

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
FACULTAT DE VETERINÀRIA
DEPARTAMENT DE SANITAT I D'ANATOMIA ANIMALS

***CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE LA
CIRCOVIROSIS PORCINA: DISEMINACIÓN EN GRANJA Y
ESTUDIO RETROSPECTIVO EN ESPAÑA.***

Trabajo presentado por
Gabriela M. Rodríguez-Arriola
para optar al grado de doctor en Veterinaria

Joaquim Segalés i Coma y **Mariano Domingo Álvarez** profesor asociado a tiempo completo y catedrático, respectivamente, del Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada “**Contribución al estudio epidemiológico de la circovirus porcina: diseminación en granja y estudio retrospectivo en España.**”, de la que es autora la licenciada en Veterinaria Gabriela M. Rodríguez Arriola, se ha realizado en los laboratorios de la Unidad de Histología y Anatomía Patológica de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona bajo nuestra dirección.

Para que conste, firmamos la presente en Bellaterra 5 de septiembre del 2002

Dr. Joaquim Segalés i Coma

Dr. Mariano Domingo Álvarez

La autora de éste trabajo de Tesis Doctoral ha disfrutado, desde el 1 de febrero de 1998 hasta el 1 de febrero de 2002, de una beca OPIS del programa de Ayudas para el intercambio de personal investigador entre industrias y centros públicos de investigación (BOE 20-11-92). La Universitat Autònoma de Barcelona y Laboratorios Calier S.A, Les Franqueses del Vallès, Barcelona, han sido las entidades colaboradoras.

Quiero dedicar este trabajo

A mi Gustavo, a Gabriel Andreu y a quién vendrá porque les amo.

A mi madre María del Valle.

A la memoria de mi padre Rafael Rodríguez Cantó

A la memoria de la inolvidable Juana Yanez.

A mis queridos Carlota, Gustavote, Isbel, Liz, Alejandra, Carlos, Alejandro,

Fred, Saúl y Diego.

A mi Facultad, FCV-UCV.

Todos sabemos que una tesis es el fruto de la colaboración de mucha gente, bien en momentos puntuales, o bien de manera constante, por ello quiero agradecer:

A Gustavo por creer en mi y haber estado a mi lado todos estos años, por su comprensión, y ayuda en todo momento, tanto en el campo profesional como en el personal. Gus gracias por todo.

A Mariano Domingo y a Quim por ofrecerme la oportunidad de realizar la tesis doctoral bajo su dirección y los medios necesarios para llegar al final de este trabajo, especialmente a Quim por haberme dado su apoyo en la orientación de la tesis, así como por su constancia y dedicación en cada uno de los estudios realizados que hicieron posible la culminación de ésta tesis, por ello Quim, muchas gracias.

A Joan Marca y Francisco Vila de Laboratorios Calier, quienes también hicieron posible la realización de esta tesis.

A todos los coautores de los estudios, especialmente a Fina, por tantas horas de laboratorio compartidas, a Mónica B. por sus enseñanzas

de la IPMA, a Jordi por las largas horas de análisis de datos que al final dieron sus frutos y a Joseph María por enseñarme el mundo de las PCR.

A los profesores y secres de Histología y Anatomía Patológica, que siempre estuvieron allí en los momentos que les necesitaba, pero quisiera agradecer especialmente a Rosa y a Martí quienes traspasaron esa frontera y me dieron su mano cuando menos lo esperaba, a ellos de verdad muchas gracias. Finalmente a mis compañeros becarios, a los que ya se fueron, Dani, Xavi y Santi, gracias por sus consejos, al principio no bien entendidos pero con el tiempo sí. A los contemporáneos, a cada uno de ellos que no nombro porque sino no acabaría nunca, a ellos por esa alegría y momentos compartidos que no volverán, pero especialmente a MJ por su amistad incondicional.

A todo el personal técnico, con los cuales compartí momentos muy agradables durante los días que 'invadía' su terreno, a ellos gracias por sus enseñanzas y sus risas, por estar siempre allí y alegrar algunos días, sin que os dierais cuenta. Y a Mónica P. unas gracias especiales, por su eficiencia, capacidad de trabajo, y por esos ratos compartidos. Este trabajo tiene sus nombres en cada resultado obtenido.

A todos y cada uno de los “infecciosos”, gracias por su aporte en alguna fase de esta tesis, a algunos, especialmente, por su apoyo personal en esos momentos que era necesario y a Jordi Casal por compartir sus conocimientos, orientación y apoyo en momentos cruciales del desarrollo de la tesis.

A la familia Gaspar-Utrera y a la familia Mejía-Zapata, por estar siempre allí.

ÍNDICE

Índice

1. Introducción	1
1.1. Reseña histórica del circovirus porcino (PCV)	3
1.2. Clasificación taxonómica	5
1.3. Similitud con otros virus	6
1.4. Circovirus porcinos (PCVs)	6
1.4.1. Características físico-químicas de los PCVs	6
1.4.2. Características del genoma de los PCVs	7
1.5. Circovirus porcino tipo 1 (PCV1)	8
1.5.1. Epidemiología del PCV1	8
1.5.1.1. Distribución geográfica del PCV1	8
1.5.1.2. Transmisión del PCV1	9
1.5.2. Inmunidad y PCV1	9
1.5.2.1. Inmunidad humoral frente a PCV1	9
1.5.2.2. Efecto del PCV1 sobre las células del sistema inmune	10
1.6. Circovirus porcino tipo 2 (PCV2)	10
1.6.1. Epidemiología del PCV2	10
1.6.1.1. Distribución geográfica del PCV2	11
1.6.1.2. Transmisión del PCV2	11
1.6.2. Inmunidad y PCV2	12
1.6.2.1. Inmunidad humoral frente a PCV2	12
1.6.2.2. Efecto del PCV2 sobre las células del sistema inmune	12

Índice

1.6.3. Patogenicidad del PCV2	13
1.7. Síndrome de adelgazamiento post-destete (PMWS)	13
1.7.1. Epidemiología del PMWS	14
1.7.1.1. Distribución geográfica del PMWS	14
1.7.1.2. Comportamiento del PMWS en las granjas porcinas ..	14
1.7.2. Sintomatología clínica	15
1.7.3. Lesiones macroscópicas	15
1.7.4. Lesiones microscópicas	16
1.7.5 Diagnóstico del PMWS	17
1.7.5.1. Detección de PCV2	17
1.7.5.1.1. Inmunohistoquímica (IH)	17
1.7.5.1.2. Hibridación <i>in situ</i> (HIS)	18
1.7.5.1.3. IFI	18
1.7.5.1.4. PCR	18
1.7.5.1.5. Aislamiento vírico	19
1.7.5.1.6. Microscopía electrónica	19
1.7.5.2. Detección de anticuerpos frente a PCV2	20
1.7.6. Tratamiento y control	20
2. Objetivos	23
3. Artículos	27

Índice

3.1. Serum antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2 in pigs with and without PMWS.....	
<i>Veterinary Record</i> (2000) 146, 762-764	29
3.2. Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain.	
Enviado a: <i>The Journal of Veterinary Medicine B</i>	35
3.3. Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome	
<i>American Journal of Veterinary Research</i> (2002) 63, 354-357	53
4. Discusión	59
5. Conclusiones	75
6. Bibliografía	79

ABREVIATURAS

ADV: *Aujeszky disease virus*, virus de la enfermedad de Aujeszky.

ATCC-CCL33: *American Type Culture Collection-CCL 33*, colección de cultivo tipo americano CCL-33.

BFDV: *beak and feather disease virus*, virus de la enfermedad del pico y de las plumas de las psitácidas.

CaCV: *canary circovirus*, circovirus del canario.

Cap: proteína estructural de la cápside.

CAV: *chicken anemia virus*, virus de la anemia del pollo.

CD25: receptor para interleukina 2.

CD4: linfocitos T cooperadores.

CD8: linfocitos T citotóxicos.

cm³: centímetros cúbicos.

CoCV o PiCV: *pigeon circovirus o columbid circovirus*, circovirus de la paloma.

CsCl: cloruro de Cesio.

DNA: *desoxiribonucleic acid*, ácido desoxiribonucleico.

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*, prueba de enzima-inmunoensayo.

g: gramos.

GCV: *goose circovirus*, circovirus del ganso.

GuCV: *gull circovirus*, circovirus de la gaviota.

HIS: hibridación *in situ*.

ICTV: *The International Committee on Taxonomy of Viruses*, Comité Internacional de Taxonomía de Virus.

IFI: inmunofluorescencia indirecta.

Ig: inmunoglobulina.

IH: inmunohistoquímica.

IBR-S2: Línea celular de riñón de cerdo del Instituto Biológico de Río-strain 2.

IPMA: *immunoperoxidase monolayer assay*, técnica de inmunoperoxidasa en monocapa celular.

kb: kilobases.

kDa: kilodalton.

MHC I: *Major Histocompatibility Complex class I*, complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I.

MHC II: *Major Histocompatibility Complex class II*, complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II.

nm: nanómetros.

nt: nucleótidos.

ORF: *open reading frames*, fragmentos de lectura abierta.

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

PCV: *porcine circovirus*, circovirus porcino.
PCV1: *porcine circovirus type 1*, circovirus porcino tipo 1.
PCV2: *porcine circovirus type 2*, circovirus porcino tipo 2.
PI: post-inoculación.
PK-15: *porcine kidney-15*, línea celular de riñón de cerdo.
PMWS: *postweaning multisystemic wasting syndrome*, síndrome (multisistémico) de adelgazamiento postdestete.
PNP: *proliferative necrotizing pneumonia*, neumonía proliferativa necrotizante.
PPV: *porcine parvovirus*, parvovirus porcino.
PRRSV: *porcine reproductive and respiratory syndrome virus*, virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino.
PSI: *cells persistently infected with an Spanish PCV2 isolate*, línea celular infectada persistentemente con un aislado Español de PCV2.
Rep: proteína de replicación vírica.
RFLP: *restriction fragment length polymorphism*, porlismorfismo de la longitud de un fragmento de restricción.
RNA: *ribonucleic acid*, ácido ribonucleico.
RPS: *reins porcine clon S*, línea celular de riñón de cerdo, clon S.
S: coeficiente de sedimentación.
SDNP: síndrome de dermatitis y nefropatía porcino.
SK: *swine kidney cell line*, línea celular de riñón de cerdo.
SPF: *specific pathogens free*, libre de patógenos específicos.
ST: *swine testicle cell line*, línea celular de testículo de cerdo.
TLMV: *TTV-like mini virus*, minivirus parecido al TTV.
TTV: *Transfusion-transmitted virus*, virus transmitido por transfusiones.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Reseña histórica del circovirus porcino (PCV)

El PCV fue descrito por primera vez hace veintiocho años como un virus contaminante de la línea celular de riñón de cerdo PK-15 (ATCC-CCL33) (Tischer *et al.*, 1974). Esta línea celular se encontraba infectada por dos virus distintos, uno similar a un *Picornavirus* que fue denominado *Picornavirus-like*, y otro morfológicamente parecido a un *Papovavirus* (*Papovavirus-like*). El *Picornavirus-like* se aislaba sistemáticamente de los subcultivos de todas las líneas PK-15 y siempre estaba presente en grandes cantidades en cada pase de células que se realizaba. Al contrario, la cantidad de *Papovavirus-like* disminuía en cada pase que se realizaba en la línea celular PK-15; durante los primeros 40 pases se detectaba el virus, pero en los siguientes pases se aislaba en muy baja cantidad o bien desaparecía. El origen de ambos virus era desconocido, y ninguno de los dos producía efecto citopático sobre esta línea celular. El *Picornavirus-like* se definió inicialmente como un virus RNA, con un diámetro de 17 nm, gradiente de densidad de 1,37g/cm³ en Cloruro de Cesio (CsCl) y termoestable.

Estudios posteriores del *Picornavirus-like* revelaron que se trataba de un pequeño virus DNA de cadena sencilla y circular, sin envoltura, icosaédrico y con un diámetro de 17 nm (Tischer *et al.*, 1982). Estos investigadores observaron que este virus no había sido descrito previamente y fue denominado circovirus porcino (PCV).

Posteriormente, se realizaron estudios epidemiológicos y de patogenicidad del PCV, demostrándose que los cerdos presentaban anticuerpos circulantes frente a este virus sin presentar ningún tipo de enfermedad. También se realizaron estudios serológicos para detectar anticuerpos frente a PCV en conejos, vacas y en la especie humana que resultaron negativos, por lo que se sugirió que el agente era originario de los cerdos y aparentemente no se había traspasado la barrera inter-especie (Tischer *et al.*, 1982). Más tarde, Tischer *et al.*, (1995) encontraron anticuerpos

Introducción

frente a PCV1 en suero de humanos, ratones y vacas utilizando una prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y una prueba de enzima-inmunoensayo (ELISA). La prevalencia frente a PCV1 observada en estos estudios fue del 30,2%; 12 a 69% y 35%, en humanos, ratones y vacas respectivamente. Los investigadores sugirieron que los anticuerpos encontrados en la especie humana, ratones y vacas podían ser debidos a posibles virus especie-específicos con epítomos antigénicos compartidos con PCV1.

Posteriormente se realizaron estudios de patogenicidad inoculando PCV en cerdos miniatura (*minipigs*), observando que éstos seroconvertían frente al virus entre las dos y cinco semanas post-inoculación (PI). De estos *minipigs* se aisló el PCV de la mucosa nasal en 4 de 6 cerdos entre las 3 y 6 semanas PI, y en 3 de 6 se logró aislar el virus a partir de muestras fecales a las 13 y 14 semanas PI (Tischer *et al.*, 1986). Por otro lado, estudios realizados en cerdos de engorde y reproductores determinaron que la presencia de anticuerpos frente a PCV en granjas porcinas era común, aunque no se observaba ninguna patología asociada a este virus (Dulac y Afshar, 1989; Tischer *et al.*, 1995).

En el año 1997 el PCV fue asociado a una enfermedad que afectaba a cerdos de transición conocida como síndrome multisistémico de adelgazamiento postdestete (PMWS, en inglés *postweaning multisystemic wasting syndrome*) (Clark, 1997). Esta enfermedad era ya conocida desde 1991 en Canadá, pero se consideraba de etiología desconocida (Harding, 1996; Clark, 1997; Harding y Clark, 1997; Harding *et al.*, 1998). Los síntomas observados eran pérdida de peso, palidez corporal, alteraciones respiratorias y, en algunos casos, ictericia y diarrea. Las lesiones más frecuentemente observadas eran neumonía intersticial y linfadenopatía generalizada, especialmente en los nódulos linfáticos inguinales superficiales. Otras lesiones que se observaban con menor frecuencia eran hepatitis, nefritis y pancreatitis no supurativas (Harding, 1996; Clark, 1997; Harding y Clark, 1997; Harding *et al.*, 1998;

Rosell *et al.*, 1999, 2000a). En los tejidos lesionados se observaba sistemáticamente una gran cantidad de antígeno y ácido nucleico de PCV (Clark, 1997; Rosell *et al.*, 1999).

El PCV estaba clasificado por el Comité Internacional Taxonómico de Virus (ICTV) en una nueva familia de virus, la familia *Circoviridae* (Lukert *et al.*, 1995). Estudios posteriores de secuenciación genómica demostraron que el PCV presente en cerdos afectados con PMWS era diferente al PCV que infectaba persistentemente la línea celular PK-15 (Hamel *et al.*, 1998; Meehan *et al.*, 1998). Por ello se sugirió la denominación de PCV tipo 1 (PCV1) para el circovirus de la línea celular PK-15, considerado apatógeno, y PCV tipo 2 (PCV2) para el circovirus asociado al PMWS (Allan *et al.*, 1998; Meehan *et al.*, 1998). Por ello, en adelante en esta tesis, se utilizará la nomenclatura PCV1 y PCV2 para designar los dos agentes víricos.

1.2. Clasificación Taxonómica

Los circovirus porcinos (PCVs) pertenecen a la familia *Circoviridae*, la cual está dividida en dos géneros, *Gyrovirus* y *Circovirus*. El género *Circovirus* contiene el PCV1, el PCV2, el virus de la enfermedad del pico y de las plumas de las psitácidas (*beak and feather disease virus*, BFDV) (Bassami *et al.*, 1998; Niagro *et al.*, 1998; Bassami *et al.*, 2001), el circovirus de la paloma (*pigeon circovirus*, PiCV ó *columbid circovirus*, CoCV) (Woods *et al.*, 1993; Mankertz *et al.*, 2000b), el circovirus del ganso (*goose circovirus*, GCV) (Todd *et al.*, 2001), el circovirus del canario (*canary circovirus*, CaCV) (Phenix *et al.*, 2001) y el circovirus de gaviotas (*gull circovirus*, GuCV) (Jestin *et al.*, 2001a). Al género *Gyrovirus* pertenece el virus de la anemia del pollo (*chicken anemia virus*, CAV) (Todd *et al.*, 1990; Pringle, 1999).

1.3. Similitud con otros virus

Un virus circular con organización genómica similar al CAV (Miyata *et al.*, 1999) ha sido aislado de pacientes humanos con hepatitis relacionadas con el uso de hemoderivados (*transfusion-transmitted virus*, TTV) (Nishizawa *et al.*, 1997). Este virus también se ha podido detectar en pacientes sanos, por lo que su patogenicidad no ha sido aclarada (Cleavinger *et al.*, 2000). Por otro lado, se ha detectado la presencia de genoma de TTV en sangre de chimpancés (Okamoto *et al.*, 2001), pollos, vacas, cerdos y ovejas (Mushahwar, 2001). Posteriormente, en 1999, se describió otro virus muy pequeño parecido al TTV en la especie humana, que fue denominado minivirus TTV-like (TTV-like mini virus, TLMV) (Takahashi *et al.*, 2000), constituyéndose en un nuevo miembro de la familia *Circoviridae*. Estudios preliminares sobre este virus demostraron que, al igual que el TTV, la prevalencia del virus en sangre (detectado por PCR) de individuos sanos era de alrededor de un 75% (Biagini *et al.*, 2001).

1.4. Circovirus Porcinos (PCVs)

1.4.1. Características físico-químicas de los PCVs

Los circovirus porcinos son virus sin envoltura, de tamaño pequeño (15 a 16 nm de diámetro) y morfología icosaédrica (Tischer *et al.*, 1982; Mankertz *et al.*, 2000a). Su genoma consiste en una cadena de DNA sencilla y circular de un tamaño de 1,76 kb (Tischer *et al.*, 1982), ligada covalentemente en sus extremos. Estos virus tienen una longitud de cadena de 1759 a 1768 nucleótidos (nt) (Meehan *et al.*, 1997; Hamel *et al.*, 1998; Fenaux *et al.*, 2000), un peso molecular de $36 \pm 2,3$ kDa, una densidad de flotación en CsCl entre 1,33 y 1,37 g/cm³ y un coeficiente de sedimentación de 52S (Tischer *et al.*, 1974). Datos referidos a PCV1 indican que se trata de un virus resistente a la

inactivación por cloroformo, al pH ácido y termoestable a 70°C durante 15 minutos (Allan *et al.*, 1994a).

1.4.2. Características del genoma de los PCVs

Estudios de secuenciación han determinado que el PCV1 contiene 1759 nt, y el PCV2 1767 - 1768 nt. El genoma de PCV2 tiene aproximadamente un 69% de similitud con el del PCV1, observándose que en la primera mitad de la cadena, entre los nt 1 al 900 existe un 82% de similitud mientras que en la segunda mitad de la cadena, de los nt 901 al 1768, existe un 62% de similitud entre los dos virus (Hamel *et al.*, 1998; Meehan *et al.*, 1998; Morozov *et al.*, 1998). Estudios realizados con distintos aislados de PCV2 de Canadá y USA han observado un 95-99% de similitud en la secuencia de nucleótidos (Fenaux *et al.*, 2000). En otro estudio de aislados de PCV2 de Europa se observó una similitud del 95 al 96% de su genoma (Mankertz *et al.*, 2000a). Aparentemente, las variaciones detectadas en el genoma de los distintos aislados de PCV2 parecen asociarse con el origen geográfico de los aislados (Fenaux *et al.*, 2000).

El genoma de los circovirus porcinos se caracteriza por tener una región que codifica proteínas (fragmentos de lectura abierta: *open reading frames*, ORFs), y una región que contiene secuencias de nucleótidos que no codifica proteínas pero que puede regular la transcripción y la replicación del virus (Hamel *et al.*, 1998). Se han descrito hasta 11 ORFs potenciales en el genoma de PCV2. La forma replicativa del PCV2 contiene varios ORFs con el potencial para codificar proteínas mayores de 5 kDa. Los dos principales serían el ORF1, que codifica una proteína de 35,7 kDa involucrada en la replicación vírica (*Rep protein*), y el ORF2 que codifica para la principal proteína estructural de la cápside (*Cap protein*) de 27,8 kDa (Mankertz *et al.*, 2000; Mankertz y Hillenbrand, 2001). La similitud entre las secuencias de los ORFs de diferentes aislados de PCV2 analizados fue aproximadamente del 90% (Fenaux *et al.*, 2000).

Se ha observado que el ORF1 de PCV1 y PCV2 presenta una similitud nucleotídica relativamente elevada de sus secuencias, siendo ésta de entre un 83 a 86% (Morozov *et al.*, 1998). Esta similitud en la estructura de la proteína Rep (producto del ORF1) podría ser la causa de la reactividad serológica cruzada que existe entre los dos PCVs (Progranichny *et al.*, 1999; Mahé *et al.*, 2000). Por otro lado, la similitud nucleotídica entre las secuencias de ORF2 entre PCV1 y PCV2 es de 65 a 67%, por lo que el ORF2 ó su proteína podría ser útil en la elaboración de pruebas de diagnóstico para diferenciar los dos virus (Liu *et al.*, 2000a,b; Mahé *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001; Nawagitgul *et al.*, 2002). Las diferencias entre los genomas de PCV1 y PCV2 serían, aparentemente, la causa de la diferencia en virulencia entre PCV1 y PCV2 (Hamel *et al.*, 1998).

1.5. **Circovirus porcino tipo 1 (PCV1)**

1.5.1. **Epidemiología del PCV1**

1.5.1.1. **Distribución geográfica del PCV1**

Estudios serológicos realizados por Tischer *et al.*, (1986), con técnicas que no discriminaban entre anticuerpos frente a PCV1 y PCV2, mostraron un 77 a 95% de seroprevalencia frente a PCV1 en cerdos sacrificados en un matadero en Berlín y, posteriormente, se obtuvieron resultados similares al evaluar rebaños porcinos de otras regiones de Alemania, por lo que se concluyó que el PCV1 era un virus ubicuo (Tischer *et al.*, 1995). Estos datos fueron similares a los obtenidos en Estados Unidos de América (Suh *et al.*, 1998), Canadá (Dulac y Afshar, 1989) y en el Reino Unido (Edwards y Sands, 1994), donde se obtuvieron seroprevalencias de PCV1 del 51, 55 y 86%,

respectivamente, también utilizando técnicas que no discriminaban entre PCV1 y PCV2.

1.5.1.2. Transmisión del PCV1

No existe información sobre la vía de transmisión natural de PCV1 en los cerdos. Se ha demostrado por medio de infecciones experimentales realizadas en cerdos que este virus se excreta a través de secreciones nasales y heces aproximadamente hasta 2 semanas PI (Tischer *et al.*, 1986). También se ha sugerido la posible transmisión vertical del virus ya que el PCV1 ha sido aislado de lechones neonatos procedentes de madres que habían sufrido problemas reproductivos (Allan *et al.*, 1995).

1.5.2. Inmunidad y PCV1

1.5.2.1. Inmunidad humoral frente a PCV1

La seropositividad frente a PCV1 debida a los anticuerpos calostrales se mantiene aproximadamente hasta las 9 semanas de vida, y posteriormente éstos no se detectan hasta más o menos las 13 semanas de vida, indicando que existe una infección vírica de forma natural entre las 9 y 13 semanas de vida (Tischer *et al.*, 1995; Allan, 1996). Sin embargo estos estudios se realizaron con técnicas serológicas que no discriminaban entre anticuerpos frente a PCV1 y PCV2.

Por otro lado, estudios experimentales demostraron que *minipigs* inoculados con PCV1 a los nueve meses de edad desarrollaban anticuerpos frente al virus a una semana PI, detectados mediante IFI. Los títulos serológicos se incrementaban rápidamente entre la tercera y quinta semana PI, y luego disminuían pero eran detectables hasta las 39 - 47 semanas PI (Tischer *et al.*, 1986).

1.5.2.2. Efecto del PCV1 sobre las células del sistema inmune

Se ha demostrado que el PCV1 es capaz de infectar *in vitro* a células mononucleares de cerdo, cordero, bovino y mono mientras que no se han logrado infectar células de aves. La replicación del virus fue demostrada por la presencia de antígeno viral en el núcleo de las células infectadas por medio de una IFI (Allan *et al.*, 1994b). Las células porcinas de la línea monocito/macrófago que presentaron mayor cantidad de células positivas a IFI se localizaban en el pulmón y médula ósea, y en menor proporción en sangre periférica, timo y nódulos linfáticos. Los linfocitos, aparentemente, no se infectaban con PCV1 (Allan *et al.*, 1994b).

La infección con PCV1 produce alteraciones en algunas funciones inmunológicas de los macrófagos. Se ha descrito que los macrófagos infectados con PCV1 incrementaron la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC-I) a los 4 días PI, aunque esta diferencia no fue significativa respecto al grupo control. No obstante, a los 8 días PI se observó disminución en el número de células que expresaban MHC-II (McNeilly *et al.*, 1996). Aunque se sabe que el PCV1 causa una infección asintomática en los cerdos, es posible que la disminución en el número de células que expresan MHC-II pudiera implicar diferencias en la capacidad de reconocer y destruir las células infectadas por el mismo virus, por lo que podría interferir en la respuesta inmune humoral ó celular (Tischer *et al.*, 1986; McNeilly *et al.*, 1996).

1.6. Circovirus porcino tipo 2 (PCV2)

1.6.1. Epidemiología del PCV2

1.6.1.1. Distribución geográfica del PCV2

Se han detectado anticuerpos frente a PCV2 en cerdos de Bélgica, Reino Unido, Irlanda del Norte, Canadá, Estados Unidos de América, Italia y Francia, (Ellis *et al.*, 1998; Magar *et al.*, 2000; Mesu *et al.*, 2000; Walker *et al.*, 2000; Blanchard *et al.*, 2001; Martelli *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2001). Debido a la detección de anticuerpos frente a PCV2 en todos los países donde se han buscado, se asume que este virus presenta una distribución mundial.

Estudios realizados en Francia han descrito una alta seroprevalencia frente a PCV2 en cerdas y cerdos adultos de todas las granjas evaluadas. Sin embargo, un 93% de los lechones de 11 a 17 semanas de vida tenían anticuerpos frente a PCV2 en granjas con PMWS, mientras que solo un 54% de lechones eran positivos en granjas sin síntomas clínicos de la enfermedad (Blanchard *et al.*, 2001).

1.6.1.2. Transmisión del PCV2

Se considera que la vía aerógena es la ruta más probable de transmisión natural de PCV2 entre cerdos. En estudios experimentales se ha detectado PCV2 en heces entre 4 y 24 días PI (Charreyre *et al.*, 2000; Resendes *et al.*, 2001a). Por otro lado, en lechones infectados de forma natural y/o experimental se ha detectado la presencia de PCV2 en heces, orina, saliva y secreciones oculares, por lo que es probable que éstas puedan ser también vías de excreción del virus (Krakowka *et al.*, 2000; Calsamiglia *et al.*, 2001; Resendes *et al.*, 2001a; Sibila *et al.*, 2001b).

Experimentalmente se ha detectado la excreción de PCV2 en semen de verracos previamente inoculados con PCV2. No obstante, se desconoce si las cantidades de PCV2 presentes en semen pueden realmente producir la infección de las cerdas, ya sea por monta natural o por inseminación artificial (Larochelle *et al.*, 2000).

Las inoculaciones experimentales de PCV2 a cerdas SPF durante la preñez han inducido hipertermia, anorexia y dermatitis, observándose también patologías reproductivas incluyendo lechones nacidos muertos y momias (Cariolet *et al.*, 2001a). En otro estudio se inocularon cerdas con PCV2 en el momento de la inseminación; en este caso el virus se replicó en algunos fetos en la segunda fase de la gestación (después de las 8 semanas), o antes del parto, pudiendo estar unos fetos infectados y otros no (Cariolet *et al.*, 2001b). Resultados similares fueron observados en otro estudio donde el PCV2 era inoculado en dos fetos de cada una de las cerdas del experimento (días 57, 75 y 92 de gestación), detectándose que el virus se reproducía en los tejidos del feto inoculado, pero aparentemente era incapaz de transmitirse de un feto a otro (Sánchez *et al.*, 2001).

1.6.2. Inmunidad y PCV2

1.6.2.1. Inmunidad humoral frente a PCV2

La dinámica de anticuerpos frente a PCV2 se comporta de forma similar a la observada frente a PCV1 en cerdos infectados de forma natural, observándose que los anticuerpos calostrales frente a PCV2 pueden durar entre las 6 y las 12 semanas de edad. Asimismo la seroconversión frente a PCV2 suele ocurrir entre la semana 8 y 14 de edad (Harding *et al.*, 1998; Blanchard *et al.*, 2001).

Estudios experimentales han demostrado que la seroconversión frente a PCV2 ocurre entre los 7 y 14 días PI. Estos anticuerpos frente a PCV2 se pueden mantener elevados un tiempo relativamente largo, que puede llegar al menos hasta los 69 días PI (Resendes *et al.*, 2001b).

1.6.2.2. Efecto del PCV2 sobre las células del sistema inmune

El PCV2 se localiza principalmente en las células de la línea monocito/macrófago, así como en otras células presentadoras de antígeno, tales como las células dendríticas foliculares (Clark, 1997; Rosell *et al.*, 1999; Kennedy *et al.*, 2000). Algunos autores han observado, aunque de forma ocasional, la infección de linfocitos por PCV2 (Rosell *et al.*, 1999; Shibahara *et al.*, 2000). Por otra parte, se ha sugerido que la depleción de los órganos linfoides que se observa en los casos de PMWS podría ser causada por la apoptosis de las células B (Shibahara *et al.*, 2000). También se ha observado disminución de células T en los órganos afectados, así como un incremento de las células de la línea monocito/macrófago y de la expresión de MHC-II (Chianini *et al.*, 2000).

En sangre periférica, las alteraciones son similares a las detectadas en los órganos linfoides, donde se observa una disminución de linfocitos T (especialmente linfocitos CD4⁺ y CD8⁺) y linfocitos B, así como un aumento de los monocitos circulantes (Segalés *et al.*, 2001; Darwich *et al.*, 2002).

Estos hallazgos sugieren que la capacidad de respuesta inmune de los cerdos infectados por PCV2 y afectados clínicamente por PMWS esta alterada (Domingo *et al.*, 2001; Segalés *et al.*, 2001).

1.6.3. Patogenicidad del PCV2

El PCV2 es considerado el causante del PMWS (Albina *et al.*, 2001; Bolin *et al.*, 2001; Harms *et al.*, 2001). No obstante, el PCV2 también ha sido asociado a otras patologías como son el síndrome de dermatitis y nefropatía porcina (SDNP) (Rosell *et al.*, 2000b), alteraciones reproductivas (West *et al.*, 1999; Ohlinger *et al.*, 2000), neumonía proliferativa necrotizante (PNP) (Pesch *et al.*, 2000) y temblor congénito tipo A2 (Stevenson *et al.*, 2001).

1.7. Síndrome de adelgazamiento postdestete (PMWS)

1.7.1. Epidemiología del PMWS

1.7.1.1. Distribución geográfica del PMWS

La enfermedad se encuentra distribuida mundialmente siendo habitualmente descrita en cerdos de transición y engorde (Harding, 1996).

Desde la primera descripción del PMWS en rebaños porcinos de Canadá (Harding, 1996), la enfermedad también se ha descrito en España (Segalés *et al.*, 1997), Francia (Le Cann *et al.*, 1997), Reino Unido (Kennedy *et al.*, 1998), Irlanda (Spillane *et al.*, 1998), Italia (Marcato *et al.*, 1999), Dinamarca (Allan *et al.*, 1999b), Japón (Onuki *et al.*, 1999), Corea (Choi y Chae, 1999), Holanda (Wellenberg *et al.*, 2000), Alemania (Pesch *et al.*, 2000), Grecia (Kyriakis *et al.*, 2000), Hungría (Kiss *et al.*, 2000), Lituania (Ohlinger *et al.*, 2000), República Checa (Celer y Crasova, 2001), Suiza (Borel *et al.*, 2001), México (Trujano *et al.*, 2001), Taiwán (Chen *et al.*, 2000), Austria (Schmoll *et al.*, 2001), Argentina (Serradell *et al.*, 2002) y Filipinas (Llopart *et al.*, 2002). Por otro lado, estudios retrospectivos han mostrado que la infección por PCV2 asociada a PMWS ya existía en España desde 1986 (Rosell *et al.*, 2000c) y en Japón desde 1989 (Mori *et al.*, 2000).

1.7.1.2. Comportamiento del PMWS en las granjas porcinas

El PMWS se describió inicialmente en granjas de alta sanidad en Canadá (Ellis *et al.*, 1998), pero la enfermedad también se ha observado en explotaciones con manejos productivos diversos, afectando de forma muy similar a explotaciones pequeñas y grandes (Ellis *et al.*, 1998; Harding *et al.*, 1998).

Esta enfermedad se inicia unas 2 a 3 semanas después del destete, especialmente en cerdos de entre 8 y 13 semanas de edad (Harding y Clark, 1997; Madec *et al.*, 2000). La morbilidad varía entre el 5 y el 10%, pudiendo

alcanzar hasta más del 50% (Clark y Harding, 1998). La mortalidad es variable y suele oscilar entre el 4 y el 20%, aunque esporádicamente puede alcanzar hasta el 60% (Clark y Harding, 1998; Segalés *et al.*, 2000b). El PMWS se ha descrito con mayor frecuencia en lechones machos castrados, así como en lechones de menor peso al destete o al cambio de transición a engorde (Corrége *et al.*, 2001). La gravedad del PMWS parece estar estrechamente relacionada con problemas de manejo tales como la introducción de animales de diferentes orígenes en un mismo rebaño, la alta densidad de cerdos por corral y problemas de ventilación (Hamel *et al.*, 2000).

La seroprevalencia frente a PCV2 dentro de las granjas oscila entre el 15 y 100% independientemente de la existencia de PMWS. Se observa que los cerdos de engorde, las cerdas y verracos presentan una prevalencia prácticamente del 100%, mientras que los cerdos con edades de entre 6 y 12 semanas de vida presentan una seroprevalencia más baja (Allan y Ellis, 2000).

1.7.2. Sintomatología clínica

Los signos clínicos que se observan con mayor frecuencia en cerdos afectados con PMWS son adelgazamiento, disnea, aumento en el tamaño de los nódulos linfáticos inguinales superficiales y, aunque con menor frecuencia, también se puede observar palidez, diarrea e ictericia (Clark y Harding, 1998; Harms *et al.*, 2001). La palidez corporal se ha asociado a la presencia de úlcera gástrica en la *pars oesophagica*, presentando los animales afectados una anemia microcítica e hipocrómica (Segalés *et al.*, 2000a).

1.7.3. Lesiones macroscópicas

Las lesiones observadas con mayor frecuencia se encuentran en nódulos linfáticos y pulmón, aunque también se observan en hígado, riñón y estómago (Clark 1997; Clark y Harding, 1998; Rosell *et al.*, 1999, 2000a).

Los nódulos linfáticos pueden presentar un aumento de tamaño y color blanquecino (Rosell *et al.*, 1999).

Las lesiones observadas en pulmón incluyen ausencia de colapso pulmonar con un marcado patrón lobulillar y/o zonas de consolidación pulmonar en los lóbulos medio y craneal, atribuidas a infecciones bacterianas concomitantes (Rosell *et al.*, 1999).

En el hígado se pueden observar áreas de decoloración del parénquima con presencia de un prominente tejido conjuntivo interlobular (Rosell *et al.*, 2000a). En el riñón se pueden detectar múltiples focos blanquecinos de diámetro variable en la corteza renal (Rosell *et al.*, 1999). En el estómago es frecuente encontrar úlcera en la *pars oesophagica* (Clark y Harding, 1998; Rosell *et al.*, 1999), aunque este hallazgo no se asocia propiamente a la infección por PCV2 sino a efectos colaterales del estado de la enfermedad.

1.7.4 Lesiones microscópicas

Las principales lesiones histológicas del PMWS se observan en los órganos linfoides. Estas lesiones se caracterizan por depleción linfocitaria, infiltración de células histiocíticas, células gigantes multinucleadas (Rosell *et al.*, 1999) y necrosis lítica multifocal (Segalés *et al.*, 2000c). En cierta proporción de animales se observa la presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos en histiocitos (Clark, 1997, Rosell *et al.*, 1999). Además, en estos órganos se suele detectar gran cantidad de ácido nucleico y antígeno de PCV2 (Rosell *et al.*, 1999).

Los pulmones pueden presentar un grado variable de neumonía intersticial, con infiltrado granulomatoso y/o linfohistiocitario. También se ha observado bronconeumonía catarral purulenta, en una moderada a elevada proporción de animales, asociada a infecciones bacterianas concomitantes (Segalés *et al.*, 1997; Rosell *et al.*, 1999). También puede observarse necrosis del

epitelio de las vías aéreas que puede progresar hasta una bronquitis fibrosa obliterante (Clark, 1997).

Hasta un 75% de los cerdos afectados de PMWS presentan lesiones de hígado, caracterizadas por una hepatitis periportal linfoplasmohistiocitaria. En los casos más graves, aparecen hepatocitos en apoptosis y un grado variable de desorganización de los cordones hepáticos. De forma esporádica, y en aquellos cerdos con ictericia, se puede encontrar una masiva pérdida de hepatocitos, infiltración inflamatoria difusa y fibrosis perilobulillar (Rosell *et al.*, 2000a).

En un 50 a 75% de cerdos afectados con PMWS se ha observado nefritis intersticial multifocal leve a moderada (Clark, 1997; Rosell *et al.*, 1999).

1.7.5. Diagnóstico del PMWS

El diagnóstico del PMWS se basa en tres criterios que incluyen: sintomatología clínica compatible con la enfermedad, lesiones microscópicas características en los órganos linfoides y detección de PCV2 en los tejidos que presentan lesiones (Clark y Harding, 1998; Sorden, 2000; Quintana *et al.*, 2001).

1.7.5.1. Detección de PCV2

1.7.5.1.1. Inmunohistoquímica (IH)

La IH es una técnica utilizada para detectar antígeno de PCV2 en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina (Rosell *et al.*, 1999; Segalés *et al.*, 1999; Allan y Ellis, 2000). Algunos estudios han comparado diferentes métodos para la detección de PCV2, concluyendo que la IH es una prueba de alta sensibilidad, específica, económica, rápida y sencilla (Alborali *et al.*, 2001). Actualmente se disponen de anticuerpos monoclonales y policlonales frente a

PCV2 que hacen de ésta una técnica de gran utilidad en estudios de patogenia del PMWS (McNeilly *et al.*, 1999).

1.7.5.1.2. Hibridación *in situ* (HIS)

La detección de ácido nucleico de PCV2 mediante HIS se realiza sobre secciones de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina. La HIS permite detectar la ubicación de ácido nucleico dentro de la célula y su distribución en los tejidos, así como correlacionar las lesiones microscópicas observadas con la presencia de PCV2 (Rosell *et al.*, 2000b; Morvan *et al.*, 2001). Para ello se utiliza una secuencia de DNA complementaria a la secuencia del genoma de PCV2 (Rosell *et al.*, 1999; Choi y Chae, 1999). La HIS para la detección de PCV2 tiene una sensibilidad similar a la IH (Segalés *et al.*, 1999). Se han utilizado sondas de hibridación para la detección de PCV1 y PCV2 (sondas PCV-específicas) (Allan *et al.*, 1998; Choi y Chae, 1999; Rosell *et al.*, 1999), y otras sondas específicas para PCV2 (Rosell *et al.*, 2000a; Morvan *et al.*, 2001).

1.7.5.1.3. IFI

Esta técnica permite la detección de antígeno de PCV2 en cultivos celulares mediante el uso de anticuerpos policlonales ó monoclonales (Allan *et al.*, 1999). La IFI también ha sido realizada sobre secciones de tejidos congelados usando anticuerpos monoclonales frente a PCV2 (Alborali *et al.*, 2001; McNeilly *et al.*, 2001). La IFI es una técnica altamente específica, sensible, económica y sencilla (Alborali *et al.*, 2001).

1.7.5.1.4. PCR

Mediante la técnica de PCR es posible detectar ácido nucleico de PCV2 a partir de muestras de tejidos y secreciones orgánicas (Hamel *et al.*, 2000; Quintana *et al.*, 2000; Calsamiglia *et al.*, 2001b). La técnica de PCR también tiene la ventaja de ser altamente sensible y específica, pero además de poder

detectar el genoma, también es posible cuantificarlo (Liu *et al.*, 2000a; Rovira *et al.*, 2002). Los genomas detectados por medio de la PCR también pueden ser secuenciados y, mediante la utilización de la técnica de polimorfismo de la longitud de un fragmento de restricción (RFLP), es posible la caracterización y clasificación de cada PCV estudiado (Morozov *et al.*, 1998; Onuki *et al.*, 1999; Fenaux *et al.*, 2000; Hamel *et al.*, 2000; Mankertz *et al.*, 2000a).

1.7.5.1.5. Aislamiento vírico

La línea celular PK-15 es usualmente la más utilizada para el aislamiento de PCV2, aunque también es posible su replicación en otras líneas de origen porcino como son las diversas líneas celulares de riñón de cerdo (RPS, SK o IBR-S2), células de testículo de cerdo (ST) y línea celular Vero (células de riñón de mono) (Tischer *et al.*, 1982; Edwards y Sands, 1994). El tratamiento de las células infectadas con glucosamina es importante para lograr una adecuada replicación del virus (Tischer *et al.*, 1987). Al no producir efecto citopático sobre las células, la detección del virus en las células infectadas se realiza por IFI, IH ó PCR.

1.7.5.1.6. Microscopía electrónica

Es una técnica de uso ocasional en el diagnóstico de PCV2 debido a que solo permite evidenciar la presencia de partículas víricas compatibles morfológicamente con PCV2 mediante tinción negativa (Mankertz *et al.*, 2000a), identificándose como PCV2 mediante el uso de inmunotinción. También se puede observar su localización ultraestructural específica en las células, principalmente en el citoplasma de los macrófagos, como partículas con un diámetro de 15 a 16 nm, electrodensas, de forma redondeada a ovoide con márgenes irregulares (Ellis *et al.*, 1998; Kiupel *et al.*, 1998; Mankertz *et al.*, 2000a).

1.7.5.2. Detección de anticuerpos frente a PCV2

La detección de anticuerpos frente a PCV2 se puede realizar mediante diferentes técnicas como son la técnica de inmunoperoxidasa en monocapa de células (IPMA, *immunoperoxidase monolayer assay*), IFI y ELISA. Actualmente se dispone de diversos ELISAs que permiten la detección de anticuerpos frente a PCV2 mediante el uso de diferentes sustratos específicos frente a PCV2. Se utilizan proteínas de la cápside del virus (producto del ORF2), un cultivo celular con PCV2 y un anticuerpo monoclonal específico que actúa como agente reactivo competitivo (Balasch *et al.*, 1999; Cottrell *et al.*, 1999; Mesu *et al.*, 2000; Walker *et al.*, 2000; McNair *et al.*, 2001; Nawagitgul *et al.*, 2002).

1.7.6. Tratamiento y control

Actualmente no existen vacunas ni tratamientos específicos frente al PMWS. Estudios epidemiológicos han sugerido que la presión de infección es determinante en la aparición del PMWS (Madec *et al.*, 2000; Royer *et al.*, 2001). Estudios realizados por diferentes autores (Harding y Clark, 1997; Madec *et al.*, 2000) han concluido que las medidas zootécnicas son importantes para el control del PMWS y minimizan el impacto del PMWS en las granjas afectadas (Guilmoto y Wessel-Robert, 2000). Estas medidas sugeridas son:

- medidas de higiene adecuadas,
- evitar la mezcla de animales de diferentes grupos,
- separar los animales enfermos de los sanos,
- controlar la presencia de otras enfermedades,
- ventilación adecuada,
- reducir la densidad de animales por grupo,
- sistema “todo dentro-todo fuera”,
- controlar el flujo de personal dentro de las granjas.

Introducción

La realización de estudios *in vitro* para evaluar la sensibilidad de PCV2 a la inactivación por desinfectantes, demuestra que el virus es resistente al etanol, productos yodados, formaldehído y compuestos de clorhexidina. Asimismo, se observó que el PCV2 es sensible a los compuestos fenólicos, amonio cuaternario, hidróxido de sodio, hipoclorito de sodio y un compuesto de peroximonosulfato y cloruro de sodio (Royer *et al.*, 2001). La reducción de la carga vírica en el ambiente podría reducir o eliminar la transmisión del virus entre grupos de animales, por lo que los protocolos de desinfección junto con las medidas de manejo previamente comentadas, podrían ser útiles para la prevención y control del PMWS (Royer *et al.*, 2001).

2. OBJETIVOS

Objetivos

Los conocimientos sobre PCV1, PCV2 y el PMWS en 1998, año de inicio de la presente tesis, eran escasos. Apenas dos años antes, en 1996, se describió por primera vez el PMWS en Canadá, y en 1997 se empezaba a diagnosticar esta enfermedad en otros países como USA, Francia y España, demostrándose la presencia de antígeno ó ácido nucleico de PCV en las lesiones de los animales con PMWS (Daft, 1996; Clark, 1997; Segalés *et al.*, 1997). Un año después, en 1998, se logró caracterizar el virus, demostrando que el PCV encontrado en los animales afectados de PMWS era diferente al PCV contaminante de la línea celular PK-15, el cual se denominaría posteriormente PCV1 (Allan *et al.*, 1999). Estos resultados llevaron a la conclusión que el PCV asociado a PMWS, que fue denominado PCV2 (Allan *et al.*, 1999), era el causante del síndrome.

Al inicio de ésta tesis se carecía de técnicas serológicas que permitieran diferenciar anticuerpos frente a PCV1 y frente a PCV2, lo que representaba una importante barrera para poder determinar la prevalencia serológica en un país como España, donde el PMWS se había diagnosticado en el año 1997 y donde potencialmente, la enfermedad podría haber existido con anterioridad.

Por otro lado, existían evidencias de que el PCV2 estaba asociado a cerdos que presentaban el PMWS, pero se desconocía como el virus circulaba dentro de una explotación porcina que presentaba animales con PMWS.

Partiendo de estos antecedentes se pretendió alcanzar los siguientes objetivos específicos:

Objetivos

- Estudiar la respuesta serológica frente a PCV1 y PCV2 en sueros de cerdos con y sin PMWS.
- Realizar un estudio retrospectivo para detectar: (1) anticuerpos frente a PCV2, (2) lesiones compatibles con PMWS en tejidos positivos a PCV2 y (3) ácido nucleico de PCV2 en tejidos porcinos con y sin lesiones de PMWS con anterioridad a 1997, año de la primera descripción de PMWS en España.
- Conocer la dinámica de la infección por PCV2 en cerdos de una granja con un brote clínico de PMWS.

3. ARTÍCULOS

**3.1. Serum antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2
in pigs with and without PMWS.
Veterinary Record (2000) 146, 762-764.**

**3.2. Retrospective study on porcine circovirus type 2
infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain.**

Enviado a: *The Journal of Veterinary Medicine B.*

1 *Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals, Facultat de Veterinària Universitat*
2 *Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain*

3

4 **Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in**
5 **pigs from 1985 to 1997 in Spain**

6

7 G.M. Rodríguez-Arriolja^{1,2}, J. Segalés^{1,2,5}, C. Rosell^{1,2}, A. Rovira^{1,2},
8 J. Pujols^{2,3}, J. Plana-Durán⁴ and M. Domingo^{1,2}

9

10 Addresses of authors: ¹Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals, Facultat de
11 Veterinària Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain
12 ²Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), Facultat de Veterinària (Universitat
13 Autònoma de Barcelona), 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain ³Institut de Recerca i
14 Tecnologia Agroalimentària (IRTA), Passeig de Gràcia 44, 08007 Barcelona, Spain
15 ⁴Fort Dodge Veterinaria, S.A., R&D, Ctra. Camprodon s/n, La Riba, 17813 Vall de
16 Bianya (Girona), Spain ⁵Corresponding author: Tel: 34-93-5811599; Fax: 34-93-
17 5813142; E-mail: joaquim.segales@uab.es

18

19 With 1 figure and 2 tables

20

21

22

23

24

25

Summary

A retrospective survey was performed to detect lesions of PMWS and nucleic acid of porcine circovirus type 2 (PCV2) in archived formalin-fixed, paraffin embedded tissues and antibodies to this virus in sera of pigs from the Spanish livestock between the years 1985 and 1997. Presence of PCV2 nucleic acid was detected by an *in situ* hybridisation (ISH) technique on tissues corresponding to 189 pigs. PCV2 antibodies were determined by an immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) on 388 porcine serum corresponding to 265 of one to 5-month-old pigs and 123 sows, from 72 different unrelated farms. PCV2 nucleic acid was detected in tissues from 78 out of 189 (41.3%) examined pigs. Variable amount of viral genome was detected in association with slight to severe microscopic lymphoid lesions consisting of lymphocyte depletion and histiocytic infiltration. The first positive case of PMWS with typical lesions and ISH positive corresponded to a pig necropsied in 1986. PCV2 antibodies were detected in sera from 65 out of 72 (90.3%) farms. Two hundred and eighty two out of 388 (72.7%) sera were positive by IPMA, corresponding to 189 out of 265 (71.3%) 1 to 5-month old pigs and 93 out of 123 (75.6%) sows. Serological and pathological data of the present study indicate that PCV2 was a enzootic infection in Spain since 1985, suggesting that the introduction of this virus in the livestock occurred previously. Therefore, the emergence or the highest prevalence of PMWS after 1997 in Spain is apparently due to other factors rather than the introduction of a new virus in the swine population.

Introduction

1
2 Porcine circovirus type 2 (PCV2) is a single-stranded circular DNA virus of
3 pigs, which causes postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) (Allan et
4 al., 1999; Bolin et al., 2001; Harms et al., 2001). PMWS has been diagnosed in
5 several countries from Europe, North America and Southeast Asia (Allan and Ellis,
6 2000). The disease was initially detected in 1991 in Canada (Harding, 1997), while
7 the presence of this disease in Europe was firstly noticed in France (Brittany) in 1996
8 (Le Cann et al., 1997). The first PMWS cases in Spain were described in 1997
9 (Segalés et al., 1997); nowadays, the disease is widespread throughout the whole
10 Spanish territory.

11 PMWS affects weaned piglets with ages from five to twelve weeks of age,
12 and is clinically characterised by progressive loss of weight, dyspnoea, coetaneous
13 pallor and occasionally jaundice. Typical PMWS gross lesions include enlargement
14 of lymph nodes, tan-mottled, non-collapsed lungs, multiple white foci in the kidney
15 surface, and atrophy or enlargement of the liver (Rosell et al., 1999; Rosell et al.,
16 2000a). Microscopic lesions characteristic of PMWS are seen in lymphoid tissues,
17 including lymphocellular depletion (in both lymphoid follicles and parafollicular
18 areas) together with infiltration by large histiocytic cells and multinucleate giant cells
19 (Clark, 1997; Rosell et al., 1999). The observation of multiple amphophilic to
20 basophilic botryoid intracytoplasmic inclusion bodies in histiocytes allows the
21 establishment of a definitive diagnosis of PMWS. Also, granulomatous inflammatory
22 infiltrates in a wide range of tissues can be observed in severely diseased pigs.
23 Microscopic lesions are strongly associated to the presence of PCV2 antigen and/or
24 nucleic acid within the cytoplasm and/or nuclei of monocyte/macrophage lineage

1 cells, dendritic follicular cells, hepatocytes and, in a lower degree, of epithelial and
2 endothelial cells (Clark, 1997; Rosell et al., 1999; Rosell et al., 2000a).

3 Several tests are useful to detect retrospectively the presence of PCV2 in the
4 pig population. Firstly, serologic studies in archived sera may give clues about the
5 time of introduction of the virus in the swine population. Secondly, a virus isolation
6 or other viral detection techniques such as polymerase chain reaction (PCR) from
7 these archived sera or frozen tissues would allow to detect and characterise the virus.
8 Finally, techniques to detect PCV2 in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues,
9 such as immunohistochemistry (IHC) and/or *in situ* hybridisation (ISH), can be
10 applied to archived paraffin blocks. The later techniques have the advantage to detect
11 virus and simultaneously identify the currently well-known microscopic lymphoid
12 lesions characteristic of PMWS.

13 The purpose of the present study was to perform a retrospective study to
14 detect evidence of PCV2 nucleic acid concurrent with characteristic PMWS
15 microscopic lesions in archived formalin-fixed, paraffin-embedded tissues and PCV2
16 antibodies in sera of pigs from the Spanish livestock between years 1985 and 1997.

17

18 **Materials and methods**

19 *Histopathology*

20 Formalin-fixed, paraffin-embedded tissues corresponding to 189 pigs were
21 included in this study; 121 out of these 189 pigs have been preliminary evaluated
22 (Rosell et al., 2000). All samples were submitted as necropsies or formalin-fixed
23 tissues to the Pathology Department of the Veterinary School of Barcelona between
24 1986 and 1997 (prior to the first diagnosed case of PMWS in May 1997). The
25 number of studied cases per year is summarised in Table 1. Case selection criteria

1 included the age of the pigs (1 to 4-month-old animals, age in which PMWS is
2 usually described) and the availability of, at least, lymphoid and/or lung tissues.

3 Paraffin-embedded tissue blocks were sectioned at 4µm and stained with
4 haematoxylin and eosin (HE). Histopathologic examination was performed, the
5 lymphoid organs were assessed for depletion of lymphoid cells, infiltration by
6 histiocytic cells, presence of multinucleated cells (syncytia) and intracytoplasmic
7 inclusions. The other tissues were also evaluated for lesions.

8

9 *In situ hybridisation (ISH) for the detection of PCV2*

10 An *in situ* hybridisation (ISH) technique was carried out on selected tissue
11 samples using previously described protocols (Rosell et al., 2000a). A specific 40
12 nucleotide probe (5'-
13 CAGTAAATACGACCAGGACTACAATATCCGTGTAACCATG-3')
14 complementary to the 1085 to 1124 nucleotide sequence of ORF2 from PCV2 [7]
15 was used; this probe only labelled PCV2 infected cells when tested for specificity on
16 PCV1 and PCV2 infected cell cultures.

17

18 *Immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) detection of PCV2*

19 Three hundred and eighty eight pig sera corresponding to 72 unrelated
20 Spanish farms (265 from 1 to 5-month-old pigs and 123 from sows) sampled
21 between 1985 and 1997 were used for this study. Twenty to 50 pig sera per year were
22 analysed, except for year 1992 from which a lower number of sera (n=3) were
23 available (Table 2). Serum samples were selected from bank sera at the Infectious
24 Disease Department from the Veterinary School of Barcelona (Barcelona, Spain) and

1 the *Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària* (IRTA, Barcelona, Spain). Sera
2 were stored frozen at -70°C until analysed.

3 Sera were tested to detect antibodies to PCV2 virus using a previously
4 described immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) technique [16]. This
5 technique was based on a porcine circovirus-free swine kidney (SK) continuous cell
6 line persistently infected with a PCV2 Spanish isolate from a PMWS-affected pig.

7

8

RESULTS

9

Histopathologic findings

10 Characteristic microscopic lesions of pigs affected with PMWS were
11 observed in most of the studied tissues. Histopathological evaluation revealed slight
12 to severe lymphocyte depletion in most of the tissues (84.4%), with infiltration by
13 histiocytic cells (36.7%). The first case in which these lesions were evident
14 corresponds to a single pig from 1986, in which moderate lymphocyte depletion
15 together with a slight histiocytic infiltration was observed. Marked granulomatous
16 inflammation was observed only in cases from 1995 onwards. Clear evidence of
17 intracytoplasmic inclusion bodies characteristic of PCV2 and multinucleate giant
18 cells (in 42.8% and 30% of the studied lymphoid tissues, respectively) were detected
19 in cases from 1996 and 1997, but not in the previous years. Also, a slight to moderate
20 lymphohistiocytic inflammation in lung, liver and/or kidney were observed.

21

22

In situ hybridisation

23 Results of the detection of PCV2 nucleic acid are summarised in Table 1.
24 PCV2 nucleic acid was detected in tissues of 78 out of 189 (41.3%) examined pigs.
25 The amount of PCV2 genome in tissues (lymph nodes, spleen, Peyer's patches, lung,

1 liver and kidney) was variable. Slight to large amounts of viral nucleic acid were
2 detected in lymph nodes (Fig. 1), Peyer's patches and spleen. Labelling was
3 primarily observed in the cytoplasm of histiocytes and follicular dendritic cells.
4 Sporadically, small round cells, which morphologically resembled lymphocytes,
5 showed cytoplasmic labelling. In the lung, PCV2 nucleic acid was found in the
6 cytoplasm of alveolar and interstitial macrophages. PCV2 genome was sporadically
7 found in cytoplasm of infiltrating macrophages in the liver and kidney, and Kupffer
8 cells of liver.

9

10 *Serology*

11 Serologic prevalence per year and age group is summarised in Table 2. Two
12 hundred and eighty two out of 388 (72.7%) tested sera had antibodies to PCV2.
13 Sixty-five out of 72 farms had at least one seropositive pig, representing an overall
14 90.3% herd seroprevalence. The antibody titres obtained were variable independently
15 of pig age. One hundred and eighty-nine out of 265 (71.3%) sera of 1 to 5-month-old
16 pigs were positive, while 93 out of 123 (75.6%) sow sera were also positive.
17 Approximately 50% of tested sera had high titres ranging from 1:5120 to 1:20480
18 (data not shown).

19

20 **Discussion**

21 Data compiled in this retrospective study, (together with previously published
22 preliminary results) (Rosell et al., 2000b), indicate that characteristic lesions of
23 PMWS concurrent with presence of PCV2 nucleic acid and antibodies against PCV2
24 have been present in the Spanish swine population at least since 1985, twelve years
25 before the first description of PMWS in the country (Segalés et al., 1997). These data

1 agree with retrospective studies performed in other countries, in which PCV2
2 antibodies and/or nucleic acid were also detected before the knowledge on the
3 existence of PMWS. Specifically, PCV2 antibodies have been detected in pig sera as
4 early as 1969 in Belgium (Sanchez et al., 2001), 1973 in Northern Ireland (Walker et
5 al., 2000) and 1985 in Canada (Magar et al., 2000). PCV2 nucleic acid has also been
6 detected in archival paraffin blocks from 1986 in the United Kingdom (Sandvik et
7 al., 2001) and 1989 in Japan (Mori et al., 2000) using PCR and ISH techniques,
8 respectively.

9 PMWS diagnosis is usually established based on three criteria: 1) presence of
10 clinical signs compatible with PMWS (mainly wasting), 2) detection of characteristic
11 microscopic lesions in lymphoid tissues (lymphocellular depletion together with
12 histiocytic infiltration), and 3) detection of PCV2 nucleic acid or antigen within the
13 lymphoid lesions (Quintana et al., 2001; Sorden, 2000). Available clinical
14 antecedents of some of the farms (data not shown) and the presence of typical
15 PMWS lymphoid microscopic lesions with PCV2 detection within these lesions
16 indicate that the early cases described in this study would nowadays be diagnosed as
17 PMWS. However, these old PMWS cases were unrecognised and diagnosed as other
18 diseases such as Glässer's disease, gastric ulcers of *pars* oesophagea, or unspecific
19 colitis, complicated or not with systemic viral infections (mainly porcine
20 reproductive respiratory syndrome (PRRS) virus since 1991). Lymphoid depletion,
21 when recognised at that time, was attributed to the stress of the disease or to
22 management conditions, and not further studied. It is noteworthy that viral
23 intracytoplasmic inclusion bodies or multinucleate giant cells were not found in
24 PMWS cases prior to 1996; this result is not surprising since the number of pigs that
25 nowadays would be recognised as PMWS before that year is relatively low. On the

1 other hand, activity of the Diagnostic Laboratory of the Veterinary School of
2 Barcelona started at 1984, and the swine case load was very low during the first three
3 years. Therefore, the number of pig samples corresponding to the years where no
4 positive cases were detected, was very low. It is also possible that other laboratories
5 in Spain have misidentified PMWS cases earlier than 1986. Low prevalence of the
6 disease in earlier times, unspecific clinical signs, and/or concurrent presence of other
7 infectious agents have undoubtedly helped the disease to remain undiagnosed for
8 many years (Rosell et al., 2000b).

9 At the present moment, no clear interpretation exists to explain why PMWS
10 was sporadic before 1997 in Spain, and generalised or highly prevalent after that
11 year. It has been speculated that changes of production systems over the last decade,
12 such as early weaning, increase in farm size, and three-site production systems,
13 would have created subpopulations of pigs susceptible to the developed of PCV2-
14 associated disease in higher numbers than before (Allan, 2001). On the other hand,
15 recent investigations have suggested that immunostimulation is a pivotal event in the
16 production of PMWS in pigs infected with PCV2 (Krakowka et al., 2001). These
17 authors have suggested that any introduced immunostimulus, intentional or
18 inadvertent, combined with pre-existent subclinical and endemic PCV2 infection
19 may have resulted in conditions helpful to the development of PMWS. This scenario
20 may occur mainly in relatively high health farms, in which the reduction of
21 pathogenic microflora may have unintentionally resulted in understimulated,
22 immunologically naive pigs (Krakowka et al., 2001).

23 In conclusion, serological and viral detection data of the present study
24 indicate that PCV2 infection was already widespread in 1985, suggesting that the
25 introduction of this virus in the Spanish livestock occurred previously. Also,

1 pathological findings indicate that PMWS is not a new disease in Spain, since it was
2 present at least in 1986. Therefore, the emergence or the highest prevalence of
3 PMWS after 1997 in Spain is apparently due to other factors rather than the
4 introduction of a new virus in the swine population.

5

6

Acknowledgements

7 The authors thank Miss Blanca Perez, Mrs. Silvia Usero, Mr. Pere Losada,
8 and Mrs. Mónica Pérez for technical assistance, and Department of Infectious
9 Diseases at the Veterinary School of Barcelona from years 1996 and 1997. This work
10 was partly funded by the Project QLRT-PL-199900307 from the Fifth Framework
11 Programme 1998-2002 of the European Commission, and the project 2-FEDER-
12 1997-1341 from the I+D National Plan (Spain).

13

14

References

- 15 Allan, G.M., S. Kennedy, F. McNeilly, J.C. Foster, J.A. Ellis, S.J. Krakowka, B.M.
16 Meehan, and B.M. Adair, 1999: Experimental reproduction of severe wasting
17 disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine
18 parvovirus. *J. Comp. Pathol.* 121, 1-11.
- 19 Allan G.M. and J.A. Ellis, 2000: Porcine circoviruses: a review. *J. Vet. Diagn.*
20 *Invest.* 12, 3-14.
- 21 Allan G., 2001: PCV2: Causal agent of PMWS. *Pig Progress.* 17, 22-23.
- 22 Bolin S.R., W.C. Stoffregen, G.P.S. Nayar and A.L. Hamel, 2001: Postweaning
23 multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of
24 cesarean-derived, colostrum-deprived piglets with type 2 porcine circovirus.
25 *J. Vet. Diagn. Invest.* 13, 185-194.

1 Clark E., 1997: Post-weaning multisystemic wasting syndrome. Proceeding the
2 American. Association of Swine Practitioners, 28, 499-501.

3 Ellis J., S. Krakowka, M. Lairmore, D. Haines, A. Bratanich, E. Clark, G.M. Allan,
4 C. Konoby, L. Hassard, B. Meehan, K. Martin, J. Harding, S. Kennedy and F.
5 McNeilly, 1999: Reproduction of lesions of postweaning multisystemic
6 wasting syndrome in gnotobiotic pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11, 3–14.

7 Hamel A., L. Lin and G. Nayar, 1998: Nucleotide sequence of porcine circovirus
8 associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J.*
9 *Virology* 72, 5262-5267.

10 Harding J.C., 1997: Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS):
11 Preliminary epidemiology and clinical presentation. Proceeding the
12 American. Association of Swine Practitioners, 282, 503.

13 Harms P.A., S.D. Sorden, P.G. Halbur, S.R. Bolin, K.M. Lager, I. Morozov and P.S.
14 Paul, 2001: Experimental Reproduction of Severe Disease in CD/CD Pigs
15 Concurrently Infected with Type 2 Porcine Circovirus and Porcine
16 Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, *Vet. Pathol.* 38, 528-539.

17 Kennedy S., D. Moffett, F. Mc Neilly, B. Meehan, J. Ellis, S. Krakowka and G.M.
18 Allan, 2000: Reproduction of lesions of post-weaning multisystemic wasting
19 syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2
20 alone or in combination with porcine parvovirus. *J. Comp. Pathol.* 122, 9-24.

21 Krakowka S., J.A. Ellis, F. McNeilly, S. Ringler, D.M. Rings and G. Allan, 2001:
22 Activation of the Immune System is the Pivotal Event in the Production of
23 Wasting Disease in Pigs infected with Porcine Circovirus-2 (PCV-2). *Vet.*
24 *Pathol.* 38, 31-42.

1 Le Cann P., E. Albina, F. Madec, R. Cariolet and A.Jestin, 1997: Piglet wasting
2 disease, *Vet. Rec.* 141, 600.

3 Magar R., P. Müller and R. Larochele, 2000: Retrospective serological survey of
4 antibodies to Porcine Circovirus Type 1 and Type 2. *Can. J. Vet. Res.* 64,
5 184-186.

6 Mori M., K. Sato, S. Akachi, S. Asahi, S. Taniguchi and M. Narita, 2000:
7 Retrospective study of Porcine Circovirus 2 infection in Japan: seven cases in
8 1989. *Vet. Pathol.* 37, 667-669.

9 Quintana J., J. Segalés, C. Rosell, M. Calsamiglia, G.M. Rodríguez-Arrijoja, F.
10 Chianini, J.M. Folch, J. Maldonado, M. Canal, J. Plana-Durán and M.
11 Domingo, 2001: Clinical and pathological observations on pigs with
12 postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet. Rec.* 149, 357-361.

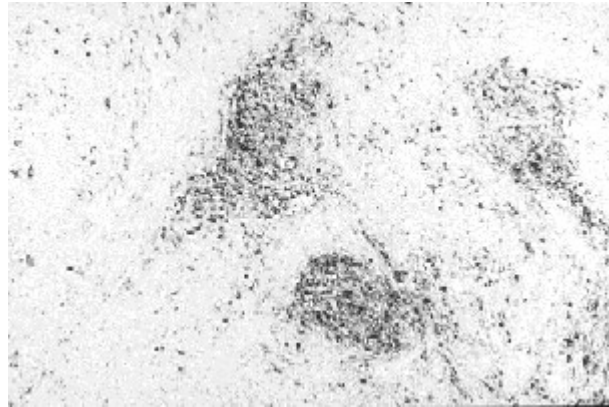
13 Rodríguez-Arrijoja G.M., J. Segalés, M. Balasch, C. Rosell, J. Quintana, J.M. Folch,
14 J. Plana-Durán, A. Mankertz and M. Domingo, 2000: Serum antibodies to
15 porcine circovirus type 1 (PCV-1) and type 2 (PCV-2) in pigs with and
16 without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet. Rec.*
17 146, 762-764.

18 Rosell C., J. Segalés, J. Plana-Durán, M. Balasch, G.M. Rodríguez-Arrijoja, S.
19 Kennedy, G.M. Allan, F. McNeilly, K.S. Latimer and M. Domingo, 1999:
20 Pathologic, immunohistochemical and in situ hybridization studies of natural
21 cases of Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J.*
22 *Comp. Path.* 120, 59-78.

23 Rosell C., J. Segalés and M. Domingo, 2000a: Hepatitis and Staging of Hepatic
24 Damage in Pigs Naturally Infected with Porcine Circovirus Type 2. *Vet. Path.*
25 37, 687-692.

- 1 Rosell C., J. Segalés, A. Rovira and M Domingo, 2000b: Porcine circovirus in Spain.
2 Vet. Rec. 146, 591-592.
- 3 Sanchez R., H. Nauwynck and M. Pensaert, 2001: Serological survey of porcine
4 circovirus 2 antibodies in domestic and feral pig population in Belgium.
5 Proceedings of ssDNA Viruses of Plants, Birds, Pigs and Primates, pp. 122.
- 6 Sandvik T., S. Grierson, D.P. King, Y. Spencer, M. Banks and T. Drew, 2001:
7 Detection and genetic typing of porcine circovirus DNA isolated from
8 archived paraffin embedded pig tissues. Proceedings of ssDNA Viruses of
9 Plants, Birds, Pigs and Primates, pp. 111.
- 10 Segalés J., M. Sitjar, M. Domingo, S. Dee, M Del Pozo, R. Noval, C. Sacristan, A.
11 De las Heras, A. Ferro and K.S. Latimer, 1997: First report of post-weaning
12 multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain. Vet. Rec. 141, 600-601.
- 13 Sorden S.D., 2000: Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic
14 wasting syndrome (PMWS). J. Swine Health Prod. 8, 133-136.
- 15 Walker I.W., C.A. Konoby, V.A. Jewhurst, I. McNair, F. Mc Neilly, B.M. Meehan,
16 T.S. Cottrel, J.A. Ellis and G.M. Allan, 2000: Development and application
17 of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of
18 serum antibodies to porcine circovirus. J. Vet. Diagn. Invest. 12, 400-405.
- 19

1 Fig 1. PCV2 nucleic acid in lymph nodes with depletion of lymphoid cells.



2

3 Table 1. Number of pigs with PCV2 nucleic acid detected in tissues by ISH

Year	No of pigs	No of pigs with PCV2 nucleic acid
1986	2	1
1987	1	0
1988	7	0
1989	8	0
1990	10	0
1991	20	7
1992	20	3
1993	9	3
1994	2	0
1995	10	3
1996	43	21
1997	57	40
TOTAL	189	78

4

1 Table 2. Prevalence of PCV2 antibodies in pigs in different years and age-groups
 2 (adults and nursery/fattening pigs of 1-5 months of age).

Year	No. of tested farms	Group of age	No. of tested sera	No. of positive sera (%)
1985	6	Adults	30	25 (83.3)
		Nursery/Fattening	0	0
1986	6	Adults	16	12 (75)
		Nursery/Fattening	15	9 (60)
1987	5	Adults	15	13 (86.7)
		Nursery/Fattening	15	12 (80)
1988	6	Adults	14	6 (42.8)
		Nursery/Fattening	15	10 (66.6)
1989	6	Adults	14	8 (57.1)
		Nursery/Fattening	15	14 (93.3)
1990	7	Adults	20	18 (90)
		Nursery/Fattening	10	4 (40)
1991	7	Adults	0	0
		Nursery/Fattening	35	28 (80)
1992	1	Adults	0	0
		Nursery/Fattening	3	2 (66.6)
1993	6	Adults	0	0
		Nursery/Fattening	44	35 (79.5)
1994	1	Adults	0	0
		Nursery/Fattening	24	21 (87.5)
1995	7	Adults	0	0
		Nursery/Fattening	50	26 (52)
1996	6	Adults	14	11 (78.5)
		Nursery/Fattening	15	9 (60)
1997	8	Adults	0	0
		Nursery/Fattening	20	19 (95)
TOTAL	72	Adults	123	93 (75.6)
		Nursery/Fattening	265	189 (71.3)

3
 4
 5
 6
 7
 8

3.3. Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome.
American Journal of Veterinary Research (2002) 63, 354-357.

4. DISCUSIÓN

Discusión

La mayoría de los estudios realizados hasta el año 1998 revelaron que una elevada proporción de explotaciones porcinas de diferentes países presentaban anticuerpos frente a PCV (Tischer *et al.*, 1982; Tischer *et al.*, 1986; Dulac y Afshar, 1989; Horner, 1991; Allan *et al.*, 1994c; Edwards y Sands, 1994; Tischer *et al.*, 1995). En el momento de la realización de esos estudios el PCV no se había asociado a ninguna enfermedad de los cerdos. Después de la primera descripción del PMWS en el año 1996 (Harding, 1996), se asoció un PCV (el que hoy es conocido como PCV2) a las lesiones observadas en esta patología (Daft *et al.*, 1996; Clark, 1997; Segalés *et al.*, 1997). Por ello, se hizo necesaria la utilización de una herramienta diagnóstica que permitiera diferenciar si los anticuerpos que se encontraban ampliamente distribuidos en las poblaciones porcinas correspondían a PCV1 ó a PCV2, y, asimismo, hasta que punto el PCV2 estaba distribuido en los cerdos de todo el mundo, tanto en granjas afectadas como libres del PMWS.

En un primer momento se estudió la respuesta de un panel de sueros porcinos frente a PCV1 y PCV2, para comprobar la reacción frente a ambos virus. Para ello se puso a punto una técnica de IPMA que se basaba en la utilización de una monocapa de cultivo celular infectada con uno u otro virus. Para la detección de anticuerpos frente a PCV1 se utilizó la línea celular PK-15 (ATCC CCL-33) infectada persistentemente con este virus, mientras que para PCV2 se utilizó una monocapa de células procedente de una línea celular

Discusión

continua de riñón de cerdo libre de PCV1 (células PSI). La técnica de IPMA utilizada en éste estudio permitió la titulación de los sueros evaluados desde 1:20 a 1:20480.

Mediante el uso de la técnica de IPMA se detectaron anticuerpos frente a PCV2 en cerdos de granjas afectadas con el PMWS pero también en granjas libres de la enfermedad. Estos hallazgos demostraron que el PCV2 se encontraba ampliamente distribuido en las granjas porcinas con historia clínica de PMWS, dado que el porcentaje de animales seropositivos fue muy alto (74%), y, por otra parte, se observó la presencia de serología frente a PCV2 en cerdos de granjas sin PMWS. Estos resultados concuerdan con los de otros investigadores que mediante diferentes técnicas como IFI, IPMA y ELISA, también demostraron que los anticuerpos frente a PCV2 estaban ampliamente distribuidos en las explotaciones porcinas de distintas partes del mundo (Cotrell *et al.*, 1999; Magar *et al.*, 2000; Mesu *et al.*, 2000; Walker *et al.*, 2000; Blanchard *et al.*, 2001; Sibila *et al.*, 2001a; Nawagitgul *et al.*, 2002).

En el primer estudio de ésta tesis se observó que el porcentaje de cerdos seropositivos a PCV2 fue mayor que el número de cerdos positivos a PCV1. Además, los títulos frente a PCV2 eran altos ó muy altos, con títulos mayoritariamente de 1/20480; por el contrario, los títulos de PCV1 eran más bajos, con un máximo de 1/5120. Asimismo, se observó una correlación estadísticamente significativa entre los títulos de anticuerpos frente al PCV1 y el PCV2, lo que sugería que la positividad frente a PCV1 se trataba

Discusión

probablemente de una reacción cruzada producida por la infección de PCV2. De hecho, la reactividad cruzada entre PCV1 y PCV2 ha sido también descrita en cerdos infectados con PCV2 de forma experimental y se ha relacionado con el desarrollo de anticuerpos neutralizantes. Se ha sugerido que una proteína de 35 kd, producto del ORF1, es probablemente la responsable de la reactividad cruzada entre PCV1 y PCV2 y, al parecer, se asocia con la inducción de anticuerpos neutralizantes (Progranichny *et al.*, 2000). Debido a las diferencias en la secuencia de aminoácidos de las proteínas de la cápside de PCV1 y PCV2, actualmente se ha podido desarrollar un ELISA que permite detectar anticuerpos específicos frente a PCV2 sin reactividad cruzada con PCV1 (Nawagitgul *et al.*, 2002).

En este primer estudio de la tesis se sugiere que los títulos elevados frente a PCV2 pueden coexistir con la presencia del virus en las lesiones características de PMWS, ya que muchos de los cerdos que contenían ácido nucleico de PCV2 en sus tejidos tenían títulos de anticuerpos frente a PCV2 muy altos. Esto coincide con observaciones de otros autores que sugieren que los anticuerpos frente a PCV2 no son protectivos contra el PMWS (Quintana *et al.*, 2001). También se ha planteado que los anticuerpos neutralizantes podrían generarse en una fase más avanzada de la enfermedad, pudiendo después interrumpir o disminuir la excreción de PCV2. Esta hipótesis se basaría en el hecho que algunos cerdos en una fase más crónica de la enfermedad presentaban también títulos muy altos de anticuerpos frente a

Discusión

PCV2 y ya no presentaban ácido nucleico de PCV2 en los tejidos (Quintana *et al.*, 2001).

La técnica de IPMA presentada en esta tesis ha sido utilizada y validada en distintos estudios. Mediante el uso de ésta técnica en sueros de cerdos de 6 a 9 semanas de edad inoculados intranasalmente con PCV2, se confirmó que la seroconversión ocurría entre los 14 y 21 días PI, con unos títulos que oscilaban entre 1:320 y 1:20480, para luego incrementarse hacia el final de los diferentes experimentos (días 28 hasta 69 PI), a títulos de 1:5120 y más de 1:20480 (Balasch *et al.*, 1999; Resendes *et al.*, 2001b; Rovira *et al.*, 2002). Asimismo, esta técnica ha sido utilizada en estudios clínicos para evaluar la dinámica de la respuesta humoral frente a PCV2, observándose que cerdos en la fase aguda presentaban títulos altos frente a PCV2 (Quintana *et al.*, 2001). Con todo ello se concluye que la IPMA es una técnica que permite la titulación de anticuerpos frente a PCV2 y es una herramienta importante en estudios epidemiológicos. No obstante, el uso de ésta técnica como elemento de diagnóstico es muy limitado ya que el comportamiento serológico en granjas con y sin PMWS es muy similar. Desde el punto de vista técnico, la IPMA precisa una preparación previa del cultivo celular, el virus y las placas de 96 pocillos que supone una inversión de trabajo y personal importante. Por ello, y con el objetivo de facilitar la preparación de las placas y realizar lecturas automáticas o semiautomáticas, no hay duda que las técnicas de ELISA,

Discusión

utilizando proteínas recombinantes de PCV2, serán en un futuro las técnicas de elección para la detección de anticuerpos frente a PCV2.

La presencia del PMWS está descrita desde 1991 en Canadá y desde 1997 en España (Segalés *et al.*, 1997). Sin embargo, no se puede descartar que el PCV2 estuviera circulando en la población porcina Española con anterioridad al año 1997. La disponibilidad de sueros porcinos desde el año 1985 y de tejidos porcinos desde el año 1986, permitió la realización de un estudio retrospectivo en España para la detección de anticuerpos frente a PCV2, a través de la técnica de IPMA desarrollada en el estudio anterior, así como detección de ácido nucleico vírico en bloques de tejidos incluidos en parafina, a través de una técnica de HIS descrita previamente por Rosell *et al.*, (1999, 2000a). Los datos obtenidos en este estudio indican que el PCV2 ha estado presente en la población porcina española al menos desde 1985, doce años antes de la primera descripción del PMWS en España. Por otro lado, en los tejidos utilizados en este estudio retrospectivo se observó depleción linfocitaria, cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos, células gigantes multinucleadas e infiltración histiocitaria en los tejidos linfoides, lesiones que son características de lo que conocemos desde 1997 como PMWS en España, pero que para el momento del diagnóstico no fueron relacionadas con una posible nueva enfermedad.

Discusión

En este estudio retrospectivo se detectó la presencia de ácido nucleico de PCV2 en tejidos al menos desde el año 1986, y la presencia de anticuerpos frente a PCV2 en un porcentaje elevado en los sueros evaluados, al menos desde 1985. Estos datos coinciden con otros estudios retrospectivos donde se detectó la presencia de anticuerpos frente a PCV2 con anterioridad a la descripción del PMWS. Se han detectado anticuerpos frente a PCV2 a partir de 1969 en Bélgica (Sánchez *et al.*, 2001), 1973 en Irlanda del Norte (Walker *et al.*, 2000), 1985 en Canadá (Magar *et al.*, 2000) y 1987 en USA (Nawagitgul *et al.*, 2002). Asimismo se ha detectado ácido nucleico de PCV2 en tejidos porcinos desde 1986 en el Reino Unido (Sandvik *et al.*, 2000) y en el año 1989 en Japón (Mori *et al.*, 2000). Por otro lado, se conoce la existencia generalizada de anticuerpos de PCV2 en cerdos de países tales como Australia y Nueva Zelanda, en los cuales no se ha descrito PMWS hasta el momento (Dr. R. Morris, Massey University, New Zealand, comunicación personal).

Como se ha descrito anteriormente, se asume que el diagnóstico de PMWS se basa en tres criterios básicos: la presencia de síntomas clínicos compatibles con PMWS, la detección de lesiones microscópicas características de esta enfermedad en los tejidos linfoides y, por último, la detección de ácido nucleico ó antígeno de PCV2 en los tejidos lesionados (Sorden, 2000; Quintana *et al.*, 2001). De esta manera, la presencia de lesiones microscópicas en el tejido linfoide características de PMWS y la detección de PCV2 en las zonas de lesión, indican que los casos descritos en el estudio retrospectivo

Discusión

podrían actualmente ser diagnosticados como PMWS. Sin embargo en su momento esos casos no fueron reconocidos como tales y fueron diagnosticados como enfermedad de Glässer, úlcera gástrica de las *pars oesophagea* ó colitis inespecíficas, complicadas, o no, con infecciones víricas sistémicas (principalmente PRRSV, *porcine reproductive and respiratory syndrome virus*, desde 1991). Estos datos sugieren muy claramente que, a pesar de existir indicios patológicos que hoy se asumen evidentes, éstos pasaron desapercibidos por el desconocimiento de la enfermedad en ese momento. Un factor clave por el cual estos casos iniciales de PMWS no fueron reconocidos como una nueva entidad fue el hecho que la depleción linfoide, que en algunos casos si se observaron en esos diagnósticos, fue asociada a problemas de estrés debido a condiciones de manejo u otras causas no aclaradas. Además, los cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos característicos de la infección por PCV2 y las células gigantes multinucleadas, hallazgos de gran ayuda para el diagnóstico de PMWS, no estaban presentes en la mayoría de esos casos iniciales; de hecho, estos hallazgos no fueron observados hasta el año 1996 en algunos animales. Por otro lado, la baja prevalencia de la enfermedad, los síntomas clínicos relativamente inespecíficos, y/o la presencia simultánea de otras infecciones han ayudado probablemente a que la enfermedad permaneciera sin diagnosticarse durante muchos años.

Actualmente es muy difícil explicar porque el PMWS fue esporádico antes de 1997 en España, y en cambio posteriormente se ha presentado con

Discusión

una prevalencia relativamente alta, una de las más altas de Europa. Se especula que los cambios en los sistemas de producción y de la genética en la última década, tales como el incremento en el número de lechones/cerda/año, el mayor ratio de crecimiento de los animales, el incremento en el número de adopciones en paridera, la mezcla de animales en el momento del destete, la sobrepoblación, el destete temprano, el incremento en el tamaño de las explotaciones, y los sistemas de producción en tres sitios, podrían haber creado de alguna manera aún no clarificada, subpoblaciones de cerdos susceptibles a desarrollar PMWS con mayor proporción que en años anteriores (Guilmoto y Wessel-Robert, 2000). Por otro lado, investigaciones recientes han sugerido que la reducción de la microflora patógena en los rebaños porcinos combinada con la exclusión intencional de patógenos conocidos mediante el uso masivo de distintas medidas profilácticas como las vacunaciones, podrían haber provocado una sobreestimulación en cerdos que previamente no habían sido expuestos a determinados patógenos. Esta estimulación del sistema inmune podría haber sido un factor desencadenante para el desarrollo del PMWS en cerdos previamente infectados de forma subclínica y enzootica con PCV2 (Krakowka *et al.*, 2001; Kyriakis *et al.*, 2002). Por otro lado, estudios de infecciones naturales y experimentales asocian una mayor cantidad de PCV2 presente en los tejidos a una mayor severidad de la presentación clínica del PMWS (Liu *et al.*, 2000a; Rovira *et al.*, 2002), por lo que podría sugerirse que los cambios introducidos en las explotaciones

Discusión

porcinas podrían, de alguna manera, haber favorecido una mayor capacidad de replicación del virus y así poder alcanzar la cantidad de PCV2 necesaria para desarrollar PMWS. No obstante, tampoco se pueden descartar otras posibilidades no estudiadas hasta ahora tal como una posible selección genética no intencionada de cerdos susceptibles a esta enfermedad.

La mayoría de los estudios realizados sobre infecciones atribuidas a PCV2 han dirigido sus objetivos hacia el diagnóstico de PMWS y la reproducción experimental de la enfermedad, pero muy pocos han estudiado la dinámica de la infección por PCV2 dentro de una explotación porcina. Por tanto, un avance crucial para la posible implementación de medidas de manejo para el control del PMWS en las granjas consiste en determinar el comportamiento de la infección por PCV2 dentro de una granja con la enfermedad. En el tercero de los estudios presentados en esta tesis se escogió una granja con graves problemas clínicos asociados al PMWS, y libre de otras infecciones víricas tales como parvovirus porcino (PPV, *porcine parvovirus*), PRRSV y el virus de la enfermedad de Aujeszky (ADV, *Aujeszky disease virus*), para el estudio de la dinámica de la infección por PCV2. Los síntomas clínicos observados en los animales afectados de ésta granja fueron similares a los descritos por otros autores (Clark y Harding, 1998; Sorden, 2000; Quintana *et al.*, 2001). Curiosamente, se observó que la mortalidad asociada al proceso era mayor en los machos que en las hembras, teniendo en cuenta que la mayoría

Discusión

de los machos del estudio estaban castrados, se sugiere que la castración podría ser un factor de riesgo que contribuya al desarrollo o potenciación de infecciones y enfermedades, en éste caso del PMWS. Este dato ha sido también apuntado por otros investigadores (Corrégé *et al.*, 2001). En el caso de algunas granjas Españolas afectadas con el PMWS, se ha observado una tendencia en cuanto a mayor mortalidad debida al PMWS en los machos, castrados y no castrados, que en las hembras. Es posible que otros factores genéticos y hormonales también puedan estar involucrados en la predisposición de los machos a presentar mayores índices de mortalidad (Bereskin *et al.*, 1973; Fahmy *et al.*, 1978; Roehe y Kalm, 2000).

La técnica de IPMA, desarrollada para detectar anticuerpos frente a PCV1 y PCV2, también fue utilizada en éste estudio para determinar el patrón serológico de la infección natural por PCV2. En este estudio, el diagnóstico de PMWS se basó en los síntomas clínicos, lesiones histopatológicas en órganos linfoides y detección del virus en tejidos por HIS; adicionalmente se realizaron serología y PCR para detectar anticuerpos y genoma de PCV2, respectivamente. El patrón serológico observado en éste estudio fue similar al descrito para otros virus que afectan a los cerdos, detectándose una disminución de los anticuerpos calostrales durante el período de lactación y transición con los títulos más bajos a las 7 semanas de edad y una seroconversión en el período entre las 7 y 12 semanas de edad. Estos datos coinciden con lo descrito por otros autores para PCV2, utilizando una técnica

Discusión

de ELISA de competición (Harding *et al.*, 1999). Se han obtenido resultados similares también utilizando una técnica de ELISA que utiliza la proteína codificada por el ORF2 de PCV2 como antígeno (Blanchard *et al.*, 2001). Mediante esta última técnica, y en un estudio realizado en Francia, se detectó que la seroconversión del 35% de los lechones ocurría después de la décima semana de edad y, de estos, el 57% seroconvertían después de la semana 13 de edad.

Los resultados de PCR indicaron que el mayor número de cerdos virémicos se encontraban a las 12 semanas de edad, momento en el cual los síntomas clínicos empezaban a disminuir en intensidad. Asimismo, se observó que el brote del PMWS coincidió entre las 7 y 12 semanas de vida, asociado con el incremento del número de cerdos virémicos. Este hecho indica que la viremia está estrechamente relacionada con la existencia del cuadro clínico de PMWS, lo cual coincide con resultados de otros autores donde se han observado mayores cantidades de PCV2, detectadas mediante PCR cuantitativas, en cerdos con sintomatología clínica de PMWS, que en cerdos sanos (Liu *et al.*, 2000a; Rovira *et al.*, 2002). Al realizarse la detección del virus durante las siguientes semanas a la aparición de la enfermedad se observó que la viremia se mantenía hasta las 28 semanas de vida en algunos cerdos, lo cual no había sido descrito previamente. Lo que quedaría por dilucidar, es si la viremia fue continua o intermitente, y si esos cerdos virémicos son capaces o no de excretar virus infeccioso en cantidades suficientes para infectar otros

Discusión

cerdos. Los largos períodos de viremia por PCV2 en cerdos aparentemente sanos, descritos por primera vez en éste estudio, indican que los anticuerpos detectados por IPMA frente a PCV2 no son capaces de neutralizar el virus y que, quizás, la producción de anticuerpos neutralizantes pueda ser tardía. Para confirmar esta teoría se deberían haber realizado estudios de seroneutralización para así determinar la generación o no de anticuerpos neutralizantes durante el seguimiento de los animales hasta las 28 semanas de vida. La dificultad de producir gran cantidad de virus en cultivos celulares ha provocado que, al menos hasta ahora, no se hayan desarrollado y aplicado de forma más o menos generalizada las técnicas de seroneutralización viral. No obstante, en un estudio experimental se encontró que los anticuerpos neutralizantes se desarrollaban a partir de los 28 días después de la infección (Progranichny *et al.*, 2000).

Estudios realizados de casos naturales de infecciones mixtas de PCV2 con PRRSV y/o PPV han sugerido que la aparición y la severidad del PMWS están relacionadas con algún tipo de interacción entre estos virus (Ellis *et al.*, 2000; Quintana *et al.*, 2001; Segalés *et al.*, 2002). Estas observaciones se han visto corroboradas en estudios experimentales, donde se ha observado que la presencia del PRRSV o PPV, simultáneamente a la infección por PCV2, han incrementado la severidad de las lesiones del PMWS (Allan *et al.*, 1999a; Ellis *et al.*, 2000; Allan *et al.*, 2000; Kennedy *et al.*, 2000; Krakowka *et al.*, 2000; Harms *et al.*, 2001; Rovira *et al.*, 2002). Se ha observado que en infecciones

Discusión

mixtas del PRRSV y PCV2, la cantidad de PCV2 detectada mediante PCR cuantitativa ha sido mayor, por lo que se piensa que la infección por PRRSV promueve la replicación de PCV2 (Allan *et al.*, 2000; Rovira *et al.*, 2002). Uno de estos estudios, además, ha descrito una mayor duración en la viremia del PRRSV cuando los cerdos son inoculados PRRSV y PCV2, por lo que han sugerido que el PCV2 también puede favorecer la replicación del PRRSV (Rovira *et al.*, 2002).

Este estudio, al descartar la presencia de otras infecciones víricas como son las causadas por el PRRSV, PPV y ADV, indica que el PCV2 es el principal agente patógeno involucrado en el PMWS y que, aparentemente, no necesita de otros agentes víricos para causar la enfermedad. Lógicamente, no se pueden descartar otros efectos no controlados en este estudio, tales como una posible estimulación del sistema inmune (Krakowka *et al.*, 2001, Kyriakis *et al.*, 2002), u otros factores actúen como desencadenantes del PMWS en cerdos infectados por PCV2.

5. CONCLUSIONES

Conclusiones

1. La utilización de una línea celular de riñón de cerdo persistentemente infectada con PCV2, permite la detección de anticuerpos frente a este virus mediante una técnica de IPMA.
2. Se observó una correlación estadísticamente significativa entre los títulos de anticuerpos frente a PCV1 y PCV2, lo que indica que la positividad frente a PCV1 en los sueros porcinos evaluados fue probablemente debida a una reacción cruzada producida por la infección de PCV2.
3. La técnica de IPMA permitió observar una elevada seroprevalencia frente a PCV2 en cerdos con y sin PMWS. Estos resultados indican que la infección por PCV2 está ampliamente distribuida en las granjas porcinas.
4. El estudio serológico retrospectivo indica que el PCV2 ha estado presente en la población porcina española al menos desde 1985, doce años antes de la primera descripción del PMWS en España.
5. El estudio patológico retrospectivo indica que el PMWS, con lesiones microscópicas características de la enfermedad como depleción linfoide e infiltración de células histiocíticas, existe en España al menos desde 1986. Estas lesiones estaban asociadas a la presencia de ácido nucleico de PCV2 en los tejidos afectados.
6. En una granja convencional libre de agentes víricos comunes del cerdo como PPV, ADV y PRRSV se encontraron casos severos de PMWS con alta mortalidad, lo cual sugiere que el PCV2 puede ser capaz de producir el PMWS sin la presencia de otros agentes infecciosos conocidos.

Conclusiones

7. Se observó una mayor mortalidad asociada a PMWS en cerdos machos que en hembras, lo que podría significar una mayor predisposición de los machos a sufrir el PMWS.
8. El patrón serológico observado en una infección natural de PCV2 en una granja afectada de PMWS se caracterizó por una disminución de los anticuerpos calostrales durante el período de lactación y transición, observándose los títulos más bajos a las 7 semanas de edad, y una seroconversión entre las 7 y 12 semanas de edad.
9. El brote de PMWS coincide con el incremento de la viremia por PCV2 entre las 7 y 12 semanas de vida. Esto hecho indica que la viremia está estrechamente relacionada con la existencia del cuadro clínico de PMWS.
10. Las viremias para PCV2 observadas en los cerdos fueron de 5 hasta 21 semanas. Este largo período de viremia, de 21 semanas, en un cerdo aparentemente sano indican que los anticuerpos detectados frente a PCV2 no son capaces de neutralizar el virus y, asimismo, que la producción de anticuerpos neutralizantes puede ser tardía.
11. La presencia de altos títulos de anticuerpos frente a PCV2 coincidió con la presencia de ácido nucleico de PCV2 en los tejidos de los animales evaluados, indicando que, al menos en la fase inicial de la respuesta serológica, los anticuerpos frente a PCV2 no son neutralizantes.