

Confirmación de casos de Circovirus Porcina por distintas técnicas de laboratorio

Favaro, P.¹; Prieto, G.¹; Tonini, M. F.¹; Campá, M.²; Sánchez, A.³; Canal, A.³; Rouzic, L.¹; Magnone, B.¹; Occhi, H.¹

1- Cátedra de Microbiología. 2- Cátedra de Producción de Porcinos. 3- Cátedra de Patología Básica
paulafavaro10@gmail.com

El Circovirus porcino (PCV) es un virus pequeño con ADN de cadena simple y circular que afecta a cerdos en todo el mundo. Se conocen dos tipos, el tipo II que provoca el llamado síndrome de desmedro post-destete (PMWS) además de enfermedades inmunodepresivas y respiratorias, fue descubierto en 1991 en Canadá¹. En la Argentina los primeros casos de fueron reportados en una granja de la Provincia de Córdoba en 2002³.

La presentación clínica de PMWS se caracteriza por pérdida de peso, deterioro general de la condición corporal, disnea, secreción nasal, diarrea, ictericia, y efectos inmunosupresores severos. En algunos animales se puede observar un aumento en el tamaño de los linfonódulos superficiales. La edad de los animales afectados suele oscilar entre las 5 y las 12 semanas. La morbilidad y la letalidad son muy variables, y se sugieren valores de 4-20% y 70-90%, respectivamente³. Además del PMWS, hay debilidad, disnea, linfadenopatía, diarrea, palidez e ictericia. Las lesiones asociadas con su presencia incluyen neumonía intersticial granulomatosa a linfocitocítica, hepatitis, nefritis, miocarditis, enteritis, pancreatitis, hidropericardio, ascitis, presencia de manchas blanquecinas difusas en hígado y riñones, ganglios linfáticos aumentados de tamaño entre otros, e histopatológicamente puede observarse glomerulonefritis, ganglios linfáticos con depleción linfática, neumonía bronco intersticial con infiltrado granulomatoso y células gigantes multinucleadas en ganglios linfáticos. La expresión completa de la enfermedad puede requerir la presencia de otros agentes del complejo respiratorio porcino (CRP). Nuevas investigaciones lo han relacionado con otros desórdenes en cerdos, como abortos y fallas reproductivas. Sin dudas el mayor inconveniente de la infección es la inmunodepresión, que permite que se instalen enfermedades asociadas a PCV2 (PCVAD)².

El objetivo de este trabajo fue demostrar la presencia de PCV-2 por técnicas de laboratorio en cerdos con enfermedad respiratoria y pérdidas en la ganancia de peso.

Ingresaron al laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral muestras provenientes de 18 cerdos de distintas procedencias remitidas por profesionales de la región. Los animales tenían entre 6 y 12 semanas y presentaban signología respiratoria, desmedro y debilidad. Las muestras consistieron en trozos de órganos (bazo, hígado, ganglios, intestino, riñón) que fueron tomadas durante necropsias. Sobre hígado, bazo y ganglios se realizó la técnica de inmunofluorescencia directa (IFD), para esto se usaron improntas de los órganos y se tiñieron con antisuero policlonal anti-PCV2 conjugado con isotiocianato de fluoresceína de origen comercial VMRD (N° cat: PAB-PCV2) y luego se observaron en el microscopio fluorescente. Posteriormente se realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según el siguiente protocolo: extracción del ADN con el método Wizard Genomic DNA Purification Kit Cat.#A1120 sobre tejido animal fresco o descongelado, se homogeneizó con la solución lisis núcleo con el microprocesador (dispenser), se le agregó la precipitación de proteínas con la solución ARNasa, seguido de la deshidratación con isopropanolol y etanol 70% y finalmente la hidratación con la solución re hidratante de ADN. La amplificación del material genético obtenido se realizó utilizando primers específicos CVF: CGA GAA AGC GAA AGG AAC AGA, y CVR: GGT AAC CAT CCC ACC ACT T durante 3hs en el termociclador y el tamaño del producto amplificado es 371 pb. La electroforesis o corrida en un gel de agar a 35 MV, 400 MA, durante 40 minutos y por ultimo lectura en transiluminador. A su vez, se enviaron trozos de todos los órganos en formol al 10% al laboratorio de Histopatología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral para observar alteraciones microscópicas. Allí fueron procesadas con técnicas histológicas de rutina, se

utilizó el micrótopo tipo Minot para lograr cortes de 5µ que fueron coloreados con hematoxilina eosina y tinciones especiales para ser observadas y describir las lesiones microscópicas.

N.E	793	816	837	841	842	843	845	883	903
IFD	No se realizó	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
PCR	Positivo	Positivo	Positivo	No se realizó	Positivo	No se realizó	Positivo	Positivo	Positivo
HTP	No se realizó	Compatible	No se realizó	Compatible	Compatible	No compatible	Compatible	No compatible	Compatible

N.E	904	925	930	932	940	950	955	988	989
IFD	Positivo	No se realizó	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	No se realizó	No se realizó
PCR	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
HTP	Compatible	Compatible	Compatible	Compatible	Compatible	Compatible	Compatible	No se realizó	No se realizó

Tabla 1: Resultados. N.E.: Número de entrada para el laboratorio de Virología. PCR: reacción en cadena de la polimerasa. IFD: Inmunofluorescencia directa. HTP: histopatología.

En la tabla N° 1 se detallan los resultados de IFD, PCR e histopatología. Cabe resaltar que en el 100% de las muestras analizadas por PCR se amplificaron productos con 371pb, y de las 14 muestras que fueron sometidas a IFD, el 78% (11) fueron positivas. Las lesiones microscópicas halladas que se consideraron como compatibles con circovirus fueron marcada tumefacción de epitelios tubulares renales y presencia de inclusiones basófilas en el citoplasma de histiocitos. Marcada tumefacción de hepatocitos que comprimen el conjuntivo interlobulillar alterando la estructura normal. Núcleos hipertróficos y éstasis biliar canalicular. En bazo depleción y necrosis de linfocitos en pulpa blanca, presencia de polimorfocitos y cuerpos de inclusión en histiocitos. En ganglio linfático mesentérico se encontró necrosis de linfocitos difusa. En intestino mucosa con atrofia y necrosis en sectores de vellosidades, infiltrados en lámina propia y necrosis de linfocitos en placas de Peyer en la submucosa. En intestino grueso necrosis del epitelio, infiltrados de eosinófilos en lámina propia y presencia de micro abscesos en submucosa, en área de nódulos linfáticos.

Al relacionar las lesiones microscópicas halladas con los resultados de IFD y PCR y la signología y edad de presentación podemos suponer que el agente interviniente en la patología es el PCV2. Si bien no existen datos nacionales acerca de las pérdidas productivas y económicas causadas por PCV-2, podemos a partir de los resultados obtenidos, relacionar la existencia y circulación del virus con los atrasos de crecimiento observados en los animales de las granjas estudiadas. Estos son datos suficientes para evaluar la necesidad de detectar precozmente el PCV-2, haciendo uso de herramientas diagnósticas y desarrollar un plan de vacunación acorde a la situación de cada establecimiento porcino.

Bibliografía

- 1- Faurez, F., Dory, D., Grasland, B., Jestin, A. (2009) Replication of porcine circoviruses. Virol. J 2009; 6:60. May 18.
- 2- Noriega, J., Reyes, P., Bucarey, S. (2007) Circovirus porcino: un virus pequeño que genera un gran problema. Avances en Ciencias Veterinarias 22, pp. 62-71.
- 3- Sarradell J., Perez AM., Comba E., Pereira N., Anthony I., Andrada M., Segales J. (2004) Pathological findings in pigs affected by postweaning multisystemic wasting syndrome in Argentina. Rev. Arg. Microbiol. Jul-Sep; 36 (3): 118-24.