



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

**DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL DE CIRCOVIRUS PORCINO
EN CERDOS INMUNIZADOS CON UNA VACUNA ORAL
EXPERIMENTAL**

JONATÁN ARMANDO MARTÍNEZ VÁSQUEZ

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

PROFESOR GUÍA: SERGIO BUCAREY VIVANCO
Universidad de Chile

PROYECTO FONDEF IT13120021

SANTIAGO, CHILE
2016



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

**DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL DE CIRCOVIRUS PORCINO
EN CERDOS INMUNIZADOS CON UNA VACUNA ORAL
EXPERIMENTAL**

JONATÁN ARMANDO MARTÍNEZ VÁSQUEZ

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

Nota Final:

Profesor Guía: Sergio Bucarey Vivanco

Profesor Corrector: Leonardo Sáenz

Profesor Corrector: Victor Neira Ramírez

PROFESOR GUÍA: SERGIO BUCAREY VIVANCO
Universidad de Chile

SANTIAGO, CHILE

2016

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo agradecer a Dios que siempre ha guiado mi camino, luego agradecer a mi familia que me ha guiado y acompañará en cada etapa importante de mi vida.

Agradezco a mis amigos en general que son capaces de aguantar mi carácter y por darme animo cada vez que es necesario.

Agradezco a mi profesor guía que fue capaz de enseñarme que no hay resultados en la vida que sean buenos o malos, son solo resultados.

Y finalmente agradezco a quien fue mi compañía durante la mayor parte de mi carrera universitaria quien fue mi aliento y mi sustento en todo momento V. R.

RESUMEN

El circovirus porcino tipo 2 (PCV-2), es un virus pequeño (1768 nucleótidos), ubicuo y resistente en el ambiente. PCV-2 es considerado como el agente etiológico necesario, mas no suficiente para la presentación del Síndrome multisistémico de desmedro postdestete (PMWS). Este síndrome se caracteriza por provocar una severa inmunosupresión, además de un retraso en el crecimiento de los cerdos. Una de las medidas sanitarias efectivas que se reconoce a la hora de disminuir los efectos provocados por el PCV-2 es la inmunización a través de vacunas. Estas en su mayoría son administradas de forma parenteral y han demostrado mejorar índices productivos como ganancia de peso diario y disminución de la mortalidad. En este estudio se evaluó la carga viral de PCV-2 en suero de cerdos, que fueron inmunizados con una vacuna experimental de administración oral que utiliza como agente antigénico la proteína CAP de PVC-2 versus una vacuna comercial de administración parenteral y un grupo control sin inmunizar. Los resultados indican que no existe diferencia significativa en la carga viral de los tres grupos estudiados en los distintos días de muestreo.

Palabras clave: Circovirus porcino tipo 2 (PCV-2); Síndrome multisistémico de desmedro postdestete (PMWS); Vacuna; Carga viral.

ABSTRACT

Porcine circovirus type 2 (PCV-2) is a small virus (1768 nucleotides), ubiquitous and resistant in the environment. PCV-2 is considered as the necessary, but not sufficient, etiologic agent for post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). This syndrome is characterized by causing severe immunosuppression and delayed growth of pigs. One of the effective sanitary measures recognized when decreasing the effects caused by PCV-2 is immunization through vaccination. These are mostly parenterally administered and have shown to improve production rates such as daily weight gains and decreased mortality. This study evaluated the viral load of PCV-2 in serum from pigs which were immunized with an experimental oral vaccine that uses the CAP protein as an antigenic agent versus a commercial vaccine for parenteral administration and a control group unimmunized. The results indicate no significant difference in viral load of the three groups during different days of testing.

Keywords: Porcine circovirus type 2 (PCV-2); Postweaning multisystemic wasting syndrome; Vaccine; Viral load.

INTRODUCCIÓN

La carne de cerdo se ha consolidado como una de las más consumidas a nivel mundial (FAO, 2002), además es uno de los sectores con mayor crecimiento en el rubro pecuario.

La participación de la carne porcina en el mercado internacional alcanza un 42% dentro de del total de carnes, y en el mercado chileno la producción de carne de cerdo en vara ocupa el segundo lugar, alcanzando un 38% en la producción de carne a nivel nacional (Asprocer, sf.).

Según la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA) el aumento de la producción mundial de carne porcina se debe al aumento en el peso por animal, desaparición de los criadores ineficientes, y mejoras en la eficiencia productiva de los criadores modernos, entre otros (Echávarri y de la Fuente, 2012).

Con el objetivo de incrementar estas cifras, se hace necesario eliminar aquellos factores que disminuyen la producción. Dentro de estos, se considera que el que genera mayor cantidad de pérdidas es el síndrome de desmedro post destete (PMWS), siendo el circovirus porcino tipo II (PCV-2) el agente etiológico necesario, pero no suficiente para la presentación de este síndrome. La enfermedad se caracteriza por causar debilitamiento y efectos inmunosupresores severos en el hospedero porcino, por lo tanto, el animal se torna incapaz de responder a señales de peligro asociadas a patógenos. La infección por PCV-2 genera pérdida de la conexión entre el sistema inmune innato y adquirido, haciendo al hospedero susceptible a las infecciones concomitantes. De esta forma, el PCV-2 genera una infección persistente de difícil control y en la cual los tratamientos sólo son paliativos.

En Chile se han introducido dos vacunas contra PCV-2 desde el mercado internacional. Ambas de uso parenteral, han disminuido las tasas de mortalidad de los animales infectados y mejorado el crecimiento, reduciendo así el impacto económico que PCV-2 genera en la producción porcina (Estrada, 2009).

Aunque las vacunas inyectables son eficientes, existen problemas asociados al uso de este tipo de productos tales como: duración del procedimiento (requiere mayor tiempo en relación al uso de otras vías de administración), estrés en los animales, inducción de la

respuesta inflamatoria en el sitio de inyección y la necesidad de procedimientos laboriosos. Por las razones anteriores, se ha indagado en el estudio y creación de vacunas orales que pudiesen suministrarse en el alimento y/o agua de bebida, lo que se traduciría en una mejor entrega del antígeno, evitando problemas de estrés y manejo mencionados.

De esta forma, en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile se ha generado una alternativa que consiste en el desarrollo de una vacuna de formulación oral, que disminuiría la manipulación de los animales y los costos indirectos asociados a la vacunación por la vía inyectable.

En la presente memoria de título se medirán los niveles de carga viral en sueros mediante qPCR, en cerdos vacunados con una vacuna comercial parenteral y otra experimental oral, con el fin de determinar la eficacia de esta última bajo condiciones de campo en un plantel nacional.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Características del Circovirus

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), clasifica al circovirus dentro de la familia *Circoviridae*, género *Circovirus*. Actualmente, a esta familia se le atribuye la propiedad de afectar a aves y cerdos (Li *et al.*, 2010) y más recientemente se ha demostrado que también puede afectar a caninos (Kapoor *et al.*, 2012). Dentro del grupo de circovirus porcino (PCV) se describen dos especies: circovirus porcino tipo 1 o PCV-1, y circovirus porcino tipo 2 o PCV-2, siendo el primero un virus apatógeno, y el segundo patógeno. Además, este último es reconocido como agente etiológico principal del PMWS.

El PCV-2 es un virus pequeño que posee 1768 nucleótidos, y DNA circular de una sola hebra (Fenaux *et al.*, 2000, Hamel *et al.*, 1998). Este virus cuenta con dos principales marcos de lectura abiertos (open reading framework, ORFs por su sigla en inglés) importantes. El gen de replicasa (Rep) u ORF-1, el cual codifica una proteína (35,7kDa) que participa en la replicación del virus, y el gen de la cápside (Cap) u ORF-2, el cual codifica la principal proteína de la cápside (27,8kDa) (Cheung, 2003, Olvera *et al.*, 2007). Además, se ha descrito un tercer ORF que se piensa que puede estar implicado en apoptosis (Liu *et al.*, 2005).

El análisis filogenético de PCV sugiere que tanto PCV-1 como PCV-2 poseen un origen común sin embargo las cepas virales, obtenidas mediante aislamiento viral, divergen según la ubicación geográfica de donde son obtenidas las muestras (Fenaux *et al.*, 2000). Entre los genomas de PCV-2 existe un nivel de homología cercana al 94% (Olvera *et al.*, 2007), lo que da cuenta de que el genoma es relativamente estable, dificultando la detección de diferencias significativas entre las cepas de diferentes regiones geográficas (Fenaux *et al.*, 2000). Pese a lo anterior, los genomas de PCV-2 pueden ser divididos en distintos linajes clonales (Olvera *et al.*, 2007). Hasta la fecha se han identificado tres genotipos de PCV-2: PCV2a, PCV2b y PCV2c y dos subtipos llamados PCV2d y PCV2e (Hee *et al.*, 2015).

Diseminación viral

En infecciones experimentales se ha demostrado que PCV-2 se elimina en grandes cantidades a través de las secreciones nasales, orales y fecales, siendo la primera de ellas la principal vía de transmisión entre los animales. Además, existe el riesgo de transmitir el virus de manera iatrogénica (Magar *et al.*, 2000). Se ha descrito que el tiempo de infección de un animal promedio corresponde a 18 días; cuando éstos, sin haber sido tratados previamente, mantienen contacto con animales infectados (Patterson *et al.*, 2011).

Epidemiología

El circovirus porcino se caracteriza por ser ubicuo, altamente contagioso e infeccioso, y muy resistente a la mayoría de los desinfectantes de uso común. Presenta una morbilidad que fluctúa entre 4 y 30%, y una mortalidad entre 70 y 80%. Existen datos que avalan que la prevalencia de PCV-2 es superior al 82%, y que la infección es cercana al 100% en animales a término; por lo que se deduce que una vez presente PCV-2 en un plantel, este último puede asumirse como 100% positivo (Puvanendiran *et al.*, 2011).

Enfermedades asociadas a circovirus porcino (PCVAD)

Se ha asociado la infección de PCV-2 en cerdos con diferentes presentaciones clínicas, *e.g.* dermatitis porcina, infección sistémica, síndrome de desmedro post destete (PMWS), y síndrome de dermatitis y nefropatía (PDNS) (Li *et al.*, 2010). Entre los signos y síntomas clínicos asociados a las presentaciones anteriores destacan: aumento de la mortalidad, depleción linfoide, emaciación, enteritis, fallas reproductivas, inflamación granulomatosa de tejidos linfoides, lesiones cardiovasculares y hepáticas, linfadenitis necrotizante, signos respiratorios, entre otras (Segalés, 2012).

El PMWS representaría la presentación más grave. En ella los animales cursan con depresión inmune, disminución en la ganancia de peso, e incluso muerte (Puvanendiran *et al.*, 2011). Cabe destacar que la presencia de PCV-2 actúa como un factor desencadenante para la presentación de este síndrome, sin embargo su presencia no es necesariamente indicadora de la existencia de alguna patología, ya que numerosos animales cursan con infecciones sub-clínicas, en las cuales no se manifiestan signos clínicos (Segalés *et al.*, 2005). Además, cuando el PCV-2 co-infecta junto a otros virus, como por ejemplo el virus PRRS, el desarrollo e incidencia de PMWS es más alta (Silva *et al.*, 2011).

Diagnóstico de PCV-2

Existen distintos métodos de diagnóstico de PCV-2, entre los cuales se puede mencionar la detección de antígenos virales a través de técnica inmunohistoquímica, detección del ácido nucleico viral mediante hibridación "*in situ*", reacción de la polimerasa en cadena (PCR), y amplificación isothermal de ácido nucleico. También puede emplearse la detección de anticuerpos específicos a través del ensayo de inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA) y el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). De las técnicas anteriormente mencionadas, una de las más específicas y sensibles es el diagnóstico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta es una técnica precisa que permite amplificar múltiples copias de un segmento de DNA. Para esto es necesario la utilización de cebadores, una plantilla de DNA, nucleótidos y la enzima DNA polimerasa. Esta composición es llevada a un termociclador que aumenta y disminuye la temperatura de la reacción en forma cíclica a través de tres principales pasos: denaturación, alineamiento y extensión, donde la muestra es amplificada. Posteriormente las muestras obtenidas con el DNA amplificado, son medidas a través de electroforesis. Es en este último paso donde es posible saber si la reacción fue amplificada. Existe una variante de este método denominada reacción de la polimerasa en cadena en tiempo real (qPCR). La principal ventaja que posee esta técnica por sobre el PCR convencional es la detección de la amplificación en fases tempranas de la reacción, esto a su vez permite cuantificar la cinética de la reacción para posteriormente interpolar valores de DNA viral mediante la utilización de curvas estándar (O`Dea, 2010).

Algunos autores determinan que posible categorizar a los cerdos infectados mediante cuantificación de carga viral (VC) medida por qPCR. Si VC es inferior a 10^6 copias PCV-2/ml de DNA se les considera cerdos subclínicos, si VC se encuentra en el rango 10^6 - 10^7 copias PCV-2/ml de DNA los cerdos se consideran sospechosos, y finalmente como cerdos positivos si presentan más de 10^7 copias PCV-2/ml de DNA, respectivamente (Olvera *et al*, 2004).

Vacunas contra PCV-2

Por las características que presenta el virus, su control y prevención se torna bastante difícil en los planteles porcinos. Dentro de las alternativas que han demostrado ser más eficaces a se encuentran las vacunas anti PCV-2.

En el año 2006 surgió la primera vacuna comercial, proveniente del Laboratorio Merial, bajo el nombre de Circovac[®], una vacuna inactivada con un adyuvante oleoso (Fraile *et al.*, 2012). Más tarde se incluyeron tres vacunas: CircoFLEX[®] de Boehringer Ingelheim; Eludir[®] de Intervet/ Merck y Porcillis PCV[®] de Schering-Plough/Merck. Estas tres últimas formuladas a partir del ORF-2. Por último, está disponible en el mercado una vacuna quimérica de PCV 1 y 2 llamada Suvaxyn PCV2[®] de laboratorio Zoetis (Fenaux *et al.*, 2004). Fue hasta el año 2009 cuando el Servicio Agrícola Ganadero (SAG) permitió la importación de dos vacunas anti PCV-2 (Estrada, 2009). Actualmente, según el registro del SAG, están disponibles en el mercado nacional las siguientes vacunas anti PCV2: Ingelvac Circoflex, Foster PCV, Cicromune, Circovac, Porcilis PCV, Porcilis PCV M Hyo, Circumvent PCV, Circumvent PCV M, Porcilis PCV, Porcilis PCV M Hyo, Porcilis PCV y Porcilis PCV M Hyo.

Chae (2012) identificó y comparó la eficacia de cinco vacunas comerciales anti PCV-2 bajo condiciones experimentales y de campo, concluyendo que ellas difieren en adyuvantes, administración, antígenos, y dosis necesaria; sin embargo, todas ellas son altamente eficaces contra la infección de PCV-2 sobre la base de datos clínicos: como mejora en ganancia diaria de peso, disminución de la mortalidad. Datos inmunológicos: disminución en la viremia, disminución de la carga viral en suero, secreciones nasales y fecales. Y sobre datos patológicos: disminuyendo las lesiones microscópicas y la carga de PCV-2 en tejidos linfoides en comparación con animales no vacunados.

La administración de las vacunas debe realizarse en el momento en que los anticuerpos maternos residuales son mínimos y en que los cerdos tienen la mínima posibilidad de infectarse de forma natural, dado que los anticuerpos maternos pueden presentar algún tipo de interferencia al momento de la vacunación (Chae, 2012). Por otro lado, se ha demostrado que los anticuerpos maternos a partir de 3 a 4 semanas de edad no producirían una disminución significativa en la eficacia de la vacunación contra PCV-2. Se ha

demostrado que la vacunación a las 4 semanas de vida de los animales resulta ser efectiva en la disminución de PCVAD (Pejsak *et al.*, 2010)

En la actualidad, todas las vacunas formuladas contra PCV-2 deben administrarse por vía parenteral y han demostrado ser eficientes para su propósito. Las desventajas de esta vía de administración es que se requiere de personal capacitado, mayor disponibilidad de tiempo para la aplicación de la vacuna, etc. Además, las vacunas presentan el inconveniente de que producir una respuesta inflamatoria exacerbada en el sitio de inyección, con el consecuente estrés que genera en los animales derivado del manejo, lo que disminuye la respuesta a la vacunación (Kim *et al.*, 2009, Padgett y Glaser, 2003).

Numerosos estudios indican que el estrés, en general, exagera las patologías bacterianas y virales, además de generar enfermedades autoinmunes y retardar la cicatrización de heridas, dado que las hormonas del estrés (glucocorticoides y catecolaminas) inhiben la circulación de neutrófilos, células presentadoras de antígenos (APC), linfocitos B y T, entre otros. Además, disminuye la producción de citoquinas que generan respuesta inmune adaptativa (Padgett y Glaser, 2003). Por lo tanto, al tomar en consideración que el PCV-2 no actúa de manera aislada al producir los síndromes, sino que lo hace en conjunto a una serie de otros patógenos, se hace indispensable disminuir el estrés de los animales; y por lo tanto, la vía de vacunación utilizada debe ser la adecuada, favoreciendo la inmunización pasiva que otorgan las vacunas orales (Bucarey *et al.*, 2009).

Inmunidad de mucosas

El intestino es el órgano que posee mayor cantidad de células inmunes del organismo. Su función no sólo tiene relación con la digestión y absorción de nutrientes, sino que también contempla un rol en el sistema inmune. Este tejido debe ser capaz de identificar aquellos elementos inocuos para el organismo, y a la vez reaccionar ante aquellos que son perjudiciales. En el intestino actúan dos sistemas de defensa principales: inespecíficos (no inmunes que evitan la adhesión de elementos dañinos), y específicos (inmunoglobulinas y células del sistema inmune intestinal) (Vega, 1994). Además, se debe considerar que las mucosas se comportan como interfases entre el medio interno y externo, y están expuestas a una mayor cantidad de antígenos. La mucosa puede generar tolerancia frente a ciertas partículas mediante un mecanismo denominado “exclusión inmune”, mediado por la acción

de inmunoglobulinas secretorias y de la capa de mucus, los cuales impiden la adhesión y/o invasión de antígenos a las células epiteliales (Everett *et al.*, 2004; Strugnell y Wijburg, 2010). Por otra parte, cuando un antígeno es presentado se genera un proceso inflamatorio local, el cual resulta en respuesta mucosal efectiva (Vega, 2007). La defensa a microorganismos y toxinas en la luz de los órganos mucosos depende de la secreción de inmunoglobulinas A (IgA), producidas en los tejidos linfoides y mucoso, y transportadas activamente a través de las células epiteliales hasta la luz (Abbas *et al.*, 2002).

La eficacia de las vacunas orales es variable, explicado principalmente porque la biodisponibilidad es baja debido a características propias de las vacunas tales como: características hidrófilas, impermeabilidad a la barrera mucosa y alto peso molecular (Islam *et al.*, 2012). Además, la biodisponibilidad de los antígenos vacunales es disminuida por características que son atribuibles al hospedero, puesto que estas vacunas se enfrentan a los mecanismos de defensa propios del sistema digestivo, *e.g.* dilución en las secreciones mucosas, captura en el mucus del intestino, ataque por proteasas y nucleasas, exclusión inmunológica por parte de las mucosas (Thanou *et al.*, 2001).

Por las razones anteriores tiene sentido utilizar un vehículo o transportador, como el quitosano, para la microencapsulación de antígenos vacunales. Este es un polisacárido que mejora la absorción de biomacromoléculas administradas por la vía mucosal. Este polímero posee características mucoadhesivas y de permeabilidad en la mucosa, proporcionando a la vacuna una interacción íntima con la mucosa intestinal, asegurando de esta forma una liberación sostenida y controlada del antígeno (Islam *et al.*, 2012).

En base a esta premisa, es que se ha elaborado una vacuna experimental oral contra PCV-2, que puede ser entregada en el alimento y/o agua de bebida, traducándose en una mejora tecnológica en el suministro del antígeno y disminuyendo el estrés que genera una inoculación parenteral (Bucarey *et al.*, 2009).

OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar el efecto, sobre la carga viral, de una vacuna experimental oral versus una vacuna comercial inyectable contra Circovirus Porcino Tipo 2 en cerdos de criadero

ESPECÍFICOS

Determinar mediante la utilización de qPCR la carga viral de PCV-2 en suero de cerdos no inmunizados y cerdos inmunizados con vacuna experimental oral y vacuna comercial contra PCV-2

Evaluar si existen diferencias estadísticamente significativas entre la carga viral de PCV-2 de cada uno de los grupos de animales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Protocolo de vacunación y muestreo

Para la realización de esta memoria fueron utilizados cerdos del predio Comercial e Industrial “El Monte”, ubicado en Talagante, Región Metropolitana de Santiago.

Los animales muestreados correspondieron a 105 cerdos de raza Landrace que fueron destetados a los 25 días de vida, divididos en 3 grupos homogéneos de 35 animales cada uno, y posteriormente diferenciados mediante un dispositivo de identificación individual (crotal) situado en la oreja derecha con números correlativos. El grupo 1 correspondió a animales sin inmunizar (control negativo), el grupo 2 a individuos sujetos a vacunación con producto comercial (Circumvent®PCV, Intervet International B.V.), y el grupo 3 a aquellos inmunizados con la vacuna experimental. Del total de animales, se escogieron al azar 10 representantes de cada grupo para la realización de las pruebas.

El protocolo de vacunación que se utilizó en el grupo 2 fue el sugerido por el Laboratorio fabricante de la vacuna comercial; el cual recomienda que la inmunización se realice vía intramuscular en la zona de la tabla del cuello, utilizando 2 ml del producto a los 25 días de edad con un *booster* a los 55 días. Este producto consiste en una vacuna sub-unitaria inactivada que contiene la proteína CAP del PCV-2 como ingrediente activo.

En el grupo 3 se administró 0,5 ml por vía oral, y 0,5 ml por vía intranasal de la vacuna experimental a los 25 días de edad, luego se aplicó booster a los 45 y 65 días de vida. Esta vacuna fue formulada mediante microencapsulación de extractos crudos de levadura, enriquecidos con antígenos de PCV-2, con quitosano de bajo peso molecular 1% mediante el método de gelación iónica (Nuñez, 2014).

En todos los grupos se extrajeron 5 ml de sangre a los 25, 45, 65, 85, 105, 125 y 145 días de vida que fueron obtenidos a través de punción de la vena yugular con estiletos de 21G x 1 (Precision Glide), o en su defecto con jeringas desechables de 5 ml estériles con aguja de 21G x 1½. Una vez obtenidas las muestras, éstas fueron almacenadas en tubos *Vacutainer* para serología, sin anticoagulantes. Los tubos fueron identificados con el número correspondiente al crotal de cada animal, posteriormente fueron transportados en neveras al

Laboratorio Biovetec, donde fueron centrifugadas a $10.000 \times g$ por 10 min a 4°C , con el fin de extraer el suero que se conservó en tubos eppendorf de 2 ml a -80°C .

Extracción de DNA de las muestras de suero

Para realizar la extracción de DNA se utilizó el kit de reactivos AxyPrepBloodGenomic DNA Miniprep Kit (AXYGEN Biosciences[®]), según indicaciones técnicas el fabricante.

Posteriormente, se procedió a determinar la concentración de DNA a través de espectrofluorometría. Para ello se utilizó el fluoróforo PicoGreen[®] y luminómetro GloMax[®] 20/20, con el módulo de fluorescencia azul que mide longitudes de onda Ex 365 nm y Em 440 - 470nm. Para la cuantificación de la concentración de DNA fue necesario realizar una recta de calibración a partir de diluciones seriadas. Para ello, se utilizó el estándar de DNA Thermo Scientific Lambda DNA/HindIII Marker a una concentración de $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, con lo cual fueron interpoladas las lecturas del luminómetro.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

Para llevar a cabo el qPCR se solicitó la síntesis de los partidores “Cap-98” (Risso, 2013) mediante la utilización del software Universal ProbeLibrary AssayDesign Center de la compañía Roche[®]. Las secuencias de dichos partidores fueron las siguientes:

- “Reverse”: 5`- CCT GGG GGA AGA AAG TCA TTA – 3`
- “Forward”: 5`- CGC ACC TTC GGA TAT ACT ATC AA – 3`

En la reacción de qPCR fue utilizado el kit de reactivos FastStart Essential DNA Green Master (Roche[®]), el que contiene FastStart Taq DNA polimerasa, tampón de reacción, mezcla de dNTP, colorante SYBR Green I, y MgCl_2 . Para la reacción se empleó un volumen final de 12 μL . Este volumen estuvo compuesto por 0,5 μL de cada uno de los partidores, 6 μL de FastStartEssential DNA Green Master, 1 μL de templado de DNA y el resto del volumen fue completado con 4 μL agua libre de nucleasas.

El qPCR se realizó en el termociclador LightCycler[®] Nano System (Roche[®]). La formación del producto fue monitoreado a través de la detección de unión fluorescente de SYBR[®] Green al DNA, en cada paso de elongación. Las condiciones de amplificación se realizaron de acuerdo a una modificación del protocolo descrito por Zheng *et al.*, 2012, consistentes en la activación inicial de la DNA polimerasa a 95°C durante 10 minutos,

seguidos por 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, alineamiento de partidores a 52° C durante 30 segundos, y extensión a 72° C durante 30 segundos. Inmediatamente después del término de la amplificación, se realizó una curva de temperatura de fusión (o curva de Melting) para confirmar la especificidad de amplificación. Todas las muestras fueron examinadas en duplicado.

Una vez finalizada la reacción los datos fueron analizados con el *software* LightCycler® Nano de Roche®, el cual entregó como resultado los ciclos de cuantificación (Cq), además de las correspondientes curvas de Melting.

Obtención de valores de carga viral

Para obtener la carga viral de los sueros analizados en este estudio se realizó una curva de calibración con una muestra que contuvo el plasmidio pGEM::PCV2, en el cual se encuentra clonado el genoma completo del virus PCV-2. El DNA plasmidial, fue extraído a través del kit de reactivos PlasmidMidi Kit (Qiagen®), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración de la preparación del plásmido control se determinó midiendo la fluorimetría de acuerdo al protocolo descrito con anterioridad. Posteriormente, se calculó la concentración molar de DNA agregado, considerando un peso molecular promedio (AMW) de un par de bases igual a 660 g/ mol, resultando en un AMW para el plásmido control (4729 pb) de $3,12 \times 10^6$ pg/ pmol, y se estableció su equivalencia en moles de genoma agregados como templado. De esta forma fueron utilizados en las reacciones de la curva estándar de amplificación, diluciones seriadas (1/10 hasta 1/1.000.000) de concentraciones molares conocidas de DNA plasmidial en agua libre de nucleasas.

Para conocer la cantidad efectiva de copias o moléculas de DNA viral contenida en cada una de las muestras fue necesario interpolar los valores de Cq obtenidos con los valores correspondientes de la curva estándar, construida a partir del genoma control mediante la ecuación entregada por el software LightCycler® Nano.

Análisis de los resultados obtenidos en qPCR

Los resultados fueron analizados a través de análisis de varianza para medidas repetidas, utilizando el software GraphpadPrism 6 e Infostat versión 2014 utilizando un intervalo de confianza de 95%, y un valor de significancia estadística, $p < 0.05$.

Bioseguridad

Para la obtención de muestras en el predio, se utilizaron las siguientes medidas de bioseguridad:

- Previo a la entrada a los galpones con animales, se debió tomar duchas por protocolo de la empresa, y se requirió el uso de vestuario adecuado para las labores de trabajo (overol y botas). Además, fue necesario sumergir las botas en un pediluvio con solución sanitizante antes de entrar a los galpones. Para la extracción de muestras fue necesario el uso de guantes de látex. Una vez realizada la labor, nuevamente se procedió a la higienización de botas y baño de ducha.

En el Laboratorio se trabajó con las siguientes medidas de bioseguridad:

- Utilización de gabinete de bioseguridad tipo II A. Uso de guantes y delantal blanco durante el trabajo de laboratorio. Desinfección y limpieza de todo el instrumental utilizado durante el desarrollo de las pruebas. Esterilización de desechos biológicos, puntas, micropipetas y guantes, posterior a su uso. Lavado de manos con desinfectantes, luego de la manipulación de productos biológicos.

RESULTADOS

Purificación y medición de la concentración de DNA a partir de muestras de sueros

Una vez realizada la purificación de las muestras se estableció un mínimo de concentración de 1ng/ ml de DNA para ser evaluadas a través de qPCR. El promedio de todas las muestras purificadas fue de 8.67 ng/ ml. Todas las muestras que tuvieron una concentración inferior al valor mínimo fueron nuevamente purificadas con el fin de evitar falsos negativos en la prueba.

Curva de calibración

Antes de comenzar el análisis de las muestras problemas, se realizó la curva de calibración. Para esto se evaluaron con qPCR diluciones seriadas de concentración conocida del plasmidio pGEM::PCV2. En la figura 1 se observa la curva estándar entregada por el *software* del termociclador. Posteriormente, se cuantificaron las copias de los genes en las muestras a través de la ecuación de la recta obtenida.

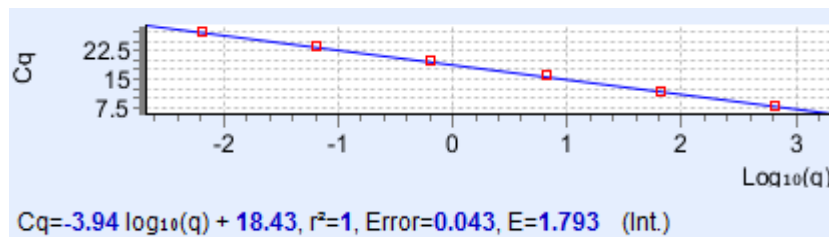


Gráfico 1: Curva estándar realizada con los partidores cap-98 “R” y “F”. En la parte inferior se observa la ecuación de la recta arrojada por el programa: $Y = -3,94X + 18,43$.

Luego, los datos fueron graficados para obtener la ecuación de la recta, y calcular la correlación de los datos (r^2), la que ofrece una medida de cuán adecuada es la relación lineal entre los valores de “x” e “y”. Se calculó un valor de $r^2 = 0,9997$. Cuando este valor es

cercano a 1 indica que la relación entre los valores de “x” e “y” son directamente proporcionales, lo que hace confiable la ecuación.

Análisis de la curva de la temperatura de fusión

Para evaluar especificidad de la reacción se realizó el análisis de la curva de temperatura de fusión o curva de melting, ya que a través de ésta es posible identificar la formación de productos generados exclusivamente por el qPCR bajo condiciones determinadas para la muestra problema. El peak de la curva representa la temperatura en que se producen los niveles de fluorescencia máximos en la reacción de qPCR, y este valor sirve para discriminar que la reacción de amplificación se deba efectivamente a la presencia del PCV-2, y no, por ejemplo, a dímeros de primers, entre otros. En la figura 2 se muestra una curva de fusión obtenida luego de la realización de qPCR para analizar las muestras. Es posible observar que la temperatura de fusión (81°C) coincide en todas las muestras analizadas, obteniendo como resultado una reacción específica para PCV-2 en cada uno de los casos.

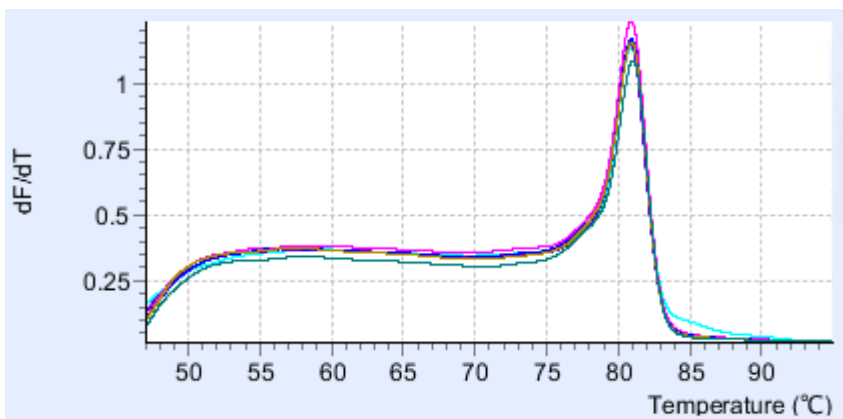


Gráfico 2: Curva de *Melt*, obtenida luego de uno de los análisis de muestras problemas durante el estudio.

Valores de carga viral y análisis estadístico

Para la obtención de los valores de carga viral se interpolaron los datos de valores de umbral del ciclo, específicamente C_q , de las muestras problema en la curva de calibración. Posteriormente, estos resultados fueron graficados con valores de carga viral/ 200 μ l de muestra, ya que esta fue la cantidad de suero inicialmente utilizada para la purificación de DNA. Los resultados que se consiguieron en dicho análisis se muestran en los gráficos 3, 4, 5 y 6.

Evolución de la carga viral de cerdos del grupo control en distintos días de muestreo.

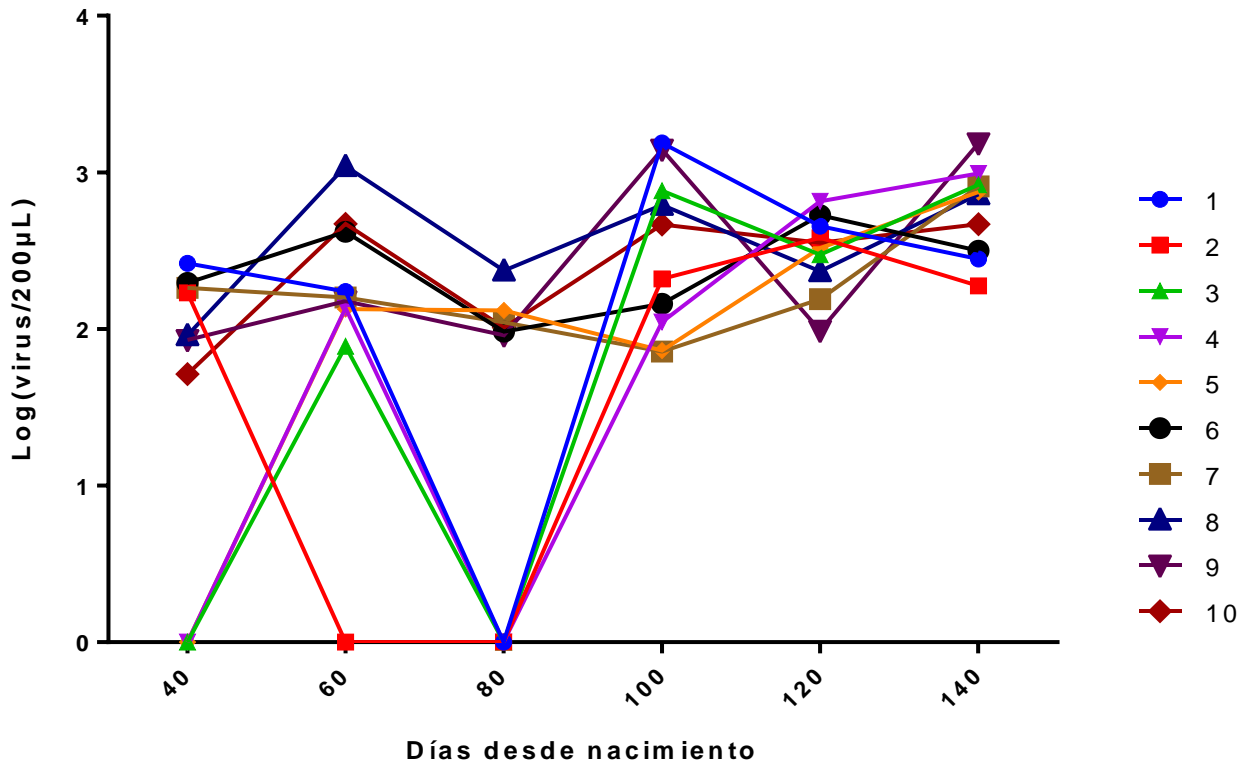


Gráfico4: Evolución del logaritmo de carga viral en sueros del grupo de cerdos control, analizados a través de los distintos días de muestreo. Se grafican un total de 10 muestras.

En el gráfico 4 se muestra la evolución de la carga viral de los animales del grupo control. Es posible apreciar que los valores de carga viral disminuyen levemente hacia el día 80 del estudio ($\text{Log } 1,24 \pm 0,23$ partículas virales/200 μl). Al final del periodo (día 100), los valores de carga viral ($\text{Log } 2,49 \pm 0,11$ partículas virales/200 μl) tienden a aumentar en todos los animales. El análisis estadístico (Anexo 1) indica que existe diferencia estadística para la carga viral según el tiempo de muestreo entre los distintos animales ($F= 7.1$, $p < 0.05$).

Evolución de la carga viral de cerdos del grupo vacuna comercial en distintos días de muestreo.

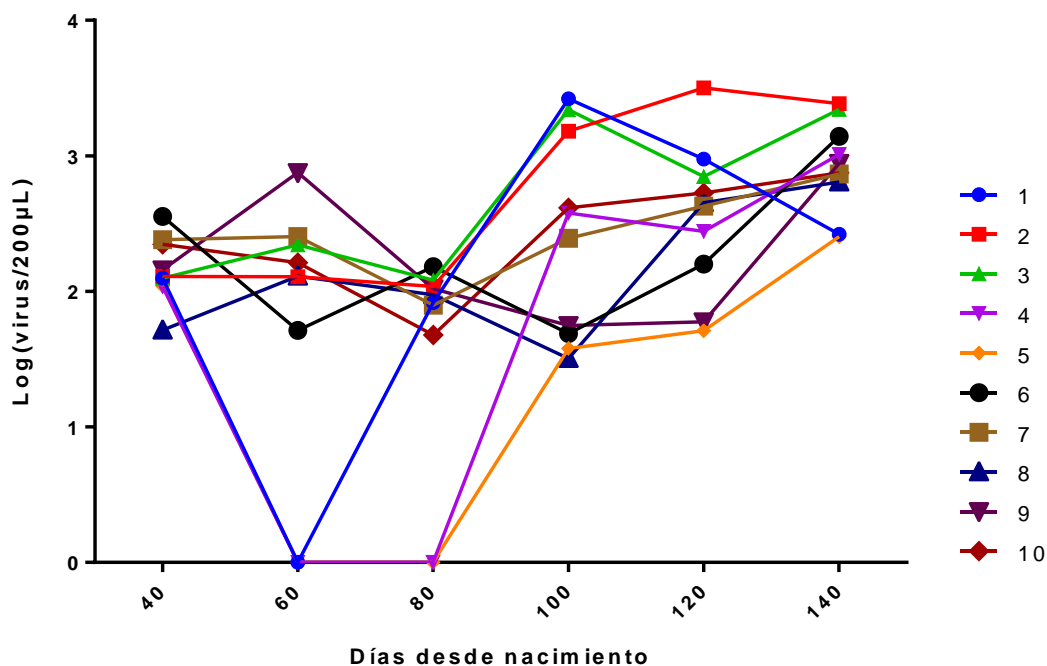


Gráfico5: Evolución del logaritmo de carga viral en sueros del grupo de cerdos a los que se les aplicó la vacuna comercial, analizados a través de los distintos días de muestreo. Se grafican un total de 10 muestras.

En el gráfico 5 se muestra la evolución de la cantidad de carga viral en los animales inmunizados con la vacuna comercial. Se observa que la carga viral disminuye alrededor del día 60 ($\text{Log } 1,34 \pm 0,25$ partículas virales/ 200 μl), y posteriormente tiende a aumentar gradualmente desde el día 100 ($\text{Log } 2,54 \pm 0,16$ partículas virales/ 200 μl). El análisis estadístico (Anexo 2) indica que existe diferencia estadísticamente significativa en la carga viral según la variable día entre los distintos días de muestreo ($F= 5.72, p<0.05$).

Evolución de la carga viral de cerdos del grupo vacuna experimental oral en distintos días de muestreo.

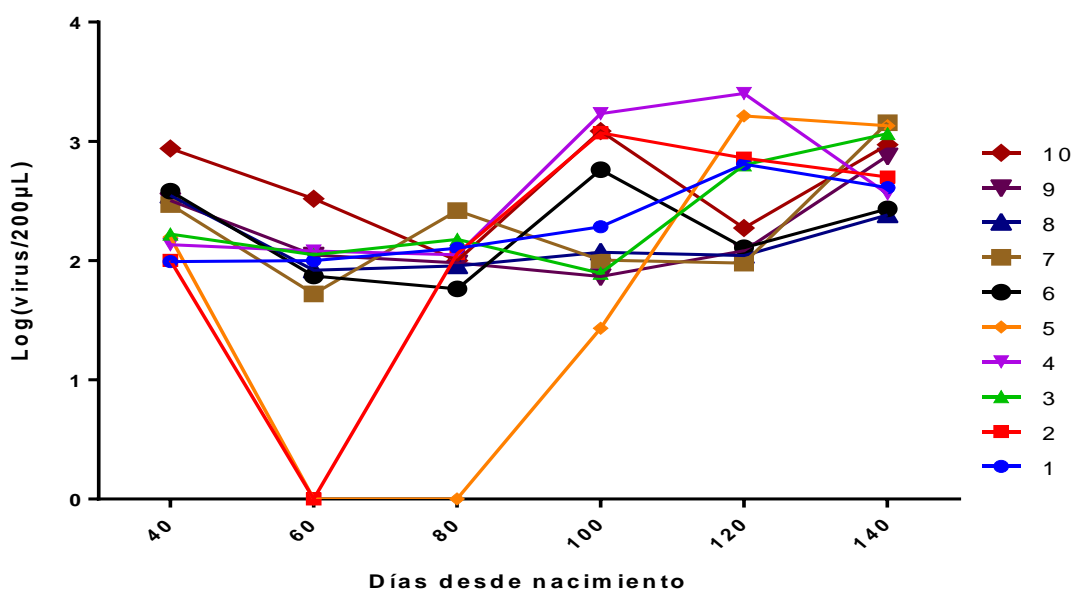


Gráfico 6: Evolución del logaritmo de carga viral en sueros del grupo de cerdos a los que se les aplicó la vacuna oral, analizados a través de los distintos días de muestreo. Se grafican un total de 10 muestras.

En el gráfico 6 se aprecia la evolución de la carga viral en el grupo de los animales inmunizados con la vacuna experimental oral. Se observa que los valores de carga viral tienden a mantenerse más estables que en los otros tratamientos (control y vacuna comercial), sin embargo las diferencias observadas no son significativas para la variable vacuna. El

análisis estadístico (Anexo 3) indica que existe diferencia significativa para la carga viral según la el tiempo de muestreo en los distintos animales ($F= 4.12$ y $p<0.05$).

Evolución del promedio y desviación estándar de Log(virus/200 μ L) por día de muestreo en cada uno de los grupos de animales.

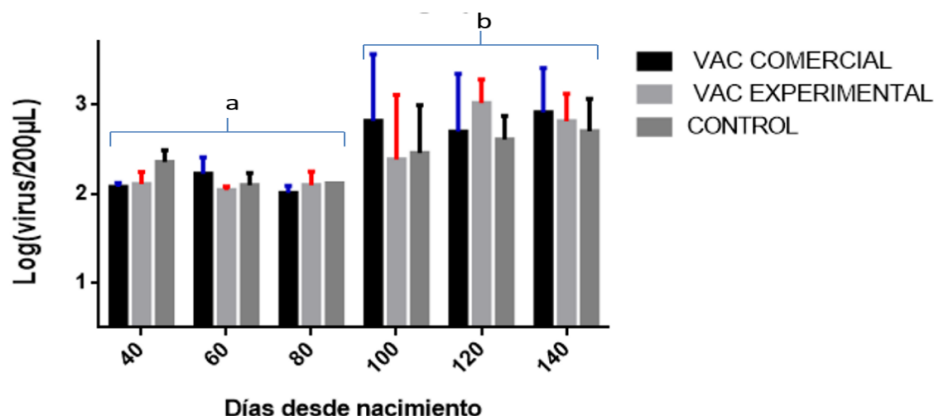


Gráfico 3: Evolución del logaritmo de carga viral grupal en sueros de cerdos de los grupos analizados a través de los distintos días de muestreo. Se grafican un total de 10 muestras por tratamiento. Sobre las columnas se presenta la desviación estándar de los promedios obtenidos. Las letras sobre las columnas indican diferencias significativas.

En el gráfico 3 se muestra la evolución de la cantidad de carga viral en 3 grupos analizados (duración del muestreo= 140 días). Se aprecia una disminución de los valores de carga viral alrededor del día 80 (Log $1,51 \pm 0,03$ partículas virales/200 μ l) respecto a los muestreos de los días 40 (Log $1,91 \pm 0,06$ partículas virales/200 μ l) y 60 (Log $1,69 \pm 0,03$ partículas virales/200 μ l). Posteriormente, la carga viral aumenta desde el día 100 (Log $2,46 \pm 0,02$ partículas virales/200 μ l) hasta el fin del estudio (Log $2,82 \pm 0,04$ partículas virales/200 μ l). El análisis estadístico (Anexo 4) demuestra que existe diferencia estadísticamente significativa para el tiempo de muestreo ($F= 14,43$; $p< 0,0001$), no así para el tipo de vacuna ($F= 1,53$, $p> 0,5$).

DISCUSIÓN

El PCV-2 es el virus que causa mayores pérdidas a nivel mundial en la industria porcina (Beach y Meng, 2012). En el mercado existen vacunas que reducen la tasa de mortalidad y mejoran índices los crecimiento de los animales (Kurmman et al., 2011), ellas difieren en la naturaleza y concentración del antígeno, adyuvantes y dosis (Kwangsoo et al., 2012). Si bien las vacunas disminuyen los efectos clínicos de las PCVAD, desafortunadamente no logran impedir la propagación del virus (Beach y Meng, 2012).

Numerosos estudios han determinado la carga viral de PCV-2 en condiciones de laboratorio (Segalés et al., 2009). Una característica relevante de este estudio es que fue realizado en condiciones de campo, lo que permitió evaluar el comportamiento de la carga viral de PCV-2 en un ambiente con características de crianza convencional (nivel de control de variables reducido). Además, los animales se encuentran expuestos de forma natural al virus, situación que se contrapone a la mayoría de los estudios en los cuales se ha utilizado animales libres de patógenos (SPF), los que posteriormente son desafiados a dosis infectantes de virus PCV-2 y otros patógenos conocidos (Kwangsoo et al., 2012).

En trabajos previos se ha utilizado como método de aproximación diagnóstica la cantidad de virus PCV-2 por mililitro de suero, expresado como copias genómicas virales/ ml para categorizar si un animal se encuentra infectado o enfermo subclínico (Olvera et al, 2004). Segalés et al. 2012 concluye que no existe uniformidad en los límites de detección de pruebas, similares a los reportados por Olvera et al. 2004, que permitirían adjudicar valores de categorización. La cuantificación de la carga viral está fuertemente relacionada a la técnica de laboratorio empleada, por lo tanto es una limitante en la reproducibilidad del experimento. Si bien, en esta tesis es viable asignar la relación carga viral/ ml suero, no es posible correlacionar los datos obtenidos con las categorías de clasificación reportadas, ya que para un diagnóstico certero es obligatorio evaluar del estado clínico de los animales, además de realizar técnicas histopatológicas que comprueben la presencia de PMWS dentro del plantel.

Kwangsoo et al. 2011 encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de carga viral entre el grupo de animales no vacunado (control negativo) y los grupos vacunados (aplicación de tres vacunas comerciales), lo que fue atribuído a una reducción

más lenta de los anticuerpos maternos en los animales inmunizados con vacunas comerciales (mayor tiempo de protección contra el virus). Además de la reducción en la viremia fue posible observar una disminución en las lesiones asociadas al PCVAD en los animales inmunizados con la vacuna comercial. En esta tesis se apreció que la vacuna comercial y experimental presenta una curva de carga viral similar a la descrita en el estudio anterior, mostrando un alza en la carga viral alrededor de las 22 semanas de vida.

Por su parte, Segalés et al. 2009 no encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el efecto de una vacuna comercial versus el grupo control negativo. Si bien en el estudio citado, las muestras de carga viral no evidenciaron diferencias, en éstas si fue posible encontrar diferencias en otras variables como: mayor ganancia diaria de peso (18g/día) y tasa de mortalidad menor en cerdos vacunados. La vacunación disminuiría la presentación de PCVAD, ya que disminuye los niveles de inmunosupresión inducidos por el PCV-2, y con ello la sinergia existente entre PCV-2 y patógenos concomitantes. Finalmente, Segalés et al., 2009 proponen realizar estudios más extensivos, y con mayor frecuencia para evaluar la intermitencia de la viremia y evaluar si existen diferencias significativas en la carga de PCV-2.

La vacuna oral formulada por nuestro grupo alcanzaría en el muestreo inicial realizado el día 40, niveles de carga viral ($\text{Log } 2.133 \pm 0.17$ partículas virales/ 200ml) similar a los que se logran mediante la administración de una vacuna comercial ($\text{Log } 2.131 \pm 0.06$ partículas virales/ 200ml) esta tendencia es similar para el último día de muestreo donde la vacuna experimental presenta niveles de carga viral ($\text{Log } 2.78 \pm 0.07$ partículas virales/ 200ml) estadísticamente sin diferencias con el grupo comercial ($\text{Log } 2.91 \pm 0.08$ partículas virales/ 200ml). Pese a lo anterior, se recomienda la inmunización con la vacuna experimental oral debido a que está comprobado que las vacunas anti PCV-2, independiente de su formulación y/o administración, disminuyen las PCVAD (Olvera *et al*, 2004; Villa *et al.*, 2013). Si bien, la aplicación de la vacuna experimental oral no disminuye la carga viral, como se mencionó anteriormente existen índices productivos que evidencian: la disminución de la incidencia de PMWS, la reducción de las tasas de mortalidad y coinfecciones, además mejoran la ganancia diaria de peso y permiten una disminución gradual de los anticuerpos anti PCV-2 (Segalés et al., 2009; Kwangsoo et al., 2012; Villa, *et al.*, 2013).

La tendencia mundial en torno a la prevención de enfermedades porcinas producidas por PCV-2 es buscar medidas estratégicas que atenúen los niveles de carga viral de los animales (Fort *et al.*, 2008), ya que su eliminación se torna bastante difícil y conllevaría un costo económico alto debido a que el virus presenta un carácter ubicuo, altamente contagioso y de gran resistencia en el medio ambiente (Puvanendiran *et al.*, 2011). Por lo anterior, es que los recursos de económicos y de investigación apuntan a la adopción de medidas que permitan controlar la patología y sus efectos negativos sobre la producción. Como ya fue mencionado, el fin del desarrollo de una vacuna oral es la necesidad de disminuir del estrés que se genera la vacunación por la vía parenteral. De esa forma, es posible eliminar factores predisponentes que influyen en la presentación de la enfermedad.

Al realizar el análisis de varianza con todas las variables (animal, tiempo de muestreo y tipo de vacuna) se observa que entre los días 40 y 100 del estudio hay diferencias estadísticamente significativas ($F= 14,43$; $p < 0,0001$) en los valores de carga viral, siendo menor (Log 1.91 partículas virales/ 200ml) entre los días mencionados, y mayor (Log 2.46 partículas virales/ 200ml) en los días posteriores (entre 100 y 140 días). Con esto queda en evidencia que independiente de vacunar o no a los animales, la carga viral en los cerdos aumenta progresivamente en el tiempo. Basados en la observación anterior, se confirma el hecho que el objetivo final de la vacunación no apunta a eliminar la carga viral en los animales, sino que a retrasar o disminuir el nuevo aumento de ésta en el tiempo comprendido entre el destete y la engorda de los cerdos (Villa *et al.*, 2013).

CONCLUSION

- Se logró determinar la carga viral de PCV-2 mediante qPCR en muestras de suero provenientes de cerdos pertenecientes a un plantel nacional.
- Los valores de carga viral fueron similares en los grupos evaluados (control negativo, vacuna comercial parenteral y vacuna experimental oral).
- La carga viral se mantiene estable hasta el día 80 de muestreo, posterior a esto tiende a aumentar.

BIBLIOGRAFÍA

- **ABBAS, A.** 2002. Inmunología celular y molecular. 4ª ed. S.A. Mcgraw-Hill / interamericana de España. 624p.
- **ASPROCER.** Sf. Mercado mundial de la carne de cerdo.[En línea] <http://www.asprocer.cl/index/plantilla1.asp?id_seccion=2&id_subsecciones=77> [25-05-14]
- **BUCAREY, S.; NORIEGA, J.; REYES, P.; TAPIA, C.; SAENZ, L.; ZUÑIGA, A.; TOBAR, A.** 2009. The optimized gene of porcine circovirus type 2 expressed in yeast forms virus-like particles and elicits antibody responses in mice fed with recombinant yeast extract. *Vaccine*. 27(42): 5781-5790.
- **CHAE, C.** 2012. Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: Efficacy and clinical application. *The Veterinary Journal* 194: 151–157
- **CHEUNG, A.** 2003. Transcriptional analysis of porcine Circovirus Type 2. *Virology*. 305 168–180
- **ECHÁVARRI, V.; DE LA FUENTE, T.** 2012. Situación del sector productor de carne porcina. Oficina de estudios y políticas agrarias.12p
- **ESTRADA, ALEJANDRA.** 2009. Síndrome de desmedro multisistémico posdestete (PMWS) Boletín Veterinario Oficial Servicio Agrícola y Ganadero. [En línea] <http://www2.sag.gob.cl/Pecuaria/bvo/BVO_9_I_semestre_2009/articulos/PMWS.pdf > [27-10-2013].
- **EVERETT, M.; PALESTRANTA, D.; MILLERB, S.; BOLLINGERA, R.; PARKERA, W.** 2004. Immune exclusion and immune inclusion: a new model of host-bacterial interactions in the gut. *Clinical and applied immunology reviews*. 4: 321–332.
- **FAO.** 2002. Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030 Informe resumido. [En línea] <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/004/y3557S/>> [27-07-2013].
- **FRAILE, L.; GRAU-ROMA, L.; LÓPEZ-SORIA, S.; LÓPEZ-JIMÉNEZ, R.; NOFRARÍAS, M.; SRASOLA, P.; SEGALÉS, J.; SIBILA, M.; SINOVAS, N.** 2012. Inactivated PCV2 one shot vaccine applied in 3-week-old piglets: Improvement of production parameters and interaction with maternally derived immunity. *Vaccine*. 30: 1986-1992.

- **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. *Journal of Clinical Microbiology*. 38(7): 2494–2503.
- **FENAUX, M.; OPRIESSNIG, T.; HALBUR, P.; ELVINGER, F.; MENG, X.** 2004. A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs. *Journal of Virology* 78: 6297–6303
- **FORT, M.; SIBILA, M.; ALLEPUZ, A.; MATEU, E.; ROERINK, F.; SEGALÉS, J.** 2008. Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins. *Vaccine* 26: 1063-1071.
- **HAMEL, A.; LIN, L.; NAYAR, G.** 1998. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Journal of Virology*. 72 (6) 5262–5267
- **HEE, C.; THI, L.; SUN, M.; WON, S.** 2015. Differential recognition of the ORF2 region in a complete genome sequence of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolated from boar bone marrow in Korea. *Gene*. 569 (2): 308–312.
- **ISLAM, M.; FIRDOUS, J.; CHOI, Y.; YUN CH.; CHO, CH.** 2012. Design and application of chitosan microspheres as oral and nasal vaccine carriers: an updated review. *International Journal of Nanomedicine*. 7:6077–6093
- **KAPOORA, A.; DUBOVIB, E.; HENRIQUEZ, J.; LIPKINA, W.** 2012. Complete Genome Sequence of the First Canine Circovirus. *Journal of Virology*. 86: 7018
- **KIM, T.; TOAN, NT.; SEO, J.; JUNG, B.; LEE, J.; LEE, B.** 2009. Bordetella bronchiseptica aroA mutant as a live vaccine vehicle for heterologous porcine circovirus type 2 major capsid protein expression. *Veterinary Microbiology*. 138: 318 – 324.
- **KURMANN, T.; SYDLER, E.; BRUGNERA, E.; BUERGI, M.; HAESSIG, M.; SUTER, X.** 2011 Vaccination of dams increases antibody titer and improves growth

parameters in finisher pigs subclinically infected with porcine circovirus type 2. *Clinical vaccine immunology*. 18:1644–1649

- **LI, L.; KAPOOR, A.; SLIKAS, B.; SOJI, O.; WANG, C.; SHAUKAT, S.; MASROOR, M.; WILSON, M.; NDJANGO, J.; PEETERS, M.; GROSS-CAMP, N.; MULLER, M.; HAHN, B.; WOLFE, N.; TRIKI, H.; BARTKUS, J.; ZAIDI, S.; DELWART, E.** 2010. Multiple diverse Circoviruses infect farm animals and are commonly found in human and chimpanzee feces. *Journal of Virology*. 84(4): 1674–1682.
- **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. *Journal of Virology*. 79 (13) 8262-8274
- **MAGAR, R.; LAROCHELLE, R.; THIBAUT, S.; LAMONTAGNE, L.** 2000. Experimental transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2) in weaned pigs: a sequential study. *Journal of Comparative Pathology*. 123: 258–269
- **NUÑEZ, I.** 2014. Efecto en los parámetros productivos de cerdos vacunados de manera oral contra circovirus porcino tipo 2. . Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U.Chile, Facultad de ciencias veterinarias y pecuarias. 25 p
- **O`DEA, M.** 2010. Porcine circovirus infection. [En línea]. <http://www.scahls.org.au/__data/assets/pdf_file/0005/1915943/anzsdp-porcine.pdf> [Consulta:27-06-2013].
- **OLVERA, A.; SIBILA, M.; CALSAMIGLIA, M.; SEGALÉS, J.; DOMINGO, M.** 2004. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *Journal of Virological Methods* 117: 75-80
- **OLVERA, A.; CORTEY, M.; SEGALÉS, J.** 2007. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology*. 357 (2) 175-185
- **PADGETT, D.; GLASER, R.** 2003. How stress influences the immune response. *Trends in Immunology*. 24: 444-448
- **PATTERSON, A.; RAMAMOORTHY, S.; MADSON, D.; MENG, X.; HALBUR, P.; OPRIESSNIG, T.** 2011. Shedding and infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) after experimental infection. *Veterinary Microbiology*. 149 (1–2) 91–98

- **PEJSAK, Z.; PODGÓRSKA, K.; TRUSZCZYŃSKI, M.; KARBOWIAK, P.; STADEJEK, T.** 2010. Efficacy of different protocols of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) in a farm affected by postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases* (2009). 33 (6) E1-E5
- **PUVANENDIRAN, S.; STONE, S.; YU, W.; JOHNSON, C.; ABRAHANTE, J.; GARCIA, L.; GRIGGS, T.; HALEY, C.; WAGNER, B.; MURTAUGH, P.** 2011. Absence of porcine circovirus type 1 (PCV1) and high prevalence of PCV 2 exposure and infection in swine finisher herds. *Virus Research*. 157 (1) 92–98
- **RISSO, V.** 2013. Determinación y comparación de la carga viral mediante qPCR en sueros de cerdos inmunizados y no inmunizados contra pcv-2 en Chile. Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U.Chile, Facultad de ciencias veterinarias y pecuarias. 56 p.
- **SEGALÉS, J.; CALSAMIGLIA, M.; OLVERA, A.; SIBILA, M.; BADIELLA, L.; DOMINGO, M.** 2005. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) *Veterinary Microbiology* 111 (3–4) 223–229
- **SEGALÉS, J.; URNIZA, A.; ALEGRE, A.; BRU, T.; CRISCI, E.; NOFRARÍAS, M.; LÓPEZ, S.; BALASCH, M.; SIBILA, M.; XU, Z.; CHU, J.; FRAILE, L.; PLANA, J.** 2009. A genetically engineered chimeric vaccine against porcine circovirus type 2 (PCV2) improves clinical, pathological and virological outcomes in postweaning multisystemic wasting syndrome affected farms. *Vaccine*. 27: 7313-7321.
- **SEGALÉS, J.** 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Research*. 164(1–2) 10–19
- **SILVA, F.; SILVA, A.; VIDIGAL, P.; OLIVEIRA, C.; VIANA, V.; SILVA, C.; VARGAS, M.; FIETTO, L.; ALMEIDA, M.** 2011. Porcine Circovirus-2 Viral Load versus Lesions in Pigs: Perspectives for Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome. *Journal of Comparative Pathology*. 144: 296-302
- **STRUGNELL, R.; WIJBURG O.** 2010. The role of secretory antibodies in infection immunity. *Nature reviews microbiology* 8: 656-667.

- **THANOU, M.; VERHOEF, J.; JUNGINGER, H.** 2001. Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*52(2):117–126.
- **VEGA, M.** 1994. Sistema inmune intestinal porcino. [En línea]. <<http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol6/CVv6c6.pdf>> [Consulta: 27-06-13].
- **VEGA, M.** 2007. Inmunobiología de las mucosas, un nuevo enfoque de la protección y la adaptación al medio de nuestro organismo. [En línea]. <http://www.cinvestav.mx/Portals/0/SiteDocs/Sec_Difusion/RevistaCinvestav/enero-marzo2007/inmunobiologia.pdf> [Consulta: 27-06-13].
- **VILLA, A.; HUERTA, R.; CÓRDOVA, A.; ORTEGA, S.; TREJO, A.** 2013. Efecto de la vacunación de cerdas y lechones contra circovirus porcino tipo 2 (PCV2) en la ganancia de peso y porcentaje de mortalidad en México. *Archivos de medicina veterinaria.* 45(2), 145-149.

ANEXOS

Anexo 1

VACUNA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
CONTROL	CARGA VIRAL	30	0,59	0,51	44,69

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	22,74	5	4,55	7,01	0,0004
DIA	22,74	5	4,55	7,01	0,0004
Error	15,57	24	0,65		
Total	38,31	29			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,57497

Error: 0,6487 gl: 24

DIA	Mediasn	E.E.				
80,00	0,42	5	0,36	A		
40,00	0,94	5	0,36	A	B	
60,00	1,68	5	0,36	A	B	C
100,00	2,46	5	0,36		B	C
120,00	2,61	5	0,36			C
140,00	2,70	5	0,36			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 2

VACUNA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
COMERCIAL	CARGA VIRAL	30	0,54	0,45	38,75

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	18,98	5	3,80	5,72	0,0013
DIA	18,98	5	3,80	5,72	0,0013
Error	15,91	24	0,66		
Total	34,89	29			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,59227

Error: 0,6630 gl: 24

DIA	Mediasn	E.E.				
60,00	0,89	5	0,36	A		
80,00	1,21	5	0,36	A	B	
40,00	2,08	5	0,36	A	B	C
120,00	2,70	5	0,36		B	C
100,00	2,82	5	0,36			C
140,00	2,91	5	0,36			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 3

VACUNA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
EXPERIMENTAL	CARGA VIRAL	30	0,46	0,35	37,05

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	12,83	5	2,57	4,12	0,0076
DIA	12,83	5	2,57	4,12	0,0076
Error	14,93	24	0,62		
Total	27,76	29			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,54221

Error: 0,6220 gl: 24

DIA	Mediasn	E.E.
60,00	1,23 5	0,35 A
40,00	1,65 5	0,35 A B
80,00	1,68 5	0,35 A B
100,00	2,38 5	0,35 A B
140,00	2,81 5	0,35 B
120,00	3,02 5	0,35 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 4

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
promedios	90	0,55	0,44	39,93

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	56,51	17	3,32	5,16	<0,0001
VACUNA	1,97	2	0,98	1,53	0,2244
DIA	46,49	5	9,30	14,43	<0,0001
VACUNA*DIA		8,06	10	0,81	1,25 0,2752
Error	46,41	72	0,64		
Total	102,92	89			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,86026

Error: 0,6445 gl: 72

DIA	Mediasn	E.E.
80	1,10 15	0,21 A
60	1,26 15	0,21 A
40	1,56 15	0,21 A
100	2,55 15	0,21 B
120	2,77 15	0,21 B
140	2,81 15	0,21 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)