



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

COMPARACIÓN DE LA CARGA VIRAL MEDIANTE QPCR EN SUEROS DE  
CERDOS INMUNIZADOS Y NO INMUNIZADOS CONTRA PCV-2 EN CHILE

VICTORIA PAZ RISSO FOLATRE  
Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias Biológicas Animales

PROFESOR GUÍA: SERGIO BUCAREY VIVANCO  
SANTIAGO, CHILE  
2013

PROYECTO FONDECYT 11110135



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

COMPARACIÓN DE LA CARGA VIRAL MEDIANTE QPCR EN SUEROS DE  
CERDOS INMUNIZADOS Y NO INMUNIZADOS CONTRA PCV-2 EN CHILE

VICTORIA PAZ RISSO FOLATRE  
Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias Biológicas Animales

NOTA FINAL: .....

|                                    | NOTA  | FIRMA |
|------------------------------------|-------|-------|
| PROFESOR GUÍA: SERGIO BUCAREY      | ..... | ..... |
| PROFESOR CONSEJERO: LEONARDO SÁENZ | ..... | ..... |
| PROFESOR CONSEJERO: JOSÉ PIZARRO   | ..... | ..... |

SANTIAGO, CHILE  
2013

## AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a Dios por darme la fuerza en cada momento, tanto en los buenos como en aquellos en que las cosas no salían como esperaba.

A mi hermosa familia por todo su apoyo, su preocupación y estar presentes desde el día que decidí estudiar esta carrera hasta hoy, cuando por fin finalizo este proceso y alcanzo uno de mis más grandes sueños. Sobre todo agradezco a mis sobrinos Teo y Nahuel por regalarme esas lindas sonrisas que llenan de alegría mis días y de ganas de seguir adelante pase lo que pase.

A Jonatán Martínez por su apoyo, paciencia y comprensión que con amor me entregó cada día. Por todas sus palabras y consejos cuando los necesité. Por su ayuda incondicional y por darme ánimos cuando ya no los tenía.

A mis amigos, que como siempre he dicho, son mi segunda familia. Aquellos de toda la vida, a las hermosas personas que conocí en la universidad y a los que he conocido en otras circunstancias, les agradezco de todo corazón la contención que me dieron en cada momento, por escucharme siempre que lo necesité y sobre todo por entregarme incondicionalmente su amistad.

No puedo dejar de mencionar a mi profesor guía, el Dr. Sergio Bucarey, que con paciencia me enseñó a valorar cada cosa, incluso los errores y a entender que equivocarse es aprender algo más. Gracias a todas las personas que trabajan en el laboratorio de BIOVETEC, sobre todos a quienes me ayudaron a concretar mi trabajo.

Nunca olvidaré los bellos momentos vividos en mi querida Facultad, cada uno de los cuales contribuyeron en mi formación como persona y como profesional.

*“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”*

*Albert Einstein.*

## ÍNDICE DE CAPÍTULOS

| CAPÍTULO   | PÁGINA |
|--|--------|
| 1. INTRODUCCIÓN.....                                     | 1      |
| 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....                           | 3      |
| Reseña histórica de la circovirosis porcina.....         | 3      |
| Taxonomía de circovirus porcino.....                     | 4      |
| Características del virus.....                           | 5      |
| Epidemiología.....                                       | 7      |
| Patogenia.....   | 9      |
| Signología relacionada con PCV-2.....                    | 10     |
| Diagnóstico de PCV-2.....                                | 11     |
| Control y prevención.....                                | 12     |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS.....                               | 15     |
| Muestras y selección de estas.....                       | 15     |
| Extracción de DNA de las muestras.....                   | 15     |
| PCR tiempo final.....                                    | 16     |
| Curva de calibración para interpolación re resultados... | 16     |
| Reacción de la polimerasa en cadena en tiempo real....   | 17     |

|  |    |
|--|----|
| Análisis de los resultados obtenidos en qPCR.....  | 18 |
| Instalaciones.....   | 18 |
| Bioseguridad.....  | 18 |
| 4. RESULTADOS.....   | 19 |
| Extracción de DNA viral desde suero de cerdos.....                                       | 19 |
| Estandarización de las condiciones de qPCR.....  | 19 |
| Curva de calibración de qPCR utilizando partidores<br>Cap-nest.....                      | 20 |
| Curva de calibración de qPCR utilizando partidores<br>Cap-98.....                        | 22 |
| Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real para<br>el análisis de las muestras..... | 24 |
| Carga viral.....   | 27 |
| Análisis estadístico.....  | 30 |
| 5. DISCUSIÓN.....  | 31 |
| 6. CONCLUSIONES.....   | 37 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA.....   | 38 |
| 8. ANEXOS.....   | 43 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

| FIGURA   | PÁGINA |
|--|--------|
| <b>Figura 1.</b> Mapa que señala los países donde se ha descrito la presencia PCV-2.....                     | 4      |
| <b>Figura 2.</b> Representación del genoma de PCV-2.....   | 6      |
| <b>Figura 3.</b> Fotografía de gel de electroforesis luego de PCR tiempo final.....                          | 19     |
| <b>Figura 4.</b> Curva de calibración o curva estándar realizada con los partidores Cap-nest “R” y “F” ..... | 20     |
| <b>Figura 5.</b> Curva de amplificación obtenida con los partidores Cap-nest “R” y “F” .....                 | 21     |
| <b>Figura 6.</b> Curva de Melt obtenida con los partidores Cap-nest “R” .....                                | 22     |
| <b>Figura 7.</b> Curva de calibración o curva estándar realizada con los partidores Cap-98 “R” y “F” .....   | 23     |
| <b>Figura 8.</b> Curva de amplificación obtenida con los partidores 98 “R” y F” .....                        | 23     |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 9.</b> Curva de Melt obtenida con los partidores Cap-98 “R” y “F” .....   | 24 |
| <b>Figura 10.</b> Amplificación tipo con partidores Cap-nest.....   | 25 |
| <b>Figura 11.</b> Fotografía de gel de electroforesis control.....  | 26 |
| <b>Figura 12.</b> Curva de amplificación obtenida luego de utilizar los partidores Cap-98.....  | 27 |
| <b>Figura 13.</b> Evolución del logaritmo de los promedios de carga viral por día de cada uno de los grupos del estudio.....  | 28 |
| <b>Figura 14.</b> Evolución del logaritmo de carga viral por animal en sueros de cerdos del grupo 1 (vacunados), a través de los distintos días de muestreo.....    | 29 |
| <b>Figura 15.</b> Evolución del logaritmo de carga viral por animal en sueros de cerdos del grupo 2 (no vacunados), a través de los distintos días de muestreo..... | 29 |

## **RESUMEN**

La producción porcina en Chile aporta un importante porcentaje al total de toneladas de carne producidas anualmente en el país. Es por esta razón que se debe resguardar la calidad sanitaria de los cerdos y evitar enfermedades como la circovirus la cual ha mostrado generar un gran impacto en la industria porcina mundial.

El agente causal de la enfermedad es Circovirus porcino tipo II (PCV-2), el cual genera un estado de inmunosupresión severo en los animales y consecuentemente, la manifestación de patologías secundarias que terminan por afectar el crecimiento del cerdo.

Además de mejorar la gestión y las prácticas de manejo (mejor higiene, menor hacinamiento y mejor ventilación), la disponibilidad de vacunas contra PCV-2 ha representado una opción inmunológica eficaz para paliar el impacto de estas enfermedades. Existen diferentes vacunas contra PCV-2, muchas de ellas probadas en otros países, pero con pocos referentes de su acción y eficacia en Chile. Además, la presencia de variantes genéticas de PCV-2 en el país, sugiere la importancia de evaluar la eficacia de formulaciones importadas actualmente usadas en la industria porcina nacional, con el fin de obtener información de relevancia para mejorar los protocolos de prevención y control de la enfermedad.

En el presente estudio y con la finalidad de evaluar el efecto de una vacuna comercial contra PCV-2 en Chile, se midió la carga viral de dicho virus en cerdos de un plantel nacional de producción porcina bajo un programa de vacunación contra PCV-2. Para esto, se implementó y estandarizó un ensayo de PCR tiempo real usando SYBR<sup>®</sup> Green y se utilizó una cohorte de 30 animales (15 vacunados vs 15 no vacunados) muestreados a distintos periodos de tiempo: 30, 50, 70, 90, 110 y 130 días, como grupo de estudio.



Los resultados obtenidos permitieron concluir que en los primeros 90 días de la medición, la carga viral se mantiene en un nivel basal no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control no vacunado y aquellos animales en los cuales si se administró el producto. Posteriormente, se evidenció una significativa alza de carga viral en ambos grupos en el día 110 del estudio, sin embargo en los animales vacunados, este aumento en el parámetro es ligeramente más tardío (día 130 del muestreo). Por esto se dedujo que la vacuna tiene un factor protector sobre los animales al retardar el peak de carga viral en los cerdos vacunados.

Palabras Clave: **PCV-2, inmunosupresión, vacuna, carga viral, qPCR.**

## **ABSTRACT**

Porcine production in Chile provides a significant percentage of the total tons of meat produced annually in the country. Thus, pigs' health quality must be safeguarded and avoid diseases like circovirus which has shown to generate a great impact on the swine industry worldwide.

The causal agent of the disease is porcine circovirus type I (PCV-2), which generates a state of severe immunosuppression in animals and consequently the manifestation of secondary pathologies that ultimately affect pig growth.

In addition to improving management practices (better hygiene, less overcrowding and better ventilation), the availability of vaccines against PCV-2 represents an effective immunology option to alleviate the impact of these diseases. There are different vaccines against PCV-2, proven in many other countries, but with few references of its action and effectiveness in Chile. Furthermore, the presence of genetic variants of PCV-2 in the country, suggests the importance of evaluating the effectiveness of imported formulations currently used in domestic pig industry, with the purpose of obtain relevant information to improving prevention protocols and the control of disease.

In this study and in order to evaluate the effect of a commercial vaccine against PCV-2 in Chile, viral load of the virus was measured in pigs of a national campus pig production under a vaccination program against PCV-2. For this, mounted and standardized a real time PCR assay using SYBR<sup>®</sup> Green and used a cohort of 30 animals (15 vs 15 vaccinated and unvaccinated) sampled at different time periods: 30, 50, 70, 90, 110 and 130 days, like a study group.

The results allowed us to conclude that in the first 90 days of measurement, viral load remains at a basal level no statistically significant differences between the control group and those unvaccinated animals in which if the product was administered.

Subsequently, showed a significant increase in viral load in both groups on day 110 of the study, however in vaccinated animals, the increase in the parameter is slightly later (day 130 of the sampling). Therefore it is concluded that the vaccine has a protective factor for animals because it can retard the peak of viral load in the vaccinated pigs.

**Keywords: PCV-2, immunosuppression, vaccine, viral load, qPCR.**

## 1. INTRODUCCIÓN

La producción porcina en Chile representa un 38% de la producción total de carnes en el país. Este rubro ha logrado duplicar la cantidad de toneladas de cerdo producidas al año en la última década, además de representar una veta importante de exportación (ASPROCER, 2012). Dentro de los avances que se han realizado en la industria se encuentran los mejoramientos genéticos, los cambios a nivel de manejo de los animales y en el estatus sanitario de estos. Lo anteriormente mencionado constata una creciente preocupación por parte de los productores por obtener un desarrollo óptimo de sus animales para concretar su posterior venta.

Hoy en día se conocen una gran cantidad de enfermedades que afectan a los cerdos, atentando contra las ganancias de este sector productivo. Entre estas patologías, las de mayor impacto son las atribuidas a circovirus porcino, siendo tipo II (PCV-2) el reconocido como causante de la enfermedad. Este virus se caracteriza por causar una inhibición en la maduración y regulación del sistema inmune de los animales, provocando en consecuencia una inmunodepresión severa que predispone al contagio con agentes secundarios y cuyos signos repercuten en un menor desarrollo y ganancia de peso por parte del animal. Al conjunto de las patologías concomitantes desarrolladas por el cerdo debido a la presencia de PCV-2 se le conoce como Enfermedades Asociadas a PCV-2 (PCVAD).

El Circovirus Porcino fue descrito por primera vez como agente contaminante de la línea celular de cerdo PK-15 y fue clasificado como un virus apatógeno. Posteriormente se relacionó con enfermedades como el Síndrome Multisistémico de Desmedro Post Destete (PMWS), concluyendo que existía una variante del virus original, la cual representaba un problema sanitario para los animales. En el caso de Chile, los primeros casos de circovirosis fueron diagnosticados por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) en el año 2006 (Estrada, 2009). Desde esa fecha, se pudo asociar la presencia del virus en los distintos planteles porcinos con un aumento de la mortalidad en los animales. La Región Metropolitana es la que posee un mayor número de animales que padecen la enfermedad, lo cual se relaciona también con que en esta región se concentra la mayor producción de cerdos.

Entre las técnicas diagnósticas más eficaces para la detección de PCV-2, se encuentra el qPCR, el cual permite cuantificar el DNA viral presente en una muestra y por consiguiente, la carga viral. Se ha descrito que aquellos animales que cursan con PMWS, poseen una mayor carga viral en secreciones y otro tipo de muestras (Calsamiglia *et al.*, 2004) que aquellos cerdos sin signología.

Es sabido que por las características del virus, no existen tratamientos efectivos para disminuir los efectos que causa en los animales y en la producción. Es por esto que la prevención y el control de la patología han cobrado gran relevancia dentro de los plantales porcinos. Para poder contrarrestar los efectos adversos de la enfermedad, se han desarrollado diferentes tipos de vacunas contra el virus, las cuales han demostrado ser efectivas para el control del agente.

Si bien estas vacunas han sido probadas y evaluadas en distintos países, es importante considerar que en Chile existen variantes genotípicas del virus (Noriega, 2008), por lo que podrían presentarse diferencias en cuanto a la eficacia que puedan tener las vacunas importadas en predios chilenos. Por esto, cobra importancia tener un referente de la eficacia de la vacuna en nuestro país que, además de evaluar dicha formulación, permita estandarizar los valores y resultados para que puedan ser utilizados en estudios posteriores.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### **Reseña histórica de la circovirosis porcina**

En el año 1974, investigadores alemanes descubrieron la existencia de un virus que persistentemente contaminaba los cultivos de la línea celular de riñón de cerdo PK-15. A este virus lo nombraron inicialmente como *picornavirus-like* (Tischer *et al.*, 1974). Más tarde luego de estudiar sus características genómicas, fue denominado como circovirus porcino (PCV, del inglés *porcine circovirus*).

Durante varios años, principalmente durante la década de los 80, el virus PCV se consideró como apatógeno. Esto se fundamentaba en que en muchas partes del mundo los animales presentaban anticuerpos anti-PCV, sin embargo, no evidenciaban signos clínicos asociados (Allan *et al.*, 1995).

En 1991 en Canadá, fue descrita una nueva enfermedad en cerdos que se caracterizaba por la presencia de signos inespecíficos que afectaba a animales en el postdestete. Un investigador de dicho país separó animales de ese estrato etario que presentaban desmedro y condición corporal disminuida, para la realización de necropsias y estudios histopatológicos, tras los cuales se evidenciaron lesiones microscópicas en el tejido linfoide, similares a las reconocidas en circovirosis aviares. La ausencia de más planteles con la signología mencionada, repercutió en que no se realizaran mayores indagaciones en el tema.

Más tarde en 1994, cuando resurgieron los signos en otras granjas y tomando en cuenta las características de las lesiones microscópicas encontradas con anterioridad, se retomaron los estudios concluyendo que todos los cerdos enfermos analizados presentaban anticuerpos contra PCV (Segalés, 2007). Por esto, en 1998 se realizaron secuenciaciones del genoma de PCV y se determinó la existencia de dos variantes: PCV-1 contaminante de la línea celular el cual demostró ser apatógeno, y PCV-2 asociado como el agente causal principal de una enfermedad emergente de alto impacto en la industria porcina mundial (Faurez *et al.*, 2009) la cual se denominó Síndrome Multisistémico de Desmedro Postdestete (PMWS, del inglés Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome) (Harding y Clark 1997). Hoy se continúa



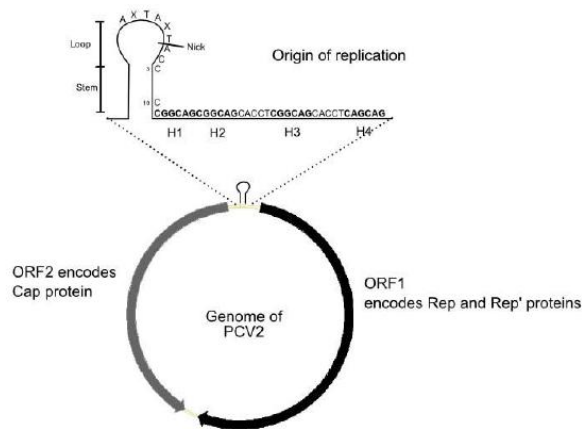
(GCV, del inglés *Goose Circovirus*) (Todd et al., 2001), circovirus del canario (CaCV, del inglés *Canary Circovirus*) (Phenix et al., 2001) y circovirus de gaviotas (GuCV, del inglés *Gull Circovirus*) (Jestin et al., 2001). También dentro de este género se encuentran el Circovirus Porcino tipo I y el Circovirus Porcino tipo II, el cual ha mostrado afectar a cerdos en sus primeros estados de vida.

Estudios recientes han comprobado la existencia de un virus denominado TTV (*Transfusion transmitted virus*) que afecta al ser humano. Se ha asociado a transfusiones sanguíneas en pacientes que presentan hepatitis. TTV presenta características que sugieren una similitud con virus de la familia *Circoviridae*, por lo que podría eventualmente ser incluido en este grupo (Irshad et al., 2006).

### **Características del virus**

Los Circovirus Porcinos son esféricos, con simetría icosaédrica y estructuralmente muy pequeños (17 nanómetros). Además se describe que no poseen envoltura (Faurez et al., 2009). El genoma de PCV está compuesto por un DNA circular de hebra simple de aproximadamente 1.760 nucleótidos de largo. En parte de dicho genoma se han identificado varios marcos de lectura abiertos (ORF, del Inglés *Open Reading Frames*) y otros segmentos no codificantes que han sido relacionados con la regulación de la transcripción y replicación del virus. De los ORFs conocidos, los más estudiados y caracterizados son el 1 y 2. El ORF1 codifica para la enzima replicasa (Rep), esencial para la replicación del DNA viral, mientras que ORF2 codifica para la proteína de la cápside viral, (Cap), la cual juega un papel fundamental, regulatorio y estructural, en el proceso de ensamblaje de la partícula viral. El ORF2 ha mostrado tener gran variación en los distintos PCVs aislados hasta hoy (Trundova y Celer, 2007). Lo mencionado se grafica en la Figura 2 la cual representa el genoma de PCV-2. En el año 2005 se demostró la presencia de un tercer ORF denominado ORF3, que si bien no es indispensable para la replicación *in vitro* de PCV-2, juega un papel importante en inducir la apoptosis vía caspasas (Liu et al., 2005).





**Figura 2:** Representación del genoma de PCV-2. El fragmento negro grafica el ORF1 que codifica para la proteína “Rep”; el fragmento gris grafica el ORF2 que codifica para la proteína “Cap”. Entre ambos esta la zona intergenética que en los orígenes de los ORFs es también el origen de la replicación (Faurez *et al*, 2009)

A lo largo del tiempo se han llevado a cabo secuenciaciones del genoma tanto de PCV-1 como PCV-2 determinando que, a pesar de la similitud encontrada en relación a la cantidad de pares de bases que posee cada uno de los virus, el PCV-2 tiene solo un 68 a 76% de identidad nucleotídica con el apatógeno PCV-1. Esto podría explicarse por inserciones y/o deleciones ocurridas en sus genomas lo que finalmente determinaría la diferencia en la patogenicidad (Mankertz *et al.*, 2000).

A pesar de que la similitud entre las secuencias de los ORFs de diferentes aislados de PCV-2 analizados fue aproximadamente del 90% (Fenaux *et al.*, 2000), existen genotipos o subgrupos del mismo agente. Estas variaciones genéticas se correlacionan más significativamente con el origen geográfico que con factores como el tropismo celular o la virulencia de PCV-2 (Wen *et al.*, 2005). En distintos países del mundo se han realizado experiencias que permiten identificar y clasificar al virus que se encuentra en cada nación. En Chile, se ha realizado una sub clasificación del virus a través de la identificación de las secuencias de ORF2 a nivel de los nucleótidos 262 y 267 y los aminoácidos correspondientes 88 y 89. Según esto, el virus presente en nuestro país corresponde al sub genotipo 1 (Noriega, 2008).

## **Epidemiología**

Los animales reconocidos como hospederos naturales de PCV-2 corresponden al cerdo doméstico y al jabalí (Vicente *et al.*; 2004). Se ha evidenciado que existe una alta probabilidad de que las granjas resulten seropositivas al virus, lo que sugiere que la transmisión tanto entre los individuos de un mismo plantel como entre planteles es bastante efectiva (Torres, 2007). De hecho, en muchos estudios se señala que casi el 100% de los planteles que se estudian resultan ser seropositivos a esta enfermedad, incluso cuando no se evidencia signología.

La morbilidad puede alcanzar un 50%, aunque por lo general oscila entre 5 al 20% de los animales. Cuando existe un brote de circovirus porcino la mortalidad puede alcanzar incluso un 70 a 90% (Torres, 2007).

La principal vía de transmisión es la horizontal, siendo la más común la vía oro nasal (Segalés *et al.*; 2005). Esto se respalda por experiencias en las cuales se ha comprobado la presencia de circovirus en sangre, hisopos nasales y rectales casi en igual cantidad, pero con una mayor carga en los hisopos nasales que rectales lo que sugiera una mayor importancia de esta vía como vía principal de diseminación del patógeno (López *et al.*; *sf*). Se ha comprobado la presencia del virus en distintas secreciones como secreciones nasales y oculares, semen y heces.

El grupo etario que se ve más perjudicado por la presencia de la patología corresponde a animales entre las seis y ocho semanas de vida (coincidente con el destete), lo que sugiere un importante rol de la inmunidad materna, ya que se cree que es en este periodo en donde disminuyen los anticuerpos entregados a través del calostro y la lactancia. A su vez se ha comprobado que las cerdas cumplen un importante papel como fuente de infección para los lechones (Torres, 2007). Por todo lo mencionado, la viremia ocurre entre el periodo de lactancia y transición en donde disminuye la inmunidad entregada por la madre y luego cuando el animal es capaz de generar una respuesta contra el virus y seroconvertir contra PCV-2, la viremia disminuye. Los anticuerpos formados en esta etapa pueden permanecer hasta la semana 28 de vida (López *et al.*; *sf*).

La vía vertical se ha estudiado como factible luego del seguimiento de infecciones intranasales en los animales (Park *et al.*; 2005), sin embargo, no se ha llegado a resultados que confirmen su efectividad en campo. Se ha evidenciado que PCV-2 no es capaz de atravesar la placenta, sin embargo, produce problemas reproductivos en los animales (Torres, 2007). Por otra parte hay autores que señalan que el virus si es capaz de atravesar la placenta, principalmente en cerdas seronegativas y que este paso de PCV-2 causaría distintos cuadros según el momento de infección durante la gestación (Soria y Segalés, 2012b).

También se piensa que existe un factor “camada” para la presentación de la patología, ya que se ha visto que hay camadas de animales más susceptibles a padecer de la enfermedad. Otro factor que influye de manera considerable en la presentación de la circovirus porcina son las características intrínsecas de cada cerdo como la genética y el sexo. Se ha comprobado que los machos castrados son mas susceptibles que las hembras, debido a las infecciones que ocurren muchas veces luego del procedimiento de gonadectomía, factores hormonales y genéticos (López et al.; sf). Los lechones más débiles con menor peso al destete presentan mayor predisposición a enfermar. Se ha observado cierta resistencia en animales de raza Pietrain (Torres, 2007). Sin embargo, se han realizados estudios en los cuales no se ha podido determinar si efectivamente las distintas líneas genéticas o individuos en concreto presentan genes con mayor o menor resistencia al virus. Por otra parte, hay experiencias en las cuales se ha atribuido a dos regiones del genoma la responsabilidad de portar genes de susceptibilidad a PCV-2 (López et al.; sf).

Es importante señalar que en un plantel infectado por circovirus, no todos los cerdos manifiestan la enfermedad, lo que sugiere que la presencia de PCV-2 no es el único factor involucrado en el desarrollo de la patología. En algunos estudios se señala que además de las prácticas de manejo (higiene, hacinamiento y ventilación), y la presencia de infecciones concomitantes, existiría un factor denominado “Factor X” el cual aún no ha sido determinado (O`Dea, 2010).

Se han realizado experiencias que sugieren la inexistencia de un potencial zoonótico del virus, sin embargo, aun esta facultad se considera como incierta. Se ha podido

comprobar la seropositividad a PCV-1 en los seres humanos, ratones y también en ganado. Aún no se ha podido encontrar anticuerpos en humanos y otras especies estudiadas contra PCV-2. Por otra parte se han realizado ensayos en los cuales se ha podido verificar la capacidad del virus para multiplicarse en cultivos de líneas celulares humanas como es el caso de la experiencia llevada a cabo por Hattermann *et al* en el año 2004, donde la finalidad del estudio era evaluar a PCV-2 como un patógeno que pueda afectar al ser humano al plantear al cerdo como un posible donante de órganos para el hombre.

### **Patogenia**

Las células que se han identificado como blanco del virus corresponden al sistema monocito-macrófago y células dendríticas. Ocasionalmente, se ha logrado aislar el virus de células endoteliales, epiteliales y linfocitos (Darwich *et al.*, 2004). A través de distintos estudios se ha comprobado que el virus, a pesar de tener como blanco los macrófagos, no se multiplica en estas células, si no que opta por la replicación en células de continuo recambio, como las células endoteliales y epiteliales (Steiner *et al.*, 2007).

Se cree que el efecto de PCV-2 sobre las células linfoides se produce en forma indirecta a través de mecanismos inhibitorios de señales inmuno moduladoras en las células dendríticas plasmoides, las cuales son productoras naturales de interferón alfa (INF- $\alpha$ ). Consecuentemente, esta inhibición genera inmunosupresión severa por un desequilibrio entre el sistema inmune innato y adquirido del cerdo. Es por esta razón que PCV-2 se asocia a otras enfermedades que afectan a la especie porcina. El conjunto de estas patologías se conoce como Enfermedades Asociadas a Circovirus Porcino o PCVAD (Vincent *et al.*, 2007). Una de las patologías que se relaciona con mayor frecuencia a PCV-2 es PMWS (O`Dea, 2010). Otras enfermedades relacionadas son síndrome de dermatitis y nefropatía porcina, falla reproductiva, complejo respiratorio porcino, neumonía proliferativa y necrotizante, temblor congénito tipo AII (Allan *et al.*, 2004).

En relación a la seroconversión de PCV-2, se ha detectado en campo que esta ocurre entre siete a doce semanas de edad y como máximo a las veintiocho semanas (Rodríguez *et al.*, 2002). Se ha descrito también que cerdos severamente infectados con PCV-2 son incapaces de generar una respuesta inmune humoral adecuada contra el patógeno. Estos animales cursan con monocitosis, linfopenia y granulocitos inmaduros (Nielsen *et al.*; 2003). Además, es importante mencionar que los anticuerpos entregados por la madre a través del calostro han mostrado ser un factor protector en cerdos jóvenes y que la disminución de estos se correlaciona en forma directa con mayores niveles de viremia en los animales (O`Dea, 2010).

### **Signología relacionada con PCV-2**

Las lesiones en los cerdos varían desde inaparentes a un gran espectro de alteraciones que pueden observarse en los animales y puede verse afectado uno o más sistemas orgánicos. Los signos clínicos están en directa relación con el grado y severidad de la manifestación de la enfermedad que se reconozca en ese momento. Cuando se presenta un brote de PCVAD los signos más característicos son emaciación corporal, taquipnea, disnea, ictericia y palidez. En algunos casos puede existir linfadenomegalia (O`Dea, 2010).

Como se ha mencionado con anterioridad, la patología más comúnmente relacionada con PCV-2 es el PMWS, en la cual vemos alteraciones respiratorias sin respuesta a terapias antibióticas, desmedro, retraso en el crecimiento producido por pérdida de peso progresiva con emaciación, anemia, diarrea, ictericia y aumento en los porcentajes de mortalidad desde 2 - 4% a 5 - 15% (Estrada, 2009). Dentro de la histopatología compatible con la enfermedad se encuentran lesiones como la depleción linfoide en áreas interfoliculares y disminución o ausencia en el número de folículos linfoides y desorganización del tejido linfoide, también se ve un aumento de células de aspecto histiocitario, sumado a la presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos principalmente en linfonódulos y placas de Peyer localizados en el citoplasma de macrófagos y células sinticiales (Estrada, 2009).

## **Diagnóstico de PCV-2**

A la fecha se han utilizado distintos métodos para el diagnóstico de PCV-2. Dentro de las técnicas usadas se encuentran la detección de ácidos nucleicos por medio de hibridación *in situ* y la detección de antígeno viral de PCV-2 por inmuno histoquímica (Estrada, 2009).

Una de las pruebas diagnósticas destacadas por su alta especificidad y sensibilidad es la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), la cual permite detectar en forma rápida la existencia del ácido nucleico viral en la muestra deseada (Liu *et al.*, 2000). Para la realización de la prueba se utiliza una muestra de DNA, *primers* o cebadores los cuales van a flanquear la secuencia de DNA que se quiere amplificar, polimerasa termoestable y un tampón que contenga iones magnesio (Kubista *et al.*, 2006). Este método se basa en la amplificación en forma exponencial de un fragmento de DNA que se utiliza como molde y de este modo poder generar millones de copias (MICROBIAL, 2009) que luego serán detectadas a través de un segundo método que es la electroforesis.

Una optimización de esta técnica, es la reacción de PCR en tiempo real (qPCR), un método sensible y versátil, que permite cuantificar de forma exacta la cantidad de DNA viral por unidad de suero o tejido (O`Dea, 2010). Esta prueba es muy semejante al PCR convencional, pero se distingue por la incorporación de una molécula que emite fluorescencia y la cuantificación en “tiempo real” de ésta (Kubista *et al.*, 2006). Cada vez que se realiza una copia del DNA problema se generará fluorescencia la cual será proporcional a la cantidad de DNA que se ha producido en cada ciclo. El resultado visible durante la amplificación se presenta como un gráfico de amplificación donde la fluorescencia está en el eje de las ordenadas y el número de ciclos en las abscisas. Existe un punto de intersección entre el umbral de detección del equipo y la curva de amplificación al cual se le denomina “Ct” (*Threshold Cycle*), por lo tanto dicho punto indicará el ciclo en el cual la fluorescencia alcanza el valor umbral. Se puede concluir que mientras mayor sea la cantidad de DNA inicial se necesitarán una menor cantidad de ciclos para alcanzar el valor umbral y por ende, el valor de la “Ct” será menor (MICROBIAL, 2009).

Para el análisis de los resultados de debe realizar una curva de calibración o curva patrón luego de la cual el programa generará una ecuación de la recta ( $y = nx+n$ , donde “y” es el valor de “Ct” y “x” la concentración del DNA de la muestra) que será utilizada para el análisis de los valores obtenidos en cada uno de los experimentos. Posteriormente el valor de “Ct” se debe interpolar en la ecuación obteniendo así como resultado el número de copias del DNA diana (MICROBIAL, 2009).

Cabe mencionar que existen dos forma de realizar qPCR: técnica relativa y absoluta. La técnica relativa de qPCR utiliza genes de referencia para evaluar cambios fisiológicos en la expresión de un gen en estudio y no requiere de la realización de una curva estándar o de calibración. Es importante que la expresión de los genes de referencia sea constante en las células estudiadas. Algunos de los genes de referencia comúnmente usados son  $\beta$ -actina y 18S del RNA ribosomal entre otros. Por otro lado, la cuantificación absoluta se basa en la detección de un número de copias fijos de una secuencia determinada mediante la utilización de una curva de calibración (Vinueza, 2009).

El qPCR se utiliza hoy en día como herramienta diagnóstica de alto impacto en la medicina veterinaria, ya que permite determinar en forma cuantitativa la cantidad de diversos agentes infecciosos (virus, bacterias, hongos) presente en muestras biológicas de animales y, de este modo, conocer de manera más objetiva, la efectividad de tratamientos médicos o de vacunas.

### **Control y prevención**

Como se ha mencionado con anterioridad, este virus tiene la característica de ser un patógeno ubicuo, presente en la mayoría de los países del mundo y muy difícil de eliminar del medio ambiente. Esto último se relaciona también con la gran resistencia que presentan los circovirus porcinos a desinfectantes y detergentes utilizados comúnmente en la industria para sanear los lugares de crianza y reproducción (Allan y Ellis, 2000). Además se debe considerar que al afectar a una especie silvestre como el jabalí, su control y erradicación se hacen aún más complejos. No existen tratamientos efectivos para poder contrarrestar los signos que caracterizan a esta

enfermedad, sin embargo, algunos autores describen tratamientos sintomáticos que ayudan a paliar de alguna manera la sintomatología sin lograr eliminarla.

En aquellos países que se ven afectados por la circovirus porcina más que intentar eliminar el virus, se trata de tomar medidas que permiten la prevención de la enfermedad. Las más utilizadas son la vacunación, la auto vacunación y las medidas de manejo y bioseguridad (Estrada, 2009).

Dentro de las medidas de bioseguridad, una de las más reconocidas son los “20 pasos de Madec” (Madec, *et al.*, 2000) que corresponde a distintas medidas de manejo que tienen como finalidad lograr reducir el impacto de la enfermedad. De hecho hoy se ha comprobado que estas medidas han logrado disminuir significativamente los porcentajes de mortalidad observado en muchas granjas (Madec, *et al.*, 2001).

El desarrollo de vacunas anti-PCV-2 ha cobrado relevancia en los últimos años y éstas han mostrado tener buenos resultados en la generación de inmunidad en los animales. Lo anterior se respalda en estudios que muestran la efectividad de vacunas aplicadas en forma previa a la exposición al virus, donde los animales presentan menor carga viral que aquellos en que no se aplicó ningún producto (Reicks y Leuwerke, 2008).

Hoy se conocen varias vacunas en el mercado internacional, cuya acción se basa en la utilización de la proteína de la cápside de PCV-2 como principal agente inmunogénico. Además, están en desarrollo numerosos ensayos que apuntan a utilizar esta proteína vehiculizada tanto en bacterias como en virus recombinantes. Una alternativa a estos vectores, es la utilización de levaduras recombinantes que expresen fragmentos del virus (Bucarey *et al.*; 2009).

En Chile existe una variante del virus y no se conoce la real efectividad de las vacunas comerciales utilizadas en el país. Los datos obtenidos en esta memoria se podrán comparar con los de vacunas experimentales que en estos momentos están en desarrollo y así, generar avances tecnológicos que permitan un mejor estatus sanitario de la industria porcina a nivel nacional.



## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de una vacuna comercial contra circovirus porcino tipo dos sobre la carga viral en animales vacunados y no vacunados contra el virus mediante la utilización de técnicas moleculares como qPCR.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Implementar la técnica de qPCR y estandarizar las condiciones necesarias para llevar a cabo la cuantificación de circovirus porcino tipo 2 en suero de cerdos.
2. Determinar la carga viral de circovirus porcino tipo 2 en suero de cerdos inmunizados y no inmunizados.
3. Comparar la carga viral de circovirus porcino tipo 2 en suero de cerdos inmunizados y no inmunizados contra dicho virus.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### **Muestras y selección de estas**

En este trabajo se dispuso de un banco de sueros de cerdos de raza Landrace provenientes de un plantel nacional de producción porcina. En un estudio previo, las muestras de sangre fueron obtenidas por punción de la vena yugular con tubos Vacutainer de 21Gx1 (Precision Glide), se transportaron al laboratorio y posteriormente se incubaron a 37° C por 30 minutos para permitir su coagulación. Luego, se centrifugaron a 10.000 x g por 10 min a 4° C, se fraccionó el suero y se guardó a -20°C.

Las muestras corresponden a un grupo de animales que no fueron vacunados y otro vacunado 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*® CircoFLEX™, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, correspondiente a una vacuna subunitaria basada en partículas virales vacías (VLP, del acrónimo Viral Like Particles) de PCV-2 en adyuvante oleoso. En ambos grupos se tomaron muestras de sangre a los días 30, 50, 70, 90, 110 y 130 de la experiencia. Cabe mencionar que todos los cerdos eran clínicamente sanos, pero positivos a PCV-2 luego de la realización de PCR tiempo final previo a la realización de este estudio.

#### **Extracción de DNA de las muestras**

Para realizar dicho proceso se utilizó un kit comercial (Axyprep Multisource Genomic DNA Miniprep kit, AXYGEN Biosciences), bajo las recomendaciones del fabricante.

La integridad del DNA se monitoreó en geles de agarosa al 0,8 ó 1% en solución de amortiguador TAE (Tris, Acetato, EDTA) y se calculó su concentración midiendo la absorbancia (abs) a 260 nm de acuerdo a la siguiente fórmula:  $\text{DNA } (\mu\text{g/mL}) = (\text{abs } 260) \times (\text{factor de dilución}) \times (50 \mu\text{g DNA/mL}) / (1 \text{ unidad de abs } 260)$ . La pureza fue estimada de acuerdo a la razón de absorbancia 260/280 nm (Maniatis *et al.*, 1982).

### **PCR tiempo final**

Se realizaron una serie de reacciones de PCR tiempo final con el fin de establecer los tiempos y temperaturas de alineamientos de partidores óptimas para la realización de qPCR. Las condiciones utilizadas fueron variadas durante el estudio. Se hicieron PCR con gradientes de temperatura principalmente modificando la temperatura de alineamiento de los partidores con rangos que fueron desde los 48°C hasta los 60°C y el resto de los rangos se modificaron de experimentos realizados con anterioridad. Finalmente la mayor especificidad y reproducibilidad se logró con los siguientes parámetros: activación inicial de la DNA polimerasa a 95° C durante 3 minutos, seguidos por 35 ciclos de desnaturalización a 94° C durante un minuto, alineamiento de partidores a 48° C durante 1 minuto, y extensión a 72° C durante un minuto. Los productos de amplificación fueron visualizados por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1% en solución amortiguador TAE, utilizando un voltaje de 90 volts durante 45 minutos.

### **Curva de calibración para interpolación de resultados**

Se tomó una muestra que contiene el origen pGEM::PCV2, en el cual está clonado el genoma completo del virus PCV-2. El DNA plasmidial, fue extraído por medio del kit comercial (Plasmid Midi Kit, Qiagen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración de la preparación del plásmido control, se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm de acuerdo al protocolo descrito con anterioridad. Posteriormente, se calculó la concentración molar de DNA agregado, considerando un peso molecular promedio de un par de bases igual a 660 g/mol, resultando en un peso molecular promedio 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 poder conocer la cantidad efectiva de copias o moléculas de DNA viral contenida en cada una de las muestras problema, fue necesario interpolar los valores

de fluorescencia o “Ct” obtenidos a los valores correspondientes en moles de acuerdo a la curva estándar construida con el genoma control.

### **Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real**

Para llevar a cabo el qPCR se utilizaron 2 pares de partidores:

- Partidores Cap-nest, los cuales estaban previamente sintetizados y guardados a -20°C en el laboratorio de BIOVETEC. Las secuencias de dichos partidores fueron las siguientes:
  - “Reverse”: 5` - TTA TGG AAG TGG GGG GTG TTT A - 3`
  - “Forward”: 5` - ATG ACG TAC CCA AGG AGG CGT TAC C
- Partidores Cap-98, sintetizados a través de un software de la compañía Roche® (Anexo 1):
  - “Reverse”: 5` - CCT GGG GGA AGA AAG TCA TTA – 3`
  - “Forward”: 5` - CGC ACC TTC GGA TAT ACT ATC AA – 3`

Se utilizó un volumen total de mix de reacción de 25 uL, los cuales estuvieron compuesto por 1 uL de cada uno de los partidores, 12,5 uL de 2x SYBR® Green master mix (Thermo scientific) (que contiene, según el fabricante, SYBR® Green I Dye, AmpliTaq Gold® DNA Polimerasa, dNTPs con dUTP y buffer), 2 uL de DNA templado y el resto del volumen fue completado con agua libre de nucleasas. El PCR en tiempo real, se llevó a cabo en un termociclador Applied Biosystems StepOne™. La formación de producto, fue monitoreado por medio 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 de una 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 para confirmar la

especificidad de amplificación. Todas las muestras fueron analizadas en duplicado, y los templados para las curvas estándar en triplicado. Los datos fueron analizados con el *software* StepOne™ de Applied Biosystem.

### **Análisis de los resultados obtenidos en qPCR**

Los resultados fueron analizados a través de la prueba de “t” de *Student*, mediante la utilización del programa Graphpad Prism 5, utilizando un intervalo de confianza de 95%,  $p = 0.05$  Se compararon los promedios por días del grupo vacunado y el grupo control. Mediante este software también se realizaron los gráficos del estudio.

### **Instalaciones**

Todos los procedimientos fueron llevados a cabo en las instalaciones del laboratorio BIOVETEC de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

### **Bioseguridad**

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 micro pipetas y guantes, posterior a su uso.
- Lavado de manos con desinfectantes luego de la manipulación de productos biológicos.

## 4. RESULTADOS

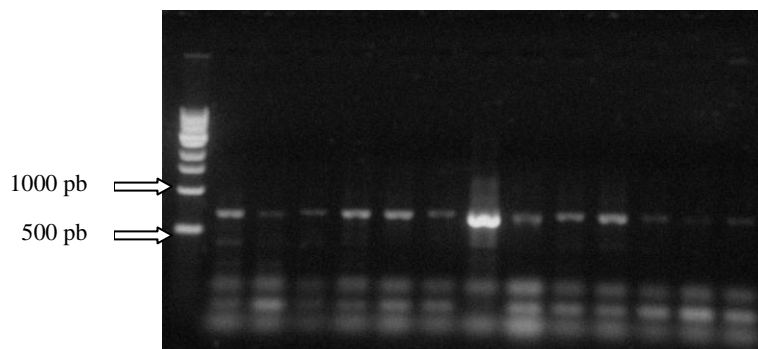
### Extracción de DNA viral desde suero de cerdos

Por medio de la utilización de un kit comercial se pudo purificar el DNA de las muestras obteniendo como producto DNA de alta pureza e integridad desde 200µl de suero. Posterior a la extracción, se realizó espectrofotometría en la cual se obtuvieron valores de concentración de DNA, en la mayoría de los casos, cercanos a los 30 ng/µL, siendo el valor mínimo obtenido 10 ng/µL y el mayor 50 ng/µL.

### Estandarización de las condiciones de qPCR

Mediante la realización de PCR tiempo final se pudieron evaluar los partidores Capnest “R” y “F”. Se probaron distintos rangos de temperatura y tiempos tanto de denaturación, alineamiento y extensión, las cuales funcionaron para este método. Se determinó que el éxito de la prueba se obtenía con los siguientes condiciones: activación inicial de la DNA polimerasa a 95° C durante 3 minutos, seguidos por 35 ciclos de desnaturalización a 94° C durante un minuto, alineamiento de partidores a 48° C durante 1 minuto, y extensión a 72° C durante un minuto.

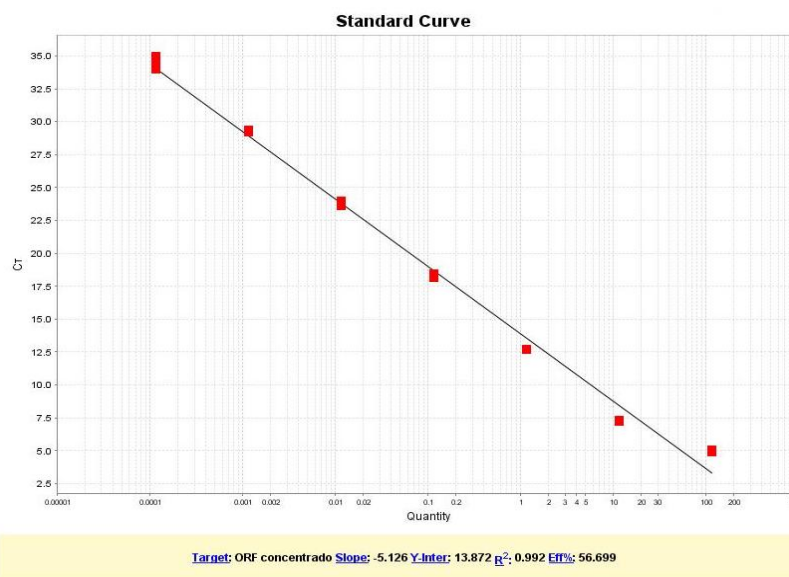
La Figura 3 a continuación muestra un PCR de prueba realizado en el cual, además de evaluar los partidores, se pudo comprobar la efectividad de la extracción de DNA mediante la utilización del kit comercial.



**Figura 3:** Fotografía de gel de electroforesis luego de PCR tiempo final. Se visualiza la positividad a PCV-2 de las muestras analizadas luego de un PCR convencional, lo cual se determina por el peso molecular del amplicón, que se sitúa alrededor de las 700 pb.

## Curva de calibración de qPCR utilizando partidores Cap-nest

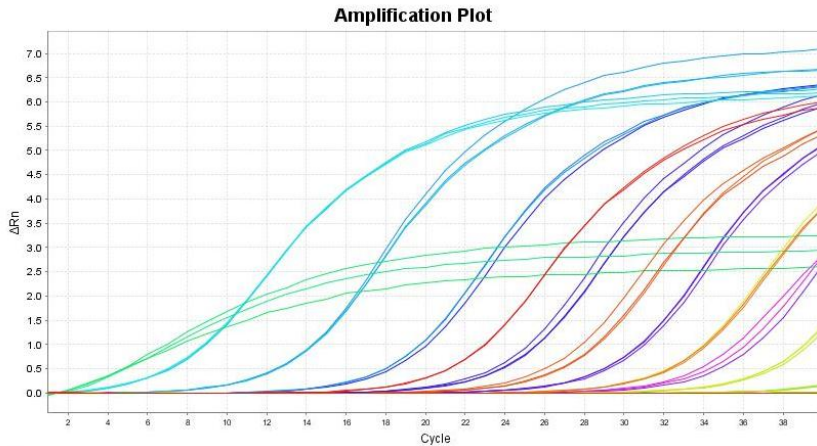
Posteriormente, se procedió a construir la curva de calibración de qPCR con un DNA de PCV-2 de concentración conocida. La Figura 4, muestra la curva de calibración o curva estándar realizada con los partidores Cap-nest “R” y “F”. En la parte inferior se observa la ecuación de la recta arrojada por el programa:  $Y = -5,126X + 13,872$ ; donde el eje “X” corresponde a distintas diluciones de concentraciones conocidas del plasmidio control pGEM::PCV2 y el eje “Y”, corresponde al menor ciclo en el cual cada dilución supera el valor umbral de fluorescencia o “Ct”. Los límites de detección expresados en logaritmo del número de copias por  $\mu\text{l}$  van desde 10,75 a 4,75.



**Figura 4:** Curva de calibración o curva estándar realizada con los partidores Cap-nest “R” y “F”. En la parte inferior se observa la ecuación de la recta arrojada por el programa:  $Y = -5,126X + 13,872$ ; donde “X” corresponde a la carga viral e “Y” al calor de “Ct”.

De forma paralela, se observó la curva de amplificación generada con los partidores Cap-nest sobre cada una de las diluciones del plasmidio control pGEM::PCV2, como muestra la Figura 5. En esta se visualizan las 3 fases de la curva de amplificación: la primera en donde se observan resultados por debajo del umbral detectado por el termociclador, una segunda fase en la cual la amplificación se manifiesta de forma exponencial y una tercera fase en la que se alcanza un plató donde se satura la

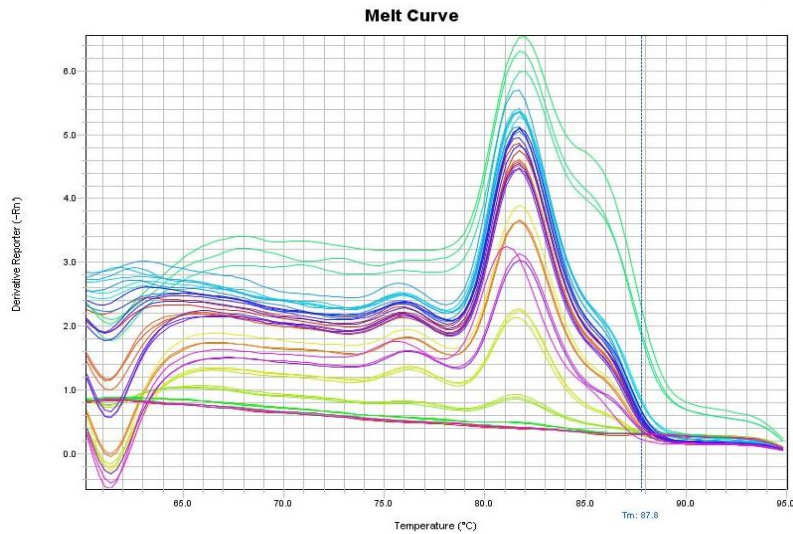
amplificación de producto. En la literatura se señala que la separación entre cada una de las diluciones debe ser equivalente a aproximadamente 3,5 ciclos, lo cual no se cumple en la amplificación obtenida con los partidores Cap-nest.



**Figura 5:** Curva de amplificación obtenida con los partidores Cap-nest “R” y “F” sobre cada dilución del plasmidio de concentración conocida.

El análisis de la especificidad de la reacción de qPCR realizada con los partidores Cap-nest, se llevó a cabo por medio de la visualización de una curva de fusión de los productos de amplificación o *melting curve*. En esta, los productos son sometidos a una gradiente de temperaturas y si la reacción fue específica, se observa un *peak* de *melting* único correspondiente al cambio de fluorescencia existente entre el punto de máxima fluorescencia y el descenso de esta. Todo lo anteriormente mencionado se refleja en la Figura 6, donde se observa que la temperatura de fusión para los productos de amplificación de PCV-2 con los partidores Cap-nest se encuentra alrededor de los 81,5 °C. En la curva de Melt obtenida se observa un peak mayor acompañado de peaks más pequeños que pueden deberse a contaminación en la reacción o a la formación de dímeros de partidores.

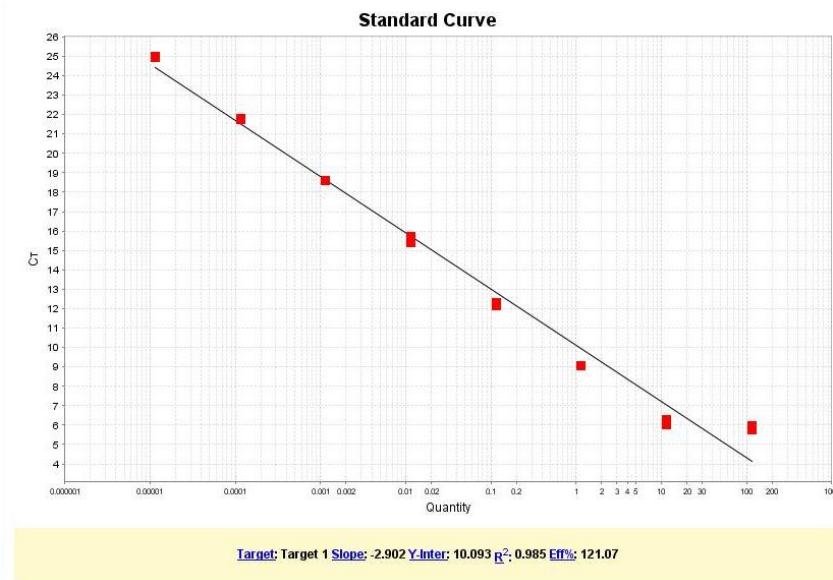




**Figura 6:** Curva de Melt obtenida con los partidores Cap-nest “R” y “F”. En esta se observa que la temperatura de Melt se encuentra alrededor de los 81,5°C.

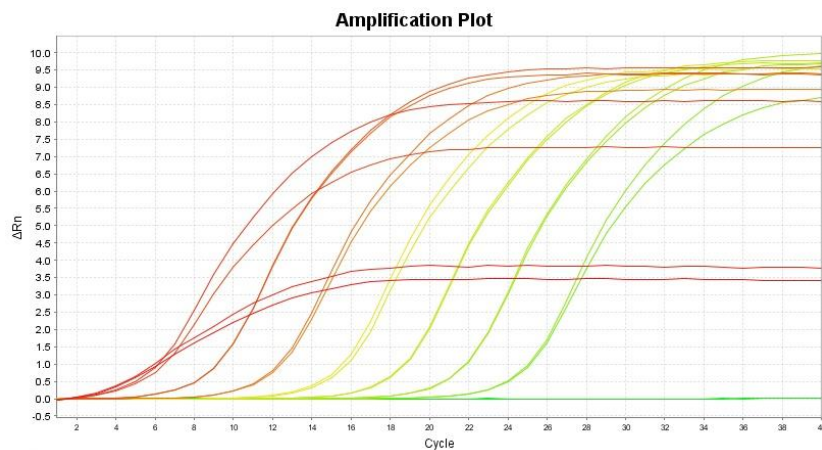
### **Curva de calibración de qPCR utilizando partidores Cap-98**

Posteriormente, debido a la baja sensibilidad obtenida con los partidores Cap-nest, basándose en la curva de Melt observada con dichos partidores, se procedió a evaluar una segunda pareja de partidores, diseñados en base a un software especializado para qPCR. De esta manera, se obtuvo una segunda la curva de calibración (Figura 7) realizada con los partidores Cap-98 “R” y “F”. A partir de esta gráfica se pudo concluir que los partidores Cap-98 presentan una mayor sensibilidad analítica, a más bajas concentraciones de DNA control, lo cual se ve graficado con un valor más positivo de la pendiente,  $-2,902$  vs  $-5,12$ . Los rangos de amplificación obtenidos con estos partidores expresados en logaritmo de copias por  $\mu\text{l}$  iban desde 3 a 9.



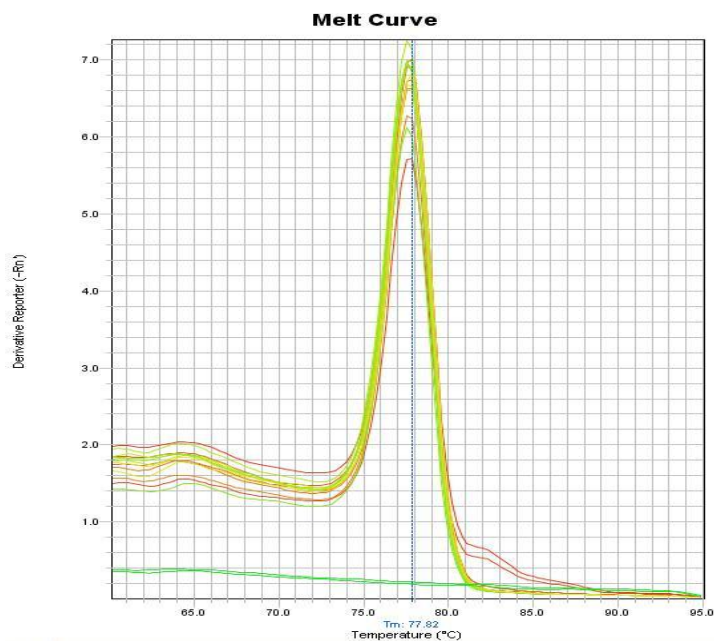
**Figura 7:** Curva de calibración o curva estándar realizada con los partidores cap-98 “R” y “F”. En la parte inferior se observa la ecuación de la recta arrojada por el programa:  $Y = -2,902X + 10,093$ ;

De forma paralela se analizó la curva completa de amplificación (Figura 8) donde se observa que cada una de las reacciones de amplificación para cada dilución está separada por 3,5 ciclos que, según lo señalado en la literatura, corresponde a lo óptimo al momento de la realización de la curva de calibración.



**Figura 8:** Curva de amplificación obtenida con los partidores cap-98 “R” y “F”.

En la curva de Melt obtenida con los partidores Cap-98 (Figura 9), se observa un peak único de temperatura de *melting*. Cabe destacar que no se aprecian peaks más pequeños que indicativos de contaminación o dímeros de partidores.

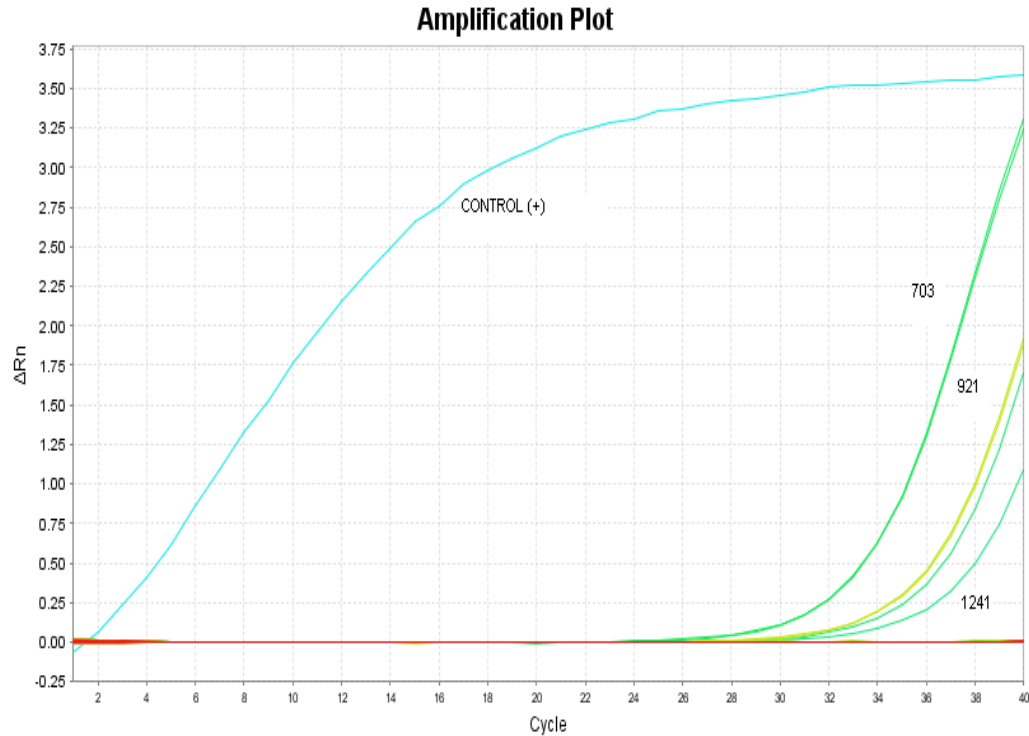


**Figura 9:** Curva de Melt obtenida con los partidores Cap-98 “R” y “F”. En esta se observa que la temperatura de Melt se encuentra alrededor de los 78°C.

En base a la realización de las curvas de estandarización de ambas parejas de partidores, se procedió a analizar las muestras problema.

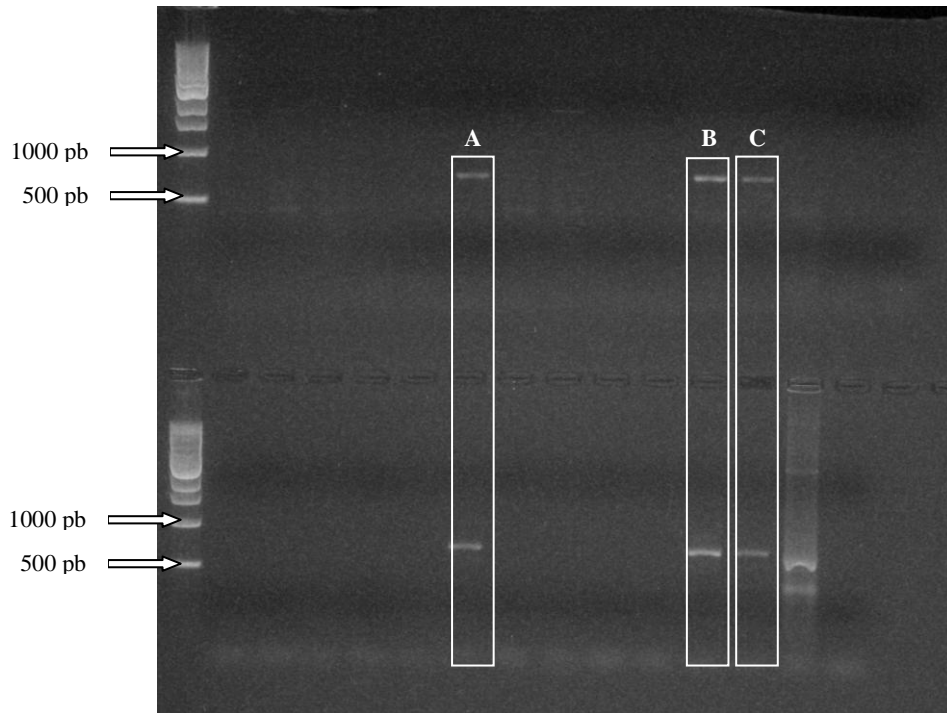
### **Reacción de la polimerasa en cadena en tiempo real para el análisis de las muestras**

Luego de procesar las primeras muestras con la pareja de partidores Cap-nest, en la reacción se denota un patrón de amplificación en el cual sólo se evidencia DNA viral en los sueros obtenidos en los días 90, 110 y 130 de vida de los animales, no obteniéndose amplificación en días tempranos de muestreo (30, 50, y 70) . Esto queda demostrado en la Figura 10 donde las muestras señaladas corresponden a la amplificación del DNA templado proveniente de sueros de cerdos muestreados en los últimos días de estudios. En el resto de los animales no se aprecia ningún tipo de amplificación durante el desarrollo de qPCR.



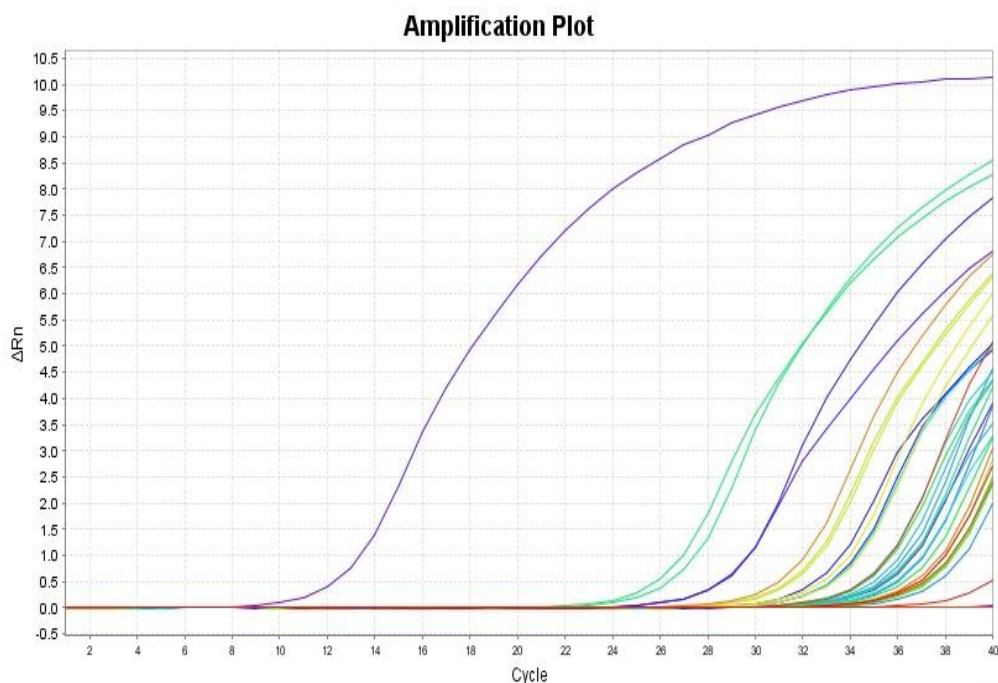
**Figura 10:** Amplificación tipo con partidores “Cap-nest”. Se muestran las curvas de amplificación obtenidas con los partidores mencionados. Las muestras señaladas, 703, 921, 1241, corresponden a sueros de cerdos obtenidos en los últimos días de muestreo, grupo no vacunado día 110, grupo vacunado día 130 y grupo no vacunado día 130, respectivamente.

Se realizó PCR tiempo final con los mismos partidores para comprobar la veracidad de los resultados observados luego del análisis a través de qPCR y una electroforesis con las muestras ya amplificadas de ambos métodos (Figura 11). Se observa que los resultados obtenidos en ambos casos se correlacionan, concluyendo que las muestras pertenecientes a los últimos días del muestro (110 y 130) presentan mayor amplificación que el resto de los días del estudio. Las bandas se observan situadas alrededor de las 700 pb, lo que coincide con el tamaño del amplicón.



**Figura 11:** Fotografía de gel de electroforesis control. (A) Muestra analizada por PCR y qPCR día 130 del grupo vacunado; (B) Muestra analizada por PCR y qPCR día 110 grupo control; (C) Muestra analizada por PCR y qPCR día 130 grupo control. La parte superior corresponde a los resultados de un PCR tiempo final y la parte inferior a un qPCR.

En base a estos resultados, se decide aumentar la sensibilidad analítica de la medición, cambiando los partidores por la pareja Cap-98. Posterior a la realización del primer qPCR, se observa un cambio en los resultados, evidenciando que si hay carga viral en los días 30, 50 y 70 (Figura 12), lo cual se asocia a una mayor sensibilidad de los partidores Cap-98.

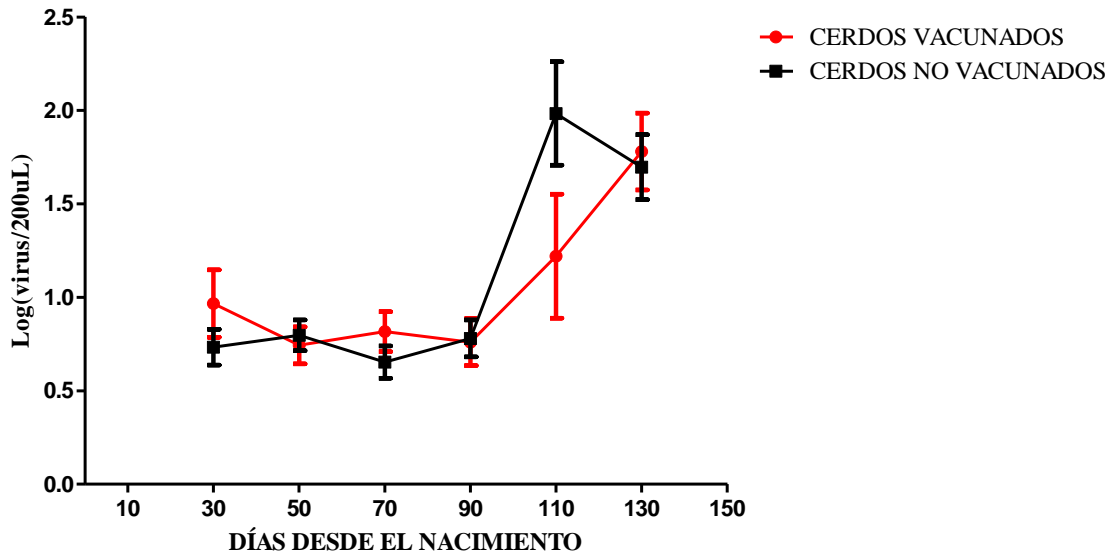


**Figura 12:** Curva de amplificación obtenida luego de utilizar los partidores Cap-98. En ella se visualiza amplificación en todos los días de muestreo de ambos grupos, representada por cada una de las curvas de amplificación. Las curvas de amplificación más temprana corresponden a sueros de los últimos días de muestreo.

### Carga viral

Para obtener los resultados de la carga viral, se interpolaron los valores correspondientes a “Ct” de cada una de las muestras en la ecuación obtenida luego de la realización de la curva de estándar. Se aplicó el logaritmo para poder trabajar con valores más manejables. Posteriormente, se sacó un promedio entre los resultados de los duplicados y luego un promedio por día de muestreo. Con esto se obtuvo la Figura 13, en donde se muestra la evolución de la carga viral promedio a lo largo del tiempo. La carga viral en ambos grupos se mantiene en rangos similares hasta el día 90. Posteriormente, aumenta en el caso de los cerdos vacunados y no vacunados, retrasándose el peak del parámetro en el caso de los animales inmunizado contra PCV-2.

**Evolución del Promedio y desviación estandar de Log(Virus/200uL) por día de muestreo en cada uno de los grupos de animales**

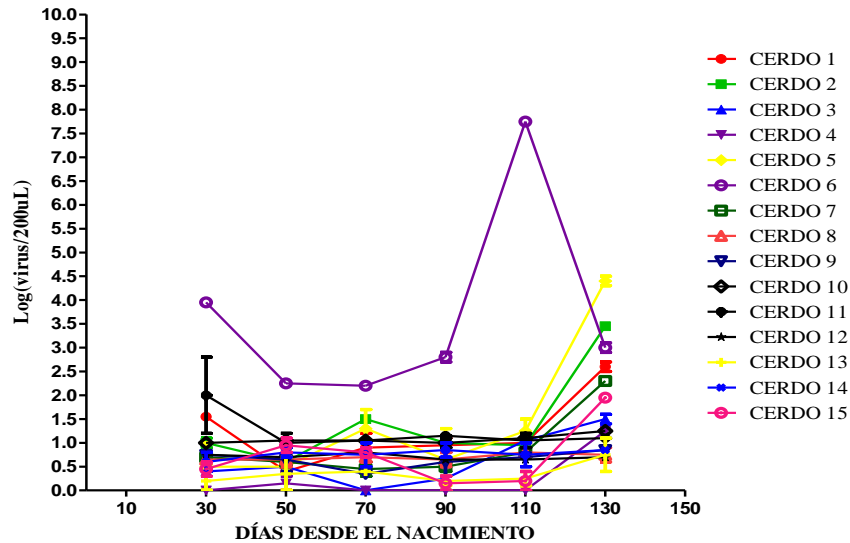


**Figura 13:** Evolución del logaritmo de los promedios de carga viral por día de cada uno de los grupos del estudio. Se observa muy poca diferencia en la tendencia a seguir entre las rectas de los cerdos vacunados y control.

Además se grafica la carga viral por animal, separándolos en vacunados y no vacunados (Figuras 14 y 15), con lo que demuestra la evolución del parámetro tanto a nivel de grupo como de individuo.

En el caso de los animales vacunados (Figura 14), se observa que la carga viral de los distintos animales estudiados se mantiene constante a lo largo del tiempo a excepción del cerdo 6, en el cual el parámetro se dispara diferenciándolo del resto de los cerdos del grupo.

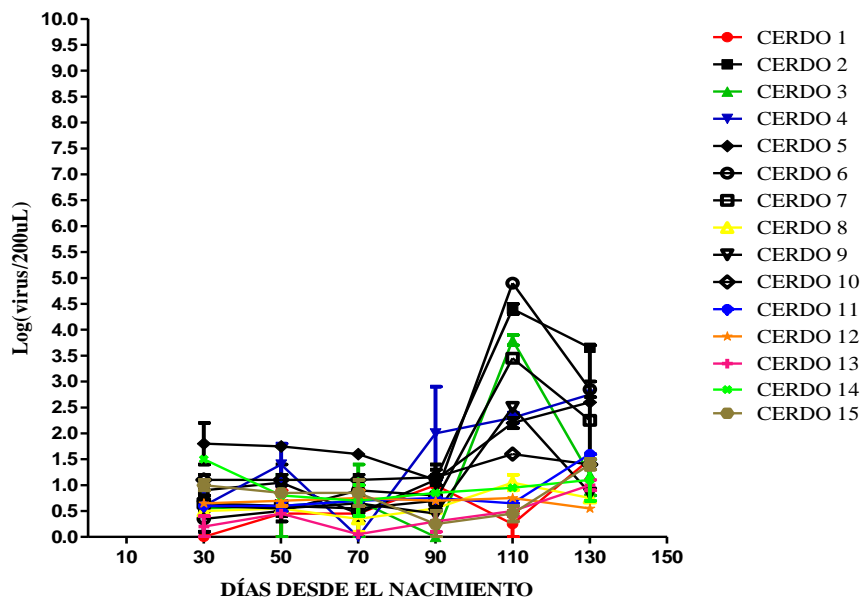
**Evolución del logaritmo de carga viral por animal en sueros de cerdos del grupo 1 (vacunados), a través de los distintos días de muestreo**



**Figura 14:** Evolución del logaritmo de carga viral por animal en sueros de cerdos del grupo 1 (vacunados), a través de los distintos días de muestreo.

En el caso de la Figura 15 correspondiente a los animales del grupo control, se observa que los valores de carga viral para cada uno de los cerdos son heterogéneos entre sí, pero mantienen una evolución similar al evaluarlo en el tiempo.

**Evolución del logaritmo de carga viral por animal en sueros de cerdos del grupo 2 (no vacunados), a través de los distintos días de muestreo**



**Figura 15:** Evolución del logaritmo de carga viral por animal en sueros de cerdos del grupo 2 (no vacunados), a través de los distintos días de muestreo.



### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico fue llevado a cabo sólo con las muestras analizadas con el partidor Cap-98, ya que Cap-nest dificultaba una interpolación de resultados pues los valores eran muy variados y se evidenció la existencia de muchas muestras en las cuales no se obtuvo amplificación.

Al realizar la prueba de “t” de Student para medidas desapareadas o muestras independientes, se pudo comprobar que no existía diferencia estadísticamente significativa en los promedios de la carga viral por días entre ambos grupos a excepción del día 110 de muestro.

Por otro lado, se realizó un análisis para evaluar si el aumento de carga viral visualizado en ambos grupos entre los días 90 y 110 era significativo. Para esto se realizó la prueba de “t” al promedio de carga viral del día 90 y 110 dentro de cada grupo. En ambos casos se obtuvo como resultado una diferencia significativa entre ambos valores.

## 5. DISCUSIÓN

En esta memoria de título se realizó la medición de carga viral de PCV-2 utilizando qPCR, en sueros de cerdos vacunados contra el virus y en un grupo control sin tratamiento. En primera instancia, se utilizaron partidores descritos en la literatura para dicho propósito (Zheng *et al.*, 2012), sin embargo, a pesar de mantener condiciones similares a las descritas por Zheng *et al.*, 2012, no se pudo llegar a reproducir los resultados obtenidos por este grupo de investigadores.

Posteriormente, se optó por la utilización de dos parejas de partidores diseñados en el laboratorio BIOVETEC. La primera pareja de partidores denominados Cap-nest, habían sido utilizados rutinariamente en la detección de DNA de PCV-2 por PCR tiempo final. Con estos antecedentes se adoptó como base un protocolo similar, en cuanto a número de ciclos y temperaturas de alineamiento, para la detección de PCV-2 en tiempo real. Para esto se realizó una curva estándar con DNA plasmidial de PCV-2 de concentración conocida, con el fin de evaluar la sensibilidad analítica de los partidores y obtener por interpolación en la curva los primeros resultados de carga viral.

Al analizar las primeras muestras problema, se evidenció amplificación positiva solo en los días 90 hasta 130 del estudio, sin embargo, no se logró obtener amplificación positiva a días tempranos del muestreo (Figura 10). Este resultado se reprodujo al analizar las mismas muestras por PCR tiempo final y una posterior electroforesis en gel de agarosa 1%, donde se compararon muestras obtenidas por PCR y qPCR y se comprobó que ambas técnicas mostraban los mismos resultados (Figura 11). Con todos estos antecedentes se concluyó que los partidores no poseen sensibilidad suficiente para detectar el virus en tiempos tempranos, lo que se evidencia además por la baja pendiente obtenida en la curva de calibración (Figura 4).

Sumado a esto, al observar la curva de Melt obtenida con los partidores Cap-nest en la Figura 6, se puede determinar que la reacción se encuentra contaminada, es decir, los partidores no amplifican únicamente PCV-2 o existen otros interferentes en la

reacción. Además se evidencia la formación de dímeros de partidores. En ambos casos, puede producirse mayor fluorescencia que es interpretada finalmente como mayor cantidad de DNA sin que este corresponda necesariamente al de PCV-2. Esto se avala al observar el gel de agarosa realizado luego de PCR tiempo final donde se observan bandas adicionales que no corresponden a PCV-2 que pueden ser contaminantes o dímeros de partidores (Figura 11).

Se optó por probar partidores nuevos para verificar si realmente la falta de amplificación en los primeros días de muestreo era debida a una baja sensibilidad analítica de los partidores o a la ausencia total de infección. Para esto se diseñaron partidores (Cap-98), cuyo producto de amplificación predicho es de menor tamaño (98 pb). Se utilizó un software de la compañía Roche®, el cual es específico para el diseño de partidores para qPCR (Anexo 1). Con estos nuevos partidores se logró un alza significativa en la sensibilidad analítica de acuerdo a la eficiencia obtenida con la nueva curva de calibración realizada (Figura 8). Se obtuvo amplificación en todos los días de muestreo, con lo que se reafirmó la presencia de PCV-2 en todas las muestras (Figura 12), tal como se había indicado en un comienzo del estudio a través de PCR tiempo final. Además al observar la curva de Melt producto de la amplificación de los partidores Cap-98 (Figura 9), esta se observa simétrica y con menor presencia de interferentes o dímeros de partidores en relación a la observada con los partidores Cap-nest.

Luego de la estandarización de la técnica con los nuevos partidores, se pudo determinar con mayor exactitud la carga viral en ambos grupos de animales y se comprobó la similitud entre la evolución por días de muestreo de este parámetro. Al graficar la evolución de la carga viral basadas en los promedios por día de cada grupo de animales se pudo determinar que ambos grupos presentan un aumento significativo de carga viral entre los días 90 y 130, (Figura 13).

Se realizó un análisis de significancia entre los promedios por días de muestreo de ambos grupos, el cual no mostro una diferencia estadísticamente significativa a

excepción del día 110 de muestreo. Además, en el día 110 se aprecia una mayor carga viral para el grupo de los cerdos no vacunados. Estos resultados se asemejan a los encontrados en otros estudios donde se observa una evolución similar en carga viral y también en el día en que se produce el peak del parámetro (Soria y Segalés, 2012b). Se observa que las curvas de promedios muestran variabilidad por día de muestreo (pequeñas diferencias de carga viral al ver la evolución durante el estudio), lo mismo que se aprecia al evaluar cada animal en forma individual. Esto se explica en que pueden existir animales que presenten valores intermitentes de carga viral a lo largo del tiempo y que pueden prolongarse hasta el la semana 28 (196 días) de vida (Soria y Segalés, 2012b).

Al analizar minuciosamente los resultados utilizando gráficas que representan la amplificación en cada uno de los días de muestreo por animal, se pudo determinar que en el caso del grupo vacunado, existe un animal (Cerdo 6) que discrepa del patrón observado en el resto de los cerdos (Figura 14). Esta diferencia se debe a una mayor carga viral que sus pares y a un peak del parámetro en el día 110 muy por encima del esperado. El resto de los animales de este grupo siguen una evolución similar en cuanto a carga viral y presentaban el peak de esta el día 130. Al posicionarse en este escenario, se puede reafirmar lo descrito por otros autores que señalan que vacunar a los cerdos contra PCV-2 es un manejo favorable para los animales, ya que al ver al patrón de comportamiento en el global de los cerdos del grupo, se puede concluir que la vacuna retarda el peak de carga viral (Reicks y Leuwerke, 2008; Soria y Segalés, 2012b).

Cabe mencionar que el hecho de que exista un animal dentro del grupo vacunado que se diferencia del resto no es irrelevante, ya que este animal representa aproximadamente un 7% del grupo. Si se asume que este animal enfermó, este dato concordaría con los niveles de morbilidad que figuran en la literatura estimados en un 5 a 20% (Torres, 2007). Esta cifra además permite reafirmar la variabilidad individual que puede presentarse entre los individuos al momento de contraer el virus.

Al evaluar individualmente las curvas obtenidas de los promedios por día de los animales no vacunados, se observa que estos animales también siguen un patrón similar en cuanto a la evolución del parámetro en el tiempo, sin embargo, los valores de cada animal en el día 110 (peak de carga viral en el grupo) poseen mayor heterogeneidad que los vistos en el grupo tratado en el día 130 (Figuras 14 y 15). En el caso de los animales no vacunados hay un descenso de la carga viral en el día 130, logrando igualar en este punto los niveles de carga viral vistos en el grupo tratado. Esto podría relacionarse con el establecimiento de una respuesta inmune activa por parte del animal. Si bien la inmunidad del animal no lleva a la eliminación por completo de la viremia en el cerdo, si repercute en una disminución en la carga viral (Soria y Segalés, 2012b).

Es importante mencionar que este estudio fue realizado bajo condiciones de campo, lo que varía muchas veces respecto a las condiciones experimentales en las que se realizan las pruebas de las vacunas. Se deben tener en consideración factores ambientales que puedan estar afectando los resultados y que puedan explicar además que exista un cerdo vacunado con cargas virales notablemente superiores al resto. Existen además factores individuales de los animales como la raza o el nivel de calostro recibido por estos que según la literatura, muestran generar diferencias en cuanto a la presentación de la enfermedad (López et al.; sf), por lo tanto, podrían también otorgar un nivel de variación con lo visto en aquellos experimentos de laboratorio.

Se hizo un análisis de significancia estadística entre el día 90 y 110 del grupo vacunado y no vacunado por separado, para evaluar si el aumento de carga viral producido dentro del grupo entre esos días era realmente significativo. Los resultados obtenidos sugieren que dicho ascenso en la medición de la cantidad de virus en suero es significativo. Esta alza en el parámetro podría relacionarse con la disminución de la inmunidad pasiva en los animales ya que esta oscila entre los 42 y 84 días (Torres, 2007), periodo que se correlaciona con los resultados obtenidos en este trabajo, donde, como se mencionó, la carga viral comienza a ascender el día 90.

Por todo lo anteriormente mencionado es que se cuestiona el calendario de vacunación actualmente utilizado en los planteles productivos en el que se estaría vacunando a los lechones en un periodo en el cual aún predominan los anticuerpos entregados a través del calostro. Se menciona en la literatura la capacidad de dichos anticuerpos para inhibir la respuesta del animal ante la vacunación. Este fenómeno se conoce como “*interferencia de la inmunidad maternal*” (Mora, 1995), lo que podría generar que la vacuna actúe retrasando la presentación del peak de carga viral, pero no evitando el ascenso del parámetro.

Por otro lado existen experiencias realizadas por otros autores en las cuales se señala que la vacuna logra ser efectiva disminuyendo la carga viral de animales vacunados cuando estos son inoculados con el virus luego de la administración del producto, sin embargo, cuando los animales han contraído previamente el virus y son inmunizados posterior a dicha infección, la vacuna no tiene un efecto significativo sobre la carga viral (Reicks y Leuwerke, 2008). Si bien la vacuna logra retardar el peak de carga viral en el grupo vacunado, la similitud de los resultados podría ser explicada por el hecho de que probablemente los animales contrajeron el virus a temprana edad previo a la administración de la vacuna en cuestión.

El veterinario debe generar un programa sanitario que asegure que los animales del plantel reciban una alta inmunidad calostrual y a la vez, obtener una ventana inmunitaria mínima para evitar posibles infecciones durante este periodo.

Los resultados obtenidos en este estudio permitirán tener un conocimiento de base sobre el comportamiento de la carga viral de PCV-2 en animales inmunizados y no inmunizados con una vacuna comercial contra circovirus porcino. De este modo, los datos podrán ser utilizados para la comparación con otros productos usados comúnmente en el mercado. Además la estandarización de la técnica permitirá que dicho método sea implementado para la evaluación del parámetro de carga viral en estudios con similares características.

Es importante la realización de experiencias semejantes a la expuesta en el presente trabajo, ya que los resultados reflejan la realidad de sólo un plantel de cerdos a nivel nacional. De realizarse la medición de carga viral en otros lugares para determinar la acción de otras vacunas, podría generarse una base de información global que permita tener conocimientos mas acabados de cómo lograr contralar a PCV-2 en la producción porcina nacional.

## 6. CONCLUSIONES

- Se logró implementar con éxito la técnica de qPCR para la determinación de carga viral de PCV-2, usando como muestra sueros de cerdos.
- Mediante la técnica de qPCR se logró determinar la carga viral de PCV-2 en los sueros de los animales de un plantel de producción porcina nacional, la cual resulto ser similar entre aquellos cerdos vacunados y no vacunados contra el virus.
- No existen diferencias estadísticamente significativas entre animales vacunados y no vacunados al evaluar la evolución de la carga viral por día de muestreo hasta el día 90 del estudio, sin embargo, en el día 110 existe un aumento de carga viral en ambos grupos de cerdos el cual es significativo.
- La vacuna contra PCV-2 produce un retardo en el día en el que se produce el peak de carga viral en aquellos cerdos que fueron inmunizados contra el virus.



## 7. 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.; ELLIS, J.** 2000. Porcine circoviruses: A review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 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.
- **ASPROCER.** 2012. Producción de carne de cerdo en Chile año 2011. [En línea]. <[http://www.asprocer.cl/index/plantilla1.asp?id\\_seccion=2&id\\_subsecciones=77](http://www.asprocer.cl/index/plantilla1.asp?id_seccion=2&id_subsecciones=77)> [Consulta: 08-06-2012].
- **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 anaemia virus. *Virology.* 249:453-459.
- **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.
- **CALSAMIGLIA, M.; OLVERA, A.; SEGALÉS, J.; DOMINGO, M.** 2004. Quantification of PCV2 in different routes of excretion: possible transmission routes and correlation with presence of PMWS characteristic lesions. *Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress.* p. 11.
- **DARWICH, L.; SEGALÉS, J.; MATEU, E.** 2004. Pathogenesis of post weaning multisystemic wasting syndrome caused by porcine circovirus 2: an immune riddle. *Arch.Virol.* 149:857-874.
- **ESTRADA, A.** 2009. Síndrome de desmedro multisistémico post destete (PMWS). [En línea]. <[http://www2.sag.gob.cl/Pecuaria/bvo/BVO\\_9\\_I\\_semestre\\_2009/articulos/PMWS.pdf](http://www2.sag.gob.cl/Pecuaria/bvo/BVO_9_I_semestre_2009/articulos/PMWS.pdf)> [Consulta: 12-01-2013].
- **FAUREZ, F.; DORY, D.; GRASLAND, B.; JESTIN, A.** 2009. Replication of porcine circovirus. *Virol. J.* 6(60): 1-8.

- **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.
- **HATTERMANN, K.; ROEDNER, C.; SCHMITT, C.; FINSTERBUSCH, T.; STEINLEDT, T.; MANKERTZ, A.** 2004. Infection studies on human cells lines whit porcine circovirus type 1 and porcine circovirus type 2. [En línea].  
<[http://www.sochinf.cl/sitio/templates/sochinf2008/documentos/Circovirus\\_1\\_y\\_2\\_en\\_lineas\\_celulares\\_2004.pdf](http://www.sochinf.cl/sitio/templates/sochinf2008/documentos/Circovirus_1_y_2_en_lineas_celulares_2004.pdf)> [Consulta: 04-03-2013].
- **HARDING, J.; CLARK, E.** 1997. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health Prod.* 5 (5): 201-203.
- **IRSHAD, M.; JOSHI, Y.; SHARMA, Y.; DHAR, I.** 2006. Transfusion transmitted virus: A review on its molecular characteristics and role in medicine. [En línea] <<http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/5122.pdf>> [Consulta: 04-03-2013].
- **JESTIN, A.; MAHE, D.; BLANCHARD, P.; BOISSESON, C.** 2001. Porcine circoviruses. *Proceedings of the ssDNA Viruses of plants, birds, pigs and primates: porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome.* European Society of Veterinary Virology. 32.
- **KUBISTA, M.; ANDRADE, J.; BENGTTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONAK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJÖBACK, R.; SJÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L.; STAHLBERGA.; ZORIC, N.** 2006. The real time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.* 27. 95-125.
- **LIU, Q; WANG, L.; WILLSON, P.; BABIUK, L.** 2000. Quantitative, competitive PCR analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Clinical Microbiology.* 38: 3474–3477.
- **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.
- **LÓPEZ, S.; GRAU-ROMA, L.; SEGALÉS, J. sf.** Epidemiología de la circovirosis porcina. [En línea] <<http://francisco47.files.wordpress.com/2010/03/epidemiologia-de-la-circovirosis-porcina.pdf>> [Consulta: 04-03-2013].
- **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.
- **MADEC, F.; ROSE, N.; EVENO, E.; MORVAN, P.; LAROUCHE, G.; JOLLY, J.; Le DIGUERHER, G.; CARIOLET, R.; Le DIMNA, M.; BLANCHARD, P.; JESTIN, A.** 2001. PMWS: on-farm observations and preliminary analytic epidemiology. In: *Proceedings of the ssDNA Viruses Plants, Birds, Pigs and Primates (ESVV) Meeting.* 86–87.
  - **MANIATIS, T., FRITSCH, E. F. Y SAMBROOK, J.** 1982. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
  - **MANKERTZ, A.; DOMINDO, 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 Research.* 66: 65-77.
  - **MICROBIAL.** 2009. Sistema de detección de patógenos por PCR a tiempo real. [En línea] <[http://www.microbial-systems.com/web/docs/Guia\\_interpretacion\\_resultados\\_SPAv2.pdf](http://www.microbial-systems.com/web/docs/Guia_interpretacion_resultados_SPAv2.pdf)> [Consulta: 18-02-2013].
  - **MORA, C.** 1995. La inmunidad maternal en porcino. [En línea] <[http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf\\_MG/MG\\_1995\\_5\\_95\\_42\\_48.pdf](http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_MG/MG_1995_5_95_42_48.pdf)> [01-03-2012].
  - **NIELSEN, J.; VICENT, E.; BOTNER, A.; LADEKJAER-MIKKELSEN, A.; ALLAN, G.; SUMMERFIELD, A.; McCULLOUGH, C.** 2003. Association of lymphopenia with porcine circovirus type 2 induced post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 92: 97-111.
  - **NORIEGA, J.** 2008. Detección y caracterización genotípica de circovirus porcino tipo 2 en Chile. Tesis Médico Veterinario. Santiago, Chile. U.Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 74 p.
  - **O'DEA, M.** 2010. Porcine circovirus infection. [En línea]. <[http://www.scahls.org.au/\\_data/assets/pdf\\_file/0005/1915943/anzsdp-porcine.pdf](http://www.scahls.org.au/_data/assets/pdf_file/0005/1915943/anzsdp-porcine.pdf)> [Consulta: 11-06-2012].
  - **PARK, J.; KIM, J.; HA, Y.; JUNG, K.; CHOI, C.; LIM, K.; KIM, S.; CHAE, C.** 2005. Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. *J. Comp. Pathol.* 132:139-144.
  - **PHENIX, K.; WESTON, J.; YPELAA R, I.; LAVAZZA, A.; SMITH, J.; TODD, D.; WILCOX, G.; RAIDAL, S.** 2001. Nucleotide sequence analysis

of a novel circovirus of canaries and its relationship to other members of the genus circovirus of the family circoviridae. *J. Gen. Virol.* 82:2805-2809.

- **REICKS, D.; LEUWERKE, B.** 2008. The effect of vaccination to porcine circovirus type 2 on detection in serum, blood swab and semen. [En línea] <<http://www.ivis.org/proceedings/ipvs/2008/oral/OR.01.14.pdf?LA=1>> [Consulta: 20-06-2012].
- **ROGRÍGUEZ, G.; SEGALÉS, J.; CALSAMIGLIA, M.; DOMINGO, M.** 2002. Dynamics of porcine circovirus type 2 wasting syndrome. *Am. J. Vet. Res.* 63: 254-357.
- **SEGALÉS, J.; ALLAN, G.; DOMINGO, M.** 2005. Porcine circovirus diseases. *Anim. Health Res. Rev.* 6: 119-142.
- **SEGALÉS, J.** 2007. Circovirus porcino (PCV2): Historia y controversia de la enfermedad. [En línea] <[http://www.3tres3.com/circovirosis\\_porcina/historia-y-controversia-de-la-enfermedad\\_2040/](http://www.3tres3.com/circovirosis_porcina/historia-y-controversia-de-la-enfermedad_2040/)> [Consulta: 04-03-2013].
- **SORIA, S.; SEGALÉS, J.** 2012a. Actualización sobre la epidemiología de PCV2 e implicaciones. [En línea] <[http://www.3tres3.com/circovirosis\\_porcina/actualizacion-sobre-la-epidemiologia-de-pcv2-e-implicaciones\\_31793/](http://www.3tres3.com/circovirosis_porcina/actualizacion-sobre-la-epidemiologia-de-pcv2-e-implicaciones_31793/)> [10-04-2012].
- **SORIA, S.; SEGALÉS, J.** 2012b. Efecto de la viremia por circovirus porcino tipo 2 (PCV2) sobre parámetros productivos. [En línea] <[http://www.3tres3.com/circovirosis\\_porcina/efecto-de-la-viremia-por-circovirus-porcino-tipo-2-pcv2\\_31560/](http://www.3tres3.com/circovirosis_porcina/efecto-de-la-viremia-por-circovirus-porcino-tipo-2-pcv2_31560/)> [10-04-2012].
- **STEINER, E.; BALMELLI, C.; VICENT, E.; SUMMERFIELD, A.; McCULLOUGH, K.** 2007. Multipotent cell targeting by PCV-2. *J. Virol.*
- **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.
- **TODD, D.; CREELAN, J.; L., MACKIE, D.; RIXON, F.; MCNULTY, M.** 1990. Purification and biochemical characterisation of chicken anaemia agent. *J. Gen. Virol.* 71:819-823.
- **TODD, D., WESTON, J.; SOIKE, D.; SMYTH, J.** 2001. Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. *Virology.* 286:354-362.
- **TORRES, M.** 2007. Enfermedades asociadas al circovirus porcino tipo 2. [En línea] <<http://www.bioline.org.br/request?la07047>> [Consulta: 06-02-2013].

- **TRUNDOVA, M.; CELER, V.** 2007. Expression of porcine circovirus 2 ORF2 gene requires codon optimized E. coli cells. [En línea] <<http://www.prairieswine.com/pdf/8601.pdf>> [Consulta: 11-09-2012].
- **VICENTE, J.; SEGALÉS, J.; HÖFLE, U.; BALASCH M.; PLANADURAN, J.; DOMINGO, M.; GORTÁZAR, C.** 2004. Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*). Vet. Res. 35: 243–253
- **VINCENT, I.; BALMELLI, C.; MEEHAN, B.; ALLAN, G.; SUMMERFIELD, A.; McCULLOUGH, K.** 2007. Silencing of natural interferon producing cell activation by porcine circovirus type 2 DNA. Immunology. 120: 47-56.
- **VINUEZA, C.** 2009. PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular. [En línea] <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020209/020910.pdf>> [Consulta: 15-07-2013].
- **WEN, L.; GUO, X.; YANG, H.** 2005. Genotyping of porcine circovirus type 2 from a variety of clinical conditions in China. Journal of Veterinary Microbiology. 110: 141-146.
- **ZHENG, L.; WANG, Y.; LI, M.; CHEN, H.; GUO, X.; GENG, J.; WANG, Z.; WEI, Z.; CUI, B.** 2012. Simultaneous detection of porcine parvovirus and porcine circovirus type 2 by duplex real time PCR and amplicon melting curve analysis using SYBR Green. J. Virol. Methods.

## 8.ANEXOS

### Anexo 1. Resultados de la síntesis de los partidores Cap-98 a partir del software de la compañía Roche®.

#### 1. gene\_1

ProbeFinder has designed an optimal real-time PCR assay for:  
gene\_1

Assay rank 12

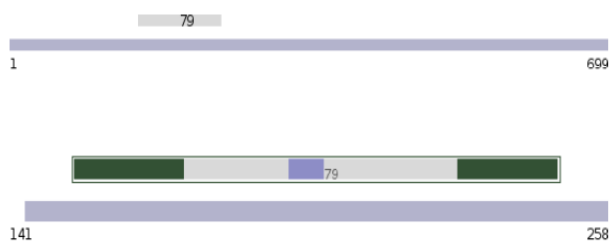
Use probe #79 (cat. no. 04689020001)

| Primer | Length | Position  | Tm | %GC | Sequence                |
|--------|--------|-----------|----|-----|-------------------------|
| Left   | 23     | 151 - 173 | 60 | 43  | cgcaacctcgatataactatcaa |
| Right  | 21     | 228 - 248 | 60 | 48  | cctggggaagaagtcatta     |

Amplicon (98 nt)

```
cgcaacctcgatataactatcaaagcaaccacagtcacaaacgcctcctgggcggtagaca:gatgagattcaatattaactttct  
tccccagg
```

This assay has [All criteria met.](#)



Input sequence:

```
>gene_1  
atgacgtatccaaggaggcgttacccggagaagaagacacogcccccgagccatcttggc  
  
cagatcctccgcgcgcctcctggctcgtccacccccgccaccgttaccgctggagaa  
gg  
aaaaatggcatcttcaaccccgctctcccgcaacctcggatatactatcaagcg  
aacc  
acagtcaaaacgcctcctgggcggtgacatgatgagattcaatattaatgac  
tttctt  
ccccaggaggggctcaaacccccgctctgtgcccttgaatactacagaa  
taagaaag  
gttaagggtgaattctggccctgctccccgatccccagggtgacagggg  
agtgggctcc  
agtgtgttattctagatgataacttgtacaaaggccacagccctc  
acctatgacccc  
tatgtaaactactcctcccgccataaccataaccagccctctctcct  
accactcccgtac  
tttcccccaaacctgtcctagattccaactattgattacttoca  
accaacaacaaaaga  
aatcagctgtggctgagactacaaactgotggaatgtagac  
cactaggcctcggcaact  
gogttcgaaaaacgtatatacagaccaggaatacaatatcc  
gtgtaacctgtatgtacaa  
ttcagagaatttaactctaaagaccccccaactaaacc  
t
```