

COINFECCIÓN DE CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2 CON EL VIRUS DEL SÍNDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO EN VENEZUELA

Coinfection of Porcine Circovirus Type 2 with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus in Venezuela

Jean P. Cano^{*1}, Carolina Rodríguez-Cariño^{*}, Elías J. Sogbe^{*}, Joaquín Segalés^{**}, Vitelio Utrera^{*}, Carmen T. Díaz^{*}

**Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Apartado 4563. Maracay 2101A, Estado Aragua, Venezuela. **CReSa - Dpt. Sanitat i Anatomía Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, España*

Correo-E: cano0009@umn.edu

Recibido: 24/05/04 - Aprobado: 20/10/05

RESUMEN

El circovirus porcino tipo 2 (PCV2) que ha sido asociado al síndrome de emaciación multisistémico postdestete (PMWS), generalmente es diagnosticado conjuntamente con otros agentes infecciosos en cerdos. El virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) es probablemente el más frecuentemente asociado a estos casos. Aunado a ello, se ha sugerido una potencial relación entre ambos agentes, basándose en infecciones experimentales. Tomando en cuenta que ambos virus, PRRSV y PCV2, han sido detectados en Venezuela, es posible que la coinfección por estos agentes ocurra de forma natural bajo condiciones de campo en el país; en razón de lo cual, el objetivo del presente trabajo fue describir los signos clínicos, las lesiones macroscópicas y microscópicas, así como la detección de ambos virus en cerdos naturalmente coinfectados en Venezuela.

Entre noviembre del 2001 y noviembre del 2002, fueron estudiados

ABSTRACT

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is usually found concomitantly with other agents in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Among them, porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is probably the most frequent one. Furthermore, a potential synergy between those agents has been suggested based on experimental infections. Taking into account that both PRRSV and PCV2 have been detected in Venezuela, it is possible that coinfections by these viral agents occur under field conditions. Therefore, the purpose of this work was to describe the clinical signs, gross lesions observed, histopathological findings and detection of both PCV2 and PRRSV in pigs naturally co-infected with these viruses in Venezuela.

Between november 2001 and november 2002, twenty seven 6-12 week-old pigs, taken from eleven farms with 300 to 1500 sows were studied. Herds were located in the states of Aragua, Carabobo,

¹ A quien debe dirigirse la correspondencia (Corresponding Author).

27 cerdos entre 6 y 12 semanas de edad, provenientes de 11 granjas, las cuales presentaron capacidades entre 300 y 1.500 madres, estando ubicadas en los estados Aragua, Carabobo, Cojedes, Mérida, Yaracuy y Zulia. Los signos clínicos y las lesiones macro y microscópicas de los cerdos seleccionados fueron registradas. Muestras de tonsila, pulmón, nódulos linfáticos, bazo, hígado, intestino y riñón, fueron fijadas en formalina bufferada al 10% para la realización del examen histopatológico. Los casos compatibles con PMWS fueron procesados según la técnica de hibridación *in situ* (HIS) para detectar PCV2, realizándose inmunohistoquímica (IHQ) para PRRSV a las muestras positivas a PCV2, de manera de detectar aquellos casos de co-infección viral.

De los 27 cerdos con signos clínicos como retraso en el crecimiento y disnea, 10 evidenciaron lesiones microscópicas consistentes con PMWS, de estos últimos, cinco resultaron positivos a la prueba de HIS, tres de ellos (dos con PMWS y uno con infección subclínica de PCV2) se encontraron positivos a PRRSV mediante la prueba de IHQ, siempre con identificación del agente en macrófagos alveolares.

(Palabras clave: Cerdo, SRRP, circoviridae, infección, Venezuela.)

Cojedes, Mérida, Yaracuy and Zulia. Clinical signs and macroscopic lesions of selected pigs were registered. Samples of tonsil, lung, lymph nodes, spleen, liver, intestine and kidney were fixed by immersion in 10% buffered formalin for histopathological examination. Those cases compatibles with PMWS were further processed by *in situ* hybridization (ISH) to detect PCV2. Finally immunohistochemistry (IHC) for PRRSV detection was only performed in the PCV2 positives samples in order to detect those cases of viral co-infection.

Ten out of 27 pigs with clinical signs, growth retardation and respiratory signs, showed microscopic lesions compatible with those of PMWS, five out of these last 10 were positive to ISH to detect PCV2. IHC to detect PRRSV antigen was performed in those 5 PCV2 positive cases. Three of them (two with PMWS and the third with a PCV2 subclinical infection) were found positive to the PRRSV IHC test; labeled cells consisted of alveolar macrophages.

(Key words: Swine, PRRS, circoviridae, infection, Venezuela.)

INTRODUCCIÓN

A finales de los años 70, se encontró un virus contaminante de algunas líneas celulares de riñón de cerdo PK15, llamado actualmente Circovirus Porcino Tipo I (PCV1, por sus siglas en inglés), este mostró no ser patogénico en cerdos infectados experimentalmente (Tischer et

al., 1986). La enfermedad que actualmente se conoce como Síndrome de Emaciación Multisistémico Postdestete o PMWS (por sus siglas en inglés), fue observada inicialmente en el oeste de Canadá en 1991 y reportada por primera vez en 1996 (Clark, 1996; Harding, 1996). Luego se logró aislar el Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2) a partir de tejidos

de un cerdo con el PMWS, utilizando un cultivo celular PK15 libre de PCV1 (Ellis *et al.*, 1998).

En Venezuela, los veterinarios de campo habían encontrado evidencias clínicas del PMWS hace algunos años y es en el año 2002 cuando se reportan oficialmente los primeros casos de PMWS asociados a PCV2, el cual fue detectado mediante la técnica de hibridación *in situ* (HIS) (Sogbe *et al.*, 2002).

El virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV, por sus siglas en inglés) fue detectado en Venezuela en 1996 mediante la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) (Díaz *et al.*, 1999). Recientemente se ha aislado y caracterizado el virus del PRRS en el país (De Jesús, 2003). La alta prevalencia del PRRS evidenciada a través de estudios serológicos (77% de los rebaños) en el año 2000 (Cano *et al.*, 2002) y el gran impacto que produjo sobre los parámetros productivos, lo han convertido en una de las principales limitantes sanitarias en el país, por lo que se considera que el estudio de esta enfermedad y su asociación con otros agentes etiológicos, son necesarios para comprender la patogenia del virus y avanzar en el control y erradicación de la enfermedad.

La asociación e interacción del PRRSV con otros agentes patógenos del cerdo, tales como *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Streptococcus suis* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*, ha sido previamente estudiada. A pesar de las dificultades para reproducir el PMWS en condiciones experimentales, algunos de los modelos que han logrado reproducir los signos clínicos de la enfermedad, han utilizado la coinfección con agentes como el PRRSV o el parvovirus porcino, especulándose el papel de otros agentes

patógenos en el desarrollo del PMWS (Allan *et al.*, 1999; Krakowka *et al.*, 2000; Harms *et al.*, 2001; Rovira *et al.*, 2002).

Durante el año 2000, se diagnosticó neumonía en 3.163 cerdos en el Laboratorio de Diagnóstico de la Universidad de Iowa, EUA. El PCV2 resultó ser el agente más comunmente detectado en combinación con otro agente, en el 56% de los casos se encontró concomitante con PRRSV (Harms *et al.*, 2002). Otro estudio realizado por Segalés *et al.* (2002), detectó el antígeno de PRRSV mediante IHQ en 23,8% de 277 cerdos diagnosticados con PMWS, sugiriendo que el PRRSV no es esencial para el desarrollo de PMWS.

En el marco de una línea de investigación sobre la presencia, distribución, presentación, impacto e interacciones del PCV2 con otros agentes (en Venezuela); así como por tratarse de un tópico de reciente significación y ante la ausencia de información en los países tropicales, se plantea un estudio sobre el PMWS, sus asociaciones y su forma de presentación en las granjas comerciales venezolanas. El objetivo de esta fase de la investigación fue determinar si los cerdos afectados con PMWS pueden ser infectados simultáneamente por el PRRSV.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el período entre noviembre de 2001 y noviembre de 2002, fueron evaluadas un total de once granjas comerciales, ubicadas en los estados Aragua, Carabobo, Cojedes, Mérida, Yaracuy y Zulia. En estas granjas se reportó la presencia de lechones entre seis y doce semanas de edad, con severo retraso en el crecimiento y desmejoramiento de la condición corporal

siendo éste el criterio utilizado para incluir a las explotaciones en el estudio. Las granjas tenían un promedio entre 300 y 1500 cerdas en producción. El nivel de manejo y el estatus sanitario de los rebaños era variable, con sistemas de ciclo completo, flujo continuo, múltiples sitios y manejo todo-dentro-todo fuera.

Se seleccionaron 27 cerdos a los cuales se les tomó muestras de tonsila, pulmón, nódulos linfáticos mediastínicos, mesentéricos e inguinales superficiales, bazo, hígado, riñón e intestino (íleon-ciego).

Todas las muestras de tejidos fueron fijadas en formalina bufferada al 10% y fueron procesadas para estudio histopatológico en el Laboratorio de Diagnóstico Anatomopatológico adscrito a la Cátedra de Patología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela, *Campus Maracay*.

El diagnóstico presuntivo de PMWS se basó en los signos clínicos reseñados, las lesiones macroscópicas y los hallazgos microscópicos, para así seleccionar a partir de los 27 cerdos, diez casos para la detección del ácido nucleico del PCV2 mediante la técnica de HIS.

Los cinco casos que resultaron positivos mediante la técnica de HIS para PCV2, se incluyeron para realizar la prueba de Inmunoperoxidasa (complejo avidina-biotina) a fin de detectar la presencia del virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino. Las muestras fueron procesadas para ambas técnicas a partir de bloques de parafina en la Unidad de Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona, España.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio clínico

Los signos clínicos más frecuentemente observados y determinantes en la selección



Figura 1. Cerdo de 12 semanas de edad (flecha) con severo retraso en el crecimiento con respecto al grupo de contemporáneos

de los cerdos para la necropsia fueron: retraso del crecimiento o emaciación (Figura 1), consistente con el 96% de los cerdos, aumento de tamaño de los nódulos linfáticos inguinales superficiales (70%), disnea (67%) y palidez de la piel (67%). Estos criterios de selección se basaron en la presentación clínica del PMWS referida por diferentes autores (Harding *et al.*, 1998; Ellis *et al.*, 1998; Allan *et al.*, 1999; Krakowka *et al.*, 2000; Harms *et al.*, 2001; Sorden y Halbur, 2002; Segalés y Domingo, 2002).

Estudio de necropsia

El aumento de tamaño de al menos un nódulo linfático (Figura 2) fue el hallazgo más común a la necropsia, (un 74% de los casos), siendo superior al reportado por Segalés y Domingo (2002); esta diferencia podría deberse a la presencia de otros agentes virales como el PRRSV, que también produce linfadenomegalia (Done y Paton, 1995; Rossow, 1998). La ausencia de colapso pulmonar se observó en el 67% de los casos, considerándose una lesión característica de PMWS y PRRS (Segalés y Domingo, 2002; Jones-Lang *et al.*, 1997). Aunado a lo descrito, el 59%



Figura 2. Nódulos linfáticos inguinales superficiales aumentados de tamaño (flecha), de un lechón de 9 semanas de edad

de los casos revisados presentó consolidación pulmonar, principalmente de los lóbulos craneal y medial, lo que generalmente se relaciona con bronconeumonía de origen bacteriano. En el 100% de las granjas incluidas en el presente estudio, se diagnosticó serológicamente *Mycoplasma hyopneumoniae*. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Segalés y Domingo en el 2002, quienes obtuvieron 58,9% de consolidación pulmonar en casos de PCV2. Otros investigadores asocian esta consolidación craneal del pulmón con el PRRSV (Done y Paton, 1995; Rossow, 1998). Se pudo detectar que el 37% de los cerdos presentaban el hígado marcadamente pálido y de consistencia friable, siendo valores superiores con relación a los obtenidos en 2002 por Segalés y Domingo (2,86% de atrofia hepática); sin embargo, en un estudio microscópico realizado a 100 casos de PMWS por Rosell *et al.* (2000), se señala 88% de hepatitis.

Se presentó 22% de serositis en diferentes grados y ubicación (pleuritis, pericarditis o peritonitis); lo que coincide con lo indicado por Segalés y Domingo

(2002), donde encontraron 24,18% de serositis en los animales evaluados.

En la mayoría de los casos, esta serositis se le ha atribuido a agentes bacterianos secundarios, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida*, rutinariamente aislados en la mayoría de las granjas incluidas en el estudio. Este hallazgo frecuente en casos de campo, podría deberse a que el PCV2 y el PRRSV, son agentes inmunosupresores que facilitan la multiplicación de estas bacterias en el tracto respiratorio; sin embargo, otros autores no han encontrado interacción clara entre el PRRSV y *Pasteurella multocida* o *Haemophilus parasuis* (Carvalho *et al.*, 1997; Segalés *et al.*, 1999).

De los 27 lechones a los que se les practicó la necropsia, se detectó 19% de úlceras gástricas, principalmente ubicadas en la *pars esofágica* del estómago. Este porcentaje es menor al encontrado por Segalés y Domingo en el 2002 (27,25%); se podría inferir que el grupo etario sujeto a estudio (lechones de 6 a 12 semanas), pudo ser un factor determinante en este valor en particular, considerando que Segalés y Domingo (2002) incluyeron en su investigación cerdos de todas las edades.

Estudio histopatológico

El hallazgo microscópico más relevante fue la neumonitis intersticial (56%). Este porcentaje fue menor al reseñado por Segalés y Domingo (2002), no obstante, esta patología ha sido un hallazgo constante en los experimentos que han logrado reproducir el PMWS mediante inoculación de PCV2 y PRRSV a los cerdos (Harms *et al.*, 2001; Rovira *et al.*, 2002). En la mayoría de los casos de infección por PRRSV, se presenta neumonitis intersticial crónica (Done y Paton, 1995; Rossow *et al.*, 1996), no obstante, es

interesante recordar que esta lesión también ha sido asociada a infecciones por PCV2, virus de la enfermedad de Aujeszky, virus de la influenza porcina y coronavirus respiratorio porcino (Harms et al., 2002; Jones-Lang et al., 1997; Rodríguez-Arriola et al., 1999).

Es importante señalar que en la mayoría de los casos en los que se observó macroscópicamente ausencia de colapso pulmonar, al estudio histológico se diagnosticó neumonitis intersticial crónica, por lo que pudiese establecerse una relación de ambos hallazgos (Figura 3).

En el tejido linfoide estudiado (tónsilas, placas de Peyer y nódulos linfáticos traqueobronquiales, mesentéricos e inguinales superficiales), se detectó depleción linfoide en el 48% de los casos (Figura 4), infiltrado inflamatorio histiocítico en el 41%, presencia de células sincitiales o multinucleadas gigantes en el 37% y cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos esféricos fuertemente basofílicos, principalmente en macrófagos, en el 19% de los casos bajo estudio. Estos hallazgos también fueron obtenidos por

Segalés y Domingo (2002), en un estudio retrospectivo de casos positivos para PCV2; los porcentajes de ocurrencia para estas lesiones señaladas en dicho estudio fueron mayores, sin embargo, en la presente investigación 5 animales de los 13 que presentaron depleción linfoide, fueron diagnosticados posteriormente como PMWS. En casos de coinfección natural o experimental de PCV2 y PRRSV se señala depleción linfoide (Harms et al., 2001; Rovira et al., 2002; Harms et al., 2002).

En ninguno de los cerdos se observó hiperplasia linfoide, a pesar que en infecciones por el PRRSV es frecuentemente indicado (Done y Paton, 1995; Rossow et al., 1996); esto pudiera explicarse en que al momento de seleccionar los cerdos para el presente estudio, (basado en los signos clínicos consistentes con PRRSV), éstos se encontraban en la fase crónica de la entidad, fase en la cual la hiperplasia linfoide ya no es observada.

En el 37% de los casos, se reportó degeneración hepática, la cual podría estar

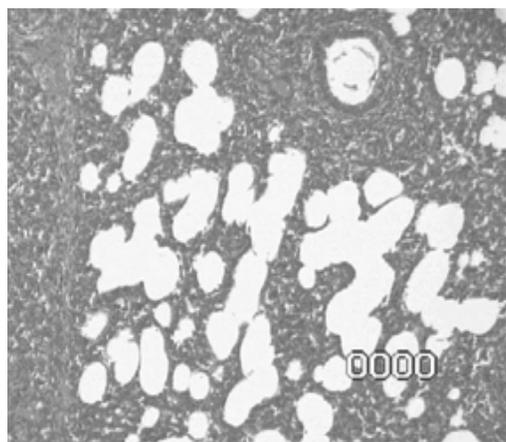


Figura 3. Micrografía digitalizada de pulmón, neumonitis intersticial crónica: nótese el infiltrado inflamatorio mononuclear que ocupa los septa interalveolares. HE: 40x

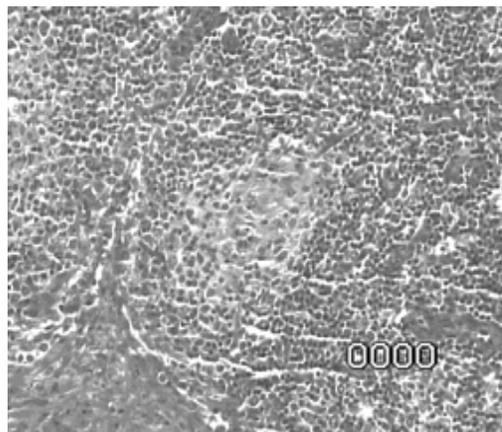


Figura 4. Micrografía digitalizada de Placas de Peyer donde se aprecia depleción linfoide marcada con infiltrado histiocitario. HE: 100x

relacionada con la infección por PCV2 (Segalés *et al.*, 2002; Segalés y Domingo, 2002) y co-infección PCV2 – PRRSV (Harms *et al.*, 2001); podría especularse sobre la participación de micotoxinas o fármacos, para lo cual se requerirían estudios complementarios.

En ninguno de los casos se observó nefritis intersticial, contrastando con la literatura consultada, donde se reseña una proporción de 39,12% (Segalés y Domingo, 2002).

Hibridación *in situ* (HIS)

El ácido nucleico del PCV2 fue detectado en cinco de diez casos evaluados; en los cinco se evidenció el ADN del virus en el nódulo linfático inguinal superficial, en dos en el bazo y sólo uno en pulmón, riñón, placas de Peyer (Ileon-ciego) o hígado; la determinación del ADN viral en estos tejidos coincide con lo registrado por diferentes autores (Quintana *et al.*, 2001; Harms *et al.*, 2002; Segalés *et al.*, 2002). El ácido nucleico de PCV2 no fue detectado en el miocardio ni en el páncreas.

Se pudo observar una correlación entre la cantidad de ácido nucleico detectado y la severidad de las lesiones

microscópicas en tejido linfoide, lo cual coincide con Quintana *et al.* (2001); mientras más severa fue la depleción linfoide observada en la histopatología, mayor fue la cantidad de marcaje para ADN de PCV2.

Al relacionar los signos clínicos y las lesiones microscópicas observadas en esos cinco cerdos positivos en la prueba de HIS, se pudo establecer el diagnóstico definitivo de circovirus porcino (PMWS). Dichos cerdos tenían 6, 8 (tres cerdos) y 11 semanas de edad y eran provenientes de cuatro granjas comerciales de cuatro estados de Venezuela (Tabla 1). Es de hacer notar que uno de los casos positivos a PMWS provenía de una granja seronegativa a PRRS.

Por otra parte, el hecho que sólo cinco cerdos de 27 se les diagnosticara PMWS, a pesar de haber sido seleccionados por la presentación clínica reportada en la literatura, nos sugiere que otros agentes o factores podrían estar asociados a esta condición de desmejoramiento de la condición corporal, emaciación y disnea en cerdos entre 6 y 12 semanas de edad en las granjas comerciales de Venezuela.

Tabla 1. Distribución de los Casos Positivos de PCV2 y PRRSV

Código por Granja	Estado	Positivos a PCV2	Positivos a PCV2 / PRRSV	Tipo de explotación
1	Aragua	1	1	Ciclo Completo–Flujo Continuo
2	Carabobo	2	2	Ciclo Completo–Flujo Continuo
4	Yaracuy	1	0	Múltiples Sitios (Tres sitios)
9	Mérida	1	0	Ciclo Completo–Flujo Continuo

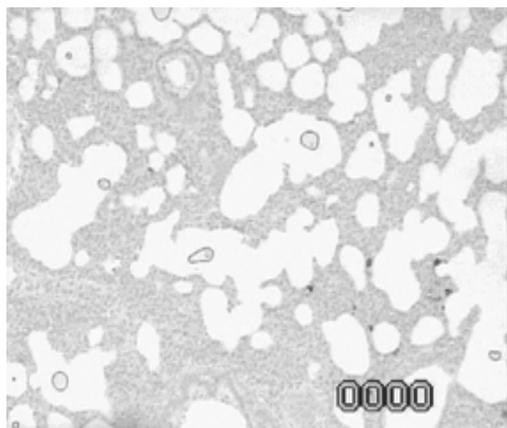


Figura 5. Micrografía digitalizada de pulmón: Inmunohistoquímica (IHQ) positiva para el PRRSV (marcaje color pardo), contraste con eosina. IHQ: 40x

Inmunohistoquímica (IHQ)

De los cinco cerdos diagnosticados con PMWS, en tres de ellos se detectó el antígeno del PRRSV en la prueba de IHQ. En todos los casos positivos el antígeno fue detectado en el pulmón, generalmente asociado a macrófagos alveolares, como puede observarse en la Figura 5. Esto coincide ampliamente por lo referido en la literatura (Magar *et al.*, 1993; Larochelle y Magar, 1995; Rossow *et al.*, 1996). Sólo en un caso, el antígeno viral fue detectado en placas de Peyer (Ileon-ciego).

Estos resultados, confirman lo señalado anteriormente sobre la presencia del PRRSV en Venezuela (Rolo *et al.*, 1998; Cano *et al.*, 2002; De Jesús, 2003).

Descripción de los casos de coinfección PCV2/PRRSV

En tres cerdos se detectó tanto el ácido nucléico del PCV2 por HIS como el antígeno del PRRSV mediante IHQ; sus edades fueron de seis semanas (1) y de ocho semanas (2) (Tabla 1). Estos animales, presentaron severo retraso en el crecimiento, depresión, disnea y

adenomegalia inguinal superficial. El caso 001 (lechón de granja ubicada en el Estado Aragua) presentó emaciación severa y el 002A (lechón de granja ubicada en el Estado Carabobo) palidez de la piel, signos clínicos que coinciden con lo reportado en la literatura (Harms *et al.*, 2001; Rovira *et al.*, 2002; Harms *et al.*, 2002). En ninguno de los casos se detectó ictericia como lo reseña Harms *et al.* (2001).

A la necropsia se observó ausencia de colapso pulmonar y presencia de zonas congestivas en la superficie pulmonar. El caso 002B (lechón de granja ubicada en el Estado Carabobo) presentó adenomegalia traqueobronquial, en concordancia con lo descrito por Harms *et al.* (2001); Rovira *et al.* (2002) y Harms *et al.* (2002). En dos de los cerdos (001 y 002B) se detectaron zonas de consolidación en los lóbulos apical e intermedio del pulmón y en el caso 002B una pleuritis leve, lo que posiblemente podría asociarse por la infección por agentes bacterianos secundarios.

Al estudio histopatológico, se diagnosticó neumonitis intersticial en los tres casos, aunque en uno de ellos (002B) se evidenció también una bronconeumonía catarral purulenta; observándose una depleción linfóide de leve a moderada. Estos dos hallazgos en pulmón y tejido linfóide se corresponden con los descritos con anterioridad (Harms *et al.*, 2001; Rovira *et al.*, 2002; Harms *et al.*, 2002).

CONCLUSIONES

La detección del ácido nucléico de PCV2, en cinco cerdos provenientes de cuatro granjas de cuatro estados de Venezuela, mediante la técnica de HIS permitió realizar el diagnóstico definitivo de PMWS al relacionarla con la presentación de signos clínicos y las lesiones microscópicas.

Se detectó el antígeno del PRRSV mediante la técnica de IHQ, en tres cerdos provenientes de dos granjas comerciales de dos estados de Venezuela.

Se evidenció que los cerdos puede estar infectados simultáneamente de forma natural con el PCV2 y el PRRSV bajo las condiciones de producción en el trópico.

Se evidenciaron los signos clínicos (retraso en el crecimiento, aumento de tamaño de los nódulos linfáticos inguinales superficiales y disnea), las lesiones macroscópicas (ausencia de colapso pulmonar y zonas congestivas en superficie pulmonar) y las lesiones microscópicas (depleción linfoide y neumonitis intersticial), características de coinfecciones por PCV2/PRRSV en el trópico.

Las lesiones hepáticas descritas pudiesen estar relacionadas con varios factores que estén interactuando en este órgano, como micotoxinas, tóxicos u otros virus, para lo cual se sugerirían estudios específicos a fin de establecer los agentes que pudieran estar relacionados con este hallazgo de Necropsia.

AGRADECIMIENTO

Al personal de la Unidad de Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinarias, UAB por el apoyo incondicional prestado durante la elaboración de la presente investigación. Así mismo, al personal de las Cátedras de Medicina Poblacional y Patología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV.

REFERENCIAS

Allan, G.M.; Kennedy, S.; McNeilly, F. 1999. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine

parvovirus. *J. Compared Pathol.*, 121:1-11.

Cano, J.P.; Utrera, V.; Fuentes, D.; Sogbe E.; Zannin, L. 2002. Some factors associated with the seroprevalence of PRRS in Venezuela. *Proceedings of 17th IPVS Congress*. Iowa – EUA. 2–5 Junio. 241p.

Carvalho, L.; Segalés, J.; Pijoan, C. 1997. Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on subsequent *Pasteurella multocida* challenge in pigs. *Vet. Microbiol.*, 55:241-246.

Clark, E.G. 1996. Pathology of post-weaning multisystemic syndrome of pigs. *Proceedings of the Western Canadian Association of Swine Practitioners*. pp: 22-25

De Jesús, A. 2003. Aislamiento e identificación genómica del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino en Venezuela. Trabajo de Grado. *Magíster Scientiarum*. FCV-UCV. 120 p.

Díaz, C.; Sogbe, E.; Ascanio, E.; Boulanger, A.; Rodríguez, C. 1999. Síndrome reproductivo y respiratorio porcino. Detección de antígeno tisular. Aspectos clínicos, anatomopatológicos y serológicos en los estados Aragua y Carabobo, Venezuela. *Rev. Cient. FCV-LUZ*, 9:215-222.

Done, S.; Paton, D. 1995. Porcine reproductive and respiratory syndrome: clinical disease, pathology and immunosuppression. *Vet. Rec.*, 136:32-35.

Ellis, J.; Hassard, L.; Clark, E.; Harding, J.; Allan, G.; Willson, P.; Stukalle, J.; Martin, K.; McNeilly, F.; Meehan, B.; Todd, D.; Haines, D. 1998. Isolation of circovirus from lesion of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can. Vet. J.*, 39:44-51.

Harding, J.C. 1996. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): preliminary epidemiology and clinical presentation. *Proceedings of the Western Canadian Association of Swine Practitioners*. p. 21.

- Harding, J.; Clark, E.; Strokappe, J. 1998. Postweaning multisystemic wasting syndrome: epidemiology and clinical presentation. *Swine Health Prod.*, 6: 249-254
- Harms, P.A.; Sorden, S.D.; Halbur, P.G. 2001. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Pathol.*, 38:528-539.
- Harms, P.A.; Halbur, P.G.; Sorden, S. 2002. Three cases of porcine respiratory complex associated with porcine circovirus type 2 infection. *J. Swine Health Prod.*, 10:27-30.
- Jones-Lang, K.; Bey, R.; Joo, H. 1997. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. *The Compendium on Continuing Education Food Animal*. 19:219-226.
- Krakovka, S.; Ellis, J.A.; Meehan, B. 2000. Viral wasting syndrome of swine: Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by co-infection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Vet. Pathol.*, 37:254-263.
- Larochelle, R.; Magar, R. 1995. Comparison of immunogold silver staining (IGSS) with two immunoperoxidase staining systems for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigens in formalin fixed tissues. *J. Vet. Diag. Investigation*, 7:540-543.
- Magar, R.; Larochelle, R.; Robinson, Y.; Dubuc, C. 1993. Immunohistochemical detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using colloidal gold. *Can. J. Vet. Res.*, 57:300-304.
- Quintana, J.; Segalés, J.; Rosell, C.; Calsamiglia, M.; Rodríguez-Arriola, M.; Chianini, F.; Folch, J.M.; Maldonado, J.; Canal, M.; Plana-Durán, J.; Domingo, M. 2001. Clinical and pathological observations on pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet. Rec.*, 149:357-361.
- Rodríguez-Arriola, M.; Segalés, J.; Rosell, C.; Quintana, J.; Ayllón, S.; Amprodón, A.; Domingo, M. 1999. Aujeszky's disease virus infection concurrent with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Vet. Rec.*, 144:152-153.
- Rolo, M.; López, N.; Palencia, L.; Sifontes, S.; Martínez, J.; Sandoval, A. 1998. The seroprevalence of porcine respiratory and reproductive syndrome in Venezuela. *Proceedings of the 15th IPVS Congress*. Birmingham, England. 314 p.
- Rosell, C.; Segalés, J.; Domingo, M. 2000. Hepatitis and the staging of hepatic damage in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. *Vet. Pathol.*, 37:687-692.
- Rossow, K. 1998. Review Article: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. *Vet. Pathol.*, 35:1-20.
- Rossow, K.; Benfield, D.; Goyal, S.; Nelson, E.; Christopher-Hennings, J.; Collins, J. 1996. Chronological immunohistochemical detection and localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in gnotobiotic pigs. *Vet. Pathol.*, 33:551-556.
- Rovira, A.; Balasch, M.; Segalés, J.; García, L.; Plana-Durán, J.; Rosell, C.; Ellerbrok, H.; Mankertz, A.; Domingo, M. 2002. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J. Virol.*, L76:3232-3239.
- Segalés, J.; Calsamiglia, M.; Rosell, C.; Soler, M.; Maldonado, J.; Martín, M.; Domingo, M. 2002. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection status in pigs naturally affected with post - weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain. *Vet. Microbiol.*, 85:23-30.
- Segalés, J.; Domingo, M.; Solano, G.; Pijoan, C. 1999. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Haemophilus parasuis* antigen distribution in dually infected pigs. *Vet. Microbiol.*, 64:287-297.

- Segalés, J.; Domingo, M. 2002. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Vet. Quarterl.*, 24:109-124.
- Sogbe, E.; Segalés, J.; Utrera, V.; Díaz, C.T.; Cano, J.P.; Rodríguez, C.; Ascanio, E.; Zerpa, H. ; Boulanger, A. 2002. Primer reporte de circovirus porcino en Venezuela. Congreso Latinoamericano de Porcicultura, Iguazú, Brasil. p. 63.
- Sorden, S.D.; Halbur, P.G. 2002. How and why we diagnose PMWS and circovirus infection. *Proceedings of PRRS and Type 2 Circovirus Workshop*. Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians. Kansas City, Ks. pp.33-37.
- Tischer, I.; Mielos, W.; Wolff, D.; Vagt, M.; Gren, W. 1986. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch. Virol.*, 91:271-276.