

Expresión de citocinas en cerdos co-infectados con circovirus porcino tipo 2 y el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino

Cytokine expression in growing pigs co-infected with porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus

Mónica Reséndiz* Maricela Montalvo-Corral* Lilian Flores-Mendoza*
Humberto Ramírez-Mendoza** Joaquim Segalés*** Jesús Hernández*

Abstract

The aim of this work was to quantify porcine circovirus type 2 (PCV2), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), as well as cytokine mRNA expression (IL-6, IL-12, TNF- α , and IFN- γ) in superficial inguinal lymph nodes (SILN) of pigs from postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and healthy farms. Genetic characterization of detected PCV2 sequences was also carried out. Based on the clinical outcome and the quantification of PCV2 nucleic acid by *in situ* hybridization and real time PCR, pigs were grouped into three categories: 1) PMWS, pigs with signs of wasting and high viral load in SILN ($n = 4$); 2) wasted-non-PMWS, pigs with signs of wasting and low to intermediate viral loads in SILN ($n = 3$); and 3) healthy, pigs with no clinical signs and low viral loads ($n = 3$). PRRSV was detected in three PMWS affected and two wasted-non-PMWS pigs. The genetic analysis of PCV2 sequences revealed the presence of two genotypes PCV2a and PCV2b in PMWS-affected farms. Cytokine mRNA expression revealed that PMWS affected pigs had low expression of IFN- γ , whereas wasted-non-PMWS pigs showed higher amounts of IFN- γ . These results suggest that an imbalance in cytokines could be involved in the pathogenesis of PMWS.

Key words: PMWS, PRRSV, PCV2, IFN-GAMMA, LYMPH NODES.

Resumen

Los objetivos de este trabajo fueron la cuantificación de circovirus porcino tipo 2 (PCV2) de virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV), así como la expresión de citocinas (IL-6, IL-12, TNF- α , e IFN- γ) en nódulos linfáticos inguinales superficiales (NLIS) de cerdos afectados por el síndrome de desmedro posdestete (postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) y en cerdos sanos. Con base en el diagnóstico clínico y a la cuantificación de PCV2 por hibridación *in situ* y qRT-PCR, los cerdos se distribuyeron en tres grupos: 1) PMWS, cerdos con signos de desmedro y con cargas virales altas en NLIS ($n = 4$); 2) con desmedro sin PMWS, cerdos con signos de desmedro y cargas virales de intermedias a bajas en NLIS ($n = 3$); y 3) cerdos sanos, sin signos clínicos y con cargas virales bajas ($n = 3$). El PRRSV fue detectado en tres de los cerdos afectados por el PMWS y en dos cerdos con desmedro, pero sin el síndrome. Se caracterizaron las secuencias nucleotídicas del ORF2 de los PCV2 encontrados y los análisis genéticos revelaron la presencia de 2 genotipos PCV2a y PCV2b en las granjas afectadas con el PMWS. El perfil de expresión de citocinas mostró una baja expresión de IFN- γ en los cerdos con PMWS, mientras que los cerdos con desmedro sin PMWS mostraron valores elevados de esta citocina. Estos resultados sugieren que existe un desbalance en la producción de citocinas que puede estar implicado en la patogénesis de la enfermedad.

Palabras clave: PMWS, PCV2, PRRSV, IFN γ , NÓDULOS LINFÁTICOS.

Recibido el 9 de noviembre de 2010 y aceptado el 30 de agosto de 2011.

*Laboratorio de Inmunología, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., km 0.6, Carretera a la Victoria, 83000, Hermosillo, Sonora, México, apartado postal 1735, Tel.: (01-662) 289-2400, ext.: 294, fax: (01-662) 280-0094.

**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510, México, DF.

***Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA)-Department of Sanitat i d'Anatomia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Barcelona, España.

Responsable de correspondencia: Jesús Hernández, correo electrónico: jhdez@ciad.mx

Introduction

Porcine circoviruses (PCVs) are small, circular, negative-sense, and single-stranded DNA viruses.¹ So far, two types of PCVs have been described, PCV1 and PCV2; however, only PCV2 has been associated with the multifactorial disease condition named postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Recently, three genotypes of PCV2 have been defined: PCV2a, PCV2b, and PCV2c.² In this syndrome, PCV2 is considered a necessary infectious agent but it is usually not sufficient to trigger the clinical condition.³ PMWS affects pigs mainly between six and 15 weeks of age. Affected animals are clinically characterized by growth retardation, respiratory problems, diarrhea, jaundice, and enlargement of inguinal lymph nodes.¹ PCV2 has been consistently detected in pigs with signs of PMWS, as well as in apparently healthy pigs;⁴ however, the amount of PCV2 load in affected pigs is significantly higher than in healthy, sub-clinically infected animals.³ This situation needs to be considered when performing a diagnosis to avoid confusion between PMWS and PCV2 infection.

PMWS diagnosis is based on the detection of PCV2 and histological changes in lymphoid tissues of clinically affected animals.³ Usual methods to detect the virus include immunohistochemistry and *in situ* hybridization on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues.⁵ Real-time PCR has also been used to quantify PCV2 in different tissues from natural,⁶ or experimentally infected pigs,⁷ and a viral load threshold in serum of 10^7 DNA copies/ml has been suggested to potentially distinguish sub-clinical from clinical infections of PCV2.^{8,9} There are many pig diseases that also show signs of growth retardation and respiratory signs. In fact, the most significant differential diagnosis with PMWS is the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), caused by PRRS virus (PRRSV). PRRSV is a small enveloped single-stranded RNA virus that belongs to the family Arteriviridae.¹⁰ PRRSV is responsible for severe economical losses worldwide due to respiratory and reproductive alterations. The frequent co-infection of PCV2 with PRRSV¹¹⁻¹³ not only complicates the diagnosis of the disease, but also mislead the interpretation of other data, such as immunological parameters.

Pigs with signs of PMWS suffer from significant alterations in their immunological parameters, such as lymphocyte depletion. PRRSV infection causes a rather opposite effect presenting lymphoid hyperplasia.¹⁴ Cytokine expression on different lymphoid tissues in PMWS reveals decrease of the cytokines IL-2, IL-12, IL-4, and IFN- γ , implying an impairment of cy-

Introducción

Los circovirus porcinos (PCVs) son virus pequeños constituidos de ADN circular de cadena sencilla y polaridad negativa.¹ A la fecha, se han descrito dos tipos, PCV1 y PCV2; sin embargo, solamente el tipo 2 (PCV2) ha sido asociado con la enfermedad de origen multi-factorial conocida como síndrome de desmedro posdestete (postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS). Recientemente, se han definido tres genotipos de PCV2: PCV2a, PCV2b y PCV2c.² En este síndrome, el PCV2 se considera un agente infeccioso necesario, pero generalmente no suficiente para desencadenar la condición clínica.³ El PMWS afecta principalmente a cerdos de entre 6 y 15 semanas de edad. Los animales enfermos presentan retardo en el crecimiento, problemas respiratorios, diarrea, ictericia y agrandamiento de los nódulos linfáticos inguinales.¹ El PCV2 se ha encontrado de forma consistente en cerdos con signos de PMWS y también en cerdos aparentemente sanos;⁴ sin embargo, la carga viral de PCV2 en cerdos afectados es significativamente mayor que en los cerdos sanos con infección subclínica.³ Este elemento debe ser considerado para el diagnóstico diferencial entre PMWS e infecciones con PCV2.

El diagnóstico de PMWS se basa en la detección de PCV2 y en los cambios histológicos observados en tejidos linfoides de animales clínicamente afectados.³ Los métodos tradicionales para la detección del virus incluyen la inmunohistoquímica y la hibridación *in situ* de tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina.⁵ También se ha empleado PCR en tiempo real para cuantificar PCV2 en diferentes tejidos de cerdos con infecciones naturales,⁶ o en infecciones experimentales,⁷ y se ha sugerido que una carga viral en suero de 10^7 copias ADN/ml o superior, permite distinguir infecciones clínicas y subclínicas con PCV2.^{8,9} Existen diversas enfermedades del cerdo que también ocasionan retardo del crecimiento y signos respiratorios. De hecho, el diagnóstico diferencial más significativo con PMWS es el síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), ocasionado por el virus del mismo nombre (PRRSV). El PRRSV es un virus pequeño, envuelto, de ARN de cadena sencilla que pertenece a la familia Arteriviridae.¹⁰ El PRRSV es responsable de grandes pérdidas económicas en todo el mundo debido a las alteraciones respiratorias y reproductivas que ocasiona. La frecuencia de infecciones por sinergia de PCV2 con PRRSV¹¹⁻¹³ no sólo complica el diagnóstico, sino que conduce a interpretaciones erróneas de datos como parámetros inmunológicos.

Los cerdos con signos de PMWS presentan alteraciones en parámetros inmunológicos como la deple-

totoxic T cell response and reduced B cells activation with the consequent reduced production of antibodies.¹⁵ Lymph nodes from piglets born from PRRSV infected sows express high levels of IFN- γ and TNF- α at two weeks after birth as compared to non-infected piglets.¹⁶ However, to date, there are no reports on cytokine production in lymphoid tissues of pigs co-infected with PCV2 and PRRSV. Therefore, the objective of the present exploratory work was to quantify the mRNA expression of cytokines, as well as PCV2 and PRRSV genomes, in inguinal lymph nodes of growth-retarded pigs from farms experiencing PMWS outbreaks.

Material and methods

Animals

Naturally growth-retarded pigs ($n = 7$) and clinically healthy pigs ($n = 3$), 5- to 7-week-old were obtained from three different farrow-to-finish commercial operation farms in the state of Sonora. All were conventional pigs and were submitted to the Laboratorio de Inmunología de CIAD AC, to investigate potential infections by PCV2 and PRRSV. Growth-retarded animals came from two different farms with a previously confirmed diagnosis of PMWS based on internationally accepted criteria.¹⁷ Five came from farm A and two from farm B. Healthy pigs came from a third farm (farm C), which was free of PRRSV infection and with no historical manifestations related to PMWS. All farms were free from Aujeszky's disease (pseudorabies), classical swine fever, and blue eye disease (porcine rubulavirus). Husbandry and management of pigs were in agreement with the Comité Institucional de Ética of CIAD, A.C. Pigs were euthanized by electrocution following the recommendations of the NOM-062-ZOO-1999 and the American Veterinary Medical Association (AVMA, 2007). After euthanizing the animals, superficial inguinal lymph nodes (SILN) were collected and immediately processed.

In situ hybridization

Portions of inguinal superficial lymph nodes (SILN) from each pig were fixed by immersion in 10% buffered formalin, embedded in paraffin, and cut into 4- μ m thick sections. An *in situ* hybridization test (ISH) was carried out to detect PCV2 genome, using a previously published protocol,⁵ and probe¹⁸ was applied on tissue sections. The amount of PCV2 nucleic acid was assessed semi-quantitatively using previously published classifications described by Quintana *et al.*¹⁹

ción linfocitaria; mientras que la infección por PRRSV ocasiona un efecto opuesto presentando hiperplasia linfoide.¹⁴ La evaluación de la expresión de citocinas en diferentes tejidos linfoides de animales con PMWS reveló una disminución en los niveles de IL-2, IL-12, IL-4 e IFN- γ , lo que implica una disminución en la capacidad de respuesta de las células T citotóxicas y una activación reducida de células B, con la consecuente disminución en la producción de anticuerpos.¹⁵ Comparados con lechones no infectados, los lechones nacidos de cerdas infectadas con PRRSV expresan niveles altos de IFN- γ y TNF- α en nódulos linfáticos a las dos semanas posparto.¹⁶ Sin embargo, a la fecha, no existen estudios sobre la producción de citocinas en tejidos linfoides de cerdos infectados a la vez con PCV2 y PRRSV. El objetivo de este estudio descriptivo fue cuantificar la expresión de citocinas, así como la detección y cuantificación de genomas de PCV2 y PRRSV en nódulos linfáticos inguinales de cerdos con retardo de crecimiento, en granjas con brotes de PMWS.

Material y métodos

Animales

Se incluyeron en el estudio cerdos con retardo de crecimiento ($n = 7$) y cerdos clínicamente sanos ($n = 3$), de 5 a 7 semanas de edad, procedentes de tres granjas porcinas de ciclo completo en el estado de Sonora. Los cerdos se mantuvieron en la granja experimental del Laboratorio de Inmunología de CIAD, A.C., para investigar las interacciones de la infección por ambos virus: PCV2 y PRRSV. Los animales con retardo en el crecimiento provenían de dos granjas con diagnóstico confirmado de PMWS, basado en criterios internacionales.¹⁷ Cinco cerdos procedían de la granja A y dos de la granja B. Los cerdos sanos se obtuvieron de una granja (C), con estatus sanitario libre de PRRSV y no tiene registros de manifestaciones relacionadas con el PMWS. Todas las granjas están libres de enfermedad de Aujeszky, fiebre porcina clásica y enfermedad del ojo azul (rubulavirus porcino). El cuidado de los cerdos se realizó siguiendo los lineamientos del Comité Institucional de Ética del CIAD, A.C. Los cerdos fueron sacrificados por electrocución siguiendo las recomendaciones de la NOM-062-ZOO-1999 y la Asociación Médica Veterinaria Americana (AVMA, 2007). Inmediatamente después del sacrificio se recolectaron y procesaron los nódulos linfáticos inguinales superficiales (NLIS).

Hibridación in situ

A partir de cada cerdo se tomaron segmentos de nódulos linfáticos inguinales superficiales (NLIS), los

DNA and RNA extraction from tissues

Twenty-five milligrams of SILN tissues were used for DNA and RNA extraction using commercial columns system,* following manufacturer's recommendations.²⁰ RNA was re-suspended in 20 µl of RNase-free water. DNA and ARN was stored at -20°C and -80°C, respectively, until used.

Cytokine quantification by real-time PCR

Real time PCR to detect IL-6, IL-12b, IFN-γ, and TNF-α mRNAs was performed as previously described, with some modifications.²¹ PCR reaction was set up by using 10 µg of RNA and a commercial One-step PCR master mix.** Amplification conditions were as follows: 50 °C for 30 min, 95 °C for 10 min; and 40 cycles of 95 °C for 15 s, and 60 °C for 1 min. Primer and probe sequences were obtained from the Porcine Immunology and Nutrition database (<http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=6065>). Probes were labeled with TET (tetrachloro-6-carboxyfluorescein) and BHQ (black hole quencher). Fluorescence signals, measured during amplification, were processed post-amplification. Differences in Ct values between healthy animals and pigs with clinical manifestations of wasting were evaluated as relative increased folds. Analyses of data were done using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formula, where one ΔC_t represents the average ΔC_t from the three healthy pigs and the other ΔC_t represents the individual value of each pig (healthy and infected). In this way, it was possible to show individual data in each group. Ct values of studied cytokines were normalized with an endogenous control. Peptidylprolyl isomerase A (PPIA), whose expression is not affected by the infections and shows constant results,²¹ was chosen as endogenous control.

Real-time RT-PCR for PRRSV detection

PRRSV RNA was quantified using a commercial kit* as previously described by Christopher-Hennings *et al.*²⁰ Known amounts of serially diluted *in-vitro* transcript RNA product (2.3×10^1 to 2.3×10^7 genomic copies/ml), were used to generate a standard curve.

Real-time PCR for PCV2 detection

Primers and fluorescent probe for quantification of PCV2, described by Opriessnig *et al.*,⁷ were used. PCR was performed using Brilliant QPCR Core Reagent kit** following manufacturer's instructions. The PCR reaction consisted of 25 µl of PCR mixtures (100 ng of DNA) with fluorescent probe, forward and reverse

cuales se fijaron por inmersión en formalina al 10%; posteriormente, se embebieron en parafina y se hicieron cortes de 4 µm de espesor. Se realizó una prueba de hibridación *in situ* (ISH) para detectar la presencia de genoma viral PCV2, empleando un protocolo publicado,⁵ y la sonda¹⁸ fue aplicada sobre los cortes histológicos. La cantidad de ácido nucleico (PCV2) fue evaluada de forma semi-cuantitativa usando una clasificación descrita por Quintana *et al.*¹⁹

Extracción de ADN y ARN a partir de tejido

Se usaron 25 mg de tejido de NLIS para la extracción de ADN y ARN, empleando un sistema comercial de columnas* siguiendo las recomendaciones del fabricante.²⁰ El ARN fue resuspendido en 20 µl de agua libre de ARNasas. El ADN y ARN se almacenaron a -20°C y -80°C, respectivamente, hasta su uso.

Cuantificación de citocinas por RT-PCR en tiempo real

Como se describió anteriormente, se empleó, con algunas modificaciones, la técnica de PCR en tiempo real para la detección de ARNm de IL-6, IL-12b, IFN-γ y TNF-α.²¹ Se usaron 10 µg de ARN total y los reactivos del sistema de detección para RT-PCR en tiempo real con mezcla maestra one-step.** Las condiciones de amplificación fueron: 50°C por 30 min; 95°C por 10 min; y 40 ciclos de 95°C por 15 s, y 60°C por 1 min. Las secuencias de los iniciadores y las sondas se obtuvieron de la base de datos de Nutrición e Inmunología Porcina (Porcine Immunology and Nutrition database, USDA, <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=6065>). Las sondas están marcadas con el fluorocromo TET (tetrachloro-6-carboxyfluoreceína) y el apagador BHQ (black hole quencher). Las señales de fluorescencia medidas durante la amplificación fueron procesadas post-amplificación. Las diferencias en los valores de Ct entre los animales sanos y los cerdos con manifestaciones clínicas de desmedro, fueron evaluadas como incrementos relativos. El análisis de datos se hizo con la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, en la cual el ΔC_t representa el valor promedio de los ΔC_t de tres cerdos sanos y el otro ΔC_t representa el valor individual de cada cerdo (sano e infectado). De esta forma, fue posible mostrar los valores individuales en cada grupo. Los valores de Ct de las citocinas estudiadas fueron normalizadas con un control endógeno (peptidil isomerasa A, PPIA), cuya expresión no se ve afectada por las infecciones y muestra resultados constantes.²¹

*QIAGEN, Estados Unidos de América.

**Stratagene, Estados Unidos de América.

primers concentrations at 200, 300, and 900 nM, respectively. Amplification conditions were as follows: 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min; and 40 cycles of 95 °C for 15 s, and 60 °C for 1 min. In order to quantify PCV2 load, a standard curve was prepared using ten-fold serial dilutions of the previously cloned PCR products.

Preparation of standard plasmid of PCV2 for real time PCR

Resulting PCV2 real time PCR products were cloned into Topo TA pCR2.1* and propagated in competent *Escherichia coli* cells following manufacturer's instructions. Plasmid DNA was quantified by measuring the optical density at 260 nm using a spectrophotometer. Genomic copies were determined as previously described by Whelan *et al.*²² Ten-fold dilutions were made in order to attain 10^8 - 10^1 genomic copies/ μ l sample for the PCR. The dilutions were stored at -20 °C, whereas stock plasmid was stored at -70 °C.

Sequencing of PCV2

A gene fragment of 817 bp, which included the whole ORF2 gene of PCV2, was amplified from SILN using primers previously described by Larochelle *et al.*²³ PCR was done in a 50- μ l reaction using 10 mM Tris HCl, 50 mM KCl (pH 8.3), 3 mM MgCl₂, 0.8 mM each dATP, dTTP, dCTP and dGTP, 20 μ M of each primer, 0.25 U *Taq* DNA polymerase (all products from Invitrogen) and 5 μ l cDNA. The PCR reaction was performed for 33 cycles at 94 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min. PCR products were purified and both strands were sequenced at the Genomic Analysis and Technology Core Facility of the University of Arizona (Tucson, AZ). The sequences were deposited in the GenBank (accession numbers: EU735558-EU735564), and compared with a virus sequenced in the laboratory in 2006 and with the reference strains of PCV2a (AF05592), PCV2b (AF055394), and PCV2c (EU148503). Analysis of sequences was performed with the software DNA-STAR Inc. vers. 8.0.2.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the U-Mann Whitney test to evaluate differences in the mRNA expression of cytokines, as well as in viral loads of PCV2 and PRRSV. Statistical significance was established at $P < 0.05$. All analyses were done using the Prism software (Graph-Pad).

RT-PCR en tiempo real para la detección de PRRSV

Como se describió anteriormente, Christopher Hennings *et al.*²⁰ usaron un paquete comercial,* para cuantificar el genoma viral de PRRSV. Se construyeron curvas estándar a partir de diluciones décuples de cantidades conocidas de ARN transcrito *in vitro* (2.3×10^1 hasta 2.3×10^7 copias ARN/ml).

PCR en tiempo real para la detección de PCV2

Para la cuantificación de PCV2 se emplearon iniciadores y sonda, descritos por Opriessnig *et al.*⁷ La PCR se llevó a cabo con el paquete Brilliant QPCR Core Reagent** siguiendo las recomendaciones del fabricante. La reacción de PCR de 25 μ l contenía 100 ng de ADN, sonda fluorescente, iniciadores sentido y antisentido a concentraciones de 200, 300 y 900 nM, respectivamente. Las condiciones de amplificación fueron: 50°C por 2 min; 95°C por 10 min; y 40 ciclos de 95°C por 15 s, y 60°C por 1 min. Para la cuantificación de la carga viral se construyó una curva estándar a partir de diluciones seriadas décuples de vector plasmídico con el inserto de interés.

Preparación del estándar plasmídico de PCV2 para el PCR tiempo real

Los productos de la amplificación de PCV2 por PCR en tiempo real fueron insertados en un vector de clonación TOPO pCR2.1*** y propagado en células competentes de *Escherichia coli*, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN plasmídico se purificó y cuantificó por densidad óptica medida a 260 nm, usando un espectrofotómetro. Las copias de ADN genómico fueron determinadas con el método descrito por Whelan *et al.*²² Se realizaron diluciones décuples de 10^8 - 10^1 copias de ADN/ μ l que fueron preservadas a -20°C, mientras que el plásmido se guardó a -70°C.

Secuenciación de PCV2

A partir de NLIS se amplificó el gen completo de ORF2 (817 pb), usando un juego de iniciadores descritos por Larochelle *et al.*²³ La PCR se llevó a cabo de la siguiente forma: en un volumen final de 50 μ l de reacción que contenía Tris HCl 10 mM, KCl 50 mM (pH 8.3), MgCl₂ 3 mM, dATP, dTTP, dCTP y dGTP 0.8 mM, cada uno,

*Tetracore Inc, Estados Unidos de América.

**Stratagene, Estados Unidos de América.

***Invitrogen, Estados Unidos de América.

Results

PCV2 detection by in situ hybridization (ISH)

Table 1 summarizes ISH results. Pigs PCb1, PCb4, PCO1, and PCO2 had moderate to high amounts of PCV2 nucleic acid, allowing their classification as PMWS cases. PCb2 and PCb3 pigs contained low amounts of PCV2 genome and were classified as wasted-non-PMWS pigs. ISH evaluation was not feasible in pig PCb5. Finally, pigs PC101, PC103, and PC104, originated from farms that never experienced PMWS-like clinical signs, were negative to ISH and were classified as healthy pigs.

Quantification of PCV2

Serial dilutions of the plasmid containing the PCV2 sequence were used to construct a standard curve. Results showed a linear curve ($R^2 = 0.9842$) between 4.8×10^2 and 4.8×10^8 genomic copies/ml. The quantification of PCV2 on SILN showed that pigs with PMWS (pigs PCb1, PCb4, PCO1, and PCO2) had an average of 1.73×10^8 genomic copies/ng (range from 2.3×10^7 to 2.8×10^8 genomic copies/100 ng of DNA). Wasted-non-PMWS pigs PCb2 and PCb3 showed an average of 2×10^5 genomic copies/ng (range from 5×10^4 to 4×10^5 copies/100 ng of DNA). The pig without an ISH result (PCb5) had 4.8×10^4 genomic copies/100 ng of DNA, which was similar to those from wasted-non-PMWS pigs; therefore, for the purpose of the pathological classification, it was classified within that group. Healthy pigs had a mean of 5.2×10^1 genomic copies/ng (range from 1.7×10^1 to 3.4×10^1 genomic copies/100 ng of DNA) (Figure 1). Significant differences in the concentration of PCV2 were observed when healthy pigs were compared with pigs with PMWS ($P < 0.001$) or with wasted-non-PMWS pigs ($P < 0.05$). In addition, significant differences between pigs with PMWS and wasted-non-PMWS pigs ($P < 0.001$) were observed.

Quantification of PRRSV

Under experimental conditions established in the laboratory, the limits of detection of the commercial kit used in this study were 2.3×10^1 to 2.3×10^7 genomic copies/ml, whereas the coefficient of determination of the standard curve was $R^2 = 0.9812$. In contrast to PCV2, genomic copies of PRRSV were fairly low (Figure 1). Healthy pigs were negative to PRRSV. Three out of four pigs with PMWS were positive to PRRSV,

de cada iniciador 20 μ M, *Taq* ADN polimerasa 0.25 U y 5 μ l ADNc. El protocolo de termociclado: 33 ciclos a 94°C por 30 s, 60°C por 30 s, y 72°C por 1 min. Los productos de PCR fueron purificados y ambas cadenas fueron secuenciadas en el Genomic Analysis and Technology Core Facility of the University of Arizona (Tucson, AZ). Las secuencias obtenidas se depositaron en el GenBank (números de acceso: EU735558-EU735564), se compararon con otra secuencia obtenida en el laboratorio en 2006 y con las cepas de referencia de PCV2a (AF055592), PCV2b (AF055394), y PCV2c (EU148503). Los análisis de secuencias se realizaron con el programa DNASTAR Inc. 8.0.2.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con la prueba de U-Mann Whitney para evaluar diferencias en los niveles de expresión de ARNm de citocinas, así como de las cargas virales de PCV2 y PRRSV. Se consideró un nivel de significancia de $P < 0.05$. Todos los análisis se hicieron con el programa Prism (Graph-Pad).

Resultados

Detección de PCV2 por hibridación in situ (ISH)

El Cuadro 1 resume los resultados de ISH. Los cerdos PCb1, PCb4, PCO1, y PCO2 presentaron cantidades de moderadas a altas de ácido nucleico de PCV2, por lo que se clasificaron como casos de PMWS. Los cerdos PCb2 y PCb3 tuvieron una baja cantidad de genomas de PCV2 y se clasificaron como cerdos con desmedro-sin-PMWS. La evaluación por ISH no fue posible para la muestra del cerdo PCb5. Finalmente, los cerdos PC101, PC103, y PC104, de la granja sin signos clínicos presuntivos de PMWS, fueron negativos a ISH, por lo que se clasificaron como cerdos sanos.

Cuantificación de PCV2

Para la construcción de la curva estándar se emplearon diluciones décuples del plásmido con la secuencia de PCV2. Los resultados mostraron un coeficiente de determinación ($R^2 = 0.9842$) y un intervalo de detección de 4.8×10^2 a 4.8×10^8 copias ADN/ml. La cuantificación de PCV2 en NLIS mostró que los cerdos con PMWS (PCb1, PCb4, PCO1, y PCO2) tuvieron una carga viral promedio de 1.73×10^8 copias ADN/100 ng de ADN (2.3×10^7 a 2.8×10^8 copias ADN/100 ng de ADN). Los cerdos con desmedro-sin-PMWS (PCb2 y PCb3) tuvieron un promedio de 2×10^5 copias

and had an average concentration of 1.6×10^2 genomic copies/25 ng (range from 5.5×10^1 to 2.7×10^2 genomic copies/25 ng). Two out of three wasted-non-PMWS pigs were positive to PRRSV and had an average of 9.9×10^3 genomic copies/25 ng (range from 1.2×10^2 to 1.9×10^4 genomic copies/25 ng). There were only significant differences between healthy pigs and PMWS pigs ($P < 0.05$).

PCV2 sequencing

Six out of seven PCV2 viruses from PMWS and wasted-non-PMWS pigs were sequenced. A gene fragment of 817 bp corresponding to the ORF2 gene was sequenced in 5 out of 6 samples (PCO1, PCO2, PCb1, PCb3, and PCb4) and a gene fragment of 628 bp was sequenced for sample PCb2. For viruses from healthy pigs only a fragment of <100 bp was adequately sequenced and it was not considered for its inclusion in the phylogenetic analysis. A PCV2 virus sequenced from a Mexican PMWS-affected pig (PC001) in 2006 was included, as well as reference virus representative sequences available in the GeneBank database (Table 2 and Figure 2). Sequences PCb1, PCb2, and PCb3 had 92 to 95% identity with PC001, whereas PCb4, PCO1, and PCO2 had 98 to 99% identity. These results suggest the existence of two different genotypes among studied pigs, as pre-

ADN/100 ng de ADN (el rango fluctuó entre 5×10^4 a 4×10^5 copias ADN/100 ng de ADN). El cerdo PCb5, sin el resultado de ISH, tuvo 4.8×10^4 copias ADN/100 ng de ADN, el cual fue similar a lo observado en aquellos con desmedro-sin-PMWS; por lo que, para los fines de la clasificación patológica, se incluyó en este grupo. Los cerdos sanos tuvieron un promedio de 5.2×10^1 copias ADN/100 ng de ADN (1.7×10^1 a 3.4×10^1 copias ADN/100 ng de ADN) (Figura 1). Se observaron diferencias estadísticas significativas en la concentración de PCV2 de los cerdos sanos comparados con los cerdos con PMWS ($P < 0.001$), o con los cerdos con desmedro-sin-PMWS ($P < 0.05$). También se observaron diferencias significativas entre los cerdos con PMWS y los cerdos con desmedro-sin-PMWS ($P < 0.001$).

Cuantificación de PRRSV

Con base en las condiciones experimentales establecidas en el laboratorio, el límite de detección del sistema comercial empleado fue de 2.3×10^1 a 2.3×10^7 copias ARN/ml, con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0.9812$. A diferencia de lo encontrado para el PCV2, el número de copias genómicas de PRRSV fue menor (Figura 1). Los cerdos sanos fueron negativos a PRRSV. De los cuatro cerdos con PMWS, tres fueron positivos a PRRSV, con una concentración promedio de 1.6×10^2 copias ARN/25 ng (5.5×10^1 a 2.7×10^2 copias ARN/25 ng). De los tres cerdos con desmedro sin PMWS, dos fueron positivos a PRRSV y tuvieron un promedio de 9.9×10^3 copias ARN/25 ng (1.2×10^2 a 1.9×10^4 copias ARN/25 ng). Sólo se observaron diferencias significativas entre los cerdos sanos y los PMWS ($P < 0.05$).

Secuenciación de PCV2

Se secuenciaron seis de siete virus PCV2, a partir de los cerdos PMWS y los cerdos con desmedro sin PMWS. En cinco de las seis muestras fue posible secuenciar un fragmento de 817 pb, que corresponde a la secuencia del ORF2 (PCO1, PCO2, PCb1, PCb3, y PCb4), y para la muestra PCb2, se obtuvo una secuencia parcial de 628 pb. En cuanto a los cerdos sanos, sólo fue secuenciado un fragmento de < 100 pb y no fue considerado en los análisis filogenéticos. Para la reconstrucción de filogenias se incluyeron: una secuencia de un aislado PCV2 mexicano de un cerdo con PMWS, de 2006 (PC001), así como otras secuencias representativas depositadas en la base de datos del GenBank (Cuadro 2 y Figura 2). Las secuencias PCb1, PCb2, y PCb3 tuvieron una identidad de 92-95% con PC001, mientras que PCb4, PCO1, y PCO2 tuvieron una identidad de 98-99%. Como se ha informado en otros estudios, es-

CUADRO 1

Resultados de la prueba de hibridación *in situ* y la clasificación patológica de los cerdos estudiados

In situ hybridization results and pathological classification of studied pigs

Identification	In situ hybridization	Classification
PCb1	+++	PMWS
PCb4	++	PMWS
PCO1	+++	PMWS
PCO2	+++	PMWS
PCb2	+	Wasted, non-PMWS
PCb3	+	Wasted, non-PMWS
PCb5	ND	Wasted, non-PMWS ^a
PC101	-	Healthy
PC103	-	Healthy
PC104	-	Healthy

ND = Not determined; ^aclassified as wasted, non-PMWS pig based on real time PCR results; +, ++, +++ represents genome viral load; -, represents a negative result.

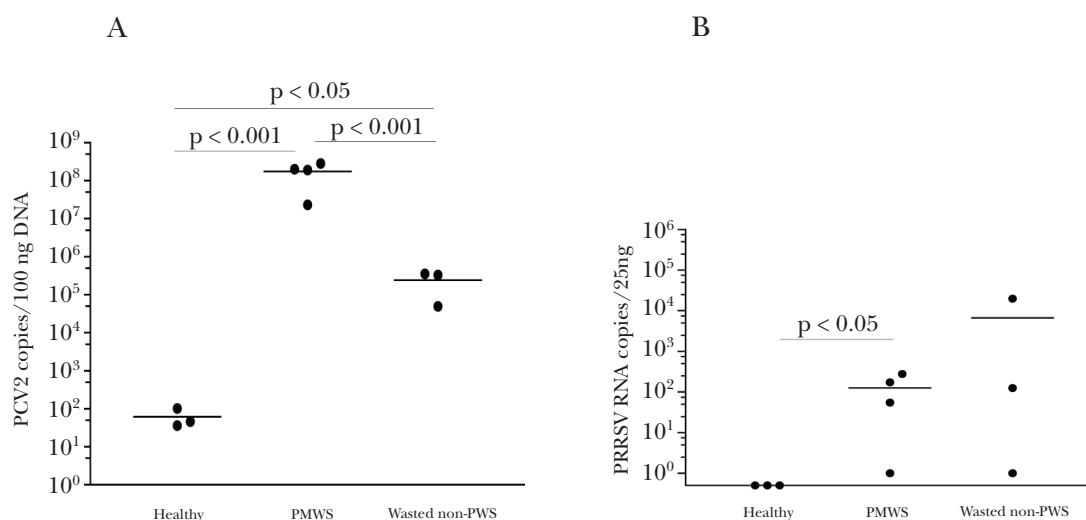


FIGURA 1. Cuantificación de PCV2 (A) y PRRSV (B) en NLIS de cerdos sanos, cerdos con PMWS, y cerdos con desmedro sin PMWS. Los datos se analizaron con la prueba U-Mann Whitney, para establecer diferencias estadísticas entre los grupos. Cada punto representa el resultado de un cerdo.

FIGURE 1. Quantification of PCV2 (A) and PRRSV (B) in SILN from healthy, PMWS, and wasted-non-PMWS affected pigs. Data were analyzed by U-Mann Whitney test to establish statistical differences between groups. Each dot represents the result of a pig.

viously described. Sequences PC001, PC01, PC02, and PCb4, with 98 to 99% identity, were of PCV2b genotype, and sequences PCb1, PCb2, and PCb3, with 97 to 99% identity, were of genotype PCV2a. The sequence identity between both detected genotypes was 92 to 95%. Three out of four pigs with PMWS contained PCV2, genotype PCV2b, in SILN, and two out of three wasted-non-PMWS pigs were infected with PCV2, genotype PCV2a.

Expression of cytokines

The average of cytokines expression (ΔCt) of healthy pigs was used to compare with cytokine expression of each individual growth-retarded pig ($\Delta \Delta Ct$) and expressed as fold increase following the formula $2^{-\Delta \Delta Ct}$. Data were analyzed to compare differences between studied animal groups (Figure 3). Results showed that mRNA IL-6 expression was similar in SILN of pigs with PMWS (median fold increase of 0.4) and wasted-non-PMWS animals (median fold increase of 0.6), but no significant differences were observed when compared to healthy ones ($P > 0.05$). The mRNA TNF- α expression was increased in healthy pigs (median fold increase of 3.7) and in wasted-non-PMWS pigs (median fold increase of 7.8), but the median fold increase was 0.2 in PMWS pigs. The comparison of mRNA TNF- α expression between wasted-non-PMWS and PMWS-affected pigs revealed significant differences ($P < 0.05$). IFN- γ was over-expressed in wasted-non-PMWS pigs (median fold increase of 5.6, range of 8.5 to 1.1), and

tos resultados sugieren la existencia de dos genotipos diferentes entre los cerdos estudiados. Las secuencias PC001, PC01, PC02, y PCb4, con una identidad de 98-99%, fueron del genotipo PCV2b y las secuencias PCb1, PCb2, y PCb3, con 97-99%, fueron del genotipo PCV2a. La identidad nucleotídica entre ambos genotipos fue de 92-95%. Tres de cuatro cerdos con PMWS tuvieron el genotipo PCV2b, y dos de tres cerdos con desmedro sin PMWS tuvieron el genotipo PCV2a.

Expresión de citocinas

Se empleó la expresión de citocinas promedio (ΔCt) de los cerdos sanos para compararla con la expresión de citocinas de cada cerdo con retardo de crecimiento de forma individual ($\Delta \Delta Ct$) y expresarla como el incremento relativo usando la fórmula $2^{-\Delta \Delta Ct}$. Los datos se analizaron para comparar las diferencias entre los grupos de animales estudiados (Figura 3). Los resultados mostraron un nivel de expresión de IL-6 similar en los NLIS de cerdos con PMWS (incremento relativo de 0.4) y los animales con desmedro sin PMWS (incremento relativo de 0.6), y las diferencias con respecto a los animales sanos no fueron significativas ($P > 0.05$). La expresión de TNF- α se incrementó en los cerdos sanos (incremento relativo promedio de 3.7) y en los cerdos con desmedro sin PMWS (incremento relativo promedio de 7.8), pero el incremento relativo promedio en los cerdos con PMWS fue de 0.2. Se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de TNF- α entre los cerdos con desmedro sin PMWS y los

CUADRO 2
Porcentaje de identidad de las secuencias del gen ORF2 de PCV2 de los cerdos con desmedro y secuencias de referencia
Percentage of identity among PCV2 sequences of ORF2 gene from wasted pigs and reference sequence

	<i>AFO55392^a</i>	<i>AFO55394^b</i>	<i>EU148503^c</i>	<i>FJ608549</i>	<i>EU408780</i>	<i>FJ440338</i>	<i>NC_006266</i>	<i>FJ159693</i>	<i>DQ650650</i>	<i>AY193712</i>	<i>PC001</i>	<i>PC1b</i>	<i>PC2b</i>	<i>PC3b</i>	<i>PC4b</i>	<i>PC10b</i>	<i>PC20b</i>
<i>AFO55392</i>	95		91	94	92	94	69	69	69	69	94	98	96	95	93	93	93
<i>AFO55394</i>		93	93	99	96	99	70	70	69	70	98	94	93	92	97	98	98
<i>EU148503</i>				94	92	93	71	71	70	71	93	92	90	90	92	93	93
<i>FJ608549</i>					97	100	71	71	70	71	99	95	94	92	98	99	99
<i>EU408780</i>						98	69	69	69	69	98	98	92	91	97	97	97
<i>FJ440338</i>							71	71	70	71	100	96	94	93	98	99	99
<i>NC_006266</i>								100	99	100	71	71	70	69	70	71	70
<i>FJ159693</i>									100	100	71	71	70	69	70	71	70
<i>DQ650650</i>										100	70	70	69	68	70	70	70
<i>AY193712</i>											71	71	70	69	70	71	70
<i>PC001</i>												95	94	92	98	99	99
<i>PC1b</i>													98	97	94	94	95
<i>PC2b</i>														99	93	93	93
<i>PC3b</i>															92	92	92
<i>PC4b</i>																98	99
<i>PC10b</i>																	99
<i>PC20b</i>																	

^aPCV2a reference strain.

^bPCV2b reference strain.

^cPCV2c reference strain.

only slightly expressed in both, PMWS-affected (median fold increase of 2.7, range of 0.005 to 11) and healthy pigs (1.1-fold increase difference). The comparison of mRNA IFN- γ expression between wasted-non-PMWS and healthy pigs showed significant differences ($P < 0.05$). Finally, the results showed an increase in IL-12 mRNA expression in wasted-non-PMWS pigs (median fold increase of 8.8), and only marginally in PMWS-affected animals (median fold increase of 2.8) and healthy pigs (median fold increase of 1.0).

Discussion

The aim of this work was to compare the viral load of PCV2 and PRRSV, the genotype of PCV2, and the mRNA cytokine expression patterns in SILN of naturally growth-retarded pigs from farms with a confirmed diagnosis of PMWS and those of pigs from a PRRSV-free farm with no PMWS-like clinical signs. Diagnosis of PMWS was confirmed by several methods, including clinical signs, PCV2 *in situ* hybridization and real time PCR on SILN, which allowed classifying the pigs into three groups: a) wasted-non-PMWS pigs, b) pigs suffering from PMWS, and C) healthy pigs. This classification agrees with previous reports.^{6,24} Although wasted-non-PMWS cases usually represent a rather un-

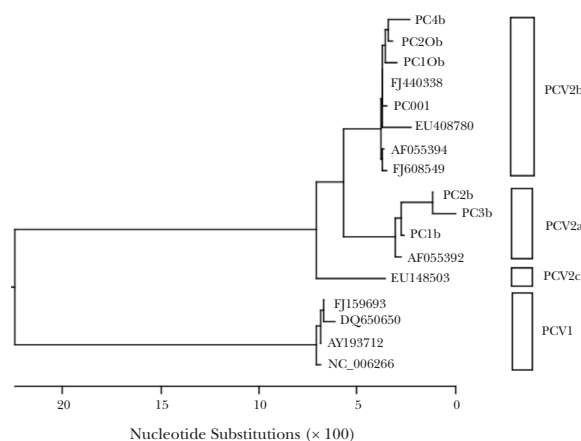


FIGURA 2. Árbol filogenético de PCV2. El árbol se construyó con el programa DNASTAR Inc., usando el método de Neighbor Joining. Los recuadros indican los grupos de circovirus porcino tipo 2. Las cepas de PCV2 identificadas en México fueron clasificadas filogenéticamente como genotipos PCV2a y PCV2b. Las cepas de referencia PCV2a (AF05592), PCV2b (AF055394), PCV2c (EU148503), y PCV1 se incluyeron en el árbol.

FIGURE 2. Phylogenetic tree of PCV2. The tree was constructed with DNASTAR Inc. program, using Neighbor Joining method. The box indicates the groups of porcine circovirus type 2. Mexican PCV2 strains were phylogenetically classified into PCV2a and PCV2b genotypes. The reference strains of PCV2a (AF05592), PCV2b (AF055394), and PCV2c (EU148503), and PCV1 were included in the tree.

cerdos PMWS ($P < 0.05$). Para el IFN- γ se observó una sobreexpresión en los cerdos con desmedro sin PMWS (incremento relativo promedio de 5.6, en un intervalo de 1.1 a 8.5), y sólo ligeramente expresado en los cerdos con PMWS (incremento relativo promedio de 2.7, en un intervalo de 0.005 a 11) y en los cerdos sanos (1.1-diferencia en incremento relativo). También se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de IFN- γ entre los cerdos con desmedro sin PMWS y en cerdos sanos ($P < 0.05$). Finalmente, se encontró un incremento en la expresión de IL-12 en cerdos con desmedro sin PMWS (incremento relativo promedio de 8.8), y sólo marginalmente en cerdos PMWS (incremento relativo promedio de 2.8) y en cerdos sanos (incremento relativo promedio de 1.0).

Discusión

El objetivo de este trabajo fue comparar la carga viral de PCV2 y PRRSV, el genotipo de PCV2, y las diferencias en los perfiles de expresión de citocinas en nódulos linfáticos inguinales superficiales de cerdos con retardo en el crecimiento, originarios de granjas con un diagnóstico confirmado de PMWS, y en cerdos sanos provenientes de granjas libres de PRRSV,

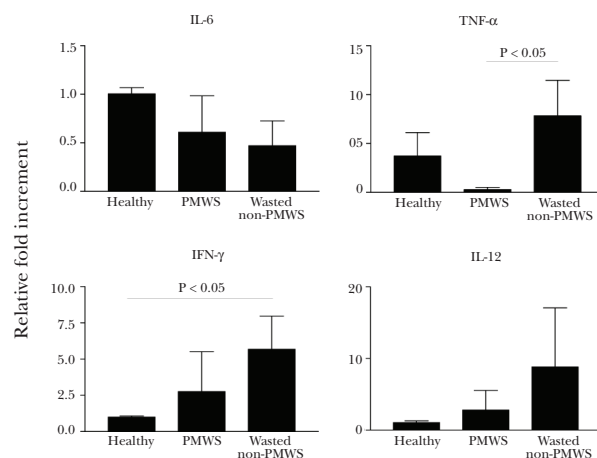


FIGURA 3. Expresión del ARNm de las citocinas IL-6, TNF- α , IFN- γ , e IL-12 en NLIS de cerdos sanos, cerdos con PMWS, y cerdos con desmedro sin PMWS. Los niveles de expresión de citocinas fueron normalizados con el gen constitutivo peptidil isomerasa A (PPIA) y representados como incrementos relativos con respecto a los animales sanos. Los datos representan el promedio y el error estándar; los datos se analizaron con la prueba de U-Mann Whitney y se expresan las diferencias significativas en cada caso.

FIGURE 3. Quantification of mRNA expression of cytokines IL-6, TNF- α , IFN- γ , and IL-12 in SILN from healthy, PMWS, and wasted-non-PMWS affected pigs. Cytokine mRNA expression was normalized against the expression of peptidyl isomerase A (PPIA) as house-keeping gene and represented as the relative fold increase with respect to healthy pigs. Data were analyzed by U-Mann Whitney test and significant differences are expressed in each case.

clear situation to define, the diagnosis of PMWS cannot be formally established in those pigs, since they did not fulfill the case definition,¹⁷ but they may represent animals in the recovery phase of the disease or, alternatively, pigs that suffered from a concomitant process leading to wasting and infected sub-clinically with PCV2.²⁵ Therefore, care must be taken when evaluating results of that particular population of animals. However, the close association of real time PCR and ISH results allows to emphasize the threshold of $>10^7$ PCV2 DNA copies, given by some authors, to strongly suspect of PMWS.^{8,9} In fact, based on the present results, this threshold can be also useful when evaluating SILN, as well as serum samples. On the other hand, wasted-non-PMWS pigs were grouped between $>10^4$ to $<10^7$ genomic copies/100 ng, whereas healthy pigs had $<10^4$ PCV2 DNA genomic copies/100 ng of DNA.

The risk of PMWS occurrence is apparently higher when PRRSV is present, compared with other viruses, such as coronavirus, enterovirus, influenza, or parvovirus.²⁶ Co-infection of pigs with PRRSV and PCV2 apparently up-regulates the replication of the latter one and, in consequence, higher viral loads in serum are obtained.²⁷ In this study, PMWS and wasted-non-PMWS pigs were positive to PRRSV and showed similar viral loads, and one pig of each group was negative to PRRSV. These results suggest that PRRSV apparently does not favor an increased viral load of PCV2 in SILN; however, this hypothesis cannot be ruled out since different infection timings may play a role in such co-infection effect, and the precise infection timing is not possible to be established in natural cases.

The analysis of PCV2 sequences in the present work suggests the presence of two of the different genotypes, PCV2b and PCV2a, previously described for PCV2.^{2,24} SILN from wasted-non-PMWS pigs contained only PCV2a, and three out of four pigs with PMWS were infected with PCV2b. Grau-Roma *et al.*²⁴ showed that pigs coming from farms with no history of PMWS were consistently infected with PCV2a, whereas farms with PMWS had both genotypes circulating. The results of this study cannot support the first condition, since it was not possible to sequence the virus coming from the farm with no PMWS, due to the low viral load present in healthy pigs. However, both genotypes were identified in pigs from farms with PMWS.

In this pilot study, pigs with PMWS had reduced ability to express IFN- and IL-12, similarly to their expression by healthy pigs, and contained high viral loads; whereas wasted-non-PMWS pigs showed high expression of IFN- γ with intermediate viral loads. It was not possible to define the precise time of infection, for which pigs were grouped according to their clinical signs and viral loads. Using these criteria, it is suggested that wasted-non-PMWS pigs have high expression

sin signos clínicos presuntivos de PMWS. El diagnóstico de PMWS fue confirmado por diversos métodos, incluyendo los signos clínicos, hibridación *in situ* y PCR en tiempo real de PCV2, en NLIS, lo cual permitió realizar una clasificación de los cerdos en tres grupos: 1) cerdos con PMWS, 2) cerdos con desmedro sin PMWS y 3) cerdos sanos. Esta clasificación coincide con lo descrito anteriormente por otros autores.^{6,24} Los cerdos que presentaron desmedro sin los otros signos característicos del síndrome son casos difíciles de clasificar, por lo que el diagnóstico de PMWS para estos cerdos no puede establecerse formalmente, ya que no cumplen con toda la definición de caso,¹⁷ debido a que los animales se encuentran en fase de recuperación de la enfermedad, o alternatively pueden ser cerdos que padecen otro proceso que conduce al desmedro y a una infección subclínica con PCV2.²⁵ Por lo que los resultados de la evaluación de animales en estas poblaciones particulares se deben considerar cuidadosamente. No obstante, la cercana asociación entre los resultados de PCR en tiempo real y la hibridación *in situ* nos permite enfatizar la utilidad en el uso de punto de corte de $>10^7$ copias de ADN de PCV2, previamente sugerido por otros autores, para sospechar de PMWS.^{8,9} De hecho, con base en los resultados del presente trabajo, este umbral o punto de corte puede ser también útil para evaluar NLIS y muestras de suero. Por otra parte, los cerdos con desmedro sin PMWS se agruparon entre $>10^4$ a $<10^7$ copias ADN/100 ng de ADN, mientras que los cerdos sanos tuvieron $<10^4$ copias ADN PCV2/100 ng de ADN.

El riesgo de ocurrencia de PMWS es más elevado cuando está presente el PRRSV, comparado con otros virus como coronavirus, enterovirus, influenza, o parvovirus.²⁶ La infección de cerdos con PRRSV y PCV2 aparentemente favorece el aumento en la replicación del circovirus y, en consecuencia, se tienen cargas virales más altas en suero.²⁷ En este estudio los cerdos con PMWS y con desmedro sin PMWS fueron positivos a PRRSV, con cargas virales similares; sólo un cerdo en cada grupo fue negativo a PRRSV. Estos resultados sugieren que el PRRSV, aparentemente no favorece un incremento en la carga viral de PCV2 en NLIS; sin embargo, esta hipótesis no puede ser descartada debido a que los diferentes tiempos de infección están involucrados en la sinergia de la infección y el tiempo preciso de infección no es posible determinarlo.

El análisis de las secuencias de PCV2 sugiere la presencia de dos genotipos, PCV2a y PCV2b, descritos anteriormente para PCV2.^{2,24} En NLIS de cerdos con desmedro sin PMWS, sólo se detectó la presencia del genotipo PCV2a, y tres de cuatro cerdos con PMWS estaban infectados con PCV2b. Grau-Roma *et al.*²⁴ demostraron que los cerdos que provienen de granjas sin

of IFN- γ . In the PMWS group, only one pig that had higher mRNA expression of IFN- γ compared to the rest of the affected animals was the one that had lower levels of the PCV2 genome in tissues (almost 1 log less compared to the rest of the affected pigs). This pig might represent an animal with a recovering infection or, alternatively, a pig with natural resistance to viral infections. The mRNA expression of IFN- γ in PMWS pigs and in wasted-non-PMWS pigs is in agreement with previous reports,²⁸ which described that cyclosporine-treated pigs and infected with PCV2 have high neutralizing antibodies titer and high mRNA expression of IFN- γ and were PCV2-negative in serum, in contrast to pigs with viremia and low titers of neutralizing antibodies and no IFN- γ . These results could suggest that Th1 cytokines (IFN- γ) might be essential to prevent PMWS and PCV2 viremia, and that IL-10 production could favor viremia and signs of PMWS.^{15,29,30}

In conclusion, at this moment it is difficult to clarify the complete picture on cytokine production by PCV2-infected pigs and further research is needed. However, these preliminary results with PCV2-naturally infected pigs indicate that wasted-non-PMWS pigs had high mRNA expression of IFN- γ , in contrast to PMWS pigs. These results suggest that IFN- γ expression could have some influence on the viral loads in SILN, as well as on the development of PMWS.

Acknowledgements.

Special thanks to SAGARPA-CONACyT (Projects No. 2004-C01-101 and 2004-C01-61) for its financial support.

References

1. ALLAN GM, ELLIS JA. Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest* 2000;12:3-14.
2. SEGALES J, OLIVERA A, GRAU-ROMA L, CHARREYRE C, NAUWYNCK H, LARSEN L *et al*. PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Vet Rec* 2008;162:867-868.
3. SEGALES J, ALLAN GM, DOMINGO M. Porcine circovirus diseases. *Anim Health Res Rev* 2005;6: 119-142.
4. CALSAMIGLIA M, SEGALES J, QUINTANA J, ROSELL C, DOMINGO M. 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* 2002;40:1848-1850.
5. ROSELL C, SEGALES J, PLANA-DURAN J, BALASCH M, RODRIGUEZ-ARRIOJA GM, KENNEDY S *et al*. Pathological, immunohistochemical, and *in situ* hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J Comp Pathol* 1999;120:59-78.

historia de PMWS presentaban infección con PCV2a de manera consistente, mientras que en granjas con PMWS circulan ambos genotipos. Los resultados del presente estudio no pueden confirmar este hallazgo, ya que debido a la baja carga viral de los cerdos sanos no fue posible obtener la secuencia del virus PCV2 procedente de la granja libre de PMWS. Sin embargo, ambos genotipos fueron identificados en los cerdos procedentes de granjas con PMWS.

En este estudio piloto, se observó que los cerdos con PMWS tuvieron una disminución en la capacidad de expresar IFN- γ e IL-12, en niveles similares a los encontrados en cerdos sanos y además presentaron cargas virales altas; mientras que los cerdos con desmedro sin PMWS mostraron niveles de expresión elevados de IFN- γ con cargas virales intermedias. No fue posible definir el tiempo preciso de infección, por lo que los cerdos se agruparon de acuerdo con sus signos clínicos y cargas virales. Empleando estos criterios, se sugiere que los cerdos con desmedro sin PMWS tienen niveles altos de expresión de IFN- γ . En el grupo de PMWS, sólo un cerdo tuvo niveles elevados de expresión de IFN- γ , y comparado con el resto de los animales afectados presentó la menor carga viral de PCV2 en tejido (casi 1 log menos). Este resultado puede ser explicado como un animal en fase de recuperación de la infección o un cerdo con resistencia natural a infecciones virales. La expresión de IFN- γ en cerdos PMWS y en cerdos con desmedro sin PMWS es similar a lo registrado por otros investigadores.²⁸ En dicho estudio se observó que los cerdos tratados con ciclosporina e infectados con PCV2 presentan títulos altos de anticuerpos neutralizantes, una expresión incrementada de IFN- γ y negativos a PCV2 en suero, en contraste con cerdos que presentaron viremia, bajos títulos de anticuerpos neutralizantes y nula producción de IFN- γ . Ello podría sugerir que las citocinas Th1 (IFN- γ) pueden tener un papel esencial para prevenir el desarrollo de PMWS y las viremias de PCV2, y que la producción de IL-10 podría favorecer la viremia y los signos de PMWS.^{15,29,30}

En conclusión, hasta este punto no es posible tener el panorama completo sobre la producción de citocinas en cerdos infectados con PCV2, por lo que se necesitan otras contribuciones a este tema. Sin embargo, estos resultados preliminares en cerdos con infecciones naturales de PCV2 indican que los cerdos con desmedro sin PMWS muestran una producción alta de ARNm de IFN- γ , comparados con los cerdos PMWS. Por lo que es posible sugerir que la producción de esta citocina puede influir en las cargas virales en NLIS, así como en el desarrollo del PMWS.

6. SEGALES J, CALSAMIGLIA M, OLVERA A, SIBILA M, BADIELLA L, DOMINGO M. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Microbiol* 2005;111:223-229.
7. OPRIESSNIG T, YU S, GALLUP JM, EVANS RB, FENAUX M, PALLARES F *et al.* Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus. *Vet Pathol* 2003;40: 521-529.
8. OLVERA A, SIBILA M, CALSAMIGLIA M, SEGALES J, DOMINGO M. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *J Virol Methods* 2004;117:75-80.
9. BRUNBORG IM, MOLDAL T, JONASSEN CM. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. *J Virol Methods* 2004;122:171-178.
10. MEULENBERG JJ, PETERSEN DEN BESTEN A, DE KLUYVER E, VAN NIEUWSTADT A, WENSVOORT G, MOORMANN RJ. Molecular characterization of Lelystad virus. *Vet Microbiol* 1997;55:197-202.
11. ELLIS J, CLARKE E, HAINES D, WEST K, KRAKOWKA S, KENNEDYS *et al.* Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. *Vet Microbiol* 2004;98:159-163.
12. LYOO KS, PARK YH, PARK BK. Prevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus from aborted fetuses and pigs with respiratory problems in Korea. *J Vet Sci* 2001;2:201-207.
13. SIRINARUMITR T, SORDEN SD, MOROZOV I, PAUL PS. Double *in situ* hybridization for simultaneous detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circovirus (PCV). *J Vet Diagn Invest* 2001;13:68-71.
14. ROSSOW KD. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet Pathol* 1998;35:1-20.
15. DARWICH L, PIE S, ROVIRA A, SEGALES J, DOMINGO M, OSWALD IP *et al.* Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Gen Virol* 2003;84:2117-2125.
16. AASTED B, BACH P, NIELSEN J, LIND P. Cytokine profiles in peripheral blood mononuclear cells and lymph node cells from piglets infected in utero with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:1229-1234.
17. SEGALES J, DOMINGO M. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Vet Q* 2002;24:109-124.
18. LIPEJ Z, SEGALES J, JEMERSIC L, OLVERA A, ROIC B, NOVOSIL D *et al.* First description of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in wild boar (*Sus scrofa*) in Croatia and phylogenetic analysis

Agradecimientos

Se agradece el financiamiento otorgado por el Fondo SAGARPA-CONACyT (Proyectos núms. 2004-C01-101 y 2004-C01-61) para la realización de este trabajo.

- of partial PCV2 sequences. *Acta Vet Hung* 2007;55: 389-404.
19. QUINTANA J, SEGALES J, ROSELL C, CALSAMIGLIA M, RODRIGUEZ-ARRIOJA GM, CHIANINI F *et al.* Clinical and pathological observations on pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Rec* 2001;149:357-361.
20. CHRISTOPHER-HENNINGS J, DAMMEN M, NELSON E, ROWLAND R, OBERST R. Comparison of RNA extraction methods for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from boar semen. *J Virol Methods* 2006;136:248-253.
21. FLORES-MENDOZA L, SILVA-CAMPA E, RESENDIZ M, OSORIO FA, HERNANDEZ J. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infects mature porcine dendritic cells and up-regulates interleukin-10 production. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:720-725.
22. WHELAN JA, RUSSELL NB, WHELAN MA. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J Immunol Methods* 2003;278:261-269.
23. LAROCHELLE R, BIELANSKI A, MULLER P, MAGAR R. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. *J Clin Microbiol* 2000;38:4629-4632.
24. GRAU-ROMAL, CRISCI E, SIBILA M, LOPEZ-SORIA S, NOFRARIAS M, CORTEY M *et al.* A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. *Vet Microbiol* 2008;128:23-35.
25. SEGALÉS J. Update on postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome diagnostics. *Swine Health Prod* 2002;10:277-281.
26. POGRANICHNIY RM, YOON KJ, HARMS PA, SORDEN SD, DANIELS M. Case-control study on the association of porcine circovirus type 2 and other swine viral pathogens with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Vet Diagn Invest* 2002;14:449-456.
27. ROVIRA A, BALASCH M, SEGALES J, GARCIA L, PLANA-DURAN J, ROSELL C *et al.* Experimental Inoculation of Conventional Pigs with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Porcine Circovirus 2. *J Virol* 2002;76:3232-3239.
28. MEERTS P, VAN GUCHT S, COX E, VANDEBOSCH A, NAUWYNCK HJ. Correlation between type of adaptive immune response against porcine circovirus type 2 and level of virus replication. *Viral Immunol* 2005;18:333-341.
29. DARWICH L, BALASCH M, PLANA-DURAN J, SEGALES J, DOMINGO M, MATEU E. Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome

in response to mitogen, superantigen or recall viral antigens. *J Gen Virol* 2003;84:3453-3457.

30. STEVENSON LS, MCCULLOUGH K, VINCENT I, GILPIN DF, SUMMERFIELD A, NIELSEN J *et al.*

Cytokine and C-reactive protein profiles induced by porcine circovirus type 2 experimental infection in 3-week-old piglets. *Viral Immunol* 2006;19:189-195.