

January 2007

Validación y aplicación de una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de circovirus porcino tipo 2 (PCV-2) en muestras de suero porcino

Luisa Fernanda Villadiego Marmolejo
luisavilladiego@gmail.com

Laura Y. Villarreal Buitrago
laura.villarreal@intervet.com

Leonardo J. Richtzenhain
Universidade de São Paulo, Brasil, paulo7926@yahoo.com

Paulo E. Brandão
Universidade de São Paulo, Brasil, paulo7926@yahoo.com

Follow this and additional works at: <https://ciencia.lasalle.edu.co/mv>

Citación recomendada

Villadiego Marmolejo LF, Villarreal Buitrago LY, Richtzenhain LJ y Brandão PE. Validación y aplicación de una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de circovirus porcino tipo 2 (PCV-2) en muestras de suero porcino. Rev Med Vet. 2007;(14): 7-15.

This Artículo de Investigación is brought to you for free and open access by the Revistas científicas at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Revista de Medicina Veterinaria by an authorized editor of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

Validación y aplicación de una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de circovirus porcino tipo 2 (PCV-2) en muestras de suero porcino¹

Luisa Fernanda Villadiego Marmolejo* / Laura Y. Villarreal Buitrago**
Leonardo J. Richtzenhain*** / Paulo E. Brandão***

RESUMEN

La circovirosis porcina es un síndrome infecto-contagioso, causado por el circovirus porcino tipo 2 (PCV-2), que se manifiesta principalmente como una enfermedad de lechones recién destetados, causando dermatitis, neuropatías, fallas reproductivas, neumonía y encefalitis. Los objetivos de esta investigación fueron validar una técnica de PCR para detección de PCV-2 en sueros porcinos y la aplicación de la técnica validada en muestras de sueros porcinos para detección del PCV-2. Se encontró, después de la aplicación de 2 diferentes PCRs, que el 100% de los animales fueron negativos a PCV-2; además, la PCR dirigida a una región entre las ORF 1 y 2 del virus se presentó como más sensible al ser comparada a otra PCR dirigida al gen de la proteína de la cápside. Se concluyó que la PCR es una técnica válida para la detección de PCV-2 en sueros porcinos y que la población muestreada era libre del virus.

Palabras clave: circovirus porcino tipo 2, PCR, suero.

VALIDATION AND APPLICATION OF A POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) TO DETECT PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 (PCV-2) IN SWINE SERA

ABSTRACT

Porcine circovirosis is an infectious-contagious syndrome caused by porcine circovirus type 2 (PCV-2) found mainly in recently weaned piglets causing dermatitis, neurological and reproductive disorders, pneumonia and encephalitis. The objectives of the present study were to validate a Polymerase Chain Reaction (PCR) technique to detect PCV-2 in swine serum and to apply the validated technique in swine serum samples to detect PCV-2. After the application of two different PCRs, 100% of the surveyed animals were negative to PCV-2; furthermore, the PCR targeted to a region between ORFs 1 and 2 of the virus was found more sensitive when compared to another PCR targeted to the capsid protein gene. As a conclusion, PCR is a valid technique to detect PCV-2 in swine serum and the surveyed population was free of the virus.

Key words: porcine circovirus type 2, PCR, serum.

¹ Investigación realizada en los laboratorios de Epidemiología y Enfermedades Zoonóticas de la Universidad de Sao Paulo, Brasil.

* Médica Veterinaria ULS, Diplomado en Producción y Salud Porcina. Correo electrónico: luisavilladiego@gmail.com

** Médica Veterinaria ULS, PhD. Epidemiología y Enfermedades Zoonóticas de la USP, Brasil. Correo electrónico: laura.villarreal@intervet.com

*** Médicos Veterinarios, PhD., docentes e investigadores área de Epidemiología y Enfermedades Zoonóticas de la USP Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de São Paulo, Brasil. Correo electrónico: paulo7926@yahoo.com

Fecha de recepción: 17 de enero de 2007.

Fecha de aprobación: 4 de septiembre de 2007.

INTRODUCCIÓN

La circovirus porcina es un síndrome infecto contagioso, causada por el circovirus porcino tipo 2 (PCV-2), que se manifiesta principalmente como una enfermedad de lechones recién destetados, en esta dolencia se presentan dermatitis, neuropatías, fallas reproductivas, neumonía y encefalitis (Harding, 2004).

La primera enfermedad asociada con PCV-2 fue el síndrome del desmedro multisistémico postdestete, conocida por sus siglas en inglés como PMWS (*Post-Weaning Multisystemic Wasting Syndrome*) (Staeble *et al.*, 2005). Los signos fundamentales de PMWS incluyen caquexia, disnea, hipertrofia de los nódulos linfáticos, diarrea, palidez e ictericia, se presenta con mayor frecuencia en porcinos entre 7 y 15 semanas de edad, en la fase postdestete (Harding, 2004).

En su forma endémica el PMWS presenta bajas morbilidades y mortalidades, no obstante, en brotes epidémicos se pueden elevar en tres o cuatro veces en la fase postdestete (Harding, 2004). Esta enfermedad fue reportada en Canadá, Estados Unidos, México, Argentina, Brasil, Corea del Sur, Japón y en diversos países de Europa (Castro *et al.*, 2004; Chae, 2004). Aunque en Colombia existen rumores de la presencia de PCV-2, no se encuentran publicaciones científicas sobre la situación actual en el país.

Los patrones de lesiones histopatológicas encontradas en caso de PMWS, incluyen una inflamación granulomatosa, que sugiere que la patogenia y la progresión de la enfermedad están asociadas con infiltración por monocitos y macrófagos (Chae, 2004).

El Síndrome de Nefropatía y Dermatitis Porcino (PDNS, *Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome*), descrita por primera vez en el Reino Unido y caracterizada por un proceso patológico vascular inmunomediado, acompañada por una dermatitis, se manifiesta con lesiones en piel de color rojo o púr-

pura, que forman placas o parches en la piel (infartos multifocales) de forma irregular o circular (Smith *et al.*, 1993; White y Higgins, 1993).

Los disturbios en la reproducción causados por PCV-2 ocurren de modo esporádico durante brotes de PMWS, se manifiestan en forma de abortos y aumento de las tasas de mortinatos y momias, pudiendo encontrar PCV-2 en diversos tejidos fetales, sugiriendo la posibilidad de transmisión vertical o el desarrollo de inmunotolerancia en los lechones (Harms, 1999; Jolie *et al.*, 2000; Harding, 2004).

Los procesos patológicos del tracto respiratorio de porcinos causados por PCV-2 sin la ocurrencia de los signos clásicos de PMWS reciben el nombre de Complejo Respiratorio Porcino (PRDC, *Porcine Respiratory Disease Complex*), caracterizado morfológicamente por neumonía proliferativa necrotizante (PNP). La PNP, histopatológicamente, se caracteriza por una bronquiolitis necrotizante que se presenta en los cerdos en la etapa del destete y en la fase de terminación (Morin *et al.*, 1990; Harding, 2004). La PRDC es un síndrome respiratorio multietiológico, que envuelve PCV-2, PRRSV (Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino), virus de influenza porcina, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Pneumocystis carinii* (Ellis *et al.*, 1998; Harms *et al.*, 2001).

Una forma diferente de manifestación de la infección por PCV-2 es el proceso patológico del sistema nervioso central; en las neuronas cerebelares, encefálicas y medulares, el PCV-2 conlleva a temblores congénitos y lesiones en meninges (Stevenson, 1999; Wellenberg, 2000).

En porcinos en la fase de crecimiento-terminación, una manifestación clínica de infección por PCV-2 distinta al PMWS es la enteritis granulomatosa, caracterizada por infiltración de macrófagos y células gigantes multinucleadas en placas de Peyer, con inclusiones citoplasmáticas en células inflamatorias (Kim *et al.*, 2004).

Esta diversidad de manifestaciones clínicas de infección por PCV-2 se originan, no solamente, en las diferentes edades de los animales, sino también en las coinfecciones observadas y en las asociaciones intrínsecas del PCV-2 con otros patógenos. Por ejemplo, en el caso de PMWS, ocurre sinergismo entre o PCV-2 y parvovirus porcino (PPV), posiblemente por la potencialización de la replicación de PCV-2 en macrófagos (Ellis *et al.*, 2004). En disturbios reproductivos, hay también la asociación PCV-2 y PPV, además de PRRSV y virus de encefalomiocarditis (O'Connor *et al.*, 2001).

En casos de procesos entéricos, hepáticos y renales a los cuales puede estar relacionado el PCV-2 con PRRSV, Aujeszky, virus de hepatitis E y PPV (Ellis *et al.*, 2004). Además de esto, como ya ha sido descrito, la patogenia del PRDC y la asociación de PCV-2 con otros virus, bacterias o protozoarios (Ellis *et al.*, 1998; Harms *et al.*, 2001).

Las infecciones mixtas por PCV y coronavirus, también se han descrito (Bersano *et al.*, 2003), lo que demuestra la complejidad epidemiológica de la patología de circovirus porcino.

En la actualidad el conocimiento acerca de la compleja patogenia, los múltiples factores de riesgo, como, por ejemplo, edades susceptibles, la cadena de transmisión y las interacciones microecológicas con PCV-2 en cerdos permite comprender, sólo en parte, el verdadero impacto de las circovirus en porcinos.

Los diagnósticos de las enfermedades asociadas a PCV-2 deben siempre basarse, no sólo en la detección del virus o de su ADN en un animal, sino que es obligatorio relacionarlo siempre con la presencia de síntomas clínicos de la enfermedad en cuestión y las lesiones histopatológicas (Chae, 2004).

Basándose en técnicas como ELISA, inmunofluorescencia directa e inmunoperoxidasa, se puede realizar

el diagnóstico indirecto de circovirus porcino por medio de la detección de anticuerpos séricos como herramienta de estudios seroepidemiológicos (Allan *et al.*, 1999; Nawagitgul *et al.*, 2002; Rodriguez-Arriola *et al.*, 2000).

El diagnóstico directo de circovirus puede ser realizado con hibridación *in situ* e inmunohistoquímica, las cuales permiten la asociación entre la presencia de PCV y lesiones del tejido (Choi y Chae, 2000; Segalés *et al.*, 2004) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que puede ser aplicada para la detección del virus en muestras de suero, tejido y heces (Liu *et al.*, 2002; Shinata *et al.*, 2003; Calsamiglia *et al.*, 2002).

En Colombia, aunque se sospeche en el campo de la ocurrencia de PCV-2, faltan investigaciones más exactas para confirmar esta sospecha y estudiar la posible implicación del virus en la porcicultura nacional.

Así, la presente investigación tuvo por objetivos validar la técnica de PCR para la detección de PCV-2 en sueros porcinos y aplicarla a una población de porcinos con histórico desconocido.

MATERIALES Y MÉTODOS

CONTROLES POSITIVOS PARA PCV-2

Como controles positivos para PCV-2 se utilizaron muestras de tejido porcino (suspensiones de mezclas o pools de riñones, hígado y bazo) previamente diagnosticadas como positivas para el virus (Castro, 2005), nombradas como 08/04, 15/04 y 03/02.

SENSIBILIDAD ANALÍTICA

Para la evaluación de la sensibilidad analítica de las PCRs descritas abajo, se diluyó la muestra control positivo 08/04 en agua ultra-pura (AUP) y en suero fetal bovino (SFB, Cultilab®, Brasil) desde 1:10 hasta 1: 100.000 con el factor 10.

SUEROS

Para la fase de aplicación de las PCRs para PCV-2, se utilizaron 16 muestras de suero porcino, disponibles en el Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva a Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidade de São Paulo (VPS-FMVZ-USP) (muestras m 311/05 4, m 311/05 7, m 311/05 9, m 311/05 10, m 311/05 11, m 311/05 12, m 311/05 13, m 311/05 14, m 311/05 15, m 311/05 16, m 311/05 17, m 311/05 20, m 311/05 21, m 311/05 22, m 311/05 23, m 311/05 24), tomadas de piaras brasileras. Dichas muestras jamás habían sido examinadas para PCV-2.

EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ADN de las diluciones de la muestra 08/04, de los controles positivos 15/04 y 03/02, de AUP y SFB (controles negativos) y de los 16 sueros porcinos se realizó según Chomkczynski *et al.* (1993). El ADN extraído de esta forma fue congelado a -80°C hasta la realización de las PCRs.

REACCIÓN EN CADENA POR LA POLIMERASA PARA EL GEN DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDE (PCR-CAP)

Se evaluó la aplicabilidad de una PCR específica para el PCV-2 dirigida al gen codificador de la proteína de la cápside del virus, descrito por Yu *et al.* (2005) para la amplificación de un segmento de 986 pares de bases (pb). La secuencia de los primers es la siguiente: CapF (senso): 5'GAGTCAAGAACAGGTTTGGGTG3' y CapR (anti-senso) 5'AGACTCCCGCTCTCCAACAAG3'.

La reacción se compuso de 1 x PCR Buffer (Invitrogen®), deoxinucleósidos-trifosfato (dNTPs) 0,2 mM, cloruro de magnesio 1,5mM, 1µM de cada uno de los primers, 2,5 U de Platinum Taq DNA polimerasa (Invitrogen®), 9,75 µL de AUP y 2,5µL de los respectivos ADN, para una reacción final de 25µL,

llevándose al termociclador para una desnaturalización inicial de 5 minutos (min) a 94°C seguida de 40 ciclos de 94°C/ 30 segundos (seg), 63°C/ 45 seg y 72°C/ 1 min; después de los ciclos, se concluyó con una extensión final de 72 °C/ 10 min.

Al final de la etapa de PCR, se realizó la electroforesis en gel de agarosa a 1% coloreado con bromuro de etidio para la detección del fragmento esperado de 986 pb.

REACCIÓN EN CADENA POR LA POLIMERASA PARA LA REGIÓN ENTRE LOS ORFS 1 Y 2 (PCR-U)

Se evaluó la aplicabilidad de una PCR específica para el PCV-2, con el objetivo de compararla con la PCR-CAP dirigida a la amplificación de un segmento de 476 pb para una región localizada entre las ORFS 1 y 2 del PCV-2, entre los nucleótidos 1584 y 828 del genoma del virus según describió Castro (2005). La secuencia de los primers es la siguiente: Fa2 (senso, ORF-1): 5'ATTACCAGCAATCAGACCCCGT3'; Ra2 (antisenso, ORF-2): 5'CAACCCTTCTCCTACCACTCC3'.

La reacción se compuso de 1 x PCR Buffer (Invitrogen®), deoxinucleósidos-trifosfato (dNTPs) 0,2 mM, cloruro de magnesio 1,5mM, 1µM de cada uno de los primers, 0,75 U de Platinum Taq DNA polimerasa (Invitrogen®), 10,1µL de AUP y 2,5µL de los respectivos ADNs, para una reacción final de 25µL, llevándose al termociclador para una desnaturalización inicial de 5 min a 95°C seguida de 40 ciclos de 95°C/ 30 seg, 51°C/ 30 seg y 72°C/ 30 seg; después de los ciclos, se concluyó con una extensión final de 72°C/ 5 min.

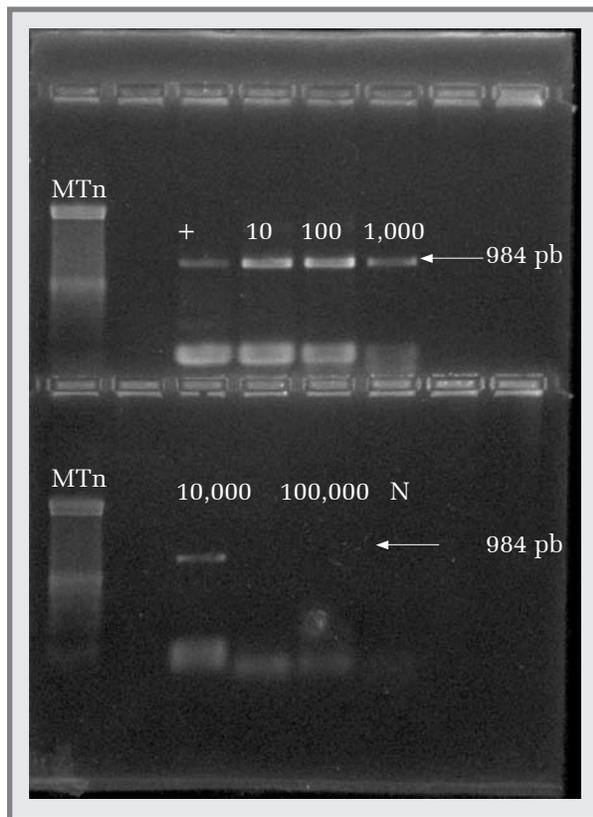
Al final de la etapa de PCR, se realizó la electroforesis en gel de agarosa a 1% corado con bromuro de etidio para la detección del fragmento esperado de 476 pb.

RESULTADOS

PCR-CAP

La electroforesis de las diluciones de la muestra AL 08/04 mostró positividad hasta 1:10.000 en SFB (Figura 1) y hasta 1:10 en agua AUP. La realización de la PCR-CAP en los 16 sueros porcinos, disponibles VPS-FMVZ-USP mostró gran cantidad de amplificaciones inespecíficas y ninguna resultó positiva para la presencia de PCV-2. En cuanto a los controles negativos (SFB y AUP) no se observó ninguna banda.

FIGURA 1. ELECTROFORESIS DE DILUCIONES EN SFB DE LA MUESTRA AL 08/04 CON PCR-CAP. MARCADOR TAMAÑO MOLECULAR 100PB = MTn. (CONTROL NEGATIVO (N)= SFB; CONTROL POSITIVO (+)=AL 08/04

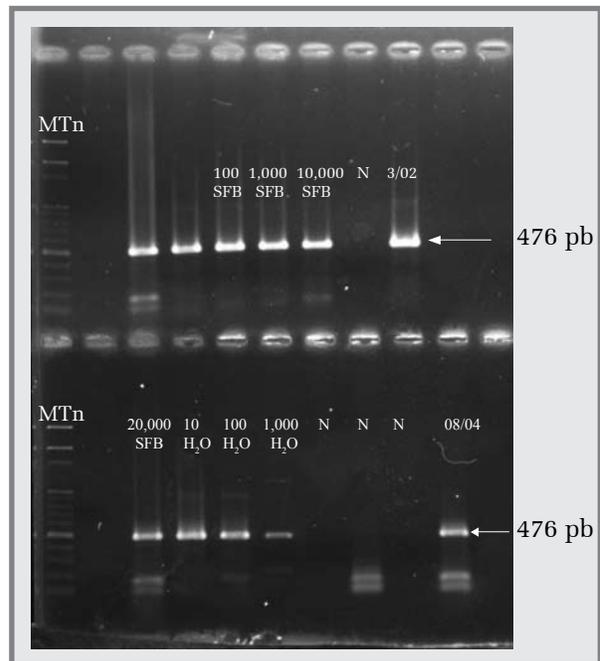


PCR-U

La prueba mostró una positividad en las diluciones en SFB hasta 1:100.000 y en agua hasta 1:1.000 (Figura 2). Las reacciones referentes a los controles negativos no resultaron en ninguna banda.

En la fase de aplicación todas las muestras de suero mostraron reacciones inespecíficas sin reacciones específicas, es decir, fueron negativas para PCV-2.

FIGURA 2. ELECTROFORESIS PCR-U 1 PARA DILUCIONES 1:10 Y 1:100 1:100 EN H₂O Y 1:100, 1:1.000, 1:10.000, 1:20.000 EN SFB. (CONTROL NEGATIVO (N)= ULTRA-PURA; CONTROL POSITIVO (+)= AL 08/04 Y 3/02.



DISCUSIÓN

Se investigó la aplicabilidad de una PCR para PCV-2 en sueros porcinos, para este propósito se utilizaron dos (2) diferentes pares de primers específicos para PCV-2. En la PCR-CAP los resultados de 984 pb, en los pools, mostraron la eficacia de los primers, al amplificar la secuencia del tamaño esperado.

Al comparar los resultados de las diluciones en agua y en SFB es evidente que la sensibilidad de la prueba es mayor en el segundo. Esto puede estar determinado por el *efecto cargador de ADN* (Meinkoth y Wahl, 1984; Maniatis, 1989) que existe en el SFB. En el suero se encuentran grandes cantidades de ADN, el cual se precipitará en la etapa de extracción, favoreciendo la precipitación de una mayor diversidad de ADN viral; por el contrario el agua ultra-pura, no posee tal efecto al encontrarse libre de patógenos y células en general por los procesos a los que es sometida.

La aplicación de la prueba en los sueros mostró una gran cantidad de bandas inespecíficas, lo cual podría estar explicado al tomar en cuenta la gran cantidad de ADN que se encontraba en las muestras, una posible pérdida de sensibilidad o el hecho de las muestras ser negativas. La última de las opciones, parece ser la más razonable, ya que al ser negativa la muestra, los componentes de la PCR amplifican fragmentos errados y llevan a la visualización de fragmentos inespecíficos.

En la PCR-U los resultados de 476 pb, en los pools, mostraron la eficacia de los primers, al amplificar la secuencia del tamaño esperado.

Se evaluaron las diluciones en SFB y en agua, de la misma extracción de la PCR-CAP. La sensibilidad alcanzada en las diluciones en agua fue de nuevo menor que las de SFB, posiblemente por el efecto cargador.

La aplicación de la PCR-U en los sueros mostró una banda inespecífica de la misma altura en todas las muestras de suero, para esclarecer la presencia de estas bandas es apropiado realizar el secuenciamiento de estas y observar a qué corresponden, para descartar la posibilidad de una variación en el segmento de PCV-2 que se buscaba o si este evento se trata simplemente de un gen que se encuentra en el genoma de los porcinos.

Al comparar la PCR-CAP y la PCR-U es evidente que esta última posee mayor sensibilidad tanto en agua como en SFB, esto puede ser debido a la diferencia en la cantidad de pares de bases para amplificar (para la PCR-CAP son 984 pb, en comparación con 476 pb en la PCR-U), ya que un segmento menor de pares de bases se encuentra bioquímicamente favorecido. Además, un segmento extenso es apropiado para el secuenciamiento de un gen y uno pequeño para el diagnóstico, sin contar con que la reacción más eficiente es la segunda.

Sumándose los resultados hasta ahora presentados con las discusiones expuestas anteriormente, queda claro que la PCR más efectiva para la detección de PCV-2 en sueros porcinos es la PCR acá nombrada PCR-U, pues posee mayor sensibilidad analítica y menor producción de bandas inespecíficas.

En cuanto a la aplicación de las PCR a una población de sueros porcinos, la frecuencia de ocurrencia de PCV-2 fue de 0%, una vez que no se detectó ninguna de las muestras como positiva. Una de las posibilidades, además de la de ser estos porcinos realmente libres de PCV-2, es que los animales muestreados no estuvieran en viremia cuando se realizó la toma de los sueros, aunque tuvieran el virus en otras partes de su organismo. En apoyo a esta hipótesis, se ha reportado que la viremia en porcinos dura desde la séptima hasta la dieciseisava semana de vida (França *et al.*, 2005). Además, la frecuencia de detección de PCV-2 en sueros porcinos es muy variable (Calsamiglia *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002).

Por último, hay que considerar que las PCRs empleadas en la presente investigación, aunque teóricamente hayan sido demostradas como sensibles, pueden haber fallado al no detectar bajos títulos de PCV-2 en los sueros estudiados.

Dado que no se tenían los antecedentes de los porcinos muestreados, la toma de muestras se dio al

azar, lo que puede haber disminuido la probabilidad de detección de animales virémicos. Así, es interesante que se asocie la PCR-U con las observaciones clínicas como pérdida de peso progresivo, ictericia, vómito, tos, lesiones en piel y diarrea, comúnmente asociados a infecciones por PCV-2 (Calsamiglia *et al.*, 2002) para la toma de muestras en estudios seroepidemiológicos.

El presente trabajo dio una puerta de entrada a investigaciones futuras acerca del estado epidemiológico de una región o una población de porcinos en cuanto al PCV-2, ya que el empleo de una PCR en suero puede brindar informaciones valiosas para el control de enfermedades a las cuales este virus ha sido asociado.

CONCLUSIONES

Se validó una técnica de reacción en cadena por la polimerasa (PCR) para detección de circovirus porcino tipo 2 (PCV-2) en sueros de porcinos. Se puede concluir que pools de órganos positivos para PCV-2 son una fuente efectiva de virus para validación de técnicas de PCR.

La PCR-U se mostró más sensible para la detección de PCV-2 y debe ser de elección en estudios posteriores.

La aplicación de PCR en muestras de sueros de porcinos para detección del PCV-2 demostró 100% de animales negativos.

RECOMENDACIONES

Es importante que la reacción de PCR que se validó en la presente investigación sea aplicada a una más amplia y diversificada población de porcinos, con el objetivo de tomar informaciones epidemiológicas que puedan ayudar en el control de las enfermedades asociadas al Circovirus porcino 2.

Es aconsejable que, a continuación de éste o de similares estudios, se realice la secuenciación de ampliificaciones inespecíficas, para elucidar su origen, y de ampliificaciones específicas, para la comparación entre diversas cepas de PCV-2.

El sector de suinocultura precisa de más investigaciones en el área de salud y prevención para que se pueda incrementar la producción y generar mayor consumo de carne suina.

Se invita a una mayor comunicación entre el sector productivo y los investigadores para entender mejor las necesidades de los porcicultores y realizar investigaciones que conlleven a una rentabilidad mejor.

Se recomienda que el gobierno, las universidades, las instituciones de investigación y las asociaciones de porcicultores desarrollen proyectos conjuntos y amplíen los convenios nacionales e internacionales, para incrementar el desarrollo del sector.

BIBLIOGRAFÍA

- Allan, G. *et al.*, Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *En: J. Comp. Pathol.* No 121. p. 1-11. 1999.
- Bersano, J., "Detecção de infecção mista por circovírus suíno (PCV) e coronavírus em suíno: relato de caso". 16A REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, São Paulo. Arquivos do Instituto Biológico. 2003.
- Calsamiglia M., *et al.* "Detection of porcine circovirus types 1 and 2 in serum and tissue samples of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome". *J. Clin. Microbiol.* 40. 5. (2002): 1848-1850.
- Castro, A. "Caraterização genética de amostras brasileiras de Circovirus suíno tipo 2 (PCV-2)". Trabajo de doctorado (Phd.). Universidad de São Paulo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva y Salud Animal. 2005.
- Castro, A., *et al.* "Detection and differentiation of porcine circoviruses in Brazilian pigs". *The Veterinary Record*, 154, (2004): 728-729.
- Chae, C. "Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology". *The Veterinary Journal*. 168, (2004): 41-49.
- Choi, C.; Chae, C. "In-situ hybridization for the detection of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome". *Journal of Comparative Pathology*. 123, (2000): 302-305.
- Chomkcynski, P.A. "A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and protein from the cell and tissues samples". *Biotechniques*. 15. 3. (1993): 532-537.
- Elli, J.A., *et al.* "Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome". *Can. Vet. J.* 39. 1. (1998): 44-51.
- Ellis, J., *et al.*, "Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field". *Veterinary Microbiology*. 98. (2004): 159-163.
- Harding, J. C. S. "The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2". *Veterinary Microbiology*. 98. (2004): 131-135.
- Harms, P. A., "Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus". *Veterinary Pathology*. 38. (2001): 528-539.
- Harms, P. A. "Hephatopathy associated with spontaneous type 2 porcine circovirus infection in caesarian derived/ colostrums deprived pigs". *Proceedings of the American Association on Veterinary Laboratory Diagnostics*. (1999): 4.
- Jolie, R.; Runnels, P.; McGavin, D. "Post-weaning mutisystemic wasting syndroime in a group of caesarian derived colostrums deprived pigs". *Proceedings of the 16th International Pig Veterinary Society Congress*. 2000.
- Kim, J *et al.* "Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs". *The canadian journal of veterinary research*. 68. (2004): 218-221.
- Liu, Q., "Seroprevalence of porcine circovirus type 2 in swine populations in Canada and Costa Rica". *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 66. (2002): 225-231.
- Maniatis, T., *et al.* "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", *Cold Spring Harbor Laboratory*, (2 ed.). 1989.
- Meinkoth, J. and Wahl, G. *Analytical Biochemistry*. 1984.

- Morin, M., *et al.* "Sever proliferative and necrotizing pneumonia in pigs: a newly recognized disease". *Canadian Veterinary Journal*. 31. (1990): 837-839.
- O'Connor, B., *et al.* "Multiple porcine circovirus2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit". *Canadian Veterinary Journal*. 42. (2001): 551-553.
- Rodríguez-Arriola, G. M., *et al.* "Serum antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2 in pigs with and without PMWS". *Veterinary Record*. 146. 26. (2000): 762-764.
- Segalés, J.; Rossel, C.; Domingo, M. "Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2-associated disease". *Veterinary Microbiology*. 98. (2004): 137-149.
- Shinata, I., *et al.* "PCR detection of Porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, nasal swab and feces from experimentally infected pigs and field cases". *Journal of veterinary Medicine Science*. 65. 3. (2003): 405-408.
- Smith, W. J.; Thompson, J. R.; Done, S.; "Dermatitis/ nephropathy syndrome of pigs". *Veterinary Record*. 132. (1993): 47.
- Staeble, S., "PMWS: an emerging disease identified in archived porcine tissues". *The Veterinary Journal*. 170 (2005): 132-134.
- Stevenson, G.; "Distribution of porcine circovirus in neonatal pigs with congenital tremors". *Proceedings of the CRWAD*. 1999.
- Wellenberg, G. J.; *et al.* "Isolation and characterization of porcine circovirus type 2 from pigs showing signs of post-weaning multisystemic wasting syndrome in The Netherlands". *Veterinary Quarterly*. 22. (2000): 167-172.
- White, M.; Higgins, R. J. "Dermatitis nephropathy syndrome of pigs". *Veterinary Record*. 132, (1993): 199.
- Yu, S.; *et al.* "Development of a reverse transcription-PCR assay to detect porcine circovirus type 2 transcription as a measure of replication". *Journal of Virological Methods*. 123. (2005): 109-112.