25-37.

Mankertz A, Persson F, Mankertz J, Blaess G, Buhk HJ. 1997. Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *J Virol*. 71(3): 2562-2566.

Mankertz A, Mankertz J, Wolf K, Buhk HJ. 1998. Identification of a protein essential for replication of porcine circovirus. *J Gen Virol*. 79: 381-384

Mankertz A, Domingo M, Folch JM, LeCann P, Jestin A, Segalés J, Chmielewicz B, Plana-Durán J, Soike D. 2000. Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Res*. 66(1): 65-77.

Maré CJ, Switzer WP. 1966. Virus pneumonia of pigs: propagation and characterization of a causative agent. *Am J Vet Res*. 27(121): 1687-1693.

Martin H, Le Potier MF, Maris P. 2008. Virucidal efficacy of nine commercial disinfectants against porcine circovirus type 2. *Vet J.* 177(3): 388-393.

Martins Gomes de Castro AM, Cortez A, Heinemann MB, Brandao PE, Richtzenhain LJ. 2007. Genetic diversity of Brazilian strains of porcine circovirus type 2 (PCV-2) revealed by analysis of the cap gene (ORF-2). *Arch. Virol.* 152: 1435-1445.

Mateusen B, Maes DG, Van Soom A, Lefebvre D, Nauwynck HJ. 2007. Effect of a porcine circovirus type 2 infection on embryos during early pregnancy. *Theriogenology.* 68(6): 896-901.

Matsushita S, Joshima H. 1989. Pathology of rats intranasally inoculated with the cilia-associated respiratory bacillus. *Lab Anim.* 23(2): 89-95.

Mavromatis I, Kritas SK, Alexopoulos C, Tsinas A, Kyriakis SC. 1999. Field evaluation of a live vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome in fattening pigs. *J Vet Med B.* 46(9): 603-612.

Maxie MG and Youssef S. 2007. Nervous system. In: Jubb, Kennedy & Palmer's *Pathology of Domestic Animals* 5th Edition. Vol 1. pp.281-457. Elsevier Saunders. New York, NY.

McEwen B, Carman S, Fairles J, Slavic D, Cai H. 2007. Porcine circovirus type 2 associated disease and co-infections. *AHL Newsletter.* 11(1):8.

McIntosh KA, Harding JC, Parker S, Ellis JA, Appleyard GD: 2006, Nested polymerase chain reaction detection and duration of porcine circovirus type 2 in semen with sperm morphological analysis from naturally infected boars. *J Vet Diagn Invest.* 18: 380-384.

McKeown NE, Opriessnig T, Thomas P, Guenette DK, Elvinger F, Fenaux M, Halbur PG, Meng XJ. 2005. Effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) maternal antibodies on experimental infection of piglets with PCV2. *Clin Diagn Lab Immunol.* 12(11): 1347-1351.

McNair I, Marshall M, McNeilly F, Botner A, Ladekjaer-Mikkelsen AS, Vincent I, Herrmann B, Sanchez R, Rhodes C. 2004. Interlaboratory testing of porcine sera for antibodies to porcine circovirus type 2. *J Vet Diagn Invest.* 16(2): 164-166.

McNeilly F, Allan GM, Foster JC, Adair BM, McNulty MS. 1996. Effect of porcine circovirus infection on porcine alveolar macrophage function. *Vet Immunol Immunopathol.* 49(4): 295-306.

McNeilly F, Kennedy S, Moffett D, Meehan BM, Foster JC, Clarke EG, Ellis JA, Haines DM, Adair BM, Allan GM. 1999. A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Virol Methods.* 80(2): 123-128.

McNeilly F, McNair I, Mackie DP, Meehan BM, Kennedy S, Moffett D, Ellis J, Krakowka S, Allan GM. 2001. Production, characterisation and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus 2. *Arch Virol.* 146(5): 909-922.

- McNeilly F, McNair I, O'Connor M, Brockbank S, Gilpin D, Lasagna C, Boriosi G, Meehan B, Ellis J, Krakowka S, Allan GM. 2002. Evaluation of a 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.* 14(2): 106-112.
- Meehan BM, Creelan JL, McNulty MS, Todd D. 1997. Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. *J Gen Virol.* 78: 221-227.
- Meehan BM, McNeilly F, Todd D, Kennedy S, Jewhurst VA, Ellis JA, Hassard LE, Clark EG, Haines DM, Allan GM. 1998. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J Gen Virol.* 79(Pt 9): 2171-2179.
- Meerts P, Misinzo G, McNeilly F, Nauwynck HJ. 2005a. Replication kinetics of different porcine circovirus 2 strains in PK-15 cells, fetal cardiomyocytes and macrophages. *Arch Virol.* 150: 427-441.
- Meerts P, Van Gucht S, Cox E, Vandebosch A, Nauwynck HJ. 2005b. Correlation between type of adaptive immune response against porcine circovirus type 2 and level of virus-replication. *Viral Immunol.* 18: 333-341.
- Meerts P, Misinzo G, Lefebvre D, Nielsen J, Botner A, Kristensen C S, Nauwynck H J. 2006. Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease. *BMC Vet. Res.* 2: 6.
- Meng XJ, Paul PS, Halbur PG, Lum MA. 1995. Phylogenetic analysis of the putative M (ORF 6) and N (ORF 7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the USA and Europe. *Arch Virol.* 140(4): 745-755.
- Messier S, Ross RF. 1991. Interactions of *Mycoplasma hyopneumoniae* membranes with porcine lymphocytes. *Am J Vet Res.* 52(9): 1497-1502.
- Mettenleiter TC, Ehlers B, Müller T, Yoon KJ, Teifke JP. 2012. Herpesviruses, p.421-446. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW (ed.), *Diseases of Swine*, 10th ed. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa.
- 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(7): 735-738.
- Misinzo G, Meerts P, Bublot M, Mast J, Weingartl HM, Nauwynck HJ. 2005. Binding and entry characteristics of porcine circovirus 2 in cells of the porcine monocytic line 3D4/31. *J Gen Virol.* 86(Pt 7): 2057-2068.
- Morandi F, Ostanello F, Fusaro L, Bacci B, Nigrelli A, Alborali L, Dottori M, Vezzoli F, Barigazzi G, Fiorentini L, Sala V, Leotti G, Joisel F, Sarli G. 2010. Immunohistochemical detection of aetiological agents of proliferative and necrotizing pneumonia in Italian pigs. *J Comp Pathol.* 142(1): 74-78.

- Mori M, Sato K, Akachi S, Asahi S, Taniguchi S, Narita M. 2000. Retrospective Study of Porcine Circovirus 2 Infection in Japan: Seven Cases in 1989. *Vet Pathol.* 37(6): 667-669.
- Morin M, Girard C, ElAzhary Y, Fajardo R, Drolet R, Lagacé A. 1990. Severe proliferative and necrotizing pneumonia in pigs: a newly recognized disease. *Can Vet J.* 31: 837-839.
- Morozov I, Sirinarumitr T, Sorden SD, Halbur PG, Morgan MK, Yoon KJ, Paul PS. 1998. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol.* 36(9): 2535-2541.
- Müller T, Hahn EC, Tottewitz F, Kramer M, Klupp BG, Mettenleiter TC, Freuling C. 2011. Pseudorabies virus in wild swine: a global perspective. *Arch Virol.* 156(10): 1691-1705.
- Muñoz A, Pallarés FJ, Ramis G. 2007. *Práctica clínica en porcicultura: análisis y abordaje de casos clínicos.* Acalanthis Comunicación y Estrategias, SLU. Madrid.
- Muñoz M, García Iglesias MJ, García Marín JF. 2003. Valoración de diferentes nódulos linfáticos, bazo y placa de Peyer para el diagnóstico histológico de circovirus porcino. XV Reunión de la SEAPV. Pg. 28.
- Murtaugh MP, Elam MR, Kakach LT. 1995. Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. *Arch Biol.* 140(8): 1451-1460.
- Nakauchi, K. 1999. The prevalence of *Balantidium coli* infection in fifty-six mammalian species. *J Vet Med Sci.* 61(1): 63-65.
- Narita M, Ishii M. 2004. Encephalomalacic lesions in pigs dually infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and pseudorabies virus. *J Comp Pathol.* 131(4): 277-284.
- Nauwynck H, Glorieux S, Favoreel H, Pensaert M. 2007. Cell biological and molecular characteristics of pseudorabies virus infections in cell cultures and in pigs with emphasis on the respiratory tract. *Vet Res.* 38(2): 229-241.
- Nawagitgul P, Morozov I, Sirinarumitr T, Sorden SD, Paul PS. 2000. Development of probes to differentiate porcine circovirus types 1 and 2 in vitro by in situ hybridization. *Vet Microbiol.* 75(1): 83-89.
- Nawagitgul P, Harms PA, Morozov I, Thacker BJ, Sorden SD, Lekcharoensuk C, Paul PS. 2002. Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9(1): 33-40.
- Nelsen CJ, Murtaugh MP, Faaberg KS. 1999. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution of two continents. *J Virol.* 73(1): 270-280.

Neuberger D, Nitzel G, Swalla R, Cowles B. 2013. Fosterer™PCV MH: Efficacy of Single-Dose Vaccination in Swine Subsequently Challenged with PCV2 and/or *Mycoplasma hyopneumoniae*. www.zoetisus.com.

Niagro FD, Forsthoefel AN, Lawther RP, Kamalanathan L, Ritchie BW, Latimer KS, Lukert PD. 1998. Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. Arch Virol. 143: 1723-1744.

Nielsen J, Vincent IE, Bøtner A, Ladekjær-Mikkelsen A-S, Allan G, Summerfield A, McCullough KC. 2003. Association of lymphopenia with porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Vet Immunol Immunopathol. 92(3-4): 97-111.

Nietfeld JC, Franklin CL, Riley LK, Zeman DH, Groff BT. 1995. Colonization of the tracheal epithelium of pigs by filamentous bacteria resembling cilia-associated respiratory bacillus. J Vet Diagn Invest. 7(3): 338-342.

Nietfeld JC, Fickbohm BL, Rogers DG, Franklin CL, Riley LK. 1999. Isolation of cilia-associated respiratory (CAR) bacillus from pigs and calves and experimental infection of gnotobiotic pigs and rodents. J Vet Diagn Invest. 11(3): 252-258.

Núñez A, McNeilly F, Perea A, Sanchez-Cordon PJ, Huerta B, Allan G, Carrasco L. 2003. Coinfection by *Cryptosporidium parvum* and porcine circovirus type 2 in weaned pigs. J Vet Med B. 50: 255-258.

O'Connor B, Gauvreau H, West K, Bogdan J, Ayroud M, Clark EG, Konoby C, Allan G, Ellis JA. 2001. Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. Can Vet J. 42(7): 551-553.

Oh Y, Seo HW, Han K, Park C, Chae C. 2012. Protective effect of the maternally derived porcine circovirus type 2 (PCV2)-specific cellular immune response in piglets by dam vaccination against PCV2 challenge. J Gen Virol. 93(7): 1556-1562.

Okuda Y, Ono M, Yazawa S, Shibata I. 2003. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in cesarean-derived, colostrum-deprived piglets inoculated with porcine circovirus type 2 (PCV2): investigation of quantitative PCV2 distribution and antibody responses. J Vet Diagn Invest. 15(2): 107-114.

Olvera A, Sibila M, Calsamiglia M, Segalés J, Domingo M. 2004. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. J Virol Methods. 117(1): 75-80.

Olvera A, Cortey M, Segalés J. 2007. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. Virology. 357: 175-185.

Onuki A, Abe K, Togashi K, Kawashima K, Taneichi A, Tsunemitsu H. 1999. Detection of porcine circovirus from lesions of a pig with wasting disease in Japan. J Vet Med Sci. 61(10): 1119-1123.

Opriessnig T, Yu S, Gallup JM, Evans RB, Fenaux M, Pallarés F, Thacker EL, Brockus CW, Ackermann MR, Thomas P, Meng XJ, Halbur PG. 2003. Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus. *Vet Pathol.* 40(5): 521-529.

Opriessnig T, Fenaux M, Yu S, Evans RB, Cavanaugh D, Gallup JM, Pallarés FJ, Thacker EL, Lager KM, Meng XJ, Halbur PG. 2004a. Effect of porcine parvovirus vaccination on the development of PMWS in segregated early weaned pigs coinfecting with type 2 porcine circovirus and porcine parvovirus. *Vet Microbiol.* 98: 209-220.

Opriessnig T, Thacker EL, Yu S, Fenaux M, Meng XJ, Halbur PG. 2004b. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Vet Pathol.* 41: 624-640.

Opriessnig T, Yu S, Thacker EL, Halbur PG. 2004c. Derivation of porcine circovirus type 2-negative pigs from positive breeding herds. *J Swine Health Prod.* 12(4): 186-191.

Opriessnig T, Fenaux M, Thomas P, Hoogland MJ, Rothschild MF, Meng XJ, Halbur PG. 2006a. Evidence of breed-dependent differences in susceptibility to porcine circovirus type-2-associated disease and lesions. *Vet Pathol.* 43: 281-293.

Opriessnig T, Halbur PG, Yu S, Thacker EL, Fenaux M, Meng XJ. 2006b. Effects of the timing of the administration of *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin on the development of lesions associated with porcine circovirus type 2. *Vet Rec.* 158: 149-154.

Opriessnig T, Janke BH, Halbur PG. 2006c. Cardiovascular lesions in pigs naturally or experimentally infected with porcine circovirus type 2. *J Comp Pathol.* 134: 105-110.

Opriessnig T, Kuster C, Halbur PG. 2006d. Demonstration of porcine circovirus type 2 in the testes and accessory sex glands of a boar. *J Swine Health Prod.* 14: 42-45.

Opriessnig T, McKeown NE, Harmon KL, Meng XJ, Halbur PG. 2006e. Porcine circovirus type 2 infection decreases the efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine. *Clin Vaccine Immunol.* 13: 923-929.

Opriessnig T, Mckewon NE, Meng XJ, Halbur PG. 2006f. Comparison of the pathogenicity of US PCV2 field isolates in an experimental model. In: *Proceedings of the American Association of Swine Veterinary Annual Meeting*, vol.37. pp.451-452.

Opriessnig T, McKeown NE, Zhou EM, Meng XJ, Halbur PG. 2006g. Genetic and experimental comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates from cases with and without PCV2-associated lesions provides evidence for differences in virulence. *J Gen Virol.* 87: 2923-2932.

Opriessnig, T, Thacker, E, Halbur, PG. 2006h. Chlortetracycline is effective in reducing lesions in pigs coinfecting with *Mycoplasma hyopneumoniae* and Porcine Circovirus type 2. In: Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress. Vol. 2. p.302.

Opriessnig T, Thomas P, Meng XJ, McKeown NE, Halbur PG. 2006i. Comparison of the efficacy of three different serotherapy regimens and vaccination with a chimeric PCV1-2 vaccine to protect pigs against PCV2 infection and disease. In: Proceedings of the 19th IPVS Congress. Vol. 1. p.160.

Opriessnig T, Meng XJ, Halbur PG. 2007. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. J Vet Diagn Invest. 19(6): 591-615.

Opriessnig T, Madson DM, Prickett JR, Kuhar D, Lunney JK, Elsener J, Halbur PG. 2008a. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and PCV2 coinfection. Vet Microbiol. 131(1-2): 103-114.

Opriessnig T, Patterson AR, Elsener J, Meng XJ, Halbur PG. 2008b. Influence of maternal antibodies on efficacy of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination to protect pigs from experimental infection with PCV2. Clin Vaccine Immunol. 15(3): 397-401.

Opriessnig T, Patterson AR, Madson DM, Pal N, Halbur PG. 2009. Comparison of efficacy of commercial one dose and two dose PCV2 vaccines using a mixed PRRSV-PCV2-SIV clinical infection model 2-3-months post vaccination. Vaccine. 27(7): 1002-1007.

Opriessnig T, Patterson AR, Madson DM, Pal N, Ramamoorthy S, Meng XJ, Halbur PG. 2010. Comparison of the effectiveness of passive (dam) versus active (piglet) immunization against porcine circovirus type 2 (PCV2) and impact of passively derived PCV2 vaccine-induced immunity on vaccination. Vet Microbiol. 142(3-4):177-183.

Opriessnig T, Madson DM, Roof M, Layton SM, Ramamoorthy S, Meng XJ, Halbur PG. 2011. Experimental reproduction of porcine circovirus type 2 (PCV2)-associated enteritis in pigs infected with PCV2 alone or concurrently with *Lawsonia intracellularis* or *Salmonella typhimurium*. J Comp Pathol. 145(2-3): 261-270.

Opriessnig T, Halbur PG. 2012. Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease. Virus Res. 164(1-2): 20-32.

Opriessnig T, Langohr I. 2013. Current state of knowledge on porcine circovirus type 2-associated lesions. Vet Pathol. 50(1): 23-38.

Opriessnig T, Xiao CT, Gerber PF, Halbur PG. 2013. Emergence of a novel mutant PCV2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the U.S. concurrently infected with PPRSV. Vet Microbiol. 163(1-2): 177-183.

- Orós J, Fernández A, Rodríguez JL, Franklin CL, Matsushita S, Poveda JB. 1997. Association of cilia-associated respiratory (CAR) bacillus with natural chronic tracheitis in goats. *J Comp Pathol.* 117(3): 289-294.
- Ostanello F, Caprioli A, Di Francesco A, Battilani M, Sala G, Sarli G, Mandrioli L, McNeilly F, Allan GM and Prosperi S. 2005. Experimental infection of 3-week-old conventional colostrums-fed pigs with porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus. *Vet Microbiol.* 108: 179-186.
- Ouardani M, Wilson L, Jetté R, Montpetit C, Dea S. 1999. Multiplex PCR for Detection and Typing of Porcine Circoviruses. *J Clin Microbiol.* 37(12): 3917-3924.
- Pal N, Huang YW, Madson DM, Kuster C, Meng XJ, Halbur PG, Opriessnig T. 2008. Development and validation of a duplex real-time PCR assay for the simultaneous detection and quantification of porcine circovirus type 2 and an internal control on porcine semen samples. *J Virol Methods.* 149(2): 217-225.
- Pallarés FJ, Halbur PG, Opriessnig T, Sorden SD, Villar D, Janke BH, Yaeger MJ, Larson DJ, Schwartz KJ, Yoon KJ, Hoffman LJ. 2002. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Vet Diagn Invest.* 14: 515-519.
- Pan Q, Huang K, He K, Lu F. 2008. Effect of different selenium sources and levels on porcine circovirus type 2 replication in vitro. *J Trace Elem Med Biol.* 22(2): 143-148.
- Park JS, Kim J, Ha Y, Jung K, Choi C, Lim JK, Kim SH and Chae C. 2005. Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. *J Comp Pathol.* 132(2-3): 139-144.
- Pejsak Z, Podgórska K, Truszczyński M, Karbowski P, Stadejek T. 2010. Efficacy of different protocols of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) in a farm affected by postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 33(6): e1-5.
- Pensaert MB, Sánchez Jr RE, Ladekjaer-Mikkelsen AS, Allan GM, Nauwynck HJ. 2004. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. *Vet Microbiol.* 98: 175-183.
- Percy DH, Barthold SW. 2007. Pathology of laboratory rodents and rabbits. Third edition. Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa. 64-142 pp.
- Pérez-Martín E, Rovira A, Calsamiglia M, Mankertz A, Rodríguez F, Segalés J. 2007. A new method to identify cell types that support porcine circovirus type 2 replication in formalin-fixed, paraffin-embedded swine tissues. *J Virol Methods.* 146: 86-95.
- Pescador CA, Bandarra PM, Castro LA, Antoniassi NAB, Ravazzolo AP, Sonne L, Cruz CEF, Driemeier D. 2007. Co-infection by porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in aborted fetuses and stillborn piglets in southern Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira.* 27(10): 425-429.

Pesch S, Schmidt U, Ohlinger VF. 2000. Proliferative necrotizing pneumonia (PNP) is a result of co-infection with porcine reproductive and respiratory disease virus (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV2). In: Proceedings of the IPVS Congress, vol.16. p.581.

Pittman JS. Reproductive failure associated with porcine circovirus type 2 in gilts. 2008. *J Swine Health Prod.* 16(3): 144-148.

Pogranichnyy RM, Yoon KJ, Harms PA, Swenson SL, Zimmerman JJ, Sorden SD. 2000. Characterization of immune response of young pigs to porcine circovirus type 2 infection. *Viral Immunol.* 13(2): 143-153.

Pogranichniy RM, Yoon KJ, Harms PA, Sorden SD, Daniels M. 2002. Case-control study on the association of porcine circovirus type 2 and other swine viral pathogens with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Vet Diagn Invest.* 14(6): 449-456.

Pomeranz LE, Reynolds AE, Hengartner CJ. 2005. Molecular Biology of Pseudorabies Virus: Impact on Neurovirology and Veterinary Medicine. *Microbiol Mol Biol Rev.* 69(3): 462-500.

Pors SE, Hansen MS, Bisgaard M, Jensen HE, Iburg TM. 2013. Immunohistochemical study of porcine lung lesions associated with *Pasteurella multocida*. *Vet J.* 197(2): 483-488.

Pravettoni D, Toccaceli S, Monestiroli S, Crippa L, Canali E, Salvi S, Scanziani E. 2001. Cilia-associated respiratory (CAR) bacillus infection in veal calves and adult cattle. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift.* 108(9): 386-389.

Quintana J, Segalés J, Rosell C, Calsamiglia M, Rodríguez-Arrijo GM, Chianini F, Folch JM, Maldonado J, Canal M, Plana-Durán J, Domingo M. 2001. Clinical and pathological observations on pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Rec.* 149(12): 357-361.

Quintana J, Balasch M, Segalés J, Calsamiglia M, Rodríguez-Arrijo GM, Plana-Durán J, Domingo M. 2002. Experimental inoculation of porcine circoviruses type 1 (PCV1) and type 2 (PCV2) in rabbits and mice. *Vet Res.* 33(3): 229-237.

Racine S, Kheyar A, Gagnon CA, Charbonneau B, Dea S. 2004. Eucaryotic expression of the nucleocapsid protein gene of porcine circovirus type 2 and use of the protein in an indirect immunofluorescence assay for serological diagnosis of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Clin Diagn Lab Immunol.* 11(4): 736-741.

Ramamoorthy S, Meng XJ. 2009. Porcine circoviruses: a minuscule yet mammoth paradox. *Anim Health Res Rev.* 10(1): 1-20.

Ramos-Vara JA, Duran O, Render JA, Craft D. 1997. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in the USA. *Vet Rec.* 141(18): 479-480.

Raye W, Muhling J, Warfe L, Buddle JR, Palmer C, Wilcox GE. 2005. The detection of porcine circovirus in the Australian pig herd. *Aust Vet J.* 83(5): 300-304.

Resendes AR, Majo N, Segalés J, Mateu E, Calsamiglia M, Domingo M. 2004a. Apoptosis in lymphoid organs of pigs naturally infected by porcine circovirus type 2. *J Gen Virol.* 85: 2837-2844.

Rodríguez-Arrijo GM, Segalés J, Rosell C, Quintana J, Ayllón S, Camprodón A, Domingo M. 1999. Aujeszky's disease virus infection concurrent with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Vet Rec.* 144: 152-153.

Rodríguez-Arrijo GM, Segalés J, Balasch M, Rosell C, Quintana J, Folch JM, Plana-Durán J, Mankertz A, and Domingo M. 2000. Serum antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2 in pigs with and without PMWS. *Vet Rec.* 146(26): 762-764.

Rodríguez-Arrijo GM, Segalés J, Calsamiglia M, Resendes AR, Balasch M, Plana-Durán J, Casal J and Domingo M. 2002. Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Am J Vet Res.* 63: 354-357.

Rodríguez-Arrijo GM, Segalés J, Domingo M, Plana-Duran J. 2003a. Lack of PCV-2 infection in non-porcine species in Spain. *Vet Rec.* 153(12): 371-372.

Rodríguez-Arrijo GM, Segalés J, Rosell C, Rovira A, Pujols J, Plana-Durán J, Domingo M. 2003b. Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. *J Vet Med B.* 50(2): 99-101.

Rodríguez-Cariño C, Segalés J. 2009. Ultrastructural findings in lymph nodes from pigs suffering from naturally occurring postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Pathol.* 46(4): 729-735.

Rose N, Larour G, Le Digerher G, Eveno E, Jolly JP, Blanchard P, Oger A, Le Dimna M, Jestin A, Madec F. 2003. Risk factors for porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in 149 French farrow-to-finish herds. *Prev Vet Med.* 61(3): 209-225.

Rose N, Abherve-Gueguen A, Le Digerher G, Eveno E, Jolly JP, Blanchard P, Oger A, Jestin A, Madec F. 2004. Effet de la génétique piétrain sur l'expression clinique de la maladie de l'amaigrissement du porcelet (MAP): étude dans 4 élevages naisseurs-engraisseurs [Effect of the Pietrain breed on clinical post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): a cohort study on four farrow-to-finish herds]. *Journées Recherche en Porcine France* 36: 339-344.

Rosell C, Segalés J, Plana-Durán J, Balasch M, Rodríguez-Arrijo GM, Kennedy S, Allan GM, McNeilly F, Latimer KS, Domingo M. 1999. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J Comp Pathol.* 120(1): 59-78.

Rosell C, Segalés J, Domingo M. 2000a. Hepatitis and staging of hepatic damage in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. *Vet Pathol.* 37(6): 687-692.

Rosell C, Segalés J, Ramos-Vara JA, Folch JM, Rodríguez-Arrijo GM, Duran CO, Balasch M, Plana-Duran J, Domingo M. 2000b. Identification of porcine circovirus in

tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Vet Rec.* 146(2): 40-43.

Ross RF. 2006. *Pasteurella multocida* and its role in porcine pneumonia. *Anim Health Res Rev.* 7(1-2): 13-29.

Rossow KD, Morrison RB, Goyal SM, Singh GS, Collins JE. 1994. Lymph node lesions in neonatal pigs congenitally exposed to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Vet Diagn Invest.* 6(3): 368-371.

Rossow KD, Collins JE, Goyal SM, Nelson EA, Christopher-Hennings J, Benfield DA. 1995. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. *Vet Pathol.* 32(4): 361-373.

Rossow KD, Benfield DA, Goyal SM, Nelson EA, Christopher-Hennings J, Collins JE. 1996. Chronological immunohistochemical detection and localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in gnotobiotic pigs. *Vet Pathol.* 33(5): 551-556.

Rossow KD. 1998. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet Pathol.* 35(1): 1-20.

Rovira A, Balasch M, Segalés J, García L, Plana-Durán J, Rosell C, Ellerbrok H, Mankertz A, Domingo M. 2002. Experimental Inoculation of Conventional Pigs with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Porcine Circovirus 2. *J Virol.* 76(7): 3232-3239.

Royer RL, Nawagitgul P, Halbur PG, Paul PS. 2001. Susceptibility of porcine circovirus type 2 to commercial and laboratory disinfectants. *J Swine Health Prod.* 9: 281-284.

Saar LI, Getty R. 2002. Sistema linfático de los porcinos. In: *Anatomía de los animales domésticos de Sisson y Grossman*, 5ª ed. Tomo II. pp. 1481-1497. Masson. España.

Salgado RL, Vidigal PM, de Souza LF, Onofre TS, Gonzaga NF, Eller MR, Bressan GC, Fietto JL, Almeida MR, Silva Júnior A. 2014. Identification of an Emergent Porcine Circovirus-2 in Vaccinated Pigs from a Brazilian Farm during a Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome Outbreak. *Genome Announc.* 20: 2(2).

Sánchez RE Jr, Nauwynck HJ, McNeilly F, Allan GM, Pensaert MB. 2001a. Porcine circovirus 2 infection in swine fetuses inoculated at different stages of gestation. *Vet Microbiol.* 83: 169-176.

Sánchez R, Nauwynck H, Pensaert M. 2001b. Serological survey of porcine circovirus 2 antibodies in domestic and feral pig populations in Belgium. In: *Proceedings of the ssDNA Viruses Plants, Birds, Pigs and Primates (ESVV) Meeting.* p.122.

Sánchez Jr RE, Meerts P, Nauwynck HJ and Pensaert MB. 2003. Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life. *Vet Microbiol.* 95(1-2): 15-25.

Sánchez RE Jr, Meerts P, Nauwynck HJ, Ellis JA, Pensaert MB. 2004. Characteristics of porcine circovirus-2 replication in lymphoid organs of pigs inoculated in late gestation or postnatally and possible relation to clinical and pathological outcome of infection. *J Vet Diagn Invest.* 16(3): 175-185.

Saoulidis K, Kyriakis SC, Kennedy S, Lekkas S, Miliotis CC, Allan G, Balkamos GC, Papoutsis PA. 2002. First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome in pigs in Greece. *J Vet Med B.* 49(4): 202-205.

Sarli G, Mandrioli L, Panarese S, Brunetti B, Segalés J, Domínguez J, Marcato PS. 2008. Characterization of interstitial nephritis in pigs with naturally occurring postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Pathol.* 45(1): 12-18.

Sarradell J, Pérez AM, Andrada M, Rodríguez F, Fernández A, Segalés J. 2002. PMWS in Argentina. *Vet Rec.* 150(10): 323.

Sarradell J, Andrada M, Ramírez AS, Fernández A, Gómez-Villamandos JC, Jover A, Lorenzo H, Herráez P, Rodríguez F. 2003. A morphologic and immunohistochemical study of the bronchus-associated lymphoid tissue of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Pathol.* 40(4): 395-404.

Sato K, Shibahara T, Ishikawa Y, Kondo H, Kubo M, Kadota K. 2000. Evidence of porcine circovirus infection in pigs with wasting disease syndrome from 1985 to 1999 in Hokkaido, Japan. *J Vet Med Sci.* 62(6): 627-633.

Schulze C, Segalés J, Neumann G, Hlinak A, Calsamiglia M, Domingo M. 2004. Identification of postweaning multisystemic wasting syndrome in European wild boar (*Sus scrofa*). *Vet Rec.* 154(22): 694-696.

Schuster FL, Ramirez-Avila L. 2008. Current world status of *Balantidium coli*. *Clin Microbiol Rev.* 21(4): 626-638.

Seeliger FA, Brüggmann ML, Krüger L, Greiser-Wilke I, Verspohl J, Segalés J, Baumgärtner W. 2007. Porcine circovirus type 2-associated cerebellar vasculitis in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected pigs. *Vet Pathol.* 44(5): 621-634.

Segalés J, Sitjar M, Domingo M, Dee S, Del Pozo M, Noval R, Sacristán C, De las Heras A, Ferro A, Latimer KS. 1997. First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain. *Vet Rec.* 141(23): 600-601.

Segalés J, Piella J, Marco E, Mateu-de-Antonio EM, España E, Domingo M. 1998. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Spain. *Vet Rec.* 142(18): 483-486.

Segalés J, Alonso F, Rosell C, Pastor J, Chianini F, Campos E, López-Fuertes L, Quintana J, Rodríguez-Arriola G, Calsamiglia M, Pujols J, Domínguez J, Domingo M. 2001. Changes in peripheral blood leukocyte populations in pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol.* 81(1-2): 37-44.

Segalés J. 2002. Update on postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome diagnostics. *J Swine Health Prod.* 10(6): 277-281.

Segalés J, Domingo M. 2002. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Vet Q.* 24(3): 109-124.

Segalés J, Calsamiglia M, Rosell C, Soler M, Maldonado J, Martín M, Domingo M. 2002. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection status in pigs naturally affected with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain. *Vet Microbiol.* 85(1): 23-30.

Segalés J, Calsamiglia M, Domingo M. 2003a. How We Diagnose Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome. 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases-Rome June 29th-July 2nd, 149-151.

Segalés J, Collell M, Jensen HE, Blanco JL, Domingo M. 2003b. Pulmonary Aspergillosis in a postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected pig. *Pig Journal.* 52: 41-47.

Segalés J, Domingo M, Chianini F, Majo N, Domínguez J, Darwich L, Mateu E. 2004a. Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. *Vet Microbiol.* 98: 151-158.

Segalés J, Rosell C, Domingo M. 2004b. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Vet Microbiol.* 98: 137-149.

Segalés J, Allan GM, Domingo M. 2005a. Porcine circovirus diseases. *Anim Health Res Rev.* 6(2): 119-142.

Segalés J, Calsamiglia M, Olvera A, Sibila M, Badiella L, Domingo M. 2005b. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Microbiol.* 111: 223-229.

Segalés J, Rodríguez J, Resendes A, Balasch M, Sanz AJ, Plana-Durán J, Venteo A. 2005c. Humoral immune responses and correlation with viraemia in pigs subclinically infected with porcine circovirus type 2. In: *Proc Intern Conf "Animal Circoviruses and Associated Diseases"*. Belfast, UK. p. 61.

Segalés J. 2006. *Proc Am Assoc Swine Veterinarians: PCV2/PMWS seminar* 12, 37: 1-7.

Segalés 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, Armstrong D, Grassland B, Baekbo P, Allan G. 2008. PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Vet Rec.* 162(26): 867-868.

Segalés J, Urniza A, Alegre A, Bru T, Crisci E, Nofrarías M, López-Soria S, Balasch M, Sibila M, Xu Z, Chu HJ, Fraile L, Plana-Duran J. 2009. A genetically engineered chimeric vaccine against porcine circovirus type 2 (PCV2) improves clinical, pathological and virological outcomes in postweaning multisystemic wasting syndrome affected farms. *Vaccine*. 27(52): 7313-7321.

Segalés J. 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res*. 164(1-2): 10-19.

Segalés J, Kekarainen T, Cortey M. 2013. The natural history of porcine circovirus type 2: From an inoffensive virus to a devastating swine disease?. *Vet Microbiol*. 165(1-2): 13-20.

Shen HG, Halbur PG, Opriessnig T. 2012. Prevalence and phylogenetic analysis of the current porcine circovirus 2 genotypes after implementation of widespread vaccination programmes in the USA. *J Gen Virol*. 93(Pt 6): 1345-1355.

Shibahara T, Sato K, Ishikawa Y, Kadota K. 2000. Porcine circovirus induces B lymphocyte depletion in pigs with wasting disease syndrome. *J Vet Med Sci*. 62(11): 1125-1131.

Shibata I, Okuda Y, Yazawa S, Ono M, Sasaki T, Itagaki M, Nakajima N, Okabe Y, Hidejima I. 2003. PCR detection of 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*. 65: 405-408.

Sibila M, Calsamiglia M, Segalés J, Blanchard P, Badiella L, Le Dimma M, Jestin A, Domingo M. 2004. Use of a polymerase chain reaction assay and an ELISA to monitor porcine circovirus type 2 infection in pigs from farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Am J Vet Res*. 65(1): 88-92.

Sibila M, Pieters M, Molitor T, Maes D, Haesebrouck F, Segalés J. 2009. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Vet J*. 181(3): 221-231.

Sibila M, Fort M, Nofrarías M, Pérez de Rozas A, Galindo-Cardiel I, Mateu E, Segalés J. 2012. Simultaneous porcine circovirus type 2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-inoculation does not potentiate disease in conventional pigs. *J Comp Pathol*. 147(2-3): 285-295.

Sipos W, Duvigneau JC, Willheim M, Schilcher F, Hartl RT, Hofbauer G, Exel B, Pietschmann P, Schmoll F. 2004. Systemic cytokine profile in feeder pigs suffering from natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) as determined by semiquantitative RT-PCR and flow cytometric intracellular cytokine detection. *Vet Immunol Immunopathol*. 99(1-2): 63-71.

Sipos W, Duvigneau JC, Pietschmann P, Schilcher F, Hofbauer G, Hartl RT, Schmoll F. 2005. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) is associated with a systemic cytokine expression profile indicative of proinflammation and a Th1 bias. *Vet Immunol Immunopathol*. 107: 303-313.

Sirinarumitr T, Morozov I, Nawagitgul P, Sorden SD, Harms PA, Paul PS. 2000. Utilization of a rate enhancement hybridization buffer system for rapid in situ hybridization for the detection of porcine circovirus in cell culture and in tissues of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Vet Diagn Invest.* 12(6): 562-565.

Sirinarumitr T, Sorden SD, Morozov I, Paul PS. 2001. Double in situ hybridization for simultaneous detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circovirus (PCV). *J Vet Diagn Invest.* 13(1): 68-71.

Smith WJ, Thomson JR, Done S. 1993. Dermatitis/nephropathy syndrome of pigs. *Vet Rec.* 132(2): 47.

Sorden SD, Harms PA, Sirinarumitr T et al. 1998. Porcine circovirus and PRRS virus co-infection in pigs with chronic bronchointerstitial pneumonia and lymphoid depletion: an emerging syndrome in Midwestern swine. *Proc Am Assoc Vet Lab Diagn.* 41: 75.

Sorden SD, Harms PA, Nawagitgul P, Cavanaugh D, Paul PS. 1999. Development of a polyclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of type 2 porcine circovirus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Vet Diagn Invest.* 11(6): 528-530.

Sorden SD. 2000. Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health Prod.* 8: 133-136.

Sørensen V, Ahrens P, Barfod K, Feenstra AA, Feld NC, Friis NF, Bille-Hansen V, Jensen NE, Pedersen MW. 1997. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. *Vet Microbiol.* 54(1): 23-34.

Spillane P, Kennedy S, Meehan B, Allan GM. 1998. Porcine circovirus infection in the Republic of Ireland. *Vet Rec.* 143(18): 511-512.

Stalker MJ, Hayes MA. 2007. Liver and biliary system. In: Jubb, Kennedy & Palmer's *Pathology of Domestic Animals* 5th Edition. Vol 2. pp.297-388. Elsevier Saunders. New York, NY.

Steiner E, Balmelli C, Gerber H, Summerfield A, McCullough K. 2009. Cellular adaptive immune response against porcine circovirus type 2 in subclinically infected pigs. *BMC Vet Res.*5: 45.

Stevenson GW, Kiupel M, Mittal SK, Kanitz CL. 1999. Ultrastructure of porcine circovirus in persistently infected PK-15 cells. *Vet Pathol.* 36(5): 368-378.

Stevenson GW, Kiupel M, Mittal SK, Choi J, Latimer KS, Kanitz CL. 2001. Tissue distribution and genetic typing of porcine circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tremors. *J Vet Diagn Invest.* 13(1): 57-62.

Stevenson LS, McCullough K, Gilpin DF, Vincent I, Summerfield A, Nielsen J, McNeilly F, Adair BM and Allan GM. 2004. Cytokine profiles induced by porcine

circovirus type 2 experimental infection in 3-week-old pigs. In: Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress. p.16.

Stevenson LS, McCullough K, Vincent I, Gilpin DF, Summerfield A, Nielsen J, McNeilly F, Adair BM, Allan GM. 2006. Cytokine and C-reactive protein profiles induced by porcine circovirus type 2 experimental infection in 3-week-old piglets. *Viral Immunol.* 19(2): 189-195.

Strasser M, Abiven P, Kobisch M, Nicolet J. 1992. Immunological and pathological reactions in piglets experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* and/or *Mycoplasma flocculare*. *Vet Immunol Immunopathol.* 31(1-2): 141-153.

Szeredi L, Szentirmai C. 2008. Proliferative and necrotising pneumonia and severe vascular lesions in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. *Acta Vet Hung.* 56(1): 101-109.

Szeredi L, Dán A, Solymosi N, Cságola A, Tuboly T. 2012. Association of porcine circovirus type 2 with vascular lesions in porcine pneumonia. *Vet Pathol.* 49(2): 264-270.

Taylor CR, Shi S-R, Barr NJ, Wu N. 2002. Techniques of immunohistochemistry: principles, pitfalls, and standardization. In: *Diagnostic Immunohistochemistry.* pp.3-43. Ed. Dabbs DJ, Churchill Livingstone. New York, NY.

Thacker B, Thacker E. 2000. The PRDC battle continues. *Pig Progress.* June: 16-18.

Thacker EL. 2001. Immunology of the porcine respiratory disease complex. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 17(3): 551-565.

Thacker EL, Thanawongnuwech R. 2002. Porcine respiratory disease complex (PRDC). *Thai J Vet Med.* 32, Suppl.: 126-134.

Thanawongnuwech R, Halbur PG, Thacker EL. 2000. The role of pulmonary intravascular macrophages in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Anim Health Res Rev.* 1(2): 95-102.

Thibault S, Drolet R, Germain MC, D'Allaire S, Laroche R, Magar R. 1998. Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine. *Vet Pathol.* 35(2): 108-116.

Thomas PJ, Opriessnig T, Juhan NM, Meng XJ, Halbur PG. 2007. Planned exposure to porcine circovirus type 2 by serum injection is not effective at preventing porcine circovirus associated disease. *J Swine Health Prod.* 15(6): 330-338.

Thomson JR, Higgins RJ, Smith WJ, Done SH. 2002. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome. clinical and pathological features of cases in the United Kingdom (1993-1998). *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 49(8): 430-437.

Ticó G, Segalés J, Martínez J. 2013. The blurred border between porcine circovirus type 2-systemic disease and porcine respiratory disease complex. *Vet Microbiol.* 163(3-4): 242-247.

Timmusk S, Wallgren P, Belak K, Berg M, Fossum C. 2005. Genetic analysis of PCV2 capsid protein sequences reveals two main groups of Swedish isolates. Proceedings of European society for veterinary virology (ESVV). Conference on animal circoviruses and associated diseases, p.82.

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(2): 153-67.

Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, Koch MA. 1982. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. Nature. 295(5844): 64-66.

Tischer I, Miels W, Wolff D, Vagt M, Griem W. 1986. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. Arch Virol. 91(3-4): 271-276.

Tischer I, Peters D, Rasch R, Pociuli S. 1987. Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. Arch Virol. 96(1-2):39-57.

Tischer I, Buhk HJ. 1988. Viral DNA from cells infected with porcine circovirus. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene. Series A. 270(1-2): 280-287.

Tischer I, Bode L, Apodaca J, Timm H, Peters D, Rasch R, Pociuli S, Gerike E. 1995a. Presence of antibodies reacting with porcine circovirus in sera of humans, mice, and cattle. Arch Virol. 140(8): 1427-1439.

Tischer I, Bode L, Peters D, Pociuli S, Germann B. 1995b. Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms. Arch Virol. 140(4): 737-743.

Tischer I, Peters D, Pociuli S. 1995c. Occurrence and role of an early antigen and evidence for transforming ability of porcine circovirus. Arch Virol. 140(10): 1799-816.

Todd D, Bendinelli M, Biagini P, et al. 2005. Circoviridae. In: Virus taxonomy, Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses, ed. Fauquet C, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. pp. 327–334. Elsevier Academic Press, San Diego, CA.

Togashi K, Mawatari T, Mitobe S, Moriya S. 2011. Reproductive losses associated with porcine circovirus type 2 in a Japanese herd of seronegative sows. J Vet Med Sci. 73(7): 941-944.

Trujano M, Iglesias G, Segalés J, Palacios JM. 2001. PCV-2 from emaciated pigs in Mexico. Vet Rec. 148(25): 792.

Truyen U, Streck AF. 2012. Porcine Parvovirus, p.447-455. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramírez A, Schwartz KJ, Stevenson GW (ed.), Diseases of Swine, 10th ed. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa.

Tucker AW. 2006. Porcine multi-systemic wasting syndrome (PMWS): a review. Pig Journal. April. 2006.

- VanAlstine WG. 2012. Respiratory System, p.348-362. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW (ed.), Diseases of Swine, 10th ed. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa.
- van Leengoed LA, Vos J, Gruys E, Rondhuis P, Brand A. 1983. Porcine Parvovirus infection: review and diagnosis in a sow herd with reproductive failure. *Vet Q.* 5(3): 131-141.
- van Zwieten MJ, Solleveld HA, Lindsey JR, de Groot FG, Zurcher C, Hollander CF. 1980. Respiratory disease in rats associated with a filamentous bacterium: A preliminary report. *Lab Anim Sci.* 30(2 Pt 1): 215-221.
- Vicente J, Segalés J, Höfle U, Balasch M, Plana-Durán J, Domingo M, Gortázar C. 2004. Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Vet Res.* 35(2): 243-253.
- Vincent IE, Carrasco CP, Herrmann B, Meehan BM, Allan GM, Summerfield A, McCullough KC. 2003. Dendritic cells harbour infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus. *J Virol.* 77(24): 13288-13300.
- Vincent IE, Carrasco CP, Guzylack-Piriou L, Herrmann B, McNeilly F, Allan GM, Summerfield A, McCullough KC. 2005. Subset-dependent modulation of dendritic cell activity by circovirus type 2. *Immunology.* 115(3): 388-398.
- Voicu IL, Silim A, Morin M, Elazhary MA. 1994. Interaction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with swine monocytes. *Vet Rec.* 134(16): 422-423.
- Vyt P, Labar G, Bos M, Nauwynck H, Roels S, Miry C, Pensaert M, Ducatelle R. 2000. The "post-weaning multisystemic wasting syndrome" in Belgium. *Flemish Vet J.* 69: 435-440.
- Waddilove AEJ, Marco E. 2002. Assessing serotherapeutic control of PMWS in the field. In: Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress. p. 34.
- Walker IW, Konoby CA, Jewhurst VA, McNair I, McNeilly F, Meehan BM, Cottrell TS, Ellis JA, Allam GM. 2000. Development and application of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2. *J Vet Diagn Invest.* 12(5): 400-405.
- Wallgren P, Hasslung F, Bergström G, Linder A, Belak K, Hård af Segerstad C, Stampe M, Molander B, Björnberg Kallay T, Nörregård E, Ehlörsson CJ, Törnquist M, Fossum C, Allan GM, Robertsson JA. 2004. Postweaning multisystemic wasting syndrome-PMWS. The first year with the disease in Sweden. *Vet Q.* 26(4): 170-87.
- Wang F, Guo X, Ge X, Wang Z, Chen Y, Cha Z and Yang H. 2009. Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2. *Virus Res.* 145: 151-156.

- Welch J, Bienek C, Gomperts E, Simmonds P: 2006, Resistance of porcine circovirus and chicken anemia virus to virus inactivation procedures used for blood products. *Transfusion*. 46: 1951-1958.
- Wellenberg GJ, Pesch S, Berndsen FW, Steverink PJ, Hunneman W, Van der Vorst TJ, Peperkamp NH, Ohlinger VF, Schippers R, Van Oirschot JT, de Jong MF. 2000. Isolation and characterization of porcine circovirus type 2 from pigs showing signs of post-weaning multisystemic wasting syndrome in The Netherlands. *Vet Q*. 22(3): 167-172.
- Wellenberg GJ, Stockhofe-Zurwieden N, Boersma WJ, De Jong MF, Elbers AR. 2004a. The presence of co-infections in pigs with clinical signs of PMWS in The Netherlands: a case-control study. *Res Vet Sci*. 77(2): 177-184.
- Wellenberg GJ, Stockhofe-Zurwieden N, de Jong MF, Boersma WJ, Elbers AR. 2004b. Excessive porcine circovirus type 2 antibody titers may trigger the development of porcine dermatitis and nephropathy syndrome: a case-control study. *Vet Microbiol*. 99: 203-214.
- Wellenberg GJ, Bouwkamp FT, Wolf PJ, Swart WA, Mombarg MJ, de Gee AL. 2010. A study on the severity and relevance of porcine circovirus type 2 infections in Dutch fattening pigs with respiratory diseases. *Vet Microbiol*. 142(3-4): 217-224.
- Wen L, Guo X, Yang H. 2005. Genotyping of porcine circovirus type 2 from a variety of clinical conditions in China. *Vet Microbiol*. 110: 141-146.
- Wensvoort G, Terpstra C, Pol JM, ter Laak EA, Bloemraad M, de Kluyver EP, Kragten C, van Buiten L, den Besten A, Wagenaar F, Broekhuijsen JM, Moonen PLJM, Zetstra T, de Boer EA, Tibben HJ, de Jong MF, van 't Veld P, Greenland GJR, van Gennep JA, Voets MTh, Verheijden JHM, Braamskamp J. 1991. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet Q*. 13(3): 121-130.
- Wesley RD, Mengeling WL, Lager KM, Clouser DF, Landgraf JG, Frey ML. 1998. Differentiation of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine strain from North American field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF 5. *J Vet Diagn Invest*. 10(2): 140-144.
- 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.
- Wills RW, Doster AR, Galeota JA, Sur JH, Osorio FA. 2003. Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Clin Microbiol*. 41(1): 58-62.
- Woodbine KA, Medley GF, Slevin J, Kilbride AL, Novell EJ, Turner MJ, Keeling MJ, Green LE. 2007. Spatiotemporal patterns and risks of herd breakdowns in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Rec*. 160(22): 751-762.

Yang JS, Song DS, Kim SY, Lyoo KS, Park BK. 2003. Detection of porcine circovirus type 2 in feces of pigs with or without enteric disease by polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest.* 15: 369-373.

Yazar S, Altuntas F, Sahin I, Atambay M. 2004. Dysentery caused by *Balantidium coli* in a patient with non-Hodgkin's lymphoma from Turkey. *World J Gastroenterol.* 10(3): 458-459.

Yu S, Carpenter S, Opriessnig T, Halbur PG, Thacker E. 2005. Development of a reverse transcription-PCR assay to detect porcine circovirus type 2 transcription as a measure of replication. *J Virol Methods.* 123(1): 109-112.

Yue F, Cui S, Zhang C, Yoon KJ. 2009. A multiplex PCR for rapid and simultaneous detection of porcine circovirus type 2, porcine parvovirus, porcine pseudorabies virus, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in clinical specimens. *Virus Genes.* 38(3): 392-397.

Zlotowski P, Correa AMR, Barcellos DESN, Cruz CEF, Asanome W Barry AF, Alfieri AA, Driemeier D. 2008. Intestinal lesions in pigs affected with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Pesquisa Veterinaria Brasileira.* 28(6): 313-318.