



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**COMPARACIÓN DEL PATRÓN DE SEROCONVERSIÓN CONTRA
CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2 (PCV-2) ENTRE CERDOS
VACUNADOS Y CERDOS INFECTADOS NATURALMENTE**

IZVARA ODETTE ALDUNCE FORTTES

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico
Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

PROFESOR GUIA: DR. SERGIO BUCAREY VIVANCO
SANTIAGO-CHILE
2012

Financiamiento Fondecyt 11110135



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

COMPARACIÓN DEL PATRÓN DE SEROCONVERSIÓN CONTRA CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2 (PCV-2) ENTRE CERDOS VACUNADOS Y CERDOS INFECTADOS NATURALMENTE

IZVARA ODETTE ALDUNCE FORTTES

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : SERGIO BUCAREY VIVANCO
PROFESOR CONSEJERO: HÉCTOR ADARMES
PROFESOR CONSEJERO: ULISES VERGARA

Agradecimientos

A toda la gran familia Forttes, ¡siempre conmigo!

A mi madre, Rosa Forttes, que espero tanto este momento, incentivándome día a día a concretar este proyecto, por su infinita paciencia y comprensión. A mi hermana, Scarlett, apoyándome toda la vida, gracias por tu guía y por la hermosa familia que nos has brindado. A mis tíos, María y Manuel, que me acogieron durante todos estos años lejos de mi casa, siempre apuntalándome con sus sabios consejos.

No puedo dejar de incluir a los que me ayudaron en la concreción de este proyecto, a mi profesor guía el Dr. Sergio Bucarey Vivanco, por su disposición a resolver siempre mis dudas, por brindarme su paciencia y guía. Del mismo modo agradezco al laboratorio Biovetec y los que allí trabajan por favorecer la realización de mi trabajo.

A mis amigos y compañeros por todos los años compartidos, por todos los gratos momentos vividos junto a ustedes que ayudaron a pavimentar el camino para que este momento finalmente llegase.

Siempre atesoraré los años vividos en mi Facultad, que me transformaron en una persona y futura profesional integral.

Mil gracias a todas las personas que contribuyeron a que todos estos años de estudio rindieran sus frutos.

RESUMEN

Las enfermedades asociadas a circovirus porcino tipo 2 (PCV-2) son consideradas el problema productivo y económico más grande de la industria porcina mundial. Además de mejorar la gestión y las prácticas de manejo (mejor higiene, menor hacinamiento y mejor ventilación), la disponibilidad de vacunas anti-PCV-2 representa la opción inmunológica más eficaz para paliar el impacto de estas enfermedades.

Para el presente estudio y con la finalidad de estudiar el patrón de seroconversión contra PCV-2 entre cerdos vacunados con una vacuna comercial versus cerdos infectados naturalmente, se montó un ensayo de ELISA indirecto, usando como sustrato específico una versión recombinante de la subunidad proteica involucrada con el ensamblaje de la cápside viral (Cap). De estos análisis se concluyó, en primera instancia, que dicha estructura pudo ser reconocida en forma específica tanto por los sueros de los animales vacunados como no vacunados infectados naturalmente, analizados a distintos periodos de tiempo: 30, 50, 70, 90, 110 y 130 días, siendo posible analizar el patrón de seroconversión IgM/IgG anti-PCV-2 en dichos animales.

En este estudio se concluye que el efecto diferenciador de la prueba montada de ELISA indirecto entre animales vacunados o no vacunados, depende si es que el animal cuenta o no con inmunidad de base materna anti-PCV-2, pudiendo ser esta una condición interferente con la vacunación temprana. Así, fue posible organizar y dividir los datos del patrón de seroconversión IgM/IgG anti-PCV-2 bajo cuatro escenarios distintos de resultados: 1, animales vacunados con baja inmunidad de base; 2, animales vacunados con alta inmunidad de base; 3, animales no vacunados con alta inmunidad de base y 4, animales no vacunados con baja inmunidad de base.

Si bien en el presente estudio la determinación de la presencia de anticuerpos totales contra PCV-2, no resultó ser útil para diferenciar anticuerpos neutralizantes, los resultados presentados y discutidos en esta memoria son de utilidad para evaluar el *status* de seroconversión general contra PCV-2 de un plantel nacional de producción porcina.

ABSTRACT

PCV-2-associated diseases are considered to be the biggest economic problem of the pig industry worldwide. In addition to improved management and husbandry practices (better hygiene, less overcrowding and better ventilation), the availability of several anti-PCV-2 vaccines represents an efficient immunological option to blunt the disease's impact.

At present study the main goal was to study the seroconversion pattern against PCV-2 between pigs vaccinated with a commercial vaccine versus naturally-infected pigs. It mounts an indirect ELISA test, by using as specific antigen a recombinant version of the subunit protein involved on the assembly of the viral capsid (Cap). From these analyses it was concluded, in the first glance, that the structure mentioned above could be recognized in specific form by the serum from both vaccinated and not vaccinated animals sampled (infected naturally) at different time-points: 30, 50, 70, 90, 110 and 130 days, being possible to analyze the seroconversion pattern IgM/IgG anti-PCV-2 among the mentioned animals.

This study concludes that the serologic differences by indirect ELISA between vaccinated or not vaccinated animals, it depends on if the animal presents or not a basal maternal immunity anti-PCV-2, being this a possible interfering condition with the response upon vaccination. Therefore, was possible to organize and to divide the information of the serconversion pattern IgM/IgG anti-PCV-2 under four different results: 1, animals vaccinated with low basal immunity; 2, animals vaccinated with high basal immunity; 3, animals not vaccinated with high basal immunity and 4, animals not vaccinated with low basal immunity.

Although at present study the determination of the presence of total antibodies against PCV-2 is not useful to differentiate neutralizing antibodies, the results presented and discussed in this memory are of usefulness to evaluate the general status of seroconversion patterns against PCV-2 in a national pig-producer farm.

ÍNDICE

Introducción.....	1
Revisión Bibliográfica.....	3
Hipótesis.....	18
Objetivo General:	18
Objetivos Específicos:	18
Materiales y Métodos:	19
1-Obtención de las Muestras.....	19
2- Preparación del antígeno recombinante, Cap-his.....	19
3- Electroforesis SDS-PAGE de la proteína recombinante Cap-6xhis.....	21
4- Evaluación de la inmunoreactividad de la proteína recombinante Cap por medio de Western blot.....	22
5-Ensayo de ELISA indirecto.....	23
6- Análisis de resultados.....	24
Resultados.....	26
1- Purificación del antígeno recombinante, Cap-His	26
2- Evaluación de la inmunoreactividad de la proteína recombinante Cap por medio de Western blot.....	28
3- Análisis de ELISA indirecto utilizando como antígeno la proteína recombinante de PCV2.....	30
Discusión	35
Conclusiones.....	40
Bibliografía.....	41

INTRODUCCIÓN

El crecimiento de la producción de carne de cerdo en la última década, en nuestro país, es notable, pasando desde poco más de 260 mil toneladas en el año 2000 a duplicar dicha cifra en el 2010.

El progreso de la industria porcina ha dependido del constante mejoramiento genético y de los sistemas de manejo y sanitarios de los animales. Actualmente, la amenaza constantes de enfermedades de etiología multifactorial se ha convertido en una de las principales preocupaciones de los productores y las autoridades sanitarias, debido a sus efectos devastadores.

Es en este contexto que, el Síndrome de Desmedro Multisistémico Postdesdete (PMWS del inglés, “*Postweaning Multisistemic Wasting Syndrome*”) es reconocida como una enfermedad epidémica de distribución mundial. El PMWS se describió por primera vez en 1991 en granjas de Canadá y, pocos años después, en 1996, se logró asociar esta enfermedad, que afecta a cerdos en transición, con el Circovirus Porcino tipo 2.

El PMWS es caracterizado principalmente por pérdida progresiva de peso, deterioro general de la condición corpórea y efectos inmunosupresores severos. De esta manera, PCV-2 se asocia de manera adicional a otras enfermedades y síndromes porcinos, como la falla reproductiva, enfermedad del complejo respiratorio, tremor congénito, síndrome de dermatitis y nefropatía porcina, traqueítis necrotizante y epidermitis exudativa (en conjunto con otros agentes virales y bacterianos concomitantes). Actualmente estas enfermedades son colectivamente conocidas como PCVAD o enfermedades asociadas a circovirus porcino, de forma de agrupar a todas las enfermedades atribuidas al Circovirus Porcino tipo 2, incluida el PMWS.

Hoy en día, el PCV-2 es considerado un virus muy ubicuo en la población de cerdos y la infección no necesariamente equivale a enfermedad, lo que provoca que el virus persista dentro del plantel gracias a la presencia de animales portadores asintomáticos. En consecuencia, la seroprevalencia de contra PCV-2 es generalmente cercana al 100%.

A nivel mundial se han utilizado diversos métodos de diagnóstico para PCV-2. Entre ellos, se cuenta la detección de anticuerpos contra PCV-2 mediante diversas técnicas como la de Inmunofluorescencia Indirecta (IIF, del inglés *Indirect Immunofluorescence*) y el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Para la técnica de ELISA se ha utilizado frecuentemente la proteína de la cápside viral (codificada por el ORF2, del inglés *Open Reading Frames 2*) como sustrato específico.

Utilizando la técnica de ELISA, es que esta memoria pretende contribuir para que, a nivel nacional, se logre establecer un marcador serológico que permita distinguir entre cerdos vacunados y cerdos sanos naturalmente infectados con PCV-2

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Reseña histórica del Circovirus Porcino (PCV)

En 1974, fue descrito en Alemania, un nuevo virus sin efecto citopatogénico, contaminante de la línea celular de riñón de cerdo PK-15, y que se designó, inicialmente, como *picornavirus-like* (Tischer *et al.*, 1974). Se definió como un virus RNA, con un diámetro de 17 nm, gradiente de densidad de 1,37 g/ml en Cloruro de Cesio (CsCl) y termoestable (Rodríguez-Arriola, 2002).

Años más tarde, se demostró que este virus es pequeño, sin envoltura, de simetría icosaédrica y, contrariamente a lo que se creía, presentaba un genoma de DNA circular, como consecuencia de lo cual se denominó como Circovirus Porcino (PCV) (Tischer *et al.*, 1982).

Durante la década de los 80 el virus fue considerado como no patogénico, aunque ubicuo en la naturaleza, ya que, a pesar de que cerdos en diferentes partes del mundo presentaban anticuerpos anti-PCV, los animales no evidenciaban signos clínicos asociados (Tischer *et al.*, 1986; Allan *et al.*, 1995).

Por otra parte, en el año 1991 en Canadá, fue descrita una extraña enfermedad de signos inespecíficos que afectaba a cerdos postdestete, a la que se le denominó como Síndrome Multisistémico de Desmedro Postdestete (PMWS, del inglés *Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome*) (Harding y Clark 1997; Harding *et al.*, 1998).

Recién en 1997, se establece la conexión entre el PMWS y el PCV, puesto que, por primera vez, se logró aislar el circovirus porcino a partir de tejidos de cerdos muertos por PMWS, utilizando un cultivo celular PK15 libre de PCV (Allan *et al.*, 1998; Ellis *et al.*, 1998). Estudios posteriores de secuenciación genómica demostraron que el genotipo de PCV presente en cerdos afectados con PMWS era diferente al genotipo de PCV que contaminaba la línea celular PK-15 (Hamel *et al.*, 1998; Meehan *et al.*, 1998). Hasta ese momento el PCV estaba clasificado por el Comité Internacional Taxonómico de Virus (ICTV) en una única familia de virus, la *Circoviridae* (Lukert *et al.*, 1995). Luego de estos

estudios se sugirió la denominación de PCV tipo 1 (PCV-1) para el circovirus asociado a la línea celular PK-15, considerado apatógeno, y PCV tipo 2 (PCV-2) para el circovirus asociado a PMWS (Allan *et al.*, 1998; Meehan *et al.*, 1998). Actualmente se reconoce al PCV-1 y al PCV-2 como dos diferentes especies del género Circovirus (International Committee of Taxonomy of Viruses, 2011).

Además de PMWS, también se han asociado otras enfermedades a PCV-2, como el Síndrome de dermatitis y nefropatía porcino (PDNS, del inglés *Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome*) o el Síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRDC, del inglés *Reproductive failure and porcine respiratory disease complex*). Por ello se ha propuesto la nomenclatura de “enfermedades asociadas a circovirus porcino” (PCVAD, del inglés *Porcine circovirus associated diseases*) para agrupar todos los síndromes asociados a PCV-2, nombre que la Asociación Americana de Veterinarios de Porcinos (AASV) recomendó en marzo de 2006 para agrupar a todas las enfermedades atribuidas al Circovirus Porcino tipo2, incluida el PMWS.

Hoy en día, se estima que, el Circovirus porcino (PCV-2) provoca pérdidas económicas valoradas en €900 millones por año en la Unión Europea, mientras que en USA alcanzaría valores de 6,6 USD por animal.

Es por ello que, han surgido variadas vacunas a nivel mundial. En el país, se ha utilizado la vacuna *Ingelvac*® de Boehringer, bajo permiso especial del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) desde el año 2008 (Chile Servicio Agrícola y Ganadero, 2009)

2. Taxonomía

Los Circovirus porcinos (PCVs) son miembros de la familia *Circoviridae*. Todos los virus asociados a esta familia comparten características comunes como simetría icosaédrica, DNA circular simple y ausencia de envoltura. Según su organización genómica la familia *Circoviridae* se divide principalmente en dos géneros: el *Circovirus* (por su DNA circular) y el *Gyrovirus* (derivado del griego *gyrus*, que significa “anillo” o “circulo”)

El género *Circovirus* agrupa once especies que, en la actualidad asocian principalmente a enfermedades que atacan a aves, entre ellas el virus de la enfermedad del pico y de las plumas de las psitácidas (BFDV) (Ritchie *et al.*, 1989). Sin embargo, dentro de este grupo también se encuentra al PCV-1 y el PCV-2. Mientras que el género *Gyrovirus* tiene una única especie, el virus de la anemia infecciosa aviar (CAV) (Todd, 1990) (Fig. 1).

También se ha logrado describir un virus humano, el TT virus (*Transfusion Transmitted Virus*), que presenta una estructura similar a los circovirus, y que se encuentra asociado a transfusiones sanguíneas en pacientes con hepatitis. A pesar de ello, su patogenicidad no ha podido ser aclarada, ya que se ha detectado también en pacientes sanos.

A continuación, se presenta un esquema de las once especies que agrupa el género *Circovirus* y la comprendida en el género *Gyrovirus*.

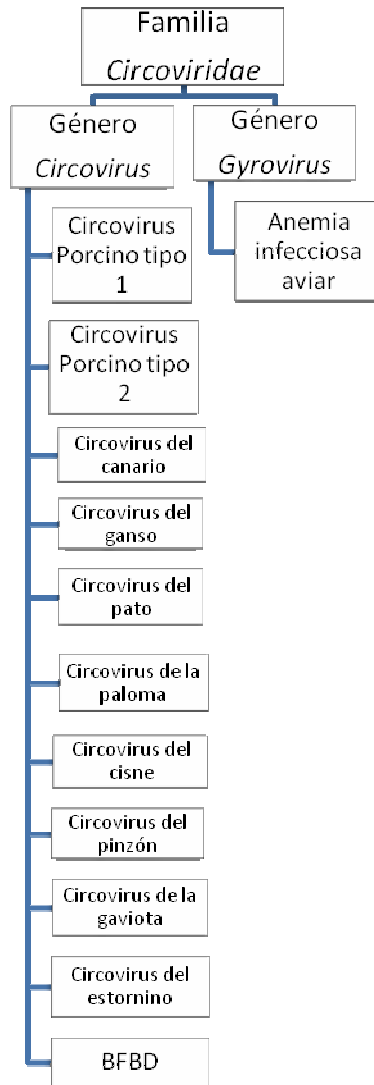


Fig 1. Géneros y especies incluidas en la familia *Circoviridae* (International Committee of Taxonomy of Viruses, 2011).

3. Organización genómica

Estudios de secuenciación han permitido determinar que el genoma de PCV-1 contiene 1759 nucleótidos, mientras que el PCV-2 contiene 1767-1768 nucleótidos de largo. A pesar de esta similitud, se ha determinado que el PCV-2 tiene solamente alrededor de 68-76% de identidad nucleotídica con el apatógeno PCV-1. Probablemente las inserciones y/o deleciones ocurridas en sus genomas son determinantes de su diferente patogenicidad (Hamel *et al.*, 1998; Meehan *et al.*, 1998; Mankertz *et al.*, 2000).

Estudios realizados en distintos aislados de PCV-2 demuestran variaciones en su genoma, según el origen geográfico de los aislados (Feneaux *et al.*, 2000). Sin embargo, hasta la fecha no existe una asociación clara de subgenotipos específicos con enfermedad o área geográfica (Olvera *et al.*, 2007). De esta forma, se ha observado entre un 95-99% de identidad nucleotídica entre los distintos aislados de PCV-2 alrededor del mundo, tanto en cerdos sanos como enfermos (Feneaux *et al.*, 2000; Mankertz *et al.*, 2000).

Recientemente se han realizado, análisis filogenéticos que indican que al menos existen dos secuencias de subgenotipos diferenciados de PCV-2. Además, se ha sugerido la variación de patogenicidad entre cepas de PCV-2, siendo las cepas del subgenotipo 1 potencialmente más virulentas que las del subgenotipo 2 (Centre de Recerca en Sanitat Animal, 2012).

Las últimas evidencias señalan que cepas originarias de Nueva Zelanda, Tailandia y el Reino Unido poseen sólo la secuencia nucleotídica perteneciente al grupo 1. Mientras que cepas de Japón, Canadá, España, Taiwán y Sudáfrica poseen sólo la secuencia de grupo 2. En contraste, cepas provenientes de Corea, Francia, Hungría, Austria, Alemania, Brasil y Estados Unidos comparten secuencias nucleotídicas de ambos grupos (Dong-jun *et al.*, 2007).

Dentro de este marco, se observa que el PCV-2 es un virus muy ubicuo en la población de cerdos y la infección no necesariamente equivale a enfermedad, en consecuencia, la seroprevalencia de contra PCV-2 es generalmente cercana al 100%.

El genoma de los PCV se caracteriza por contener al menos seis regiones codificantes o marcos de lectura abierta (*Open reading frames* u ORF) (Meehan *et al.*, 1998) y una región que contiene secuencias de nucleótidos no codificante para proteínas, la cual regula la transcripción y la replicación del virus (Hamel *et al.*, 1998). El ORF-1 y el ORF-2 son los genes principales. En general ORF-1 es altamente conservado entre PCV-1 y PCV-2 (Morozov *et al.*, 1998), cumple la función de codificar para un complejo de proteínas (replicadas) indispensables para la replicación del ADN viral: Rep y Rep` (Mankertz y Hillebrand, 2001). ORF-2 es más variable entre ambos virus con sólo un 67% de identidad nucleotídica entre ellos (Morozov *et al.*, 1998) y es el responsable de la codificación de la proteína involucrada con el ensamblaje de la cápside viral (Cap) (Nawagitgul *et al.*, 2000). En el año 2005 se demostró que un tercer ORF denominado ORF-3, si bien no es indispensable para la replicación *in vitro* de PCV-2, juega un papel importante en inducir la apoptosis vía caspasas (Lui *et al.*, 2005; Karuppanan *et al.*, 2009). La similitud global entre las secuencias de los ORFs de diferentes aislados de PCV-2 analizados fue aproximadamente del 90% (Fenaux *et al.*, 2000).

4. Ciclo de replicación viral

La unión del virus a la células del hospedero es mediada por glicosaminglicanos como heparán sulfato y dermatán sulfato (Misinzon *et al.*, 2006; Tischer *et al.*, 1987).

La replicación inicial de PCV-2 ocurre en órganos linfoides cercanos al sitio de infección. De este modo el virus se distribuye a través del sistema linfático, y se ha detectado en linfonodos, tonsilas, bazo y también en células presentes en estos sitios como linfocitos B. Sin embargo, la replicación ocurre principalmente en linfocitos T y en células mononucleares de sangre periférica (Yu *et al.*, 2007).

La viremia comienza, experimentalmente, entre los 7 a los 14 días post-inoculación, etapa en que el virus puede ser detectado en las heces. Del mismo modo ha sido posible probar la presencia del virus en orina, saliva y secreciones oculares (Krakowka *et al.*, 2000; Calsamiglia *et al.*, 2001).

5. Patogénesis

Las infecciones por PCV-2 han sido prevalentes en porcinos domésticos en todo el mundo desde algunas décadas y comúnmente el virus se encuentra endémicamente presente en todos los países con industria porcina intensiva (Nauwynck *et al.*, 2007). Sin duda, su rápida propagación se debe a que la transmisión es vía horizontal, por contacto directo, siendo considerada la vía oro-nasal la ruta más frecuente de infección entre animales infectados y susceptibles (Segalés, *et al.*, 2005). Sin embargo, el virus ha sido detectado además, en la cavidad nasal, tonsilas, secreciones bronquiales, heces y orina, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Calsamiglia, *et al.*, 2004). También se ha sugerido la posible transmisión vertical del virus, ya que el PCV-1 ha logrado ser aislado de lechones neonatos procedentes de madres que habían sufrido problemas reproductivos (Allan *et al.*, 1995; Park *et al.*, 2005). Además, experimentalmente se ha detectado excreción de PCV-2 en semen de verracos previamente inoculados con PCV-2 (Larochelle *et al.*, 2000). No obstante, se desconoce si la cantidad de PCV-2 presente en semen pueden realmente producir la infección de las cerdas, ya sea por monta natural o por inseminación artificial (Larochelle *et al.*, 2000). La mayor concentración del virus se encuentra en el fluido seminal de la fracción no espermática (Kim *et al.*, 2001). El patrón de excreción del virus en el semen es esporádico pero persistente. Aparentemente la presencia del virus no altera la morfología ni la sobrevivencia de los espermatozoides (McIntosh *et al.*, 2006).

Desde un punto de vista experimental, la seroconversión ocurre entre los 14 y 28 días post-infección (PI), no exhibiendo diferencias entre cerdos afectados subclínicamente con PCV-2 y cerdos cursando con PMWS. Estudios de campo han demostrado que la seroconversión generalmente es detectada entre las 7 y 12 semanas de edad, como máximo hasta las 28 semanas (Krakowka *et al.*, 2000).

6. Respuesta inmune a PCV-2

Las alteraciones observadas en las células del sistema inmune, sugieren que los cerdos afectados con circovirus presentan una inhabilidad (probablemente transitoria) para montar una respuesta inmune humoral o celular efectiva (Segalés *et al.*, 2005). Las evidencias indican que el PCV-2 es capaz de modular el sistema inmune en su propio beneficio. Esto implica, que el virus entorpece la rápida detección de una potencial amenaza patogénica por parte del sistema inmune innato del hospedero (Vincent *et al.*, 2005; Vincent *et al.*, 2006).

Dentro de las células del sistema inmune innato, se encuentran aquellas con capacidad para presentar antígenos, como las células monocíticas (células dendríticas, monocitos, macrófagos). En ellas se ha demostrado que la infección con PCV-2, no produce efectos citopáticos, pero sí se altera la capacidad de las células para reconocer como señal de peligro patrones moleculares propios del agente infeccioso (PAMP's, del inglés *Pathogen-associated molecular patterns*) (Vincent *et al.*, 2003; Vincent *et al.*, 2005). Además, se han descrito alteraciones con su distribución en los tejidos de cerdos afectados con PMWS. Por lo tanto, a pesar de permanecer viables, presentan antígenos virales en el núcleo y citoplasma celular, resultando una asociación persistente de estas células con el virus (Darwich *et al.*, 2004; Gilpin *et al.*, 2003).

Por otra parte, no existe evidencia que el PCV-2 pueda infectar linfocitos. Esporádicamente se ha podido demostrar una asociación del virus con los linfocitos; generalmente los linfocitos positivos a PCV-2 desaparecen a medida que el animal crece. Esta pérdida de linfocitos positivos a PCV-2 podría deberse a la linfopenia de células B y T con la que cursan los animales que sufren de PMWS, resultando en la remoción de las células positivas. En animales con infección asintomática los linfocitos positivos a PCV-2 son raros, por el contrario, en estos animales generalmente es posible evidenciar antígeno viral en macrófagos y células dendríticas, donde el virus permanece aparentemente viable (Chianini *et al.*, 2003; Darwich *et al.*, 2004; McCullough *et al.*, 2007).

7. Enfermedades asociadas a PCV-2 (PCVAD)

El PCV-2 se asocia, además del ya mencionado PMWS, con otros síndromes que afectan al cerdo, incluyendo el Complejo Respiratorio Porcino (PRDC, del inglés *Porcine Respiratory Disease Complex*) (Kim *et al.*, 2003), la Neumonía necrótica y proliferativa, problemas reproductivos en cerdas gestantes y miocarditis perinatal (West *et al.*, 1999), Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina (PDNS, del inglés *Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome*) (Allan *et al.*, 2000; Rosell *et al.*, 2000), Enteritis granulomatosa, Linfadenitis Necrótica, Encefalitis; en conjunto con otros agentes víricos como Parvovirus, PRRSV (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus*), Influenza, Aujeszky y bacterianos como *Mycoplasma pneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* y *Pastereulla multocida* (Allan *et al.*, 1999; Allan *et al.*, 2004; Harms *et al.*, 2001; Krakowka *et al.*, 2000). Actualmente estas enfermedades y otras que probablemente se descubrirán, se conocen como PCVAD (del inglés, *Porcine Circovirus Associated Diseases*), nombre que la Asociación Americana de Veterinarios de Porcinos (AASV) recomendó en marzo de 2006 para agrupar a todas las enfermedades atribuidas al Circovirus Porcino tipo 2, incluido el PMWS.

8. Síndrome de Desmedro Multisistémico Postdestete (PMWS)

El PMWS es la principal patología asociada a PCV-2 a nivel mundial, siendo prevalente en porcinos domésticos de todo el mundo desde hace algunas décadas. Debido a que el virus se encuentra endémicamente presente en todos los países con industria porcina intensiva (Nauwynck *et al.*, 2007), para un gran número de productores y veterinarios a nivel mundial, esta patología representa uno de los mayores problemas tanto para lograr una óptima producción, como para la salud y el bienestar animal.

Debido a que este síndrome fue caracterizado por pérdida progresiva de condición corporal asociada con lesiones en diferentes órganos, diversos autores propusieron el término Síndrome de Desmedro Multisistémico Postdestete para describir la condición clínica de la enfermedad.

La patología afecta fundamentalmente a cerdos de entre ocho y trece semanas de edad (Clark *et al.*, 1997). Esto se asocia a la inmunidad pasiva contra el virus proporcionada por los anticuerpos maternos, transmitidos vía calostro y se prolonga entre las seis y doce semanas de edad. Sin embargo, no todos los lechones se encuentran protegidos contra el PMWS, debido a dos razones fundamentales: el bajo nivel de anticuerpos transmitidos por la cerda y a que no todos los anticuerpos son neutralizantes contra la infección (Calsamiglia, *et al.*, 2007).

La morbilidad varía entre un 5 y 10%, pudiendo alcanzar a más del 50%. La mortalidad de la enfermedad es variable, pudiendo oscilar entre el 4 y el 20%, aunque esporádicamente puede alcanzar hasta el 60% (Allan y Ellis, 2000).

Los signos clínicos de este síndrome son variables y dependen principalmente del estado inmune y predisposición genética del hospedero, así como de factores medioambientales concomitantes. De hecho la gravedad del PMWS parece estar estrechamente relacionada con problemas de manejo tales como la introducción de animales de diferentes orígenes en un mismo rebaño, la alta densidad de cerdos por corral y problemas de ventilación (Hamel *et al.*, 2000).

Los primeros signos suelen ser inespecíficos y pueden conducir a errores diagnósticos, luego que la enfermedad progresa se manifiesta la signología más agresiva. Entre los signos clínicos de cerdos afectados se cuenta pérdida progresiva de peso, palidez corporal, aumento del tamaño de los ganglios linfáticos y, en algunas ocasiones, diarrea e ictericia acompañados, además, de diversos trastornos respiratorios (Harding *et al.*, 1997; Morozov *et al.*, 1998). A nivel productivo estas alteraciones repercuten en una disminución en la ganancia media diaria, aumento de los gastos sanitarios y una clara pérdida de homogeneidad entre lotes.

Las principales lesiones histopatológicas del PMWS se encuentran en los órganos linfoides, entre ellos los linfonodos inguinal, submandibular, mesentérico, mediastinal (Rosell *et al.*, 1999). También se han reportado lesiones en hígado, páncreas, estómago, intestino delgado y ciego, pero los órganos lesionados varían entre los animales afectados o entre granjas. (Gilpin *et al.*, 2003). Los cerdos afectados presentan una depleción linfoide

generalizada con infiltración histiocitaria y células gigantes multinucleadas, además, se observa neumonía intersticial granulomatosa, hepatitis, nefritis y pancreatitis (Allan *et al.*, 2000; Ellis *et al.*, 1998; Harding *et al.*, 1997).

El mecanismo de patogénesis de PCV-2 y su asociación PMWS no se encuentra claramente entendido. Se conoce que el virus tiene tropismo por células dendríticas, sin embargo no produce efecto citopático en ellas ni en linfocitos; por otra parte, tampoco se ha comprobado que pueda existir transmisión desde células dendríticas afectadas a los linfocitos (Vincent *et al.*, 2003). Se ha sugerido que el virus sacaría más bien “ventaja” de los mecanismos de fagocitosis y fusión de macrófagos para pasar de célula en célula, ya que no poseería capacidad replicativa en estas células (Krakowka *et al.*, 2002).

La ausencia de evidencia de que PCV-2 pueda infectar linfocitos, en contraste con estudios que demuestran la asociación con mayor frecuencia a células monocíticas (monocitos, macrófagos y células dendríticas) en conjunto con otros datos, ha llevado a concluir que la depleción linfoide es producida por una vía indirecta, supuestamente por una desregulación (inhibitoria) de las señales inmunomoduladoras a nivel de células dendríticas productoras de interferón α (IFN- α), generando una inmunosupresión por pérdida de la conexión existente entre el sistema inmune innato y adquirido del hospedero (Vincent *et al.*, 2007; Rosell *et al.*, 1999). Otros estudios también confirman esta teoría, indicando que el PCV-2 provocaría una disminución en la expresión de citoquinas como la IL-4 (actúa como factor de crecimiento de linfocitos B), IL-2 (factor de activación de macrófagos) y aumentaría la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-1 y IL-8 (Darwich *et al.*, 2003).

Ante tal desregulación del sistema inmune, algunos autores sostienen que el desarrollo de PMWS, no sólo depende de la infección con PCV-2, sino que deben presentarse concomitantemente otros virus como el Parvovirus Porcino (PPV) o el virus causante del Síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), los que serían necesarios para desencadenar la totalidad de los signos clínicos característicos (Krakowka *et al.*, 2000; Harms *et al.*, 2001; Opriessnig *et al.*, 2003). Es así, como en inoculaciones experimentales de PCV-2, resultan muchas veces, en infecciones asintomáticas con medianas a moderadas lesiones histopatológicas; en contraste con coinfecciones

concomitantes con los virus anteriormente mencionados, en que se potenciaría la replicación y la distribución del PCV-2 y la manifestación total del PMWS (Ladekjaer-Mikkelsen, *et al.*, 2002).

9. Diagnóstico de PCV-2

Existen diversos métodos para identificar la presencia del virus en el plantel, éstos van desde la observación de cerdos con signos típicos de desmedro comparado con otros en la misma etapa productiva, hasta métodos de diagnóstico de laboratorio, como el aislamiento del virus o serodiagnóstico a través del Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*).

Dependiendo de la virulencia del virus, así como factores medioambientales o de inmunidad pasiva en los individuos, existen dos escenarios posibles a nivel del plantel: que se produzca un aumento en la tasa de mortalidad, con cerdos que exhiban signos clínicos característicos, acompañados de lesiones histopatológicas típicas (depleción / inflamación granulomatosa) en linfonódulos (inguinales superficiales / mesentéricos) ó, lo que ocurre en la mayoría de los casos, en que las granjas son seropositivas a PCV-2, pero no exhiben signos clínicos de PMWS. Al ser la mayor parte de los animales portadores asintomáticos, se hace necesario el uso de métodos de diagnóstico de laboratorio de alta sensibilidad y especificidad para poder evaluar el estado sanitario de un plantel.

Entre los métodos diagnósticos se cuenta la técnica de Inmunohistoquímica (IH); este es un estudio histopatológico que se basa en la utilización de un anticuerpo específico contra PCV-2, previamente marcado mediante un enlace químico con una enzima que puede transformar un sustrato visible, sin afectar la capacidad del anticuerpo para formar un complejo con el antígeno, aplicado a una muestra de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina (Allan y Ellis, 2000). De este modo, se logra la identificación de marcadores antigénicos característicos en distintas líneas de diferenciación y función celular. Algunos estudios concluyen que esta técnica posee alta sensibilidad, es específica, económica, rápida y sencilla.

El aislamiento de PCV-2, por otro lado, se realiza por inoculación de macerados de muestras sospechosas sobre cultivos primarios de macrófagos y líneas celulares sensibles de riñón de cerdo, PK15, asegurándose que éstas no se encuentran infectadas con PCV-1. Además se han utilizado células de testículo de cerdo y de la línea celular Vero (células de riñón de mono) (Tischer, *et al.*, 1982). Como los circovirus no producen efecto citopático, la replicación viral se observa mediante el empleo de técnicas de detección viral, principalmente inmunohistoquímica o PCR.

La detección de ácidos nucleicos de PCV-2 en muestras sospechosas, utilizando la técnica de PCR ha sido altamente utilizada como método diagnóstico (Hamell, *et al.*, 1998). Esta técnica es rápida, específica y permite realizar un diagnóstico fiable de la presencia de PCV-2 así como llevar a cabo los estudios epidemiológicos a gran escala, que están permitiendo conocer la incidencia real de este virus entre la población porcina. Sin embargo, su alta sensibilidad limita su uso como herramienta diagnóstica de patógenos endémicos, que como PCV-2 con frecuencia cursan de forma subclínica.

La técnica de Hibridación in situ (HIS) se realiza de forma similar a la IH, pero es capaz de detectar una mayor cantidad de células positivas (McNeilly, *et al.*, 1999), utilizando sondas DNA específicas que hibridan con fragmentos de genoma presentes en muestras sospechosas de contener PCV-2.

Por otra parte, la detección de anticuerpos contra PCV-2 se puede realizar mediante diversas técnicas como son la técnica de Inmunoperoxidasa en monocapa de células (IPMA, del inglés *Immunoperoxidase Monolayer Assay*), Inmunofluorescencia Indirecta (IFI, del inglés *Indirect Immunofluorescence*) y Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Para la técnica de ELISA se utiliza la proteína de la cápside viral (codificada por el ORF2, del inglés *Open Reading Frames 2*) como sustrato específico (Balasch *et al.*, 1999; Nawagitgul *et al.*, 2002)

Como ya se mencionó el PCV-2 es un virus altamente ubicuo, motivo por el que la seroprevalencia es generalmente cercana al 100% (Allan, *et al.*, 1998). Por esto, la serología no ha sido el método de elección en el diagnóstico de infección de PCV-2, pero es altamente útil para determinar el momento en que ocurre la seroconversión en los cerdos

y para evaluar el correcto funcionamiento de las medidas de control, como vacunación, tomadas a nivel del plantel.

10. Prevención y Control

Desde los últimos años, se ha discutido ampliamente el rol esencial de la prevención para controlar la infección. A partir de la publicación del Dr. François Madec y la implementación de lo que hoy en día se conoce como el plan de 20 pasos de Madec (Madec, *et al.*, 2000), correspondiente a una serie de medidas de manejo que buscan disminuir el impacto de la enfermedad, es que las medidas de bioseguridad han pasado a ser un factor clave en el correcto manejo de la infección, no sólo por PCV-2, sino que por prácticamente cualquier patógeno.

La falta de existencia de tratamientos, la resistencia a desinfectantes tradicionales, la ubicuidad de la infección hace del virus un agente difícil de erradicar desde los predios infectados, haciendo de medidas como la reducción en el estrés y mejoramiento de las condiciones de higiene, las alternativas valederas para mantener a raya la infección.

Sin embargo, actualmente se cuenta con cuatro vacunas anti-PCV-2 disponibles en el mercado, *Ingelvac* de Boehringer; *Suvaxyn* de Fort Dodge; *Circovac* de Merial y *Circumvent* de Intervet, las que han logrado la protección de lotes de cerdos, demostrando sobretodo mitigación de signos clínicos y disminución de la mortalidad, aunque los resultados no son totalmente concluyentes.

En general, estas vacunas son basadas en quimeras de versiones atenuadas del virus completo, como *Suvaxyn* de Fort Dodge, o subunidades proteicas recombinantes de la proteína de la cápside (ORF2) en vectores virales como el *Baculovirus*, en el caso de las vacunas de Boehringer Ingelheim e Intervet.

Desde hace un tiempo, la proteína de la cápside viral se ha convertido en blanco principal para el desarrollo de métodos diagnósticos y vacunas, ya que se ha demostrado que la proteína de la cápside (Cap) (233aa, 30 kDa) es un antígeno muy específico del PCV-2 y posee tres epítomos muy antigénicos identificados entre los residuos 47-85, 165-200 y 230-233 (Balasch *et al.*, 1999; Nawagitgul *et al.*, 2002).

La producción de proteínas recombinantes, es decir, que son producidas a partir de material genético proveniente de distinto origen, permite la modificación o mantención de rasgos conformacionales presentes en la proteína original. Para la producción de antígenos virales con fines biotecnológicos, es esencial que las proteínas recombinantes resultantes tengan características conformacionales similares a las del virus de campo. Para esto deben ser producidas, preferentemente, por organismos los cuales le otorguen un plegamiento y modificaciones postraduccionales adecuadas (Allnutt *et al.*, 2007).

Diversos trabajos de investigación en distintos países, han expresado las subunidades proteicas de la proteína de la cápside en baculovirus o cepas de *E. coli* BL21 para el desarrollo de métodos serodiagnósticos y vacunas.

Del mismo modo, es que en esta memoria se busca, validar un test de ELISA utilizando una versión recombinante de dicha proteína y llegar a establecer un patrón de seroconversión diferencial contra PCV-2 entre cerdos vacunados versus cerdos infectados naturalmente.

HIPÓTESIS

A través de un ensayo de ELISA indirecto dirigido contra la proteína de la cápside viral de PCV-2, es posible caracterizar el patrón de seroconversión contra PCV-2 en cerdos vacunados versus cerdos infectados naturalmente y establecer un marcador serológico que diferencie ambas condiciones.

OBJETIVO GENERAL

Establecer el patrón de seroconversión contra PCV-2, a través de ELISA indirecto, en cerdos vacunados y cerdos infectados naturalmente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Montar un ensayo de ELISA indirecto contra PCV-2 utilizando una versión recombinante de la cápside viral, como antígeno específico.
- Detectar, a través de un ensayo de ELISA indirecto a distintos tiempos (30, 50, 70, 90, 110 y 130 días de edad), anticuerpos IgM e IgG anti-PCV-2 en sueros provenientes de animales naturalmente infectados con PCV-2 y animales vacunados con la vacuna comercial anti- PCV-2 *Ingelvac*®, de Boehringer.
- Caracterizar y diferenciar el patrón de seroconversión IgM/IgG anti-PCV-2 en los sueros evaluados, y establecer un marcador serológico diferenciador entre cerdos vacunados y naturalmente infectados.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención de las Muestras

Se dispuso de un banco de muestras de suero de cerdos, provenientes de un plantel nacional. Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción de la vena yugular con tubos *Vacutainer* de 21Gx1 (*Precision Glide*). Las muestras, se transportaron refrigeradas al laboratorio y posteriormente se incubaron a 37°C por 30 min para permitir su coagulación. Luego, se extrajo el suero y se centrifugó a 10.000 x g por 10 min a 4°C para remover el material insoluble remanente. Se alicuotó y se guardó a -20°C.

El total de muestras correspondió a 60 cerdos (raza Landrace), de los cuales 30 eran animales no vacunados, portadores asintomáticos del virus, lo que fue comprobado previamente mediante PCR y los otros 30 correspondían a animales vacunados a los 21 días de edad, vía intramuscular, con una dosis única de 1 ml en la zona de la tabla del cuello, con la vacuna comercial anti- PCV-2 *Ingelvac*® *CircoFLEXTM*, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, correspondiente a una vacuna inactivada basada en partículas virales vacías (VLP, del acrónimo Viral Like Particles). Cabe destacar que independiente de la vacunación todos los animales fueron positivos a la amplificación de DNA de PCV-2 por PCR (dato no mostrado).

Cada grupo fue muestreado a los días 30, 50, 70, 90, 110, 130 de edad, por lo que se dispuso de un total de 360 muestras, las que fueron mantenidas a -20°C.

2. Preparación del antígeno recombinante, Cap-6xhis

Se realizó la producción de un *stock* de proteína recombinante Cap-6xHis a partir de bacterias *Escherichia coli* BL21(Amersham) transformadas con el vector de expresión pQE80L::*orf2*. El vector pQE80L::*orf2*, permite que la proteína sea expresada como una proteína de fusión a la que se le ha añadido, en el extremo C-terminal, una secuencia de afinidad específica, que consiste en seis residuos de histidina consecutivos. El clonamiento del gen *orf2* en el vector (gen que codifica para la proteína de la cápside viral), se realizó a

partir de un aislado nacional de PCV-2, trabajo que fue realizado con anterioridad en el laboratorio Biovetec.

Para la fase de producción y purificación del antígeno se llevaron a cabo los siguientes pasos:

2.1. Cultivo e Inducción

La cepa de *E.coli* BL21 transformada con el vector que codifica para la proteína de la cápside (Cap) de PCV-2 fue inoculada en caldo Luria Broth (10g/L de Triptona, 5g/L de extracto de levadura, 5g/L de NaCl, ampicilina 100 µg/ml) y se dejó crecer durante 24 h a 37°C con agitación. Posteriormente, el cultivo se reinoculó a 1L de medio fresco y se dejó crecer por 3 h más a 37°C, para posteriormente inducir la producción de la proteína Cap-6xHis, por medio de la adición de Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG, Applichem) a una concentración de 0,5 mM por 24h a 37°C. Luego de este tiempo, las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 6000 x g por 10 minutos a 4° C.

2.2. Lisis bacteriana

El pellet obtenido fue resuspendido en 10 ml de tampón de lisis 1x (300mM NaCl+ 50mM NaH₂PO₄+ 20mM imidazol+ 8mM urea). Luego se adicionó Tween 1%, para posteriormente agregar 10 µg de lisozima e incubar 1h a 37°C. A continuación se adicionó fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF 100 mM), como inhibidor inespecífico de proteasas. Posteriormente, el extracto se pasó varias veces a través de una jeringa con aguja de 21G, para favorecer el rompimiento celular. Para luego ser sonicado en hielo y de este modo completar el proceso de lisis bacteriana. Finalmente, se centrifugó a 10000 x g por 15 min y el sobrenadante fue almacenando a -20° C.

2.3. Purificación por cromatografía de afinidad

La purificación de las proteínas se realizó mediante una cromatografía de afinidad a metal, utilizando matrices de níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA Purification System,

Invitrogen®), este sistema está diseñado para la purificación de proteínas recombinantes de fusión marcadas con residuos de histidina en tándem, desde cualquier plataforma de expresión.

Como primer paso, se preparó la columna Ni-NTA (Invitrogen®), lavándola con agua deionizada y posteriormente con tampón de unión (20 mM fosfato de sodio, 0,5 M NaCl, 40 mM imidazol pH 7,4) equivalente a 5 veces el volumen de la resina. Posteriormente, se le adicionó el sobrenadante con las proteínas bacterianas, obtenidas en el paso anterior, en una mezcla con el tampón de unión 2X.

Este sistema se basa en que los residuos de histidina fusionados a la proteína Cap interactúan con el níquel, quedando específicamente retenidos a la matriz. Posteriormente, las proteínas unidas fueron eluidas por competencia con tampón imidazol 500 mM. La columna Ni-NTA se preparó siguiendo las recomendaciones del fabricante (Invitrogen®). De forma paralela se realizó el mismo procedimiento utilizando un extracto de bacterias transformadas con el vector plasmidial vacío, pQL80., a modo de control de especificidad,

2.4. Diálisis y cuantificación de la proteína recombinante

Una vez liberada de la columna, la proteína Cap-6xHis se dializó contra agua destilada por 24 h a temperatura ambiente. La concentración de la proteína total fue determinada mediante medición gravimétrica, después de la liofilización de la proteína purificada.

3. Electroforesis SDS-PAGE de la proteína recombinante Cap-6xhis

La pureza de la proteína se analizó mediante electroforesis en geles de polyacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12% en condiciones desnaturalizantes siguiendo un protocolo de rutina (Maniatis *et al.*, 1982). La electroforesis se realizó en el equipo Polyscience 4000 a temperatura ambiente a 120 V por 2 h, utilizando como estándar de peso molecular el marcador *Prestained Protein Marker Broad Range* (Biolabs). El gel se tiñó con azul de Coomassie durante 15 min con agitación constante y luego se destiñó con

ácido acético al 10%. La banda obtenida se fotografió en un transiluminador con cámara digital “Canon Power Shot A650IS”.

4. Evaluación de la inmunoreactividad de la proteína recombinante Cap por medio de Western blot

La proteína recombinante Cap-6xHis, se observó en el gel de acrilamida como una banda de mayor intensidad acompañada en algunas ocasiones por 2 a 3 bandas de menor tamaño e intensidad, por ello se evaluó la inmunoreactividad de la proteína recombinante Cap-6xHis a través de Western Blot, transfiriendo el gel de acrilamida a una membrana de nitrocelulosa. Una vez finalizada la transferencia se bloquearon los sitios de unión inespecíficos de la membrana con una solución PBT de bloqueo (PBS, Triton 0,05% y leche descremada al 5%) por toda la noche a 4°C. Luego, se incubó con el suero de cerdo diluído 1:100 en solución PBT de bloqueo a 4°C durante la noche. Se lavó 3 veces con PBT durante 5 min y se incubó con anticuerpo anti IgG de cerdo acoplado a peroxidasa de rábano (KPL, UK) en una dilución 1:1000 en solución de bloqueo. Posteriormente, se diluyó 6 mg de 4-Chloro-1-naphthol (Pierce) en 10 ml de metanol (TCL), se tomaron 5 ml de esta solución y se le agregó 45 ml de PBS y 1ml de H₂O₂ al 3%, se incubó la membrana con esta solución por 15 min a temperatura ambiente. Una vez aparecida la coloración, se lavó con agua destilada y se dejó secar sobre un papel filtro. Se fotografió con la cámara digital “Canon Power Shot A650IS”. Como control positivo se utilizó el suero de uno de los cerdos PMWS positivos.

A continuación, se presenta un esquema de los principales pasos seguidos para la obtención de la proteína recombinante Cap-6xHis.

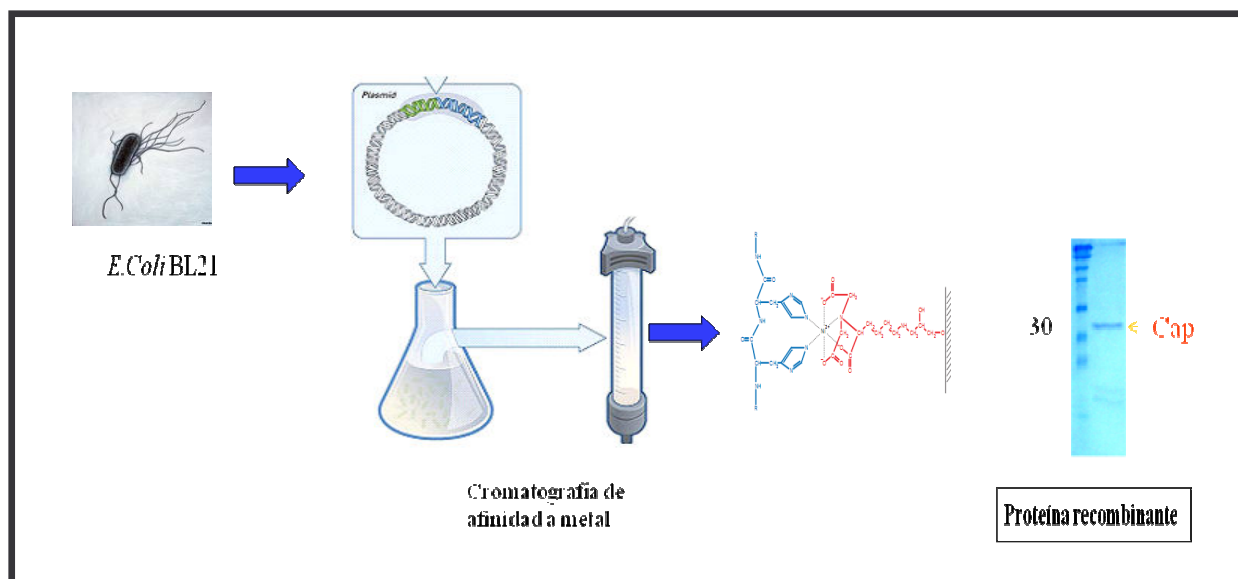


Fig.2. Esquema que muestra los principales pasos para la obtención de la proteína recombinante Cap-6xHis.

5. Ensayo de ELISA indirecto

La técnica de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) es utilizada para la detección de diversas moléculas biológicas (hormonas, inmunoglobulinas, toxinas, antígenos, etc.) basándose en la especificidad del reconocimiento antígeno-anticuerpo. Existen numerosas variantes de este tipo de ensayo. En esta oportunidad, se utilizó el método indirecto.

En placas de ELISA inmunoabsorbentes de 96 pocillos (MaxiSorp, Nunc, Dinamarca), se unió la proteína recombinante de la cápside viral de PCV-2, Cap-6xhis, previamente diluida en un tampón de cubierta (compuesto por 0.15M NaHCO₃, 0.35M Na₂CO₃, 0.03M NaN₃ a pH 9.6), hasta obtener una concentración de 40 µg/ml. Luego se agregó 50 µL de esta dilución a cada pocillo, para posteriormente cubrir la placa con *parafilm* e incubarla durante 24 h a 4 °C. Luego se retiró la solución de cubierta y la placa se lavó dos veces con

PBS, para luego proceder al bloqueo de los sitios inespecíficos con PBS+ 3% BSA por 24h a 4°C.

Posteriormente, las proteínas no adsorbidas fueron removidas de los pocillos por medio de cinco lavados con PBS + 0.05% Tween 20. Subsecuentemente cada suero en triplicado, tanto de cerdos vacunados como no vacunados, se diluyó en proporciones 1:100 y 1:1000 en un tampón compuesto por PBS+ 3% BSA + 0,05 % Tween 20, cada dilución reaccionó con el antígeno recombinante pegado en la placa, por 24h a 4°C.

Como control negativo se utilizó una dilución sin suero (PBS+ 3% BSA + 0,05 % Tween 20), ya que no se contó con suero de cerdo libre de PCV-2. Como control positivo se utilizaron los sueros de cerdos diagnosticados previamente como PMWS positivos.

Luego de cinco lavados con PBS + 0.05% Tween 20, la placa fue incubada a 37°C por 2h, con 100 µl de anticuerpo secundario anti-IgG o anti-IgM de cerdo conjugado a peroxidasa HRP (dilución 1:5000 en PBT). Posteriormente los pocillos fueron lavados nuevamente y se llevó a cabo la reacción colorimétrica utilizando 50 µl sustrato cromógeno H₂O₂-tetrametilbencidina (TMB, del inglés 3,3',5,5' tetramethylbenzidine) por cinco a diez minutos a temperatura ambiente. Finalmente se detuvo la reacción con H₂SO₄ 1N. La densidad óptica fijada en 450 nm (OD₄₅₀) fue medida en el equipo "microplate reader" modelo 680 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

6. Análisis de resultados.

Para la reacción de ELISA, los datos se analizaron tomando como valor la media aritmética de las mediciones de absorbancia a 450nm +/- las desviaciones estándar obtenidas desde cada experimento realizado en triplicado. Los cerdos fueron considerados positivos a la seroconversión por PCV-2 si el resultado de la lectura ELISA indicó una OD_{450nm} mayor al promedio ± la desviación estándar del control negativo (reacción sin anticuerpo primario).

Se determinó la existencia de diferencias estadísticas entre los valores de OD_{450nm} de los animales vacunados versus los portadores asintomáticos de PCV-2 a través del análisis estadístico *t* de *Student*.

Para el ensayo de inmunoreactividad por *Western blot*, el resultado fue analizado basándose en la presencia (reactividad positiva) o ausencia (reactividad negativa) de precipitación del sustrato cromogénico en la membrana de nitrocelulosa como una banda específica o bandeo múltiple.

RESULTADOS

1. Purificación del antígeno recombinante, Cap-6xHis.

El vector pQ80L::*cap*, el cual posee clonado uno de los amplicones del gen *cap*, que codifica para la proteína de la cápside viral de PCV-2, fue transformado en la cepa bacteriana *E. coli* BL21. Posteriormente, uno de los clones obtenidos, denominado como C4, fue crecido en medio LB e inducido con IPTG 500 mM por 24h para estimular la producción de la proteína Cap-6xHis.

Como resultado de la inducción del cultivo bacteriano y posterior lisis en condiciones desnaturantes, la proteína recombinante de la cápside viral se logró purificar mediante cromatografía de afinidad a metal, utilizando matrices de níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA). Los rendimientos de concentración alcanzados tras la purificación de la proteína fueron de 10 mg, en la primera elución y 1mg en la segunda elución. De esta manera se generó una serie de *stocks* de trabajo de la proteína recombinante con una concentración final de 3 mg/ml la cual se sometió a análisis de pureza a través de SDS-PAGE. Como resultado se observó que la proteína purificada presenta una banda específica de aproximadamente 30 kDa (Fig.3), lo que resulta consistente con el peso molecular esperado predicho para la proteína Cap-6xHis.

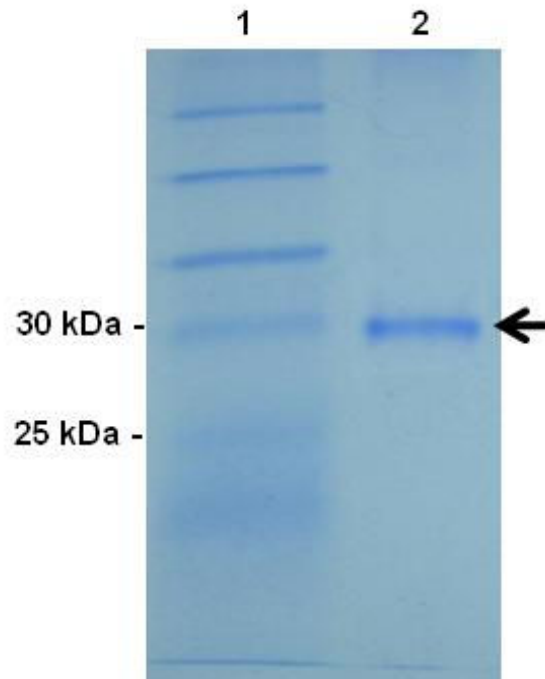


Fig. 3. Análisis SDS-PAGE la proteína Cap-6xHIS purificada en columnas NI-NTA. Las proteínas después de ser eluidas de la columna NI-NTA se separaron en geles SDS-PAGE 12%, y fueron teñidas con azul de Coomasie. La flecha indica una banda específica de aprox. 30 kDa (Carril 2), que corresponde al peso molecular descrito para la proteína Cap de PCV-2. Se utilizó el estándar de peso molecular *Prestained Protein Marker Broad Range* (Biolabs) (Carril 1).

2. Evaluación de la inmunoreactividad de la proteína recombinante Cap por medio de Western blot.

Debido a que en algunas ocasiones la banda de mayor intensidad se presentaba acompañada por 2 a 3 bandas de menor tamaño e intensidad, fue necesario evaluar la inmunoreactividad de la proteína recombinante Cap por *Western blot*, para descartar la presencia de reacción cruzada del suero de cerdo con otras proteínas.

Para el análisis *Western blot*, se realizó la transferencia de los geles de acrilamida a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente la membrana se incubó con el suero de cerdo positivo para PCV-2 diluído 1:100. La reacción fue revelada con anticuerpo anti-IgG de cerdo conjugado a peroxidasa en una dilución 1:1000, usando cloronaftol como sustrato cromogénico. Como control negativo, se utilizó el extracto bacteriano que contiene el vector pQ80L vacío, el que no generó ningún tipo de inmunomarcación (dato no mostrado).

Como resultado de la evaluación de la inmunoreactividad de la proteína recombinante Cap por medio de Western blot, se evidenció una banda inmunoreactiva específica de 30 kDa en la membrana de nitrocelulosa luego del revelado. Desde este resultado se pudo concluir dos cosas: primero, la proteína recombinante purificada es reconocida en forma específica por suero de cerdos seropositivos a PCV-2 puesto que no hay más bandas reactivas en un mismo carril; y segundo, el suero de los animales no muestra reacción cruzada con eventuales antígenos contaminantes, no detectados por la tinción de Coomasie, que pudieran estar presentes en la fracción purificada de la proteína recombinante.

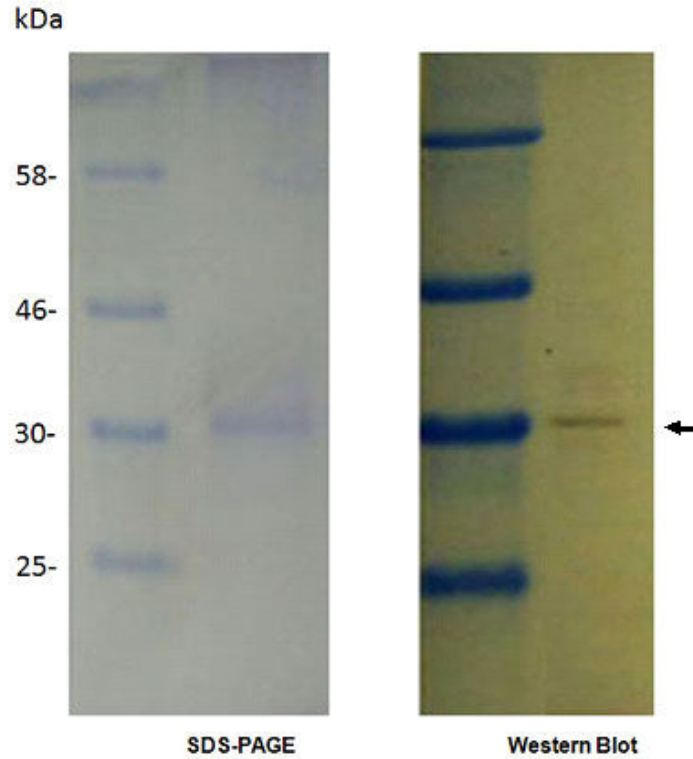


Fig. 4. Análisis SDS-PAGE y Western Blot de la proteína Cap-6xHis purificada en columnas NI-NTA. Las proteínas se separaron en forma paralela en dos geles SDS-PAGE 12%, un gel fue teñido con azul de Coomasie y el otro fue posteriormente transferido a una membrana de nitrocelulosa, la cual fue incubada con suero de cerdo positivo a PCV-2 y posteriormente fue detectado con un anticuerpo secundario anti-IgG de cerdo conjugado a HRP y revelado con sustrato cromogénico TMB. El primer carril de ambos geles corresponde a un marcador de peso molecular preteñido y la flecha indica una banda específica de ~ 30 kDa, que corresponde al tamaño esperado de la proteína Cap de PCV-2

3. Análisis de ELISA indirecto utilizando como antígeno la proteína recombinante de PCV-2

Para la cuantificación de la inmunoreactividad de los sueros de los animales contra la proteína recombinante mediante ELISA indirecto, lo que se correlaciona con el título de anticuerpos anti-PCV-2, se determinó la dilución óptima de suero y concentración del antígeno viral a utilizar. Los sueros de los cerdos evaluados a distintas etapas de desarrollo, se utilizaron en una dilución 1:100 y 1:1000, dependiendo del grado de reactividad con el antígeno viral. Por otra parte, la referencia de la cantidad de antígeno a utilizar se obtuvo de experimentos previos, los que indicaron una cantidad de 2 µg por pocillo, obtenida tras la adición de 50 µl por pocillo de una preparación de la proteína diluida, en un tampón de cubierta, a un concentración de 40 µg/ml.

La prueba de ELISA se realizó con los sueros de cerdos vacunados y no vacunados infectados naturalmente, muestreados a diferentes edades, 30, 50, 70, 90, 110 y 130 días. Se utilizó como control negativo una dilución sin suero, es decir, sin anticuerpo primario. Como control positivo se utilizó un suero de cerdo anti-PCV-2 PMWS positivo (diagnosticado previamente por histopatología e inmunohistoquímica de linfonodos).

A su vez, para medir el título de IgM e IgG total se utilizó como anticuerpo secundario anti IgM de cerdo conjugado a peroxidasa de rábano (KPL, UK) y anti IgG de cerdo conjugado a peroxidasa de rábano (KPL, UK) respectivamente, ambos en una dilución de 1:5000.

En el análisis del ELISA, se observó que la seroprevalencia de los sueros fue de un 100%, es decir, todos los sueros evaluados, tanto vacunados como no vacunados, presentaban niveles de anticuerpos IgM e IgG totales contra la proteína recombinante Cap de PCV-2.

De esta forma la comparación, a distintos tiempos, de los valores de IgM e IgG obtenidos contra la proteína Cap, sirvieron para determinar, a grosso modo, el estadio de la seroconversión contra PCV-2, y analizar si esos valores tienen algún patrón característico.

De esta manera, valores de IgM mayores o iguales a IgG, representaron para el análisis una seroconversión temprana (dentro de los primeros 30 días post vacunación), lo que se refleja en el perfil ELISA número 4, el cual corresponde a un animal vacunado con muy poca inmunidad inicial de base (medida al día 30). En este animal se evidencia, en forma clara, que tras la vacunación se produce un alza paralela de IgM e IgG hasta el día 70, tiempo desde el cual la IgM desciende hasta niveles basales hacia el día 90, sin embargo, la IgG sigue aumentando hasta alcanzar su máximo en el día 130.

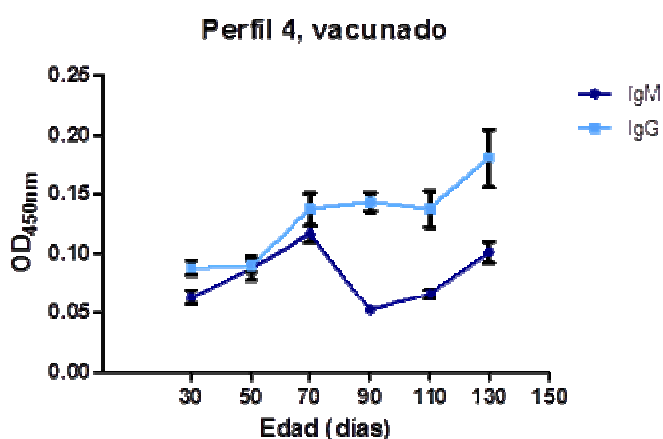


Fig. 5. Ensayo ELISA representativo de suero de cerdos vacunados contra PCV-2 que presentaron baja inmunidad de base contra el virus. Cada punto representa la media aritmética de las absorbancias a 450nm de tres mediciones +/- su desviación estándar

Un escenario levemente distinto ocurrió con los animales 7 y 8, en los cuales la inmunidad de base fue también baja y la IgM subió con valores mayores e iguales a la IgG hasta el día 70 y bajó hacia el día 90, sin embargo la IgM volvió a subir en los días 110 y 130.

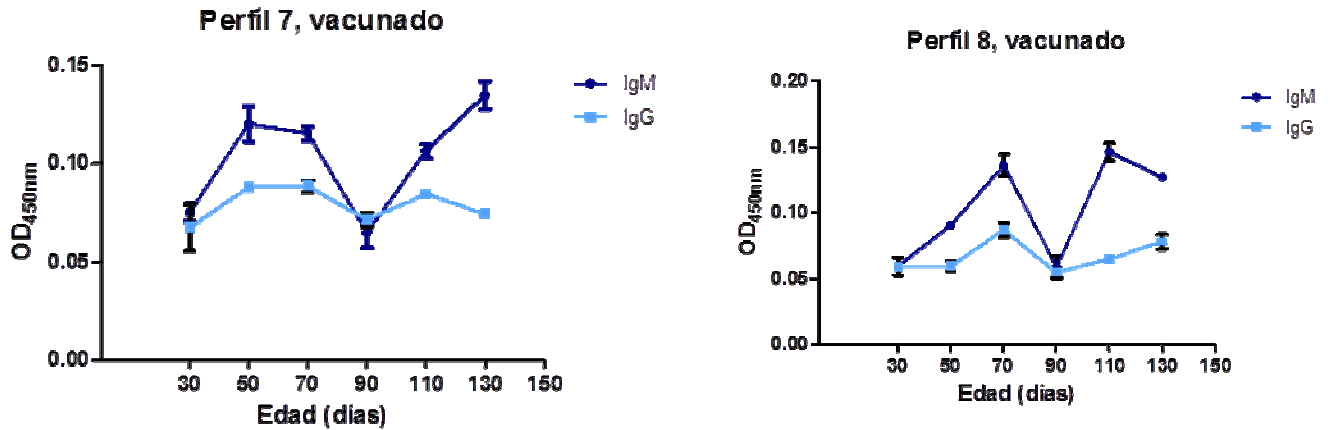


Fig. 6. Ensayo ELISA representativo de suero de cerdos vacunados contra PCV-2 que presentaron baja inmunidad de base contra el virus. Cada punto representa la media aritmética de las absorbancias a 450nm de tres mediciones +/- su desviación estándar

Un escenario completamente distinto mostraron los animales vacunados 1 y 6, los cuales presentaron un perfil de IgM menor al de IgG durante todo el muestreo, mostrando una seroconversión ya montada y activa, probablemente producto de una inmunidad de base anti PCV-2 adquirida desde la madre. Es importante destacar que en este escenario el efecto de la vacuna es indetectable (Fig 5).

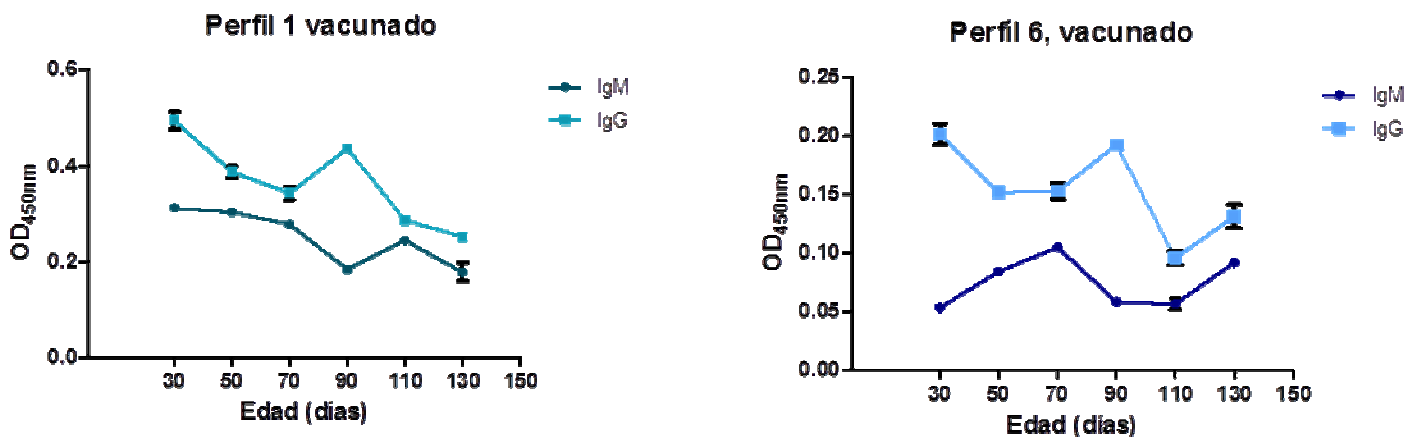


Fig. 7. Ensayo ELISA de suero de cerdos vacunados contra PCV-2 que presentaron alta inmunidad de base contra el virus. Cada punto representa la media aritmética de las absorbancias a 450nm de tres mediciones +/- su desviación estándar

Con respecto al grupo de cerdos no vacunados portadores asintomáticos, que fueron seguidos a distintos días de edad, algunos de ellos también presentaron una importante inmunidad de base probablemente materna, presentando un valor de IgG mayor al de IgM, los cuales se mantuvieron sin mayores cambios durante todo el muestreo (Fig 6).

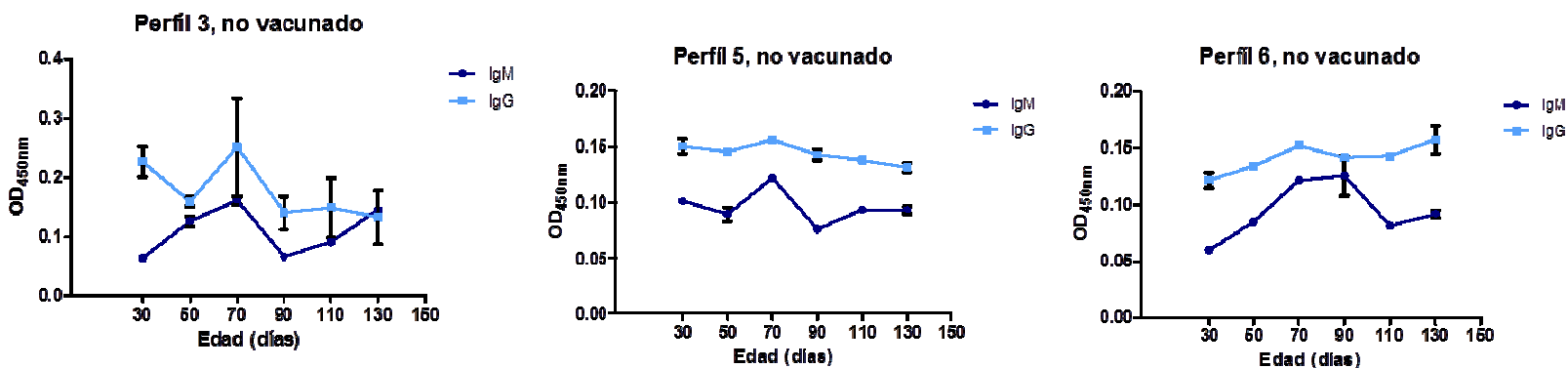


Fig. 6. Ensayo ELISA de suero de cerdos no vacunados, infectados naturalmente que presentaron alta inmunidad de base contra el virus. Cada punto representa la media aritmética de las absorbancias a 450nm de tres mediciones +/- su desviación estándar

Por otra parte, es importante destacar que en algunos animales no vacunados, infectados naturalmente que presentaron baja inmunidad de base, se puede observar un perfil del seroconversión muy similar al grupo vacunado, donde la IgM sube con valores mayores e iguales a la IgG hasta el día 70 y baja hacia día 90, sin embargo, la IgM vuelve a subir en forma paralela a la IgG en los días 110 y 130, muy probablemente por re-infección natural con PCV-2 dentro del plantel.

La dinámica de ambos anticuerpos para este grupo de cerdos, se muestra en la Figura 7.

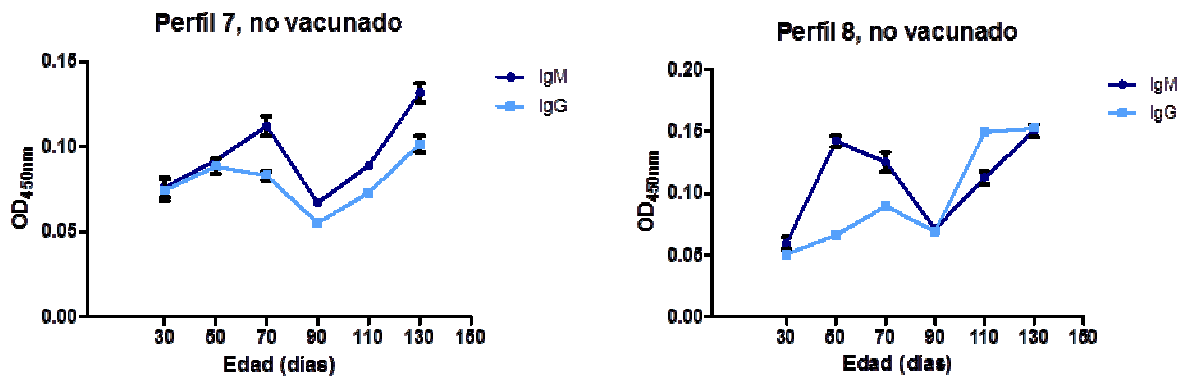


Fig. 7. Ensayo ELISA de suero de cerdos no vacunados, portadores asintomáticos que presentaron baja inmunidad de base contra el virus. Cada punto representa la media aritmética de las absorbancias a 450nm de tres mediciones +/- su desviación estándar.

DISCUSIÓN

En esta memoria, fue analizada la inmunoreactividad anti- PCV-2 de los sueros provenientes de dos grupos de cerdos, los cuales correspondieron a animales vacunados y no vacunados contra PCV-2 con una vacuna comercial. Para esto, se utilizó una versión recombinante de la proteína Cap de PCV-2, con el fin de medir la inmunoreactividad de dichos sueros mediante ELISA indirecto. De esta forma, se determinó que el patrón de seroconversión hacia PCV-2 de la mayoría de los individuos analizados en ambos grupos fue similar, mostrando todos altos niveles de anticuerpos totales contra la proteína Cap recombinante. Estos resultados son concordantes con varios estudios epidemiológicos que han encontrado en cerdos de todos los continentes, anticuerpos contra antígenos de PCV-2 con seroprevalencias alrededor del 100%, casi no existiendo predios serológicamente libres de PCV-2, independiente de que estén efectuando programas de vacunación contra el virus (Larochelle *et al.*, 2003; Rose *et al.*, 2003; López-Soria *et al.*, 2005). La proteína recombinante utilizada en esta memoria, demostró que a pesar de ser expresada en bacterias y de ser purificada en condiciones desnaturantes a través de columnas Niquel-NTA, su estructura pudo ser reconocida por los anticuerpos anti PCV-2 de los cerdos tanto vacunados como no vacunados e infectados naturalmente, siendo ésta de utilidad para evaluar el patrón de seroconversión contra PCV-2 en ambas condiciones. Este hallazgo también fue obtenido por otros autores, utilizando una versión recombinante de la proteína Cap producida en *E. coli* (Marcekova *et al.*, 2009). La utilización de este sistema en la evaluación de la eficacia de vacunas en pruebas de laboratorio, ha sido también anteriormente evaluado (Carasova *et al.*, 2007). En esta memoria se obtuvieron datos de utilidad para poder evaluar la incorporación de una vacuna comercial contra PCV-2 bajo pruebas de campo en un plantel nacional, realizándose análisis de seroconversión, secuenciales en el tiempo, en dos grupos bien definidos de animales. La finalidad última de este estudio fue determinar si, efectivamente, la vacuna administrada produce algún cambio en el patrón de seroconversión de los animales tratados comparada con los animales sin vacunación. Estos objetivos representaron un gran desafío, ya que muchos de los animales, independiente de si recibieron o no la vacuna, fueron seropositivos para el antígeno Cap a etapas tempranas del monitoreo, mostrando una marcada inmunidad de base, probablemente materna contra PCV-2. De esta forma, los resultados y la

interpretación de éstos fue diferente de acuerdo a si los animales presentaron o no inmunidad de base contra el virus.

Así, la comparación de los valores de IgM e IgG obtenidos contra la proteína Cap, sirvieron para determinar, a groso modo, el estadio de la inmunización contra PCV-2, y analizar si esos valores tienen algún patrón característico bajo cuatro escenarios distintos: 1, animales vacunados con baja inmunidad de base; 2, animales vacunados con alta inmunidad de base; 3, animales no vacunados con alta inmunidad de base y 4, animales no vacunados con baja inmunidad de base. De esta manera; valores de $IgM \geq IgG$, representaron para nosotros una seroconversión temprana (dentro de los primeros 30 días post vacunación); $IgM < IgG$, representó una seroconversión ya montada y activa (aproximadamente entre 50 y 70 días post inmunización); un alto valor de IgG y un valor muy bajo de IgM, representó una seroconversión tardía (aproximadamente 2 meses después de la inmunización) (Segalés *et al.*, 2005).

Bajo este esquema simple de análisis, nuestros resultados indicaron que un grupo de los cerdos vacunados se encontraron con seroconversión activa a los pocos días post vacunación, siempre y cuando no contaran con inmunidad de base (Fig. 3), siendo evidente el efecto en seroconversión de la vacuna en esta condición, el cual fue completamente enmascarado si los cerdos contaban con inmunidad de base (Fig 5). Estos resultados son consistentes con los descritos por quienes describen un efecto neutralizante contra la vacuna de los anticuerpos de base maternos y, por lo tanto, no observaron alzas importantes de anticuerpos tras la vacunación (Pérez-Martín *et al.*, 2010).

Un escenario levemente distinto ocurrió con los animales vacunados que presentaron los perfiles 7 y 8 (Fig 4), en los cuales la inmunidad de base fue baja y la IgM subió consistentemente con valores mayores e iguales a la IgG hasta el día 70 y bajó hacia el día 90, sin embargo la IgM vuelve a subir en los días 110 y 130, posiblemente por la infección natural con el virus. Es importante destacar que las cepas utilizadas en la elaboración de la vacuna comercial presentan diferencias subgenotípicas con las cepas de PCV-2 presentes en Chile (Noriega *et al.*, 2007), las cuales se encuentran en forma ubicua en los planteles, esto explicaría la re-alza de la IgM de estos animales en estadios tardíos del muestreo.

Con respecto al grupo de cerdos no vacunados portadores asintomáticos que fueron seguidos a distintos días de edad, un grupo también presentó una importante inmunidad de base, exhibiendo un valor de IgG mayor al de IgM, los cuales se mantuvieron sin mayores cambios durante todo el muestreo (Fig. 6). Por otra parte, es importante destacar que en algunos animales no vacunados que presentaron baja inmunidad de base, se puede observar un perfil de seroconversión muy similar al grupo vacunado, donde la IgM sube con valores mayores e iguales a la IgG hasta el día 70 y baja hacia el día 90; sin embargo, la IgM vuelve a subir en forma paralela a la IgG en los días 110 y 130, muy probablemente por re-infección natural con PCV-2 (Fig. 7).

Es importante destacar que, ninguno de los animales analizados en forma seriada en esta memoria, poseían signología compatible con PMWS como disminución del peso y/o retraso en el crecimiento en etapa de engorda. La evidencia bibliográfica señala que los títulos de IgG en los cerdos afectados por PMWS, son la mayoría de las veces menores en comparación con el título promedio de IgG en cerdos sanos y vacunados (Meertz *et al.*, 2006; Fort *et al.*, 2007). En aquellos estudios, estos anticuerpos siguieron la misma dinámica que los anticuerpos totales a través IPMA y ambos se correlacionaron positivamente con el título de anticuerpos neutralizantes. Los anticuerpos neutralizantes cumplen un papel fundamental en la defensa contra las infecciones por PCV-2. A partir del momento en que aparecen, se unen y neutralizan los virus previniendo la diseminación en el cuerpo y la infección de nuevas células (Meertz *et al.*, 2006). Se puede dar el caso, además, que algunos cerdos infectados presenten altos títulos de anticuerpos totales, pero bajo o ausente título de anticuerpos neutralizantes. Estas observaciones, indicarían que los cerdos afectados con PMWS, podrían ser incapaces de producir anticuerpos contra determinados epítomos neutralizantes (Meertz *et al.*, 2006) y que el deterioro de la respuesta humoral puede afectar tanto a anticuerpos neutralizantes como no neutralizantes (Fort *et al.*, 2007).

Esta memoria, representó una fase primaria para poder analizar la dinámica de anticuerpos contra PCV-2 en Chile, y se requieren a futuro estudios temporales de seguimiento a más largo plazo, así como la detección de anticuerpos neutralizantes en cada animal.

Desgraciadamente no fue posible contar con muestras de sueros, de los animales muestreados en esta memoria, a más temprana edad, idealmente previo a la vacunación. Además, una de las importantes limitaciones de este estudio, fue el no encontrar animales sero negativos para su uso como control experimental, y se espera que en un futuro pueda contarse con cerdos libres de PCV-2.

Lamentablemente, los datos presentados en este estudio no proveen evidencia respecto a la calidad y naturaleza de la respuesta a anticuerpos después de la vacunación contra PCV-2. Antecedentes bibliográficos muestran resultados similares entre el nivel de anticuerpos medidos por IFA, en el suero de animales infectados sanos y vacunados (Tribble *et al.*, 2012). Sin embargo, la vacunación genera al menos cuatro veces más anticuerpos neutralizantes comparados con los animales infectados naturalmente con PCV-2. De acuerdo a los últimos estudios realizados en este campo, los datos respaldan la hipótesis de que los anticuerpos producidos después de la vacunación son cualitativamente diferentes de los anticuerpos producidos durante la infección natural (Tribble *et al.*, 2012).

Se han identificado epitopos altamente inmunodominantes entre los residuos 169 y 180 de la proteína de la cápside viral de PCV-2, los cuales son eficientemente reconocidos por el suero de animales afectados con PMWS. Recientemente, con el fin de caracterizar la respuesta de anticuerpos contra PCV-2 más detalladamente, un estudio realizado por Tribble *et al.*, 2011, midió la reacción del suero frente a distintos motivos de la proteína Cap mediante ELISA indirecto. De esta forma, la reacción del suero frente a un polipéptido largo que incluye los residuos 43 al 233, fue comparada contra la reactividad sobre motivos cortos de la proteína, específicamente entre los residuos 43 al 135 y 160 al 233, los cuales son localizados cerca de la región N-terminal y C-terminal de la proteína Cap, respectivamente. Los resultados reportados mostraron que los cerdos vacunados reconocieron primariamente sólo la región larga comprendida entre los residuos 43 al 233 de la proteína Cap. En contraste, los cerdos no vacunados e infectados con PCV-2 mostraron reactividad tanto para los motivos pequeños ubicados en el N-terminal entre los residuos 43 al 233, como para los motivos ubicados en el C-terminal, entre los residuos 160 al 233 de la proteína. Estos estudios concluyen que, específicamente, el motivo entre los residuos 169 al 180 que incluye parte del dominio N-terminal, es el más

inmunodominante y funciona como un “distractor inmunogénico”, desviando la respuesta inmune de anticuerpos de los animales infectados hacia epítopes no neutralizantes. De esta forma, se propone un modelo en donde la modulación del sistema inmune durante una infección activa lleva a la producción de anticuerpos dirigidos contra el epítopo 169 al 180, los cuales son generados en respuesta a monómeros libres y/o pequeños fragmentos de la proteína Cap, producidos en las células ya infectadas con PCV-2. El análisis de este motivo mediante cristalografía de rayos X de la proteína Cap, ya sea como monómero o como partícula ensamblada (VLP), fue reportado recientemente por Khayat *et al.*, 2011. En este estudio, se apoya la noción de que el motivo 169 al 180, en el contexto de monómero, es expuesto como un *loop* externo. Sin embargo, en el contexto conformacional de la cápside ensamblada, este motivo queda localizado entre los monómeros de la proteína Cap y queda oculto hacia los anticuerpos (Trible *et al.*, 2011).

A nivel mundial se sigue la tendencia que lo más recomendable para generar protección contra PCV-2 es vacunar animales con VLPs de PCV-2 derivadas de la expresión de la proteína Cap en sistemas que favorezcan su auto ensamblado. Esta estrategia en formulación, ha sido incorporada en dos de las 5 vacunas comerciales disponibles para PCV-2 en el mercado internacional. De esta forma, la respuesta de anticuerpos que puedan inducir las vacunas, se ve altamente determinada por su formulación como VLP o como subunidad monomérica. En el caso de la vacuna utilizada en este estudio, corresponde a la vacuna *Ingelvac® CircoFLEXTM*, de Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, la cual es formulada en base a subunidades de la proteína Cap ensambladas como VLPs en células de insecto. De acuerdo a esto, se infiere que la efectividad de esta vacuna, en cuanto a la producción de anticuerpos neutralizantes sobre la fracción de anticuerpos totales, es alta.

CONCLUSIONES

- Fue posible montar un ensayo de ELISA indirecto para PCV-2, utilizando para ello una proteína recombinante expresada en bacterias. Dicha estructura pudo ser reconocida como antígeno específico, tanto en los sueros de cerdos vacunados como no vacunados e infectados naturalmente, siendo ésta de utilidad para evaluar el patrón de seroconversión contra PCV-2 en ambas condiciones.
- El efecto diferenciador de la prueba de ELISA realizada sobre animales vacunados y no vacunados, depende si es que el animal cuenta o no con inmunidad de base anti-PCV-2, siendo esta condición interferente con la vacunación.
- Si bien, en el presente estudio la determinación de la presencia de anticuerpos totales contra PCV-2, no resultó ser útil para diferenciar tipo y calidad de anticuerpos, sí fue posible caracterizar y diferenciar el patrón de seroconversión IgM/IgG anti-PCV-2 en cuatro escenarios distintos.

BIBLIOGRAFÍA

ALLAN, G.; MCNEILLY, F.; CASSIDY, J.; REILLY, G.; ADAIR, B.; ELLIS, W.; MCNULTY, M. 1995. Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infection colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. *Vet. Microbiol.*44: 49-64.

ALLAN, G.; MCNEILLY, F.; KENNEDY, S.; DAFT, B.; CLARKE, E.; ELLIS, J.; HAINES, D.; MEEHAN, B.; ADAIR, B. 1998. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with wasting disease in the U.S.A. and Europe. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10 (1): 3-10.

ALLAN, G.; MCNEILLY, F.; MEEHAN, B.; KENNEDY, S.; MACKIE, D.; ELLIS, J.; CLARK, E.; ESPUÑA, E.; SAUBI, N.; RIERA, P.; BOTNER, A., CHARREYRE, C. 1999. Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. *Vet. Microbiol.* 66:115–123.

ALLAN, G.; ELLIS, J. 2000. Porcine circoviruses: a review. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12: 3–14.

ALLAN, G.; MCNEILLY, F.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; BOTNER, A.; MCCULLOUGH, K.; NAUWYNCK, H.; KENNEDY, S.; MEEHAN, B.; CHARREYRE, C. 2004. PMWS: Experimental model and co-infections. *Vet. Microbiol.* 98: 165-168.

ALLNUTT, T.; BOWERS, R.; ROWE, C.; VAKHARIA, V.; LAPATRA, S.; DHAR, A. 2007. “Antigenicity of infectious pancreatic necrosis virus VP2 subviral particles expressed in yeast.” *Vaccine* 21:4880-4888.

BALASCH, M.; SEGALES, J.; ROSELL, C.; DOMINGO, M.; MANKERTZ, A.; URNIZA, A.; PLANA-DURAN, J. 1999. Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Comparat. Pathol.* 121: 139–148.

BASSAMI, M.; BERRYMAN, D.; WILCOX, G.; RAIDAL, S. 1998. Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses, and chicken anemia virus. *Virology.* 249:453-45

BRUNDBORG, I.; JONNASSEN, C.; MOLDAL, T.; BRATBERG, B.; LIUM, B.; KOENEN, F.; SCHONHEIT, J. 2007. Association of myocarditis with high

viral load of porcine circovirus type 2 in several tissues in cases of fetal death and high mortality in piglets. A case study. J. Vet. Diagn. Invest. 19:368-275.

CALSAMIGLIA, M.; ROCA, M.; BALASCH, M.; SEGALÉS, J.; VIAPLANA, E.; URNIZA, A.; HATTERMANN, K.; MANKERTZ, A.; PLANA-DURÁN, J.; DOMINGO, M. 2004. In vitro and in vivo characterization of an infectious clone of a European strain of porcine circovirus type 2. J. Gene. Virol. 85 (Pt 5):1259 – 1266.

CALSAMIGLIA, M.; FRAILE, L.; ESPINAL, A.; CUXART, A.; SEMINATI, C.; MARTIN, M.; MATEU, E.; DOMINGO, M.; SEGÁLES, J. 2007. Sow porcine circovirus type 2 (PCV-2) status effect on litter mortality in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Res.Vet.Sci. 82: 299-304.

CENTRE DE RECERCA EN SANITAT ANIMAL. 2012. [en línea] <<http://www.cresa.cat/cresa3/default.asp?mod=strmenu01&anio=2008&sub=noticia49&idioma=es>> [consulta: 09-04-2012]

CHIANINI, F.; MAJO, N.; SEGALÉS, J.; DOMÍNGUEZ, J.; DOMINGO, M. 2003. Immunohistochemical characterisation of PCV-2 associate lesions in lymphoid and non-lymphoid tissues of pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Vet. Immunol. Immunopathol. 94 (1): 63-75.

CHILE. SERVICIO AGRÍCOLA GANADERO. 2009. Documento Informativo [en línea] <http://laima.sag.cl/AppSag/public/medicamentos/medicamentos_BL.jsp> [consulta: 17-06-2009]

CLARK, E. 1997. Post-weaning multisystemic wasting syndrome. In: Proceedings of the American Association of Swine Practitioners, 28th Annual Meeting, pp.499–501.

CLARK, E.; HARDING, J.; ALLAN, G.; MEEHAN, B.; TODD, D.; KENNEDY, S.; MCNEILLY, F.; ELLIS, J.; ESPUNA, E.; BOTNER, A.; CHARREYRE, C. 1997. Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. Vet. Rec.141 (25): 660.

DARWICH, L.; BALASCH, M.; PLANA-DURAN, J.; SEGÁLES, J.; DOMINGO, M.; MATEU, E. 2003. 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 84:3453-7

DARWICH, L.; SEGÁLES, J.; MATEU, E. 2004. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: an immune riddle. *Arch. Virol.* 149 (5): 857-874.

DONG-JUN, A.; IN-SOON, R.; DAE-SUB, S.; CHOI-KYU, P.; BONG-KYUN, P. 2007. Phylogenetic characterization of porcine circovirus type 2 in PMWS and PDNS korean pigs between 1999 and 2006. *Vir. Res.* 129: 115-122.

ELLIS, J.; HASSARD, L.; CLARK, E.; HARDING, J.; ALLAN, G.; WILLSON, P.; STROKAPPE, 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 (1): 44-51.

FENAUX, M.; HALBUR, P.; GILL, M.; TOTH, T.; MENG, X. 2000. Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV- 2. *J. Clin. Microbiol.* 38 (7): 2494-2503.

GILPIN, D.; MCCULLOUGH, K.; MEEHAN, B.; MCNEILLY, F.; MCNAIR, I.; STEVENSON, L.; FOSTER, J.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; ADAIR, B.; ALLAN, G. 2003. In vitro studies on the infection and replication of porcine circovirus type 2 in cells of the porcine immune system. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 94 (3): 149-161.

HAMEL, A.; LIN, L.; NAYAR, G. 1998, Nucleotide sequence of porcine circoviruses associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J. Virol.* 72: 5262–5267.

HAMEL, A.; LIN, L.; SACHVIE, C.; GRUDESKI, E.; NAYAR, G. 2000. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *Can. J. Vet. Res.* 64 (1): 44–52.

HARDING, J.; CLARK, E. 1997. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health Prod.* 5 (5): 201-203.

HARMS, A.; SORDEN, D.; HALBUR, G.; BOLIN, R.; LAGER, M.; MOROZOV, I.; PAUL, S. 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.* (5): 528-539.

INTERNATIONAL COMMITTEE OF TAXONOMY OF VIRUSES. 2011. [en línea] <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2011>> [consulta: 03-10-2012]

KHAYAT, R.; BRUNN, N.; SPEIR, J.; HARDHAM, J.; ANKENBAUER R.; SCHNEEMANN A.; JOHNSON J. 2011. The 2.3-angstrom structure of porcine circovirus 2. *J Virol.* 85(15):7856-62.

KIM, J.; HAN, D.; CHOI, C.; CHAE, C. 2001. Differentiation of porcine circovirus (PCV)-1 and PCV-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods.* 98 (1): 25–31.

KIM, J.; CHAE, C. 2003. Multiplex nested PCR compared with *in situ* hybridization for the differentiation of porcine circoviruses and porcine parvovirus from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can. J. Vet. Res.* 67 (2): 133-137.

KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.; MEEHAN, B.; KENNEDY, S.; MCNEILLY, F.; ALLAN, G. 2000. Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Vet. Pathol.* 37:254-263.

KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.; MCNEILLY, F.; GILPIN, D.; MEEHAN, B.; MCCULLOUGH, K.; ALLAN, G. 2002. Immunologic features of porcine circovirus type 2 infection. *Vir. Immunol.* 15, 567-82.

LADEKJAER-MIKKELSEN, A.; NIELSEN, J.; STADEJEK, T.; STORGAARD, T.; KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.; MCNEILLY, F.; ALLAN, G.; BOTNER, A. 2002. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in immunostimulated and non-immunostimulated 3-week-old piglets experimentally infected with porcine circovirus type-2 (PCV-2). *Vet. Microbiol.* 89:97-114.

LAROCHELLE, R.; BIELANSKI, A.; MULLER, P.; MAGAR, R. 2000. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. *J. Clin. Microbiol.* 38 (12): 4629–4632.

LIU, J.; CHEN, I.; KWANG, J. 2005. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2 infected cells and its role in virus induced apoptosis. *J. Virol.* 79 (13): 8262-8274.

MADEC, F.; EVENO, E.; MORVAN, P.; HAMON, L.; BLANCHARD, P.; CARIOLET, R.; AMENNA, N.; MORVAN, H.; TRUONG, C.; MAHE, D.;

ALBINA, E.; JESTIN, A. 2000. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in france: clinical observations from follow-up studies on affected farms. *Livestock prod. Sci.* 63: 223-233.

MADSON, D.; OPRIESSNING, T. 2009. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV-2) infection on reproduction: disease, vertical transmission, diagnostics and vaccination. *En pubmed.*

MANIATIS, T.; FRITSCH, E.; SAMBROOK, J. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 1^a Ed., Coldspring Harbor Laboratory, C.S.H., New York.

MANKERTZ, A.; DOMINGO, M.; FOLCH, J.; LECANN, P.; JESTIN, A.; SEGALÉS, J.; CHMIELEWICZ., B., PLANA-DURÁN, J.; SOIKE, D. 2000.Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Res.* 66 (1): 65-77.

MANKERTZ, A.; HILLEBRAND, B. 2001. Replication of porcine circovirus type 1 requires two proteins encoded by the viral rep gene. *Virology.*279 (2): 429-438.

MCCULLOUGH, K.; VINCENT, I.; SUMMERFIELD, A.; KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.; SEGALÉS, J.; ALLAN, G. 2007. The immunology of PCV-2 infections. In: 38th Annual Meetings Proceedings. A.A.S.V.P. March 3-6. Doubletree Hotel. Orlando, Florida, USA: 497- 504.

MCINTOSH, K.; HARDING, J.; PARKER, S.; ELLIS, J.; APPLEYARD, G. 2006. Nested polymerase chain reaction detection and duration of porcine circovirus type 2 in semen with morphological analysis from naturally infected boars. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18 (4): 380-384.

MCNEILLY, F.; KENNEDY, S.; MOFFETT, D.; MEEHAN, B.; FOSTER, J.; CLARKE, E.; ELLIS, J.; HAINES, D.; ADAIR, B.; ALLAN, G. 1999. A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalinixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J. Virol. Methods* 80, 123–128.

MEEHAN, B.; MCMEILLY, F.; TODD, D.; KENNEDY, S.; JEWHRST, V.; ELLIS, J.; HASSARD, L.; CLARK, E.; HAINES, D.; ALLAN, G. 1998. Characterization of novel circovirus DNA's associated with wasting syndromes in pigs.*J. Gen. Virol.* 79 (9): 2171-2179.

MISINZO, G.; DELPUTTE, P.; MEERTS, P.; LEFEBVRE, D.; NAUWYNCK, H. 2006. Porcine circovirus 2 uses heparan sulfatase and chondroitin

sulfate B glycosaminoglycans as receptors for its attachment to host cells. J. Virol. 80 (7): 3487–3494.

MOROZOV, I.; SIRINARUMITR, T.; SORDEN, S.; HALBUR, P.; MORGAN, M.; YOON, K.; PAUL, P. 1998. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. J Clin Microbiol 36:2535-41.

NAUWYNCK, H.; LEFEBVRE, D.; MISINZO, G.; MEERTS, P.; MATEUSEN, B.; SANCHEZ, R.; DELPUTTE, P. 2007. Pathogenesis of porcine circovirus 2 infections. American Association of Swine Veterinary. pp. 489-493.

NAWAGITGUL, P.; MOROZOV, S.; BOLIN, P.; HARMS, S. 2000. Open reading frame 2 of porcine circovirus 2 encodes a major capsid protein. J. Gene. Virol. 81: 2281-2287.

NAWAGITGUL, P.; HARMS, P.; MOROZOV, I.; THACKER, B.; SORDEN, S.; LEKCHAROENSUK, C.; PAUL, P. 2002. Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 9, 33–40.

NORIEGA, J.; REYES, P.; BUCAREY, S. 2007. Circovirus porcino: un virus pequeño que genera un gran problema. Av Cs Vet. 22(1-2): 62-71

OLVERA, A.; CORTEY, M.; SEGALES, J. 2007. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. Virology 357:175-85.

OPRIESSNIG, T.; THACKER, E.; YU, S.; FENAUX, M.; MENG, X.; HALBUR, P. 2004. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual-infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. Vet. Pathol. 41 (6): 624-640.

PARK, J-S.; J. KIM., Y.; HA., K.; JUNG, C.; CHOL., J-K.; LIM, S-H.; CHAE, C. 2005. Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. J. Comp. Pathol. 132 (2): 139-144.

PÉREZ-MARTÍN, E.; GÓMEZ-SEBASTIÁN, S.; ARGILAGUET, J.; SIBILA, M.; FORT, M.; NOFRARÍAS, M.; KURTZ, S.; ESCRIBANO, J.; SEGALÉS, J., RODRÍGUEZ, F. 2010. Immunity conferred by an experimental vaccine based on the recombinant PCV-2 Cap protein expressed in *Trichoplusia ni* larvae. Vaccine. 28(11):2340-9.

RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G.; SEGALÉS, J.; CALSAMIGLIA, M.; RESENDES, A.; BALASCH, M.; PLANA-DURÁN, J.; CASAL, J.; DOMINGO, M. 2002. Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of

pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Amer. J. Vet. Res.* 63: 354–357.

ROSELL, C.; SEGALÉS, J.; PLANA-DURÁN, J.; BALASCH, M.; RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G.; KENNEDY, S.; ALLAN, G.; MCNEILLY, F.; LATIMER, K.; DOMINGO, M. 1999. Pathological, immunohistochemical, and in situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J. Comp. Pathol.* 120 (1): 59–78.

ROSELL, C.; SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. 2000. Hepatitis and staging of hepatic damage in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. *Vet. Pathol.* 37 (6): 687-692.

SEGALÉS, J.; ALLAN, G.; DOMINGO, M. 2005. Porcine circovirus diseases. *Animal Health Research Review.* 6: 119-142.

TISCHER, I., RASCH, R., TOCHTERMANN, G. 1974. Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbe Bakteriol Org A* 226:153–167.

TISCHER, I.; GELDERBLOM, H.; VETTERMANN, W.; KOCH, M. 1982. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* 295:64-66.

TISCHER, I., MIELDS, W., WOL, D., VAGT, M., GREIM, W. 1986. Studies epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Archives of Virology* 91:271–276.

TISCHER, I.; PETERS, D.; RASCH, R.; POCIULI, S. 1987. Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Arch. Virol.* 96 (1): 39-57.

TOOD, D; WESTON, J; MACKIE, D; RIXON, F; MCNULTY, M. 1990. Purification and biochemical characterization of chicken anemia agent. *J.Gen.Virol.*71:819-823.

TRIBLE, B., KERRIGAN, M., CROSSLAND, N., POTTER, M., FAABERG, K., HESSE, R., ROWLAND, R. 2011. Antibody recognition of porcine circovirus type 2 capsid protein epitopes after vaccination, infection, and disease. *Clin Vaccine Immunol.*18 (5):749-57.

TRIBLE, B.; RAMIREZ, A.; SUDDITH, A.; FULLER, A.; KERRIGAN, M.; HESSE, R.; NIETFELD, J.; GUO, B.; THACKER, E.; ROWLAND, R. 2012. Antibody responses following vaccination versus infection in a porcine circovirus-

type 2 (PCV-2) disease model show distinct differences in virus neutralization and epitope recognition. *Vaccine*. 30(27):4079-85

VINCENT, I.; CARRASCO, C.; HERRMANN, B.; MEEHAN, B.; ALLAN, G.; SUMMERFIEL, A.; MCCULLOUGH, K. 2003. Dendritic cells harbour infectious PCV-2 in absence of the apparent modulation of the cells or replication of the virus. *J. Virol.*77 (24): 13288–13300.

VINCENT, I.; CARRASCO, C.; GUZYLACK-PIRIOU, L.; HERRMANN, B.; MCNEILLY, F.; ALLAN, G.; SUMMERFIELD, A.; MCCULLOUGH, K. 2005. Subset-dependent modulation of dendritic cell activity by circovirus type 2. *Immunology*.115 (3): 388–98.

VINCENT, I.; BALMELLI, C.; MEEHAN, B.; ALLAN, G.; SUMMERFIELD, A.; MCCULLOUGH, K. 2006. Silencing of natural interferon producing cell activation by porcine circovirus type 2 DNA. *Immunology*. 120 (1): 47-56.

WEST, K.; BYSTROM, J.; WOJNAROWICZ, C.; SHANTZ, N.; JACOBSEN, M.; ALLAN, G.; HAINES, D.; CLARK, E.; KRAKOWKA, S.; MCNEILLY, F.; KONOBY, C.; MARTIN, K.; ELLIS, J. 1999. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11 (6): 530-532.

YU, S.; OPRIESSNIG, P.; KITIKOON, D.; NILUBOL, P.; HALBUR, G.; THACKER, E. 2007. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) distribution and replication in tissues and immune cells in early infected pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 115:261-72.

