



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

**CARACTERIZACIÓN DE PERFILES SEROLÓGICOS DE
CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2 DE PLANTELES DE PRODUCCIÓN
PORCINA INTENSIVA EN CHILE**

Digna del Pilar Oñate Vásquez

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva

PROFESOR GUÍA: VÍCTOR MANUEL NEIRA RAMÍREZ
Universidad de Chile
Financiamiento Proyecto Zoetis-Favet PCV2

SANTIAGO, CHILE
2017



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

**CARACTERIZACIÓN DE PERFILES SEROLÓGICOS DE
CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2 DE PLANTELES DE PRODUCCIÓN
PORCINA INTENSIVA EN CHILE**

Digna del Pilar Oñate Vásquez

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva

NOTA FINAL:

FIRMA

PROFESOR GUÍA : DR. VICTOR NEIRA RAMÍREZ

PROFESOR CORRECTOR: DR. PEDRO ÁBALOS PINEDA

PROFESOR CORRECTOR: DR. LEONARDO SÁENZ ITURRIAGA

SANTIAGO, CHILE
2017

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres y a mi familia por su constante apoyo y cariño durante este proceso, y por ser el pilar fundamental de mi vida.

También agradezco al Dr. Victor Neira, por cumplir con su labor de profesor guía de forma cercana y profesional y a todo el equipo del Laboratorio de Virología Animal, por aportar con el procesamiento de las muestras.

A los profesores correctores y personas que han contribuido a mejorar esta memoria de título, especialmente a Agustín Barría por ayudarme en la parte estadística.

Al Dr. Sergio López Videla de Zoetis, por aportar información crucial para el desarrollo de esta memoria.

A mis amigos y amigas y a todos quienes me han motivado a continuar.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	iii
ABSTRACT	v
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
HIPÓTESIS	8
OBJETIVO GENERAL	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
RESULTADOS	14
1. Resultados cualitativos: Positividad.....	15
2. Resultados cuantitativos: Títulos de anticuerpos.....	16
3. Resultados interferencia materna.....	17
4. Resultados estadísticos.....	18
DISCUSIÓN	21
1. Perfiles serológicos.....	21
2. Efecto vacunación.....	22
2.1 Interferencia materna con la vacunación.....	23
3. Factores prediales asociados.....	24
3.1 Factor sistema.....	24
3.2 Factor status PRRS.....	24
3.3 Factor vacunación.....	25
3.4 Factor tamaño.....	25
4. Relación entre PCV-2 y PMWS.....	26
5. Limitaciones.....	27
CONCLUSIONES	28
BIBLIOGRAFÍA	30
ANEXOS	35
Anexo Nro. 1. Mapa de ubicación de granjas analizadas.....	35
Anexo Nro. 2. Protocolo de SERELISA® PCV2 Ab Mono Blocking.....	36
Anexo Nro. 3. Gráficos de porcentajes de positividad por edad para cada granja.....	39
Anexo Nro. 4. Gráficos de títulos de anticuerpos por granja para cada edad.....	41
Anexo Nro. 5. Tabla resumen recopilación de información de las granjas analizadas.....	43
Anexo Nro. 6. Resultados Análisis de Varianza y prueba LSD Fischer (Infostat).....	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla Nro. 1. Descripción de granjas en estudio.....	9
Tabla Nro. 2. Resultados Análisis de Varianza.....	19
Tabla Nro. 3. Resultados prueba LSD Fischer	20

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura Nro. 1. Porcentajes de positividad para cada granja.....	14
Figura Nro. 2. Promedios de porcentajes de positividad y títulos de anticuerpos.....	15
Figura Nro. 3. Porcentajes de positividad y promedios de títulos de anticuerpos a las 3, 10 y 20 semanas para las granjas G, H, I y J.....	16
Figura Nro. 4. Promedio IPMA a las 3 semanas para cada granja.....	18
Figura Nro. 5. Porcentaje de individuos que reportan interferencia con respecto al total de individuos de cada granja.....	18

RESUMEN

El circovirus porcino tipo 2 (PCV-2) es un virus muy pequeño (17 nm. de diámetro), de estructura icosaédrica y con ADN circular simple. Se conoce ampliamente por ser el agente causal de una compleja lista de enfermedades multifactoriales denominadas PCVAD (del inglés, *Porcine circovirus associated diseases*). Entre estas, una de las más importantes en términos económicos y sanitarios para la industria porcina intensiva, es el PMWS (del inglés, *Postweaning multisystemic wasting syndrome*), que se caracteriza clínicamente por adelgazamiento progresivo, retraso del crecimiento y desmedro. La infección por si sola por PCV-2 es necesaria, pero no suficiente para desencadenar el cuadro clínico, existen otros factores, tanto individuales como prediales, que participan en el desarrollo del síndrome. Por lo tanto, es más común encontrar individuos infectados con una presentación subclínica, inmunocomprometidos y mayormente susceptibles a coinfecciones. En el presente estudio, se caracterizan los perfiles serológicos de 11 granjas de producción porcina, cuya ubicación geográfica es representativa de la producción a nivel nacional. Un perfil serológico es un estudio efectuado a grupos de animales de diferentes edades o etapas productivas, para detectar la presencia de anticuerpos contra algún patógeno en particular y determinar patrones de infección. De cada granja se tomaron 16 muestras de suero en 3 edades (3-4, 10 y 18-20 semanas). Cada muestra fue evaluada mediante una prueba de ELISA para la detección de anticuerpos anti PCV-2. A modo complementario, los títulos de anticuerpos a las 3 semanas fueron transformados a valores de IPMA (técnica de inmunoperoxidasa en monocapa de cultivo celular), a modo de evidenciar posible interferencia materna con la vacunación. Finalmente, se realizó una recopilación de información respecto a las granjas muestreadas y mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) en el programa estadístico Infostat, los factores: status PRRS, vacunación, sistema y tamaño fueron analizados, a modo de establecer posibles diferencias significativas entre las granjas al considerar estos factores. Los resultados muestran un comportamiento característico de los perfiles serológicos, con un alto título de anticuerpos a las 3 semanas, los cuales disminuyen drásticamente en el tiempo, lo que sugiere un eficiente traspaso de inmunidad materna, pero se cuestiona la efectividad en la generación de anticuerpos a través de la vacunación. Además, se observa una alta presencia del fenómeno de interferencia de la inmunidad materna con la vacunación. Por último, los

resultados del análisis estadístico muestran que todos los factores analizados generan diferencias significativas entre los perfiles serológicos de las granjas. El estudio permite concluir robustamente que existe evidencia serológica de PCV-2 en todas las granjas analizadas y que existen diferencias estadísticamente significativas entre ellas al considerar ciertos factores prediales, aceptándose la hipótesis de este estudio.

Palabras clave: PCV-2, PMWS, perfil serológico, factores asociados, producción porcina.

ABSTRACT

Porcine circovirus type 2 (PCV-2) is a very small virus (17 nm of diameter), of icosahedral structure and simple circular DNA. PCV-2 is widely known to be the causative agent of several multifactorial diseases named PCVAD (Porcine circovirus associated diseases). The most economic important disease caused by PCV-2 is the Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), which is characterized by progressive emaciation, growth retardation and wasting. PCV-2 infection is necessary but not sufficient to trigger the clinical presentation, there are other factors, individual and predial, that are involved in the development of the syndrome. Therefore, it is more common to find individuals infected with a subclinical presentation, immunocompromised and most susceptible to coinfections. In the present study, the serological profiles of 11 pig farms were characterized, whose geographic location is representative of production at the national level. A serological profile is a study carried out on groups of animals at different ages, to detect the presence of antibodies against PCV-2, and to determine patterns of infection. From each farm, sera was collected in 3-4 weeks; 10 weeks and 18-20 weeks old pigs, obtaining 16 samples per age. Each sample was evaluated by a comercial PCV-2 ELISA test for antibody detection. Additionally, antibody titres at 3 weeks were transformed to IPMA equivalent values (immunoperoxidase monolayer assay), in order to evidence possible maternal interference with vaccination. Also, information about farms characteristics and management such as; PRRS status, vaccination, type of production system and size, were collected. All variables were statistically analyzed in order to establish if there were significant differences between the farms when considering these factors. The results show a characteristic behavior of the serological profiles, with a high antibody titre in 3 weeks old pigs, which decrease drastically over time, suggesting an efficient transfer of maternal immunity, but the effectiveness of the vaccination to generate antibodies is questioned. In addition, there is a high presence of the phenomenon of interference of maternal immunity with vaccination. Finally, the results of the statistical analysis show that all the analyzed factors generate significant differences between the serological profiles of the farms. The study allows us to conclude robustly that there is serological evidence of PCV-2 in all farms analyzed and that

there are statistically significant differences between them when considering certain property factors, accepting the hypothesis of this study.

Key words: PCV-2, PMWS, serological profile, asociated factors, porcine production.

INTRODUCCIÓN

La producción porcina en Chile representa la segunda producción de carne más grande del país y la primera en términos de exportación, llegando a 520.074 toneladas vara en el año 2014, de las cuales un 51% se exportó (Asprocer, 2014). Esta producción se concentra en el sector industrial de la zona centro sur del país, principalmente en las regiones de O'Higgins y Metropolitana, con menor participación en las regiones del Bío Bío, del Maule, La Araucanía y Los Lagos (INE, 2014).

El estado sanitario de la producción porcina en Chile es excepcional, ya que se encuentra oficialmente libre de enfermedades virales que mayormente afectan porcinos, como lo son la peste porcina africana, peste porcina clásica, fiebre aftosa, encefalitis por virus de Nipah, enfermedad vesicular del cerdo, entre otras (SAG, 2014). Sin embargo, existen otras enfermedades de importancia económica que sí están presentes en nuestro país, como lo es el Síndrome Respiratorio y Disgénésico Porcino (PRRS, del inglés *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome*), para el cual existe un Plan Nacional de Control y Erradicación por parte del SAG; y también el Síndrome de Desmedro Multisistémico Postdestete (PMWS, del inglés *Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome*), que no está bajo vigilancia oficial y que será tema central del presente trabajo.

El PMWS es una enfermedad producida por el Circovirus porcino tipo 2 (PCV-2 por sus siglas en inglés *Porcine Circovirus*). Es un agente ampliamente distribuido en el mundo, sin embargo, no en todas las granjas infectadas se manifestará el cuadro clínico, ya que el virus genera diferentes grados de infección, asociados a cuadros de diferente intensidad. La signología clínica comprende adelgazamiento progresivo, retraso del crecimiento y desmedro, factores que impactan de forma negativa la producción.

En el presente trabajo se caracterizarán los perfiles serológicos de PCV-2 de diferentes granjas o planteles que representan la zona de distribución de la producción porcina intensiva a nivel nacional.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Historia

El PCV fue descrito por primera vez hace más de 40 años por investigadores alemanes, como contaminante de líneas celulares de riñón de cerdo PK-15 (ATCC-CCL33) (Tischer *et al.*, 1982). Estudios posteriores demostraron que se trataba de un virus muy pequeño, de 17 nm. de diámetro, sin envoltura ni espículas virales, de estructura icosaédrica y con ADN circular simple, por lo que se denominó *circovirus porcino* (Tischer *et al.*, 1982). Algunos años después Tischer *et al.* (1986) concluyeron que este virus no produce signos ni lesiones en animales infectados, tanto natural como experimentalmente. Posteriormente en 1997 el PCV fue asociado a una enfermedad que afectaba a cerdos de transición, conocida como Síndrome Multisistémico de Desmedro Postdestete (PMWS), que ya era conocida desde 1991 en Canadá, pero su etiología era desconocida (Harding y Clark, 1997). Estudios genómicos posteriores demostraron que el genotipo de PCV que inicialmente contaminaba líneas celulares PK-15 era diferente al genotipo de PCV que provocaba PMWS, por lo que se denominaron PCV-1 y PCV-2, respectivamente (Allan *et al.*, 1998).

Distribución

El PCV-2 es un virus ubicuo, es decir, se ha descrito la infección en todos los continentes y en todos los países donde se ha buscado y es común que el virus esté presente de forma endémica en todos los países con industria porcina intensiva. Además, mediante estudios serológicos retrospectivos se ha demostrado la longevidad del virus, las infecciones por este virus han estado presentes desde hace algunas décadas en porcinos domésticos de todo el mundo (Nauwynch *et al.*, 2007).

Transmisión

La transmisión es principalmente horizontal, por contacto directo vía oro nasal, mediante aerosoles y secreciones respiratorias de animales infectados con el virus (Calsamiglia *et al.*, 2004). La transmisión vertical también ha sido reportada, generando mortinatos, abortos y fetos momificados, mediante la vía transplacentaria que produciría una infección intrauterina, en este caso también puede haber transmisión horizontal entre compañeros de

camada (Johnson *et al.*, 2002). Se ha demostrado la presencia del virus en semen de verracos infectados, sin embargo, la concentración del virus en éste no sería suficiente para producir un contagio efectivo.

Patogenia

El virus se disemina por todo el organismo, pudiendo encontrarse tanto en macrófagos como en otras células como hepatocitos, células epiteliales y endoteliales, siendo éstas últimas consideradas como las células más importantes en la replicación viral (Steiner *et al.*, 2008). La patogenia no implica la lisis de las células de la línea monocito-macrófago, ni tampoco afecta su función de procesar y presentar antígenos, sino que altera la capacidad de detectar señales de peligro, dejando al individuo mayormente susceptible a infecciones secundarias (Vincent *et al.*, 2006).

Lesiones Macroscópicas

Las lesiones más comunes descritas por Segalés *et al.*, (2004) son emaciación, ausencia de colapso pulmonar, consolidación pulmonar cráneo-ventral y linfadenopatía regional o generalizada. Además, el pulmón presenta neumonitis, con infiltración granulomatosa y/o linfohistiocitaria, que puede estar acompañada de una bronconeumonía catarral purulenta. Por otro lado, la lesión hepática típica es una hepatitis periportal linfoplasmocitaria con infiltrado en zonas portales en los casos más severos y vacuolización que puede llevar a una fibrosis perilobulillar generalizada con cambios en la arquitectura del órgano y manifestación de diversas hepatopatías. También se puede encontrar nefritis intersticial severa con gran cantidad de virus en el riñón.

Lesiones Microscópicas

Las lesiones microscópicas más comunes son depleción linfoide con pérdida de la estructura normal del folículo linfático, la cual se encuentra principalmente en nódulos linfáticos, pero puede afectar todos los tejidos inmunocompetentes del individuo (bazo, timo, placas de Peyer, tonsilas). La disminución de linfocitos desde el tejido linfoide va acompañada de un reemplazo con células histiocíticas, o histiocitosis, que puede ser local y/o difusa. También se pueden encontrar células gigantes multinucleadas y cuerpos de

inclusión intracitoplasmáticos, de carácter basófilo, esférico y notoriamente marcado, con tinción de hematoxilina-eosina (Segalés *et al.*, 2004).

Signología Clínica

La manifestación clínica más importante es el PMWS, que se presenta típicamente después de los 40 días de vida y se caracteriza por adelgazamiento progresivo, retraso del crecimiento y desmedro. También puede haber disnea e incremento de tamaño de nódulos linfáticos superficiales, principalmente inguinales (Carr *et al.*, 2008). En un menor porcentaje de casos se presenta palidez, ictericia y diarrea, debido a la anemia producto de úlceras gástricas y hepatopatías.

Diagnóstico

Existen varias metodologías disponibles para la detección directa del agente o de antígenos virales, entre las que destacan la Hibridación *in situ* (HIS) y la Inmunohistoquímica, ambas son altamente confiables, tanto en especificidad como en sensibilidad. Para la toma de muestra se deben seleccionar cerdos vivos o recientemente muertos, sospechosos del cuadro o con signología clínica de la enfermedad. Antes de usar estas pruebas se deben seleccionar los tejidos que presenten lesiones microscópicas mediante un diagnóstico histopatológico (Segalés *et al.*, 2004).

Seroprevalencia y factores prediales asociados

Se calcula que un 80 a 90% de los cerdos en el mundo son seropositivos a PCV-2 (SAG, 2009); sin embargo, la enfermedad se presenta sólo en determinados planteles porcinos y bajo condiciones que no están del todo claras, debido a su naturaleza multifactorial.

En un estudio que abarcó gran parte del territorio de Japón, se encontró un 96,7% de granjas positivas a PCV-2 mientras que la proporción de granjas positivas a la presentación clínica de PMWS fue de un 50,4%. A nivel individual, un 82,7% de los cerdos fueron positivos a PCV-2 y 23,4% fueron positivos a la enfermedad (Kawashima *et al.*, 2007). Estos datos sugieren fuertemente que tanto la infección como la enfermedad son comunes en este país.

En Chile no existen datos publicados sobre seroprevalencia. En un estudio de caracterización genotípica de PCV-2 se analizaron 3 planteles de producción porcina de la zona central del país, determinando la presencia del virus mediante PCR desde muestras de nódulos linfáticos inguinales de cerdos con signología compatible con PMWS, siendo detectado en el 100% de las muestras (Noriega, 2008).

Dentro de los factores que podrían estar afectando la presentación de la enfermedad, el esquema de vacunación y el momento de la infección resultan ser significativos (López-Soria *et al.*, 2005), en el caso del segundo factor mencionado, una infección temprana o antes de las 12 semanas de vida parece ser un mayor riesgo para la expresión del PMWS.

También existen patógenos y/o enfermedades relacionados al PMWS que podrían ser considerados factores de riesgo. Aquí destaca el PRRSV (del inglés *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus*), el cual ha demostrado potenciar la replicación y distribución de PCV-2 (Allan *et al.*, 2000), posiblemente debido al hecho de tener células blanco en común, al igual que con PPV (del inglés *Porcine Parvovirus*). Además, la manifestación clínica de la infección por PRRSV, resulta ser más significativa que la infección por sí sola (Kawashima *et al.*, 2007).

Por último, en un estudio transversal realizado en 147 granjas de Inglaterra, se evidencia una asociación entre factores tanto de manejo como medioambientales con la severidad del cuadro, es así como una mayor cantidad de visitas veterinarias o malas condiciones de aislamiento en la infraestructura para animales enfermos, son factores relacionados con cuadros de mayor gravedad (Alarcón *et al.*, 2011).

Vacunación e interferencia maternal

En la actualidad, existen varias vacunas comerciales contra PCV-2, las cuales han demostrado aumentar las tasas de crecimiento y disminuir las tasas de mortalidad provocadas por PCV-2, producto de la estimulación del sistema inmune adaptativo y el traspaso de grandes cantidades de anticuerpos maternos a los lechones (Noriega *et al.*, 2007). Además, se continúan desarrollando vacunas experimentales, como por ejemplo una vacuna quimérica genéticamente modificada, que demostró reducir los signos clínicos, la carga viral en suero y órganos linfoides y la mortalidad general tanto en unidades de

maternidad como de engorda (Segalés *et al.*, 2009). También se han estudiado técnicas alternativas a la vacunación tradicional con aguja, como la vacunación mediante un dispositivo sin aguja con fuente de poder a base de nitrógeno (Acushot™ Needle Free, Manitoba, Canadá), la cual demostró ser igual de efectiva y segura que la inyección con aguja, disminuyendo además los riesgos de accidente ocupacional por lesiones involuntarias en el proceso de cambio de aguja (Gutiérrez *et al.*, 2015).

La vacunación contra PCV-2 y otros patógenos es un manejo estándar en producción porcina intensiva. Dentro de las estrategias de vacunación, lo más común es vacunar lechones a las 3 semanas y vacunar hembras antes de entrar al periodo reproductivo. También se reporta la vacunación de verracos, debido a la presencia del virus en semen (Beach y Meng, 2012).

Liu *et al.*, (2008) estudiaron la caída de anticuerpos maternos y perfiles serológicos de 6 poblaciones de cerdos en Taiwan. A la semana de edad, 80% de los cerdos fueron positivos a anticuerpos contra PCV-2, pero disminuyeron a niveles indetectables a las 11 semanas. La seroconversión se produjo después de la declinación de los anticuerpos maternos, la mayoría de los cerdos fueron seropositivos a PCV-2 desde las 13-15 semanas.

Con respecto a la posible interferencia de anticuerpos maternos con la vacunación, un título $> 10 \log_2$ de IPMA (técnica de inmunoperoxidasa en monocapa de cultivo celular) ha demostrado interferir con la vacunación de los lechones, es decir, los anticuerpos maternos neutralizan los antígenos vacunales, por lo que los cerdos quedan desprotegidos acelerando la infección de PCV-2 (Fort *et al.*, 2009). Para cuantificar este valor y debido a que el IPMA es muy tedioso y complicado de hacer, se buscó un método serológico que se correlacionará directamente con esta técnica, es así como Pileri *et al.*, (2014) demostró que la técnica de SERELISA® PCV2 Ab Mono Blocking, es la mejor técnica para estimar valores de IPMA.

Control y prevención

Debido a que el virus se encuentra ampliamente difundido y que no existen tratamientos específicos para la enfermedad, se hace muy importante la prevención, la cual debe contemplar dos consideraciones importantes. En primer lugar, la naturaleza multifactorial

del síndrome, y, en segundo lugar, que el virus es resistente a desinfectantes de uso común en criaderos (Allan y Ellis, 2000). Por lo tanto, la prevención debe apuntar a reducir la presión de infección mediante medidas de higiene y reducción de estrés.

Considerando que el PCV-2 continúa siendo un problema sanitario y económico en los sistemas de producción porcina intensiva en Chile y el mundo, que no existen antecedentes serológicos o de prevalencia del síndrome a nivel nacional, ni tampoco un programa de monitoreo oficial, se hace necesario, en primera instancia, caracterizar los perfiles serológicos de PCV-2 que presenta la producción porcina en nuestro país y entender cuál es su comportamiento serológico en escenarios subclínicos, debido a la importancia productiva de la infección en estos casos. Este estudio tiene múltiples aplicaciones, como por ejemplo monitorear los programas de vacunación y/o conocer la situación sanitaria de los planteles, con esta información se podrían mejorar las medidas de control y prevención, y servir como base para la implementación de un posible programa de monitoreo.

HIPÓTESIS

Se encontrará evidencia serológica de PCV-2 en todas las granjas de producción intensiva de cerdos a nivel nacional, existiendo diferencias en los perfiles serológicos, atribuibles a diferentes factores prediales.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los perfiles serológicos de PCV-2 en la producción porcina intensiva nacional.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar perfiles serológicos de PCV-2 en granjas de producción porcina intensiva a nivel nacional.
2. Relacionar perfiles serológicos entre las granjas con factores prediales.

MATERIALES Y METODOS

Unidad muestral y toma de muestras

El trabajo contempló la realización de ELISA para la detección de anticuerpos contra PCV-2 en diversas granjas de producción intensiva de cerdos. Se obtuvieron muestras de 11 sistemas de producción intensiva de cerdos a lo largo de Chile. Todas éstas tienen en común ser unidades de producción confinada, con destete-precoz segregado y producción en etapas. De cada granja se registraron detalles productivos y sanitarios, como programa de vacunación contra PCV-2 u otros patógenos, *status* PRRS y tamaño de granja. Las granjas están identificadas con letras para respetar la confidencialidad de los resultados (Tabla Nro. 1). El detalle de la ubicación de éstas se encuentra en el Anexo Nro. 1.

Tabla Nro. 1. Descripción de granjas en estudio.

Granja	Región	Sector/Comuna	Sistema
A	Metropolitana	Isla de Maipo	Monositio
B	Metropolitana	Isla de Maipo	Monositio
C	Metropolitana	Paine	Monositio
D	Metropolitana	El Monte	Monositio
E	Metropolitana	Mallarauco	Monositio
F	De O'Higgins	San Fco. de Mostazal	Multisitio
G	De O'Higgins	Peumo	Multisitio
H	De O'Higgins	Graneros	Monositio
I	Del Maule	Curicó	Monositio
J	Del Bío Bío	Bulnes/Chillán	Multisitio
K	De la Araucanía	Victoria	Multisitio

A modo aclaratorio, la categoría “sistema” descrito en la Tabla Nro. 1 se refiere a la disposición espacial de los galpones de cada granja, de acuerdo a la etapa productiva de los animales. En el caso de las monositio, éstos se encuentran agrupados en un solo sector, en cambio, en las multisitio, se encuentran separados. Este punto tendrá relevancia a la hora de

interpretar los resultados ya que la distancia entre galpones es un factor que podría incidir en la dinámica serológica de PCV-2, debido a la transmisión del virus.

Todas las muestras fueron provistas por veterinarios de campo, expertos en manejo de cerdos. Se obtuvieron así, 16 muestras de suero por edad, a las 3 o 4 semanas, a las 10 semanas y a las 18 o 20 semanas, número de muestras que permite evaluar la dinámica serológica y a su vez la carga viral (no incluida en el estudio). El número de muestras por edad y edades está basado en el programa STOMP (*Serological Targeting of Medication Program*) de Zoetis (Pfizer), el cual es usado ampliamente en estudios serológicos de enfermedades porcinas de alta prevalencia y ha sido validado por estudios de campo en todo el mundo.

El suero será obtenido a través de punción yugular usando tubos de vacío “Vacutainer®”. Este muestreo permite evidenciar el estado inmunológico de los cerdos en las principales etapas de su vida. A las 3-4 semanas, que corresponde al destete y se puede observar la inmunidad materna. A las 10 semanas corresponde al fin de la recría y se pueden observar anticuerpos activos y vacunales. Finalmente, a las 18-20 semanas, casi al fin de su período productivo, se pueden observar anticuerpos de infección de campo.

Cabe destacar que para la edad “3 semanas”, las primeras 4 muestras serán tomadas a lechones de madres primerizas, a modo de evidenciar posibles diferencias entre la inmunidad de éstos y de lechones de madres múltiparas, debido a que usualmente, las hembras primerizas reciben una dosis de vacuna antes de su primer parto. En las granjas B, F y G, debido a que se encuentran en programa de erradicación de PRRS, que consiste en el cierre de la granja, no tienen cerdas primerizas, por lo que solo se obtendrán muestras de lechones de madres múltiparas.

Procesamiento de las muestras

A la recepción de las muestras, éstas serán refrigeradas a 4°C y centrifugadas por 10 minutos a 3.000 rpm. Luego de obtenido el suero, éste es depositado en tubos estériles de 1,5 ml., los que serán rotulados y luego almacenados a -20°C, hasta su procesamiento.

Cada muestra será evaluada individualmente siguiendo el protocolo de SERELISA® PCV2 Ab Mono Blocking (Synbiotics), en el Laboratorio de Virología Animal del Departamento

de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

El “kit” SERELISA® PCV2 Ab Mono Blocking (Synbiotics) se basa en una técnica inmuno-enzimática de bloqueo que permite la detección de anticuerpos (Ac) anti-PCV2 en sueros de porcinos. En este caso se realizará usando el protocolo de dilución única, es decir, cada suero se diluirá una vez para realizar la prueba.

A continuación, se describe brevemente el protocolo de la prueba (el protocolo completo se encuentra en el Anexo Nro. 2):

1. Todos los materiales son atemperados.
2. Las muestras de suero se diluyen, usando el diluyente del “kit” en una relación de 1:1000.
3. Cada control y cada muestra se distribuyen en pocillos sensibilizados con antígeno (Ag) PCV2 (placa ELISA recubierta con antígeno).
4. Después de un paso de lavado para eliminar las fracciones que no se han adherido, se añade un conjugado específico de anticuerpo PCV2 marcado a la peroxidasa. Si no hay anticuerpos anti-PCV2 en la muestra, el conjugado anti-PCV2/peroxidasa es libre de adherirse a los antígenos.
5. El exceso de conjugado es eliminado después de un segundo paso de lavado. La enzima agregada al complejo Ag/Ac es revelada por la adición de un sustrato que se transforma en un producto coloreado.
6. Las densidades ópticas correspondientes se registran y se interpretan para determinar la presencia o ausencia de anticuerpos según valores umbrales calculados a partir de controles. Cada muestra reportará entonces un número obtenido de la relación entre la muestra y el control negativo (S/N, por sus siglas en inglés).

Interpretación de resultados

En primer lugar, los resultados serán interpretados cualitativamente, es decir, se reportarán como positivos o negativos. El punto de corte de la técnica es un valor S/N de 0.4, es decir ≤ 0.4 es considerado positivo y > 0.4 se considera negativo. Estos resultados se ilustrarán como porcentaje de animales positivos por edad, en gráficos de barra para cada granja (Liu *et al.*, 2008).

Posteriormente, el valor S/N será utilizado para calcular un título de anticuerpos, obteniendo un resultado cuantitativo. Esto es posible gracias a la validación del “kit” por parte del fabricante para tal propósito. Los valores S/N son traspasados a una planilla Excel elaborada por el fabricante (<http://diagnostics.zoetis.com/species/swine/porcine-circovirus-type-2/serelisa-pcv2-ab-mono-blocking.aspx>). Los títulos obtenidos tendrán un rango desde <150 a >2484 . El resultado cuantitativo permitirá ilustrar los resultados de manera relativa usando gráficos de puntos.

Finalmente, es relevante conocer un valor aproximado de IPMA a las 3 semanas de vida, ya que los anticuerpos en esa edad corresponden siempre a inmunidad materna y es el momento en el cual los cerdos son vacunados, a modo de evidenciar posible interferencia entre anticuerpos maternos y vacunales. Para esto, los títulos de anticuerpos a las 3 semanas serán transformados a Log_2 IPMA/equivalentes, usando la fórmula $y = 5,077x^2 + 36,398x + 30,983$ descrita por Pileri *et al.*, (2014).

Los resultados obtenidos, tanto cualitativos como cuantitativos, serán utilizados para determinar los perfiles serológicos de las granjas analizadas. Posterior a esto, se investigarán posibles relaciones respecto a factores prediales tales como *status* PRRS, programa de vacunación, tamaño de granja y tipo de producción (monositio/multisitio). Para esto se realizará un análisis de varianza (ANOVA) usando el programa estadístico Infostat, en donde en primera instancia se determinará si existen diferencias significativas entre las granjas, mediante el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon$$

En donde,

Y_{ijk} = k-ésima observación del j-ésimo tiempo (edad) de la i-ésima granja

μ = media general de las observaciones

α_i = efecto de la i-ésima granja

β_j = efecto del j-ésimo tiempo (edad)

ε = variable aleatoria normal independiente (error)

A continuación, para determinar si los factores mencionados se relacionan con los resultados obtenidos de cada granja, y por lo tanto estarían incidiendo sobre los perfiles serológicos de éstas, cada factor será transformado a un valor numérico para ser incorporado a la ecuación anterior, de manera de evidenciar si existen cambios en las diferencias significativas obtenidas anteriormente. Para finalizar, este análisis se complementará con una prueba LSD Fischer, método que compara las granjas de a pares y que asigna una o más letras a cada una, de manera tal que las medias que tienen la misma letra no muestran diferencias estadísticamente significativas.

RESULTADOS

En el estudio se analizaron un total de 528 muestras de sueros porcinos, provenientes de 11 granjas de producción porcina distribuidas a lo largo del territorio nacional. Del total de muestras, 175 (33%) resultaron positivas y 353 (67%) negativas. De las granjas muestreadas todas presentaron animales positivos en al menos dos edades de muestreo (Anexo Nro. 3). Sin embargo, existe un amplio rango de positividad entre las diferentes granjas, es así como la granja G presenta 33 positivos (69%), mientras que la granja C sólo 3 positivos (6%) (Figura Nro. 1).

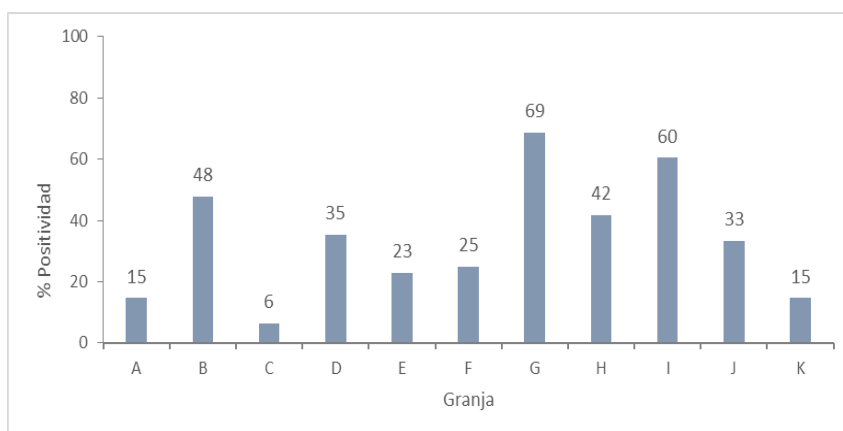


Figura Nro. 1. Porcentajes de positividad para cada granja.

En cuanto a las edades de muestreo, la edad “3 semanas” presentó 84 positivos (48% del total de muestras a esa edad), la edad “10 semanas” 53 positivos (30%) y la edad “20 semanas” 41 positivos (23%), siendo esta última la que tuvo un menor porcentaje de animales positivos (Figura Nro. 2).

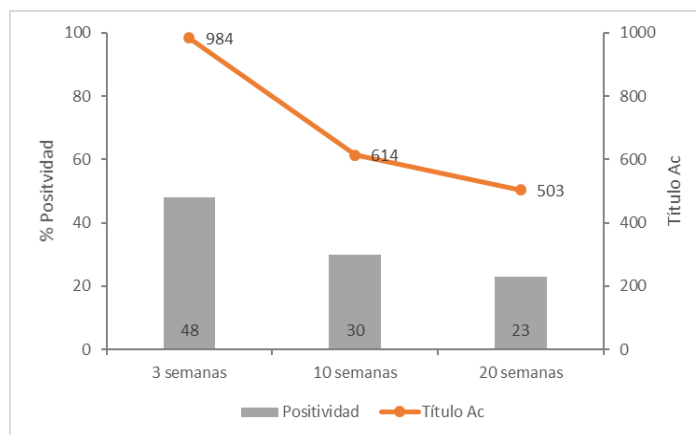


Figura Nro. 2. Porcentajes de positividad y promedios de títulos de anticuerpos a las 3, 10 y 20 semanas.

1. Resultados cualitativos: Positividad

En el Anexo 3 se grafica el porcentaje de positivos para cada edad y para cada granja según el total de muestras tomadas. A las 3 semanas, las granjas C, E y K reportan una baja cantidad de individuos positivos, con un 25%/0% (primeriza/múltipara), 0%/8% (primeriza/múltipara) y 6% (múltipara) de positividad, respectivamente. Por el contrario, las granjas G, H, I y J reportan los mayores valores, con un 100% (múltipara), 75%/92% (primeriza/múltipara), 75%/92% (primeriza/múltipara) y 83%/70% (primeriza/múltipara) de positividad a esta edad, respectivamente.

Con respecto a la edad “10 semanas”, las granjas A, C y K no reportan ningún positivo a esta edad. Por otro lado, las granjas B, D G e I muestran los valores más altos de positividad, \geq a 56%.

Para la edad “20 semanas” los porcentajes de positividad tienden a ser los más bajos para cada granja, en relación a las otras edades, reportando valores de 0% y 6% para las granjas H y K, respectivamente, llegando a un máximo de 44% en la granja G.

Finalmente, las granjas C, D, E, F y K presentan un bajo porcentaje de animales positivos en todas las edades.

Se destaca que las granjas G, H, I y J presentan un comportamiento serológico similar, con un alto porcentaje de animales positivos a las 3 semanas, los que decrecen paulatinamente en el tiempo. En la Figura Nro. 3 se grafican los resultados de las granjas mencionadas de manera conjunta, y se observa un modelo mucho más acentuado al compararlo con el gráfico que resume a todas las granjas (Figura Nro. 2).

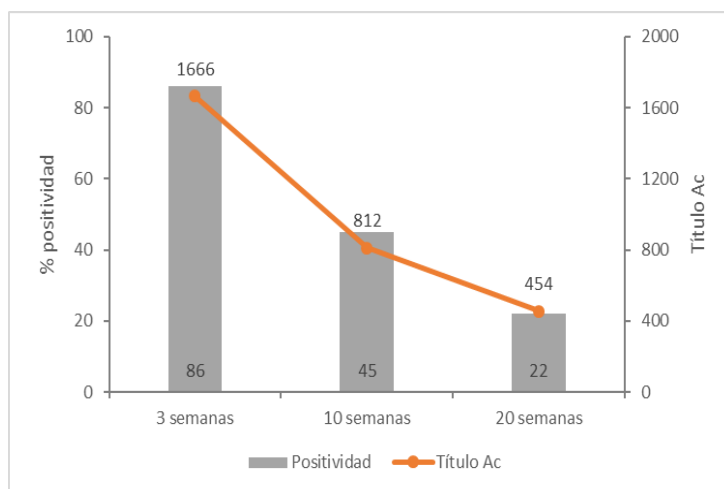


Figura Nro. 3. Porcentajes de positividad y promedios de títulos de anticuerpos a las 3, 10 y 20 semanas para las granjas G, H, I y J.

2. Resultados cuantitativos: títulos de anticuerpos

En cuanto a los títulos de anticuerpos, en la Figura Nro. 2 podemos observar la misma tendencia a la baja observada en los porcentajes de positivos para cada edad, con promedios de 984 a las 3 semanas, 614 a las 10 semanas y 503 a las 20 semanas.

En el Anexo Nro. 4 se grafican los promedios de títulos de anticuerpos para cada edad y para cada granja, con la correspondiente desviación estándar. En primer lugar, se observa que, en general, los títulos presentan gran variabilidad tanto dentro como entre las granjas y edades, además, se ratifica la tendencia a la baja de los títulos de anticuerpos en el tiempo.

A las 3 semanas, las granjas G, H y J son las que reportan los mayores títulos de anticuerpos, mientras que las granjas C, D y E reportan valores cercanos al mínimo (150).

Con respecto a la variación, éstas últimas también resultan ser las menos variables, lo que se evidencia en una baja desviación estándar en comparación a las otras granjas, las cuales se mantienen estables.

A las 10 semanas, las granjas B y J reportan los mayores valores, cercanos a 1200. Por otro lado, las granjas A y C se mantienen en el valor mínimo, sin desviación estándar. En general, la variación es menor en comparación al primer gráfico, las granjas B y J son las que muestran una mayor variabilidad.

Por último, a las 20 semanas, se observa una distribución más homogénea de los valores con respecto a las diferentes granjas, manteniéndose entre el mínimo (150) y un valor intermedio (1200). Las granjas B, I y K reportan los mayores valores tanto de los promedios como de desviación estándar. Por el contrario, las granjas A, H y J muestran los valores más bajos, cercanos al mínimo, con una desviación estándar muy baja.

3. Resultados interferencia materna

En las Figuras Nro. 4 y Nro. 5 se resumen los resultados de la conversión de títulos de anticuerpos a las 3 semanas a valores de IPMA, para poder evidenciar posible interferencia materna en la vacunación de lechones.

En la Figura Nro. 4 se muestran los promedios y desviación estándar de los valores de IPMA, en donde los títulos $> 10 \log_2$ de IPMA demuestran interferencia (Fort *et al.*, 2009), como es el caso de las granjas B, F, G, H, I y J, que corresponden a un 54% de las granjas analizadas.

En la Figura Nro. 5 se muestran los porcentajes de interferencia materna para cada granja, los cuales se corresponden con los resultados anteriores. Cabe destacar que las granjas D y E no reportan individuos que evidencien interferencia. Por el contrario, las granjas G, H e I muestran los mayores porcentajes, entre un 80-90%, evidenciando una alta interferencia en estas granjas.

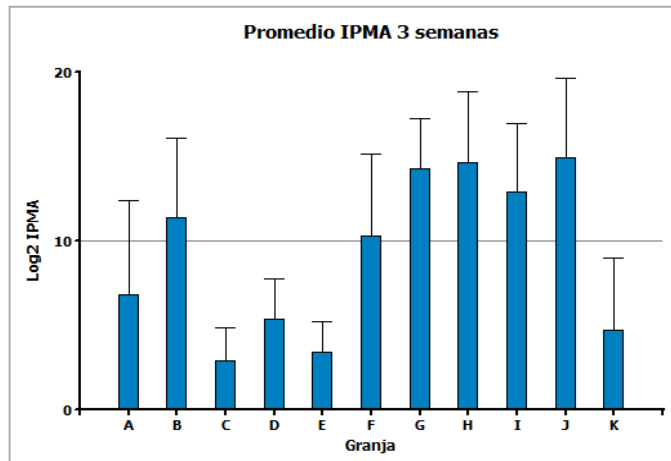


Figura Nro. 4. Promedio IPMA a las 3 semanas para cada granja. Valores > 10 log₂ reportan interferencia materna con la vacunación (Fort *et al.*, 2009).

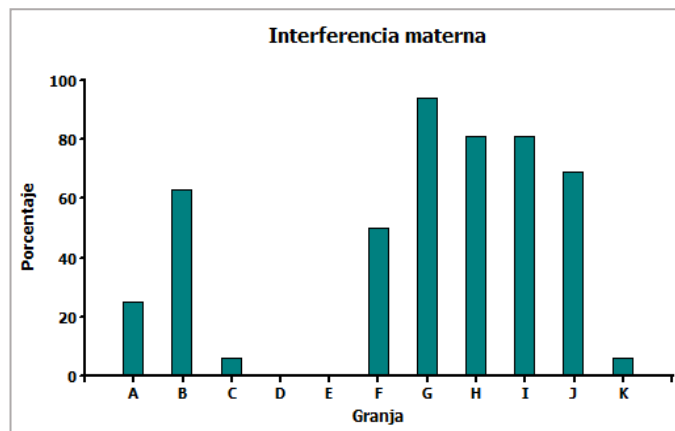


Figura Nro. 5. Porcentaje de individuos que reportan interferencia con respecto al total de individuos de cada granja.

4. Resultados estadísticos

En las Tablas Nro. 2 y Nro. 3 se resumen los resultados obtenidos del análisis de varianza (ANOVA) y de la prueba LSD Fischer, usando como variable dependiente los valores de S/N y como variables de clasificación: granja, tiempo (edad), sistema, status PRRS, vacunación y tamaño; obtenidos de la recopilación de información respecto a las granjas, la cual se muestra en el Anexo Nro. 5. A continuación se describe la información recopilada.

Sistema: Este factor se refiere a la disposición espacial de los galpones de cada granja, de acuerdo a la etapa productiva de los animales. En el caso de las monositio, éstos se

encuentran agrupados en un solo sector, en cambio, en las multisitio, alguna etapa, generalmente la engorda, se encuentra separada.

Status PRRS: El status PRRS de un plantel se reporta como positivo o negativo, de acuerdo a la situación de éste en la fecha de muestreo, y según lo establecido por el Programa Oficial de Control y Erradicación de PRRS por parte del SAG. Este factor fue incluido debido a la estrecha relación entre los virus PCV-2 y PRRSV.

Vacunación: La vacunación en las granjas analizadas sigue un protocolo estándar, el producto utilizado usualmente en la fecha de muestreo fue Circovac® o Circumvent®, ambas vacunas inactivadas con eficacia similar. Con respecto a los tiempos de vacunación, en todas las granjas se vacuna a lechones a las 3 semanas de vida, y hembras primerizas. La única diferencia detectable en la búsqueda de información es que algunas granjas vacunan madres antes de entrar a cada periodo reproductivo, y otras solamente a las primerizas.

Tamaño del plantel: Para evaluar el tamaño del plantel se utilizó un número que corresponde a la cantidad de madres de cada plantel, ya que es un buen estimador de esta característica. Cada plantel tiene un tamaño diferente, los cuales varían entre 400 y 8331 madres.

En la Tabla Nro. 2 se muestran los resultados de ANOVA para todos los factores mencionados. Valores de $p < 0,05$ indican diferencias significativas. Se observa que todos los factores muestran diferencias estadísticamente significativas entre las granjas. El detalle de los resultados estadísticos se encuentra en el Anexo Nro. 6

Tabla Nro. 2. Resultados ANOVA.

Factor	Valor-p
Granja	< 0,0001
Tiempo (edad)	0,004
Sistema	0,003
Status PRRS	< 0,0001
Vacunación	< 0,0001
Tamaño	< 0,0001

En la Tabla Nro. 3 se muestran los resultados de la prueba complementaria LSD Fischer, la cual compara las medias de S/N de las granjas de a pares y asigna una letra a cada categoría, en donde letras distintas indican diferencias significativas. Se observa que existen diferencias estadísticamente significativas entre las categorías de los factores: sistema, status PRRS y vacunación. Los resultados del factor tamaño se encuentran en el Anexo Nro. 6, en donde se observa una mayor variabilidad de resultados, probablemente debido a que cada granja presenta un tamaño diferente.

Tabla Nro. 3. Resultados prueba LSD Fischer.

Factor	Categoría	Medias S/N	N°	Letra
Sistema	Multisitio	0,55	192	A
	Monositio	0,64	336	B
Status PRRS	Positivo	0,55	288	A
	Negativo	0,67	240	B
Vacunación madres	Si	0,47	95	A
	No	0,63	433	B

DISCUSIÓN

En este estudio se demuestra que existe evidencia serológica de PCV-2 en todas las granjas analizadas y que existen diferencias estadísticamente significativas entre ellas al considerar ciertos factores prediales, por lo tanto, se acepta la hipótesis de este estudio. Considerando que las granjas analizadas representan un 44% de las empresas de producción porcina intensiva a nivel nacional, y que, además, su distribución geográfica es representativa de la misma, se puede concluir que la infección está presente de forma endémica en el territorio nacional, y se reafirma la característica de ubicuidad del virus y la naturaleza multifactorial del PMWS.

1. Perfiles serológicos

Un perfil serológico o seroperfil se define como un estudio efectuado a grupos de animales de diferentes edades o etapas productivas de una granja, para detectar la presencia de anticuerpos contra algún patógeno en particular, y determinar los patrones de infección en los animales (Morilla y González-Vega, 1996). Estos estudios son cada día más utilizados para el control sanitario de explotaciones porcinas, convirtiéndose en una importante herramienta para reducir costos en medicamentos y elevar el nivel sanitario. Dentro de las aplicaciones más relevantes de un seroperfil se puede mencionar: determinar la ausencia o presencia de patógenos, determinar a qué edad o etapa productiva ocurre la infección, y controlar los programas de vacunación.

Los perfiles serológicos obtenidos mediante la prueba de ELISA logran describir el comportamiento serológico de la infección por PCV-2. Si bien cada granja presenta un gráfico diferente (Anexo Nro. 3), el 36% de las granjas analizadas presenta un modelo característico en sus perfiles serológicos, con un alto porcentaje de individuos positivos y títulos de anticuerpos a las 3 semanas, los cuales disminuyen aproximadamente a la mitad a las 10 semanas y nuevamente a la mitad a las 20 semanas (Figura Nro. 3). Cabe destacar que, si se considera la totalidad de las granjas analizadas, el gráfico resultante presenta el mismo modelo, pero con un cambio menos drástico entre edades (Figura Nro. 2), por lo que es correcto usar el primer modelo para describir los perfiles serológicos a modo general.

El comportamiento descrito anteriormente se puede explicar por un eficiente traspaso de anticuerpos maternos a través del calostro, otorgando un alto título de anticuerpos medible a las 3 semanas de edad. Esto coincide con lo encontrado por Liu, *et al.*, (2008), en donde a la semana de vida, un 80% de individuos fueron positivos a anticuerpos contra PCV-2, posteriormente la cantidad de seropositivos alcanzó los valores más bajos detectados entre las 5 y 9 semanas de vida. Sin embargo, posterior a esta edad y debido posiblemente a una infección de campo, los anticuerpos vuelven a aumentar, y la mayoría de los animales se vuelven seropositivos a partir de las 13 a 15 semanas. Esto último marca una diferencia con respecto a los resultados obtenidos, ya que en este caso tanto los anticuerpos como la cantidad de animales positivos siempre tienden a disminuir en el tiempo, llegando a los valores más bajos obtenidos a las 20 semanas de vida. Este comportamiento podría estar relacionado directamente con la vacunación, o indirectamente, con el fenómeno de interferencia de la inmunidad materna con ésta.

2. Efecto de la vacunación

La bibliografía reporta ampliamente la vacunación como la primera medida de control y prevención contra PCV-2, ya que ha demostrado disminuir las tasas de mortalidad, aumentar las tasas de crecimiento y reducir los signos asociados a PMWS y coinfecciones, por lo tanto, se considera como una herramienta exitosa, básica y necesaria para la prevención contra la circovirus porcina (Kixmüller *et al.*, 2008; Heißenberger *et al.*, 2013; Fraile *et al.*, 2015). Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que la vacunación de lechones no estaría proporcionando una inmunidad humoral robusta, ya que en general no se observan altos títulos de anticuerpos desde las 3 semanas, momento de la vacunación, en adelante.

En condiciones experimentales, es común observar un aumento de anticuerpos posterior a la vacunación, sin embargo, en situaciones de campo la inmunidad humoral es variable (Park *et al.*, 2014, Heißenberger *et al.*, 2013). Esta diferencia puede estar asociada a una serie de factores como lo son el estado inmunológico del individuo, la presencia de coinfecciones, diferencias en la patogenicidad de las cepas de PCV-2, pero también a problemas relacionados directamente con el manejo en la vacunación, como por ejemplo el no efectuar una correcta administración de la vacuna o el no respetar los tiempos y/o las

dosis (Rovira, 2017). Esto último puede parecer simplista, sin embargo, es fundamental para alcanzar la efectividad del producto, y debería ser considerado en cualquier tipo de evaluación del efecto de la vacunación en un plantel.

2.1 Interferencia materna con la vacunación

El comportamiento de los perfiles serológicos también podría estar relacionado con el fenómeno de interferencia materna, en donde los anticuerpos maternos neutralizan los antígenos vacunales, bloqueando el proceso de seroconversión activa (Fort, *et al.*, 2009). Las granjas G, H, I y J, representantes del modelo de perfil serológico obtenido (Figura Nro. 3), presentan los mayores porcentajes de interferencia materna según los valores de IPMA a las 3 semanas (Figuras Nro. 4 y Nro. 5). Estos hallazgos sugieren la necesidad de reevaluar los protocolos de vacunación en estas granjas, a modo de elegir el momento exacto de vacunación, en donde los anticuerpos maternos no interfieran con esta. Sin embargo, existe evidencia en la bibliografía de que la vacunación a las 3 semanas de vida sigue siendo efectiva a pesar de este fenómeno, es así como Haake *et al.*, (2014), estudiaron la influencia de la edad en la efectividad de la vacunación en individuos con altos títulos de anticuerpos maternos, concluyendo que a pesar de que la inmunidad humoral disminuya, la vacunación sigue siendo protectora y su eficacia es mayor cuando se vacuna a las 3 semanas, que es lo comúnmente usado, en comparación con vacunar a la semana de vida, atribuyendo a otros factores, aún no clarificados, la interferencia con la respuesta inmune humoral. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Park *et al.*, (2014) en donde se comparó la eficacia de 4 vacunas comerciales bajo condiciones de campo y resultaron ser todas eficientes al aumentar las tasas de ganancia diaria de peso (GDP) y disminuir lesiones asociadas a PCV-2, incluso en lechones con altos títulos de IPMA.

Por lo tanto, a pesar de tener un alto porcentaje de interferencia materna en aproximadamente la mitad de las granjas analizadas, este fenómeno no estaría explicando por sí sólo el comportamiento serológico en cuestión. Una posible explicación sería que, en general, las granjas no presentan una alta infección de campo, lo que se respalda por una baja presentación de casos clínicos de PMWS en las granjas muestreadas, por lo tanto, la vacunación por sí sola no estaría levantando los anticuerpos esperados.

3. Factores prediales asociados

Todos los factores analizados reportan diferencias estadísticamente significativas entre las granjas. A continuación, se discuten los resultados obtenidos para cada factor.

3.1. Factor sistema

De las 11 granjas analizadas, 7 funcionan bajo sistema monositio, es decir, la disposición espacial de los galpones respecto a la etapa productiva de los animales se concentra en un solo lugar geográfico; y 4 funcionan bajo sistema multisitio, en donde alguna etapa productiva, generalmente la engorda, se localiza en un lugar geográficamente distante al resto de las etapas. Este factor fue analizado para evaluar si existen diferencias entre los sistemas ya que la disposición y distancia de los galpones podría estar incidiendo en la transmisión del virus. Los resultados muestran que, en efecto, existen diferencias estadísticamente significativas entre éstas (Anexo Nro. 6). Por lo tanto, se concluye que la disposición espacial de los galpones en las granjas analizadas incide en la dinámica serológica de PCV-2. A pesar de esto, cabe destacar que la infección se reporta como presente independientemente del sistema de producción, lo que coincide con la bibliografía (Segalés *et al.*, 2005).

3.2. Factor status PRRS

Actualmente, el PCV-2 se considera como el principal agente causal no solo de PMWS, sino de una amplia lista de complejas enfermedades multifactoriales agrupadas bajo el nombre de PCVAD (del inglés *Porcine Circovirus Associated Diseases*) o enfermedades asociadas a circovirus porcino, en donde el PRRS es una de las más representativas. El agente etiológico principal de este síndrome, PRRSV, ha demostrado potenciar la replicación y distribución de PCV-2 (Allan *et al.*, 2000), posiblemente debido al hecho de tener células blanco en común.

Chile fue autodeclarado ante la OIE oficialmente libre de PRRS en febrero de 2013, sin embargo, más tarde ese mismo año ocurrió un brote de una nueva cepa, por lo que desde el año 2014 se trabaja en un nuevo Plan Oficial de Control y Erradicación, en un esfuerzo conjunto entre el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) y la Asociación de Productores de

Cerdos (ASPROCER). El plan ha demostrado avances significativos, a marzo de 2016 se reporta un 88% de avance en el saneamiento de los planteles afectados al inicio del brote (SAG, 2016).

Dentro de las granjas analizadas, 5 se reportan como positivas y 6 como negativas a PRRS, al momento del muestro. Todas las granjas reportadas como positivas se encontraban bajo medidas del Plan Oficial de Control y Erradicación. Los resultados obtenidos al incorporar este factor al análisis estadístico muestran que sí existen diferencias significativas entre las granjas positivas y negativas a PRRS. Esto corrobora la estrecha relación que presentan los virus PCV-2 y PRRSV, ahora en un contexto nacional.

3.3. Factor vacunación

La vacunación en las granjas analizadas sigue un protocolo estándar, la única diferencia detectada es que la mayoría de las granjas (9) no vacunan madres cada vez que entran a un nuevo periodo reproductivo, a diferencia de las restantes 2 granjas que si realizan este manejo. Al incorporar este factor al modelo de ANOVA, este reporta que sí existen diferencias significativas entre estas granjas, lo que coincide con la prueba LSD Fischer. Estos resultados se respaldan con los perfiles serológicos y títulos de anticuerpos de las granjas mencionadas, en donde, por ejemplo, se observa un 100% de positividad a las 3 semanas para la granja G, y los mayores títulos de anticuerpos a la misma edad, en comparación con el resto de las granjas. Esto sugiere que la medida de manejo es eficiente, posiblemente debido a que provee una alta inmunidad materna a los lechones, sin embargo, no se debe olvidar el fenómeno de interferencia materna con la vacunación, ya que ambas granjas reportan esta condición.

3.4. Factor tamaño del plantel

El tamaño de las granjas, representado para este estudio como el número de hembras reproductoras, varía ampliamente entre éstas (Anexo Nro. 5), observándose 400 reproductoras para la granja B y 8.331 para la granja G. Los resultados del ANOVA muestran que existen diferencias significativas entre las granjas al incorporar este factor al modelo, sin embargo, no se puede interpretar de la misma forma que el resto de los factores, ya que cada granja presenta un tamaño distinto. Esto supone que la infección por

PCV-2 se presenta independientemente del tamaño de una granja, y que no estaría incidiendo en los perfiles serológicos de éstas, lo que coincide con lo encontrado en la bibliografía (Segalés *et al.*, 2005).

4. Relación entre PCV-2 y PMWS

Si bien estos conceptos están íntimamente relacionados, es importante recordar que la infección por PCV-2 es necesaria pero no suficiente para que se desarrolle el PMWS, debido a su naturaleza multifactorial, y que, además, este síndrome se puede presentar de forma subclínica. Por otro lado, el diagnóstico de la infección por PCV-2 es mucho más simple que el diagnóstico del síndrome, el cual supone varios niveles. En primer lugar, se deben seleccionar individuos vivos o recientemente muertos sospechosos del cuadro, luego se debe realizar un diagnóstico histopatológico en busca de lesiones microscópicas características en órganos linfoides, y finalmente, detectar el virus en los tejidos que presentan estas lesiones (Harding y Clark, 1997).

El presente estudio tuvo como objetivo describir los perfiles serológicos de PCV-2, es decir, se enfoca en la infección y no en el síndrome, ya que para incluirlo en el estudio es necesario conocer la situación de PMWS en cada granja, lo cual, considerando los antecedentes descritos anteriormente, es una tarea compleja. Una alternativa para relacionar indirectamente la infección con el síndrome, podría ser la carga viral, ya que Olvera *et al.*, 2004 argumenta una asociación positiva entre las cargas virales y la gravedad de las lesiones de PMWS. Sin embargo, si bien está demostrado que en individuos afectados por el síndrome existe una alta carga viral en tejidos, no sucede lo mismo al analizar muestras de suero, por lo tanto, una alta carga viral indica una mayor probabilidad de que el individuo tenga la enfermedad, pero no es suficiente para establecer un diagnóstico de ésta.

Es así como el estudio de los perfiles serológicos de PCV-2 sigue siendo una alternativa viable y práctica para conocer la situación de PMWS en un plantel, a pesar de ser un método indirecto, considerando la complejidad de establecer un diagnóstico del síndrome, y de la alta probabilidad de encontrar casos subclínicos en un plantel.

5. Limitaciones

La principal limitación de este estudio es la confidencialidad de los resultados y la reserva por parte de las empresas a proporcionar información sobre los planteles. Es así como la cantidad de factores analizados fue menor a la esperada. Por ejemplo, no fue posible establecer una base de datos completa respecto a otras enfermedades infecciosas que podrían haber estado presentes en la época de muestreo o anteriormente, como por ejemplo parvovirus o influenza porcina. Esta información sería útil para establecer posibles relaciones entre estas enfermedades y los perfiles serológicos de PCV-2 obtenidos.

Otro dato que podría complementar de mejor forma este estudio es el programa de vacunación completo de las granjas analizadas, tanto de PCV-2 como de otros patógenos. Esta información sería de utilidad para corroborar el carácter de estándar de los protocolos de vacunación en la industria porcina descritos en la bibliografía, además de indagar en posibles interacciones, tanto positivas como negativas, entre las diferentes vacunas, y sus efectos sobre los perfiles serológicos encontrados.

CONCLUSIONES

El presente estudio permite concluir que la infección por PCV-2 se encuentra presente en la industria porcina intensiva a nivel nacional, lo cual es un antecedente importante debido a que no existen datos publicados anteriormente al respecto y al gran impacto sanitario y económico que representan las PCVAD, principalmente el PMWS.

En cuanto a los perfiles serológicos de PCV-2, se logra caracterizar su comportamiento, en donde tanto la cantidad de individuos positivos como títulos de anticuerpos tienden a disminuir en el tiempo, a pesar de la adopción de medidas preventivas como la vacunación. Esta característica junto con un alto porcentaje de interferencia materna en la vacunación, representan los hallazgos más importantes del estudio.

Por otro lado, mediante análisis estadístico se demuestra que existen factores prediales que generan diferencias significativas entre los perfiles serológicos de las granjas estudiadas. Todos los factores analizados – sistema, status PRRS, vacunación y tamaño – reportan diferencias significativas en el ANOVA. A pesar de lo anterior, cabe destacar que la infección se reporta en todas las granjas, a pesar de las diferencias encontradas.

Desde su aparición, PCV-2 continúa siendo uno de los principales problemas sanitarios y económicos para la producción porcina a nivel mundial y nacional. En los últimos años se han destinado muchos recursos para su estudio, tanto para conocer su patogenia, comportamiento epidemiológico, como para planificar estrategias de control y prevención. Considerando la imposibilidad de erradicación, es que se hace necesario levantar información mediante estudios de este tipo que sirvan como base para establecer un monitoreo epidemiológico continuo en los países con industria porcina intensiva, además de establecer un protocolo estricto de medidas de higiene y reducción de estrés en los planteles.

Finalmente, se hace necesario incorporar otros datos y/o factores prediales a estudios posteriores a modo de complementar estos resultados, como por ejemplo presencia de otras enfermedades y/o programas de vacunación completos, con el fin de avanzar aún más en la comprensión de las PCVAD, considerando su naturaleza multifactorial y al hecho de que la

infección por PCV-2 es necesaria pero no suficiente por sí sola para desencadenar el cuadro.

BIBLIOGRAFÍA

ALARCON, P.; VELASOVA, M.; MASTIN, A.; NEVEL, A.; STÄRK, K.; WIELAND, B. 2011. Farm level risk factors associated with severity of post-weaning multi-systemic wasting syndrome. *Pre. Vet. Med.* 101:182-191.

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

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

ALLAN, G.; MCNEILLY, F.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; MEEHAN, B.; MCNAIR, I.; WALKER, I.; KENNEDY, S. 2000. Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. *Arch. Virol.* 145:2421-2429.

ASPROCER. 2014. Análisis sectorial 2014. Asociación gremial de productores de cerdo de Chile. [en línea] <http://www.asprocer.cl/index/plantilla1.asp?id_seccion=2&id_subsecciones=77> [consulta: 27-04-16].

BEACH, N.; MENG, X. 2012. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus res.* 164:33-42.

CALSAMIGLIA, M.; OLVERA, A.; SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. 2004. Quantification of PCV2 in different routes of excretion: Possible transmission and correlation with presence of PMWS characteristic lesions. **In:** IPVS Cong. Hamburg, Germany, pp. 11.

CARR, J.; O'DEA1, M.; MCLACHLAN, S.; WILCOX, W. 2008. The superficial inguinal lymph node of the pig and PCV2. **In:** Proc IPVS Cong. Durban, South Africa, pp. 39.

FORT, M.; SIBILA, M.; PÉREZ-MARTÍN, E.; NOFRARIÁS, M.; MATEU, E.; SEGALÉS, J. 2009. One dose of a porcine circovirus 2 (PCV2) sub-unit vaccine administered to 3-week-old conventional piglets elicits cell-mediated immunity and significantly reduces PCV2 viremia in an experimental model. *Vaccine* 27(30):4031-4037.

FRAILE, L.; SEGALÉS, J.; TICÓ, G.; LÓPEZ-SORIA, S.; VALERO, O.; NOFRARIÁS, M.; HUERTA, E.; LLORENS, A.; LÓPEZ-JIMÉNEZ, R.; PÉREZ, D.; SIBILA, M. 2015. Virological and serological characterization of vaccinated and non-vaccinated piglet subpopulations coming from vaccinated and non-vaccinated sows. *Pre. Vet. Med.* 119:153-161.

GUTIÉRREZ, C.; GONZÁLEZ, F.; ARAYA, A.; GADICKE, P.; RUIZ, A. 2015. Evaluación productiva de un programa de inyección sin aguja para la administración de vacunas contra *Circovirus* porcino tipo 2 y *Mycoplasma hyopneumoniae* en un plantel porcino intensivo tipo destete-venta. *Arch. Med. Vet.* 47:147-153.

HAAKE, M.; PALZER, A.; RIST, B.; WEISSENBACHER-LANG, C.; FACHINGER, V.; EGGEN, A.; RITZMANN, M.; EDDICKS, M. 2014. Influence of age in the effectiveness of PCV2 vaccination in piglets with high levels of maternally derived antibodies. *Vet. Mic.* 168:272-280.

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

HEINßENBERGER, B.; WEISSENBACHER-LANG, C.; HENNIG-PAUKA, I.; RITZMANN, M.; LADINIG, A. 2013. Efficacy of vaccination of 3-week-old piglets with Circovac® against porcine circovirus diseases (PCVD). *Trials in vaccinology* 2:1-9.

INE. 2014. Producción pecuaria, periodo 2008-2013 y primer semestre 2014. Subdepartamento de estadísticas agropecuarias. Instituto Nacional de Estadísticas. [en línea]

http://www.ine.cl/canales/chile_estadistico/estadisticas_agropecuarias/estadisticas_pecuarias/pdf/pecuaria_2008_2013_1s_2014.pdf [consulta: 27-04-16].

JOHNSON, C.; JOO, H.; DIREKSIN, K.; YOON, K.; CHOI, Y. 2002. Experimental in utero inoculation of late-term swine fetuses with porcine circovirus type 2. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14(6):507-512.

KAWASHIMA, K.; KATSUDA, K.; TSUNEMITSU, H. 2007. Epidemiological investigation of the prevalence and features of postweaning multisystemic wasting syndrome in Japan. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19(1):60-68.

KIXMÖLLER, M.; RITZMANN, M.; EDDICKS, M.; SAALMÜLLER, A.; ELBERS, K.; FACHINGER, V. 2008. Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine* 26:3443-3451.

LIU, H.; CHAU, H.; CHANG, H.; TSAI, C.; LIN, E.; YANG, P.; CHUNG, W. 2008. Decay of maternally derived antibodies and seroconversion to respiratory viral infection in pigs herds. *Taiwan Vet. J.* 34(3):127-141.

LÓPEZ-SORIA, S.; SEGALÉS, J.; ROSE, N.; VIÑAS, M.J.; BLANCHARD, P.; MADEC, F.; JESTIN, A.; CASAL, J.; DOMINGO, M. 2005. An exploratory study on risk factors for postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain. *Pre. Vet. Med.* 69:97-107.

MORILLA, A.; GONZALES-VEGA, D. 1996. Los perfiles serológicos y microbiológicos para evaluar el estado sanitario de las granjas porcinas. *Ciencia Veterinaria* 7:273-313.

NAUWYNCK, H.; LEFEBVRE, D.; MISINZO, G.; MEERTS, P.; MATEUSEN, B.; SANCHEZ, R.; DELPUTTE, P. 2007. Pathogenesis of porcine circovirus 2 infections. In: 38th Annual Meetings Proceedings. A.A.S.V.P. March 3-6. Doubletree Hotel. Florida, USA. pp. 489-495.

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

NORIEGA, J. 2008. Detección y caracterización genotípica de circovirus porcino tipo 2 en Chile. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile. Facultad Cs. Veterinarias y Pecuarias. 70 p.

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. *J. Virol. Methods* 117:75-80.

PARK, C.; SEO, H.; HAN, K.; CHAE, C. 2014. Comparison of four commercial one-dose porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines administered to pigs challenged with PCV2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus at 17 weeks postvaccination to control porcine respiratory disease complex under korean field conditions. *Clin. Vaccine Immunol.* 21(3):399-406.

PILERI, E.; CORTEY, M.; RODRÍGUEZ, F.; SIBILA, M.; FRAILE, L.; SEGALÉS, J. 2014. Comparison of the immunoperoxidase monolayer assay and three commercial ELISAs for detection of antibodies against porcine circovirus type 2. *Vet J.* 201(3):429-432.

ROVIRA, A. 2017. Actualización en circovirus porcino. **In:** Aulas virtuales Boehringer Ingelheim. Minnesota, USA. 22 junio 2017. Academia Porcina: centro académico virtual en sanidad y producción porcina.

SAG. 2009. Boletín Veterinario Oficial N°9 Síndrome de desmedro multisistémico posdestete PMWS. Servicio Agrícola y Ganadero. División de Protección Pecuaria. [en línea]<http://www2.sag.gob.cl/Pecuaria/bvo/BVO_9_I_semestre_2009/articulos/PMWS.pdf> [consulta: 27-10-16].

SAG. 2014. Informe situación sanitaria animal de Chile, 2014. Servicio Agrícola y Ganadero. División de Protección Pecuaria. Sub departamento de sanidad animal. [en línea] <http://www.sag.gob.cl/sites/default/files/situacion_sanitaria_animal_2014.pdf> [consulta: 27-04-16].

SAG. 2016. Informe Plan Nacional de Control y Erradicación de PRRS. Servicio Agrícola y Ganadero. División de Protección Pecuaria. Sub departamento de sanidad animal. [en línea] < http://www.sag.gob.cl/sites/default/files/informe_situacion_prrs_a_marzo-2016.pdf> [consulta: 24-05-16].

SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; DOMINGO, M. 2004. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Vet. Microbiol.* 98(2):137-149.

SEGALÉS, J.; ALLAN, G. M.; DOMINGO, M. 2005, Porcine circovirus diseases. *Anim. Health Res. Rev.* 6:119-142.

SEGALÉS, J.; URNIZA, A.; ALEGRE, A.; BRU, T.; CRSICI, E.; NOFRARIÁS, M.; LÓPEZ-SORIA, M.; BALASCH, M.; SIBILA, M.; XU, Z.; CHU, H-J.; FRAILE, L.; PLANA-DURÁN, 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.

STEINER, E.; BALMELLI, C.; HERRMANN, B.; SUMMERFIELD, A.; MCCULLOUGH, K.C. 2008. Porcine circovirus type 2 displays pluripotency in cell targeting. *Virology* 378: 311–322.

TISCHER, I.; GLEDERBLOM, H.; VETTERMANN, W.; KOCH, M. 1982. A very small porcine virus with circular single stranded DNA. *Nature* 295(1): 64-66.

TISCHER, I.; MIELDS, W.; WOLF, D.; VAGT, M.; GRIEM, W. 1986. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch. Virol.* 91(3-4): 271-276.

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

ANEXOS

Anexo Nro. 1. Mapa de ubicación de granjas analizadas.



Anexo Nro. 2. Protocolo de SERELISA® PCV2 Ab Mono Blocking (Synbiotics)

SERELISA® PCV2 Ab Mono Blocking



¿Cómo se usa?

(1) MÉTODO CUANTITATIVO EN SUERO USANDO TRES DILUCIONES

La prueba se realiza en sueros individuales diluidos, en tres pocillos, al 1/100, 1/1000 y 1/10000 en el diluyente de la muestra (SD). Cada muestra se compara a un modelo lineal, usando un modelo de regresión logística y una interpolación entre los tres resultados, correlacionado a un título (ver la interpretación para los detalles del modelo).

A. PASOS PRELIMINARES

- Cuidadosamente configurar la distribución y la identificación de los controles y muestras.
- Para la titulación de sueros, una gama de pre-diluciones para cada suero debe ser realizada en los tubos, seguida por una dilución al 1/10 en placa. La preparación de la gama de predilución para cada suero debe ser la siguiente:

Predilución	Preparación
1/10	10 µl de suero + 90 µl diluyente de la muestra SD
1/100	10 µl de suero prediluido 1/10 + 90 µl SD
1/1000	10 µl de suero prediluido de 1/100 + 90 µl SD

B. PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

1. Distribución de los controles:

Los controles están listos para usar. Después de agitar los frascos, añadir 100 µl de control negativo (N) a los pocillos A1, A2 y A3 y 100 µl de control positivo (P) a los pocillos B1, B2 y B3.

2. Distribución de las muestras:

Realizar una dilución al 1/10 en placa: colocar 90 µl de diluyente (SD) y 10 µl de cada predilución (1/10, 1/100, 1/1000) para cada de los sueros a probar.

	1	2	3	4	5	6
A	NC	NC	NC	S7 - 1:100	S7 - 1:1000	S7 - 1:10000
B	PC	PC	PC	S8 - 1:100	S8 - 1:1000	S8 - 1:10000
C	S1 - 1:100	S1 - 1:1000	S1 - 1:10000	S9 - 1:100	S9 - 1:1000	S9 - 1:10000
D	S2 - 1:100	S2 - 1:1000	S2 - 1:10000	S10 - 1:100	S10 - 1:1000	S10 - 1:10000
E	S3 - 1:100	S3 - 1:1000	S3 - 1:10000	S11 - 1:100	S11 - 1:1000	S11 - 1:10000
F	S4 - 1:100	S4 - 1:1000	S4 - 1:10000	S12 - 1:100	S12 - 1:1000	S12 - 1:10000
G	S5 - 1:100	S5 - 1:1000	S5 - 1:10000	S13 - 1:100	S13 - 1:1000	S13 - 1:10000
H	S6 - 1:100	S6 - 1:1000	S6 - 1:10000	S14 - 1:100	S14 - 1:1000	S14 - 1:10000

(2) MÉTODO CUANTITATIVO EN SUERO USANDO UNA DILUCIÓN ÚNICA

La prueba se realiza en sueros individuales diluidos en un pocillo a 1/1000 con el diluyente de la muestra (SD). La densidad óptica seguida de la lectura de la placa será transformada en un título según una ecuación precisa (ver la interpretación para los detalles del modelo).

A. PASOS PRELIMINARES

- Cuidadosamente configurar la distribución y la identificación de los controles y muestras.
- Para la titulación de sueros, cada suero es diluido al 1/10 en tubos, seguido de una dilución a 1/10 en placa. La preparación de la gama de predilución para cada suero debe ser la siguiente:

A. PASOS PRELIMINARES (cont.)

Dilución	Preparación
1/10	10 µl de suero + 90 µl diluyente de la muestra SD
1/100	10 µl de suero prediluido 1/10 + 90 µl SD

B. PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

1. Distribución de los controles:

Los controles están listos para usar.

Después de agitar los frascos, añadir 100 µl de control negativo (N) a los pocillos A1, A2 y A3 y 100 µl de control positivo (P) a los pocillos B1, B2 y B3.

2. Distribución de las muestras:

Realizar una dilución al 1/10 en placa: colocar 90 µl de diluyente (SD) y 10 µl de cada predilución al 1/100 para cada de los sueros a probar.

	1	2	3	4	5	6
A	N	N	N	S19 - 1:1000	S27 - 1:1000	S35 - 1:1000
B	P	P	P	S20 - 1:1000	S28 - 1:1000	S36 - 1:1000
C	S1 - 1:1000	S7 - 1:1000	S13 - 1:1000	S21 - 1:1000	S29 - 1:1000	S37 - 1:1000
D	S2 - 1:1000	S8 - 1:1000	S14 - 1:1000	S22 - 1:1000	S30 - 1:1000	S38 - 1:1000
E	S3 - 1:1000	S9 - 1:1000	S15 - 1:1000	S23 - 1:1000	S31 - 1:1000	S39 - 1:1000
F	S4 - 1:1000	S10 - 1:1000	S16 - 1:1000	S24 - 1:1000	S32 - 1:1000	S40 - 1:1000
G	S5 - 1:1000	S11 - 1:1000	S17 - 1:1000	S25 - 1:1000	S33 - 1:1000	S41 - 1:1000
H	S6 - 1:1000	S12 - 1:1000	S18 - 1:1000	S26 - 1:1000	S34 - 1:1000	S42 - 1:1000

(3) MÉTODO CUALITATIVO EN SUERO

La prueba se realiza en sueros individuales diluidos al 1/100 en el diluyente de la muestra (SD).

A. PASOS PRELIMINARES

- Cuidadosamente configurar la distribución y la identificación de los controles y muestras.
- Para la titulación de sueros, una predilución al 1/10 se realiza en tubo de hemólisis. Una dilución al 1/10 de esta predilución se realiza después en placa.

B. PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

1. Distribución de los controles:

Los controles están listos para usar.

Después de agitar los frascos, añadir 100 µl de control negativo (N) a los pocillos A1, A2 y A3 y 100 µl de control positivo (P) a los pocillos B1, B2 y B3.

2. Distribución de las muestras:

Colocar 100 µl de las muestras diluidas a 1/100 por pocillo. En el caso de dilución directa en el pocillo, colocar 90 µl del diluyente pues 10 µl de suero prediluido al 1/10. Las muestras pueden ser probadas individualmente o en duplicado y la distribución se realiza en columna.

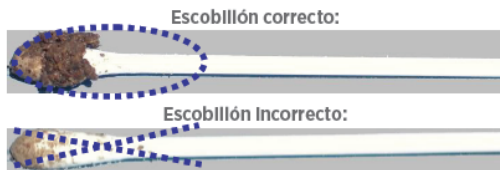
4) MÉTODO CUALITATIVO EN HECES

La prueba se realiza en heces (toma hecha con un guante sobre el animal y preparación en laboratorio). Un escobillón de heces (más o menos 0,15 g de heces) se pone en 500 µl de diluyente de la muestra (SD) y se centrifuga a 1500 g durante 15 minutos. Recuperar el sobrenadante.



SERELISA® PCV2 Ab Mono Blocking

4) MÉTODO CUALITATIVO EN HECES (cont.)



A. PASOS PRELIMINARES

1. Cuidadosamente configurar la distribución y la identificación de los controles y muestras.
2. Preparar las muestras de heces a analizar. Eventualmente pre-diluir las muestras al 1/10 en tubo de hemólisis o en microplaca virgen. Las muestras pueden ser diluidas directamente en los pocillos.

B. PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

1. Distribución de los controles:

Los controles están listos para usar. Después de agitar los frascos, añadir 100 µl de control negativo (N) a los pocillos A1 y A2 y 100 µl de control positivo (P) a los pocillos B1 y B2.

2. Distribución de las muestras:

En caso de extracto de heces previamente diluidos a 1/10, colocar 100 µl por pocillo. En el caso de dilución directa en el pocillo, colocar 90 µl del diluyente pues 10 µl de extracto de heces. Las muestras pueden ser probadas individualmente o en duplicado y la distribución se realiza en columna.

Las muestras deben ser conservadas como sigue:

Muestras	Frío (+ 5°C)	Congelación (- 20°C)	Temperatura ambiente (+23°C)
Suero	Máx. 7 días	Sí	No
Heces (antes de la preparación)	Máx. 7 días	Sí	Máx. 3 días
Extracto de Heces	No	Sí	No

Procedimiento

I - INCUBACIÓN DE LAS MUESTRAS Y DE LOS CONTROLES

- Las tiras deben colocarse siempre en el marco durante la fase de lavado y la lectura de las densidades ópticas.
- Cubrir los pocillos con un film adhesivo, cortar lo necesario para el número de tiras usadas.
- Mezclar agitando suavemente la placa de forma manual o utilizando un agitador de placas.

Incubación de la placa
1 hora ± 5 min a 37 ± 3°C.

LAVADO:

Solución de lavado: Diluir la solución concentrada de lavado (W) a 1/10 en agua destilada o desmineralizada. Retirar con cuidado el film adhesivo y lavar 4 veces.

II - ADICIÓN DEL CONJUGADO

1. Preparación del conjugado:

Preparar la solución conjugada diluyendo el concentrado (CJ) a 1/100 en el diluyente del conjugado (CD) (1 ml es necesario para una tira, es decir, 10 µl de CJ en 990 µl de CD).

2. Distribución del conjugado:

Añadir 100 µl de conjugado diluido a todos los pocillos y cubrir con un nuevo trozo de film adhesivo.

3. Incubación del conjugado:

1 hora ± 5 min a + 37 ± 3°C

LAVADO:

Retirar con cuidado el film adhesivo y lavar 4 veces.

III - REVELADO

1. Adición del sustrato:

Añadir 100 µl del sustrato de peroxidasa tamponada (PS) por pocillo. No cubrir con film adhesivo en esta etapa. Mezclar agitando la placa de forma manual o utilizando un agitador de placas para asegurar una correcta mezcla.

2. Incubación del sustrato:

Incubar 30 ± 5 min a temperatura de laboratorio (+23 ± 5°C), protegido de la luz.

3. Adición de la solución detención:

Añadir 50 µl de solución detención (S) por pocillo. Mezclar agitando suavemente la placa de forma manual o utilizando un agitador de placas. Asegurarse de que no haya burbujas en los pocillos. Limpiar con cuidado el fondo de los pocillos.

4. Medición de la densidad óptica:

Medir la densidad óptica (DO) bicromáticamente a 450 y 630 nm o monocromáticamente a 450 nm (en la banda amarilla). La lectura bicromática es muy recomendada. Si se utiliza un lector monocromático, garantizar la limpieza de la parte inferior de los pocillos antes de la lectura.

PRUEBA DE VALIDACIÓN

Los resultados de cada ensayo son válidos:

Si la \overline{DO} del control negativo (N) es >0.800 , y

Si la \overline{DO} del control positivo (P) es <0.500

Interpretación de los resultados

(1) MÉTODO CUANTITATIVO EN SUERO USANDO TRES DILUCIONES

El método de cálculo y de interpretación se basa en el modelo siguiente:

$$\text{Log(Título)} = a + b \times \text{Logit}(SNC), \text{ o}$$

$$\text{Título} = 10^{(a+b \times \text{Logit}(SNC))}$$

Con

$$SNC = \frac{DO(S) - \overline{DO}(P)}{DO(N) - \overline{DO}(P)}, \text{ a } 2.5 \text{ et } b = -0.70$$

SERELISA® PCV2 Ab Mono Blocking



PRUEBA DE VALIDACIÓN (cont.)

Cada ratio corregido, muestra dividida por el control negativo (Snc) se calcula para cada pocillo y se nota Snc (dilution). Para cada muestra, se usa el árbol de decisión siguiente*:

- si $SNC_{(1:10000)} < 0.0976$, entonces el título > 15 000 Eu (unidad ELISA)
- si $0.7437 > SNC_{(1:10000)} > 0.0976$ entonces

$$\text{Título} = 10 \times 10^{a+b \times \text{Logit}(SNC_{(1:10000)})}$$
- si $SNC_{(1:10000)} > 0.7437$, entonces
 - si $SNC_{(1:1000)} < 0.7437$, entonces

$$\text{Título} = 10^{a+b \times \text{Logit}(SNC_{(1:1000)})}$$
- si $SNC_{(1:1000)} > 0.7437$, entonces
 - si $SNC_{(1:100)} < 0.95$, entonces

$$\text{Título} = 0.1 \times 10^{a+b \times \text{Logit}(SNC_{(1:100)})}$$
- si $SNC_{(1:100)} > 0.95$, entonces

$$\text{Título} = 0$$

(2) MÉTODO CUANTITATIVO EN SUERO USANDO UNA DILUCIÓN ÚNICA

Cuando se utiliza el método con una dilución única, se hace el cálculo siguiente*:

- si $SNC_{(1:1000)} < 0.7437$, entonces

$$\text{Título} = 10^{a+b \times \text{Logit}(SNC_{(1:1000)})}$$
- si $SNC_{(1:1000)} < 0.051$, entonces

$$\text{Título} = +2484$$
- si $SNC_{(1:1000)} > 0.7437$, entonces

$$\text{Título} \leq 150$$

(3) MÉTODO CUALITATIVO EN SUERO

El método de cálculo y de interpretación es el siguiente:

- Calcular para cada muestra el ratio S/N
- Calcular el promedio de las densidades ópticas de la muestra, si la prueba se realiza por duplicado.

Este S/N se calcula según la formula siguiente:

$$\text{Ratio} = \frac{DO(E)}{DO(N)}$$

DO muestra = Promedio de las densidades ópticas de la muestra, si la prueba se realiza por duplicado.

DO N = Promedio de las densidades ópticas del control negativo.

Cada muestra presentando un ratio ≤ 0.4 es considerada como **positiva** para la presencia de anticuerpos en el suero.

Cada muestra presentando un ratio > 0.4 es considerada como **negativa** para la presencia de anticuerpos en el suero.

ratio 0.4		
Suero	+	-

Interpretación de los resultados

(4) MÉTODO CUANTITATIVO EN HECES

Método por el cálculo de los ratios:

Para cada muestra:

$$\text{Ratio} = \frac{DO(E)}{DO(N)}$$

DO muestra = Promedio de las densidades ópticas de la muestra, si la prueba se realiza por duplicado.

DO N = Promedio de las densidades ópticas del control negativo.

Cada muestra presentando un ratio ≤ 0.63 es considerada como **positiva** para la presencia de anticuerpos en las heces.

Cada muestra presentando $0.63 < \text{ratio} < 0.75$ es considerada como **sospechosa** para la presencia de anticuerpos en las heces.

Cada muestra presentando un ratio ≥ 0.75 es considerada como **negativa** para la presencia de anticuerpos en las heces.

Interpretación de los resultados

Heces	ratio 0.63		ratio 0.75
	+	+/-	-

* El uso de una hoja de cálculo es aconsejado.

Instrucciones/Advertencias



No mezclar reactivos de kits con diferentes números de lotes.



No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad.



Colocar todos los reactivos a temperatura de laboratorio durante al menos 1 hora antes de utilizar.



Manipular todos los reactivos y muestras como materia de riesgo biológico.



Mantener todos los reactivos lejos de la piel y los ojos. Si la exposición ocurre, lavar inmediatamente las áreas afectadas con agua fría.



Nunca pipetear los reactivos con la boca.



Evitar la contaminación de la muestra durante la recolección de muestras, almacenamiento o transporte. Las puntas de las pipetas deben cambiarse para cada muestra.



Evitar la contaminación de la solución de sustrato con iones metálicos, agentes oxidantes o detergentes. Asegurarse de que todos los contenedores estén limpios. No usar el mismo recipiente o la misma punta de la pipeta para el conjugado y el sustrato.

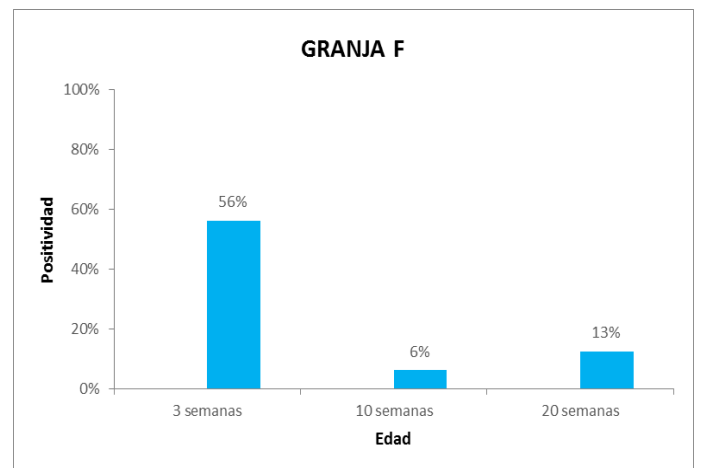
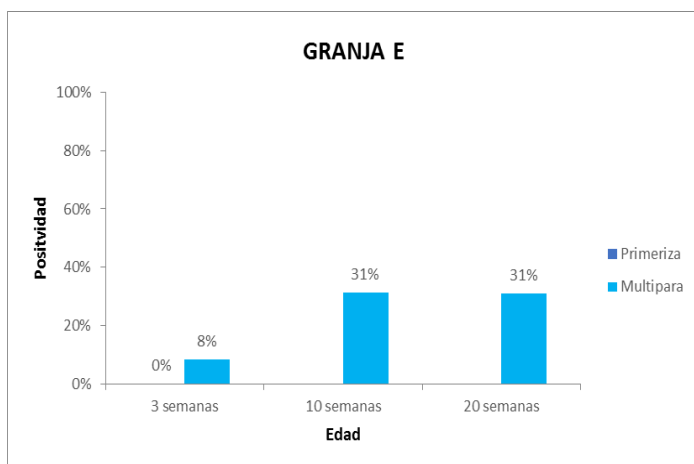
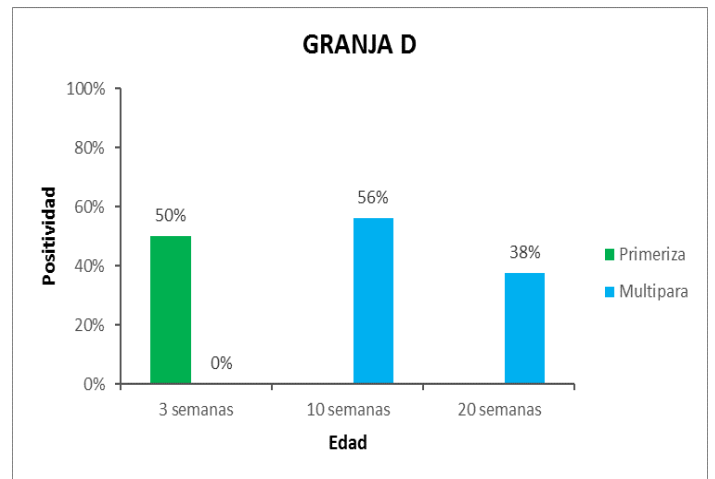
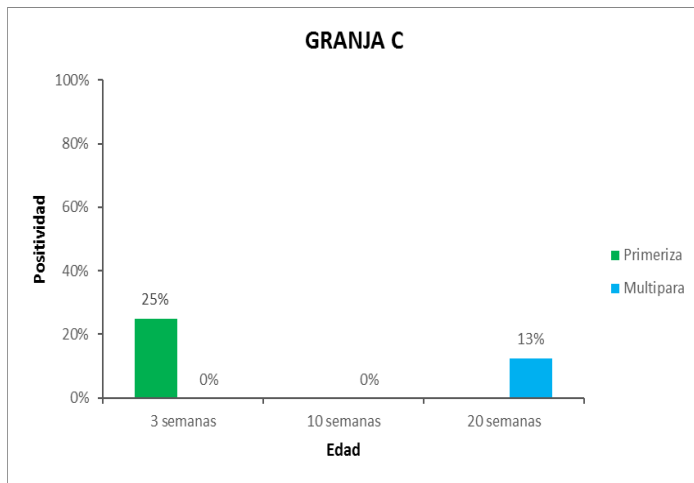
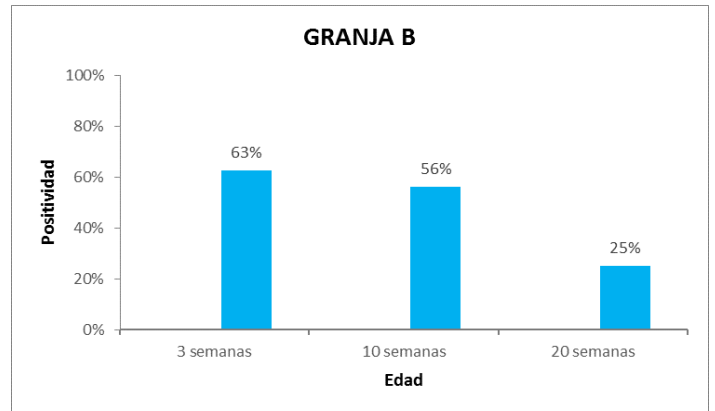
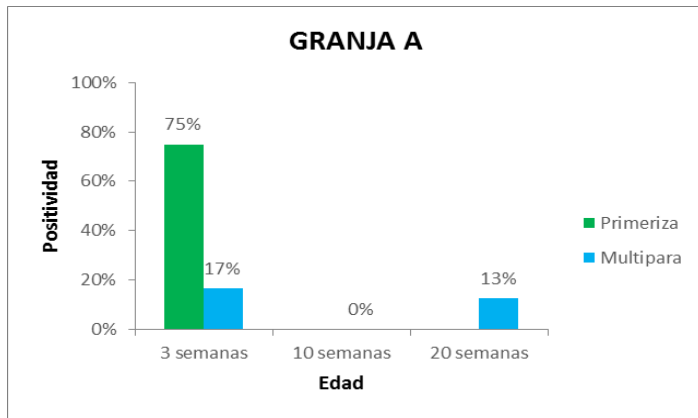


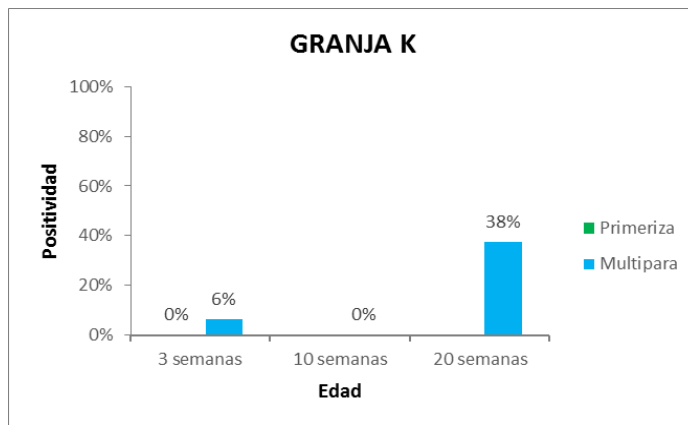
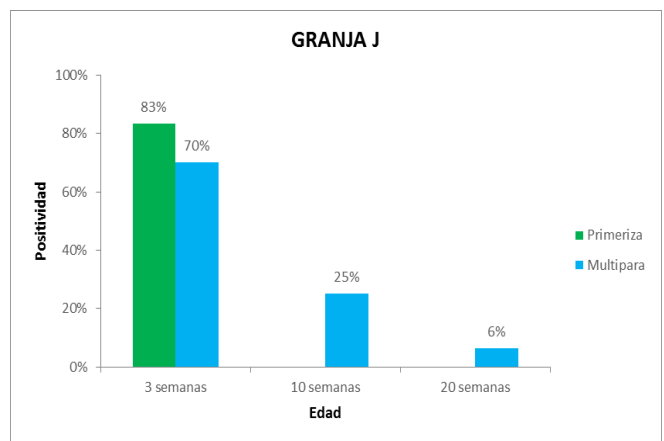
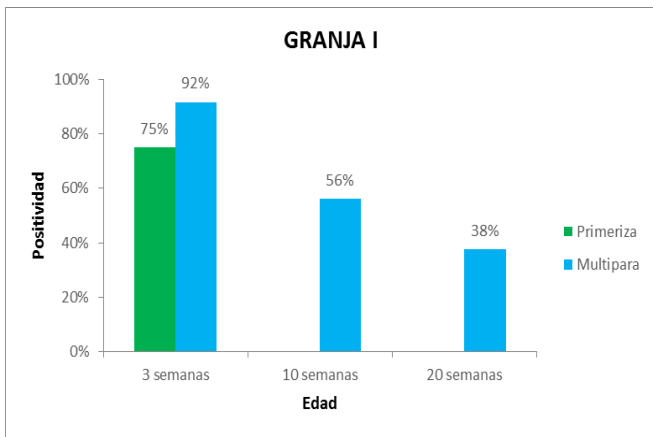
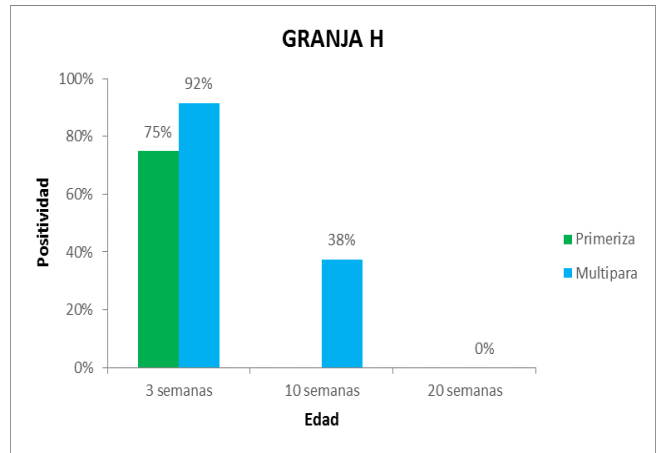
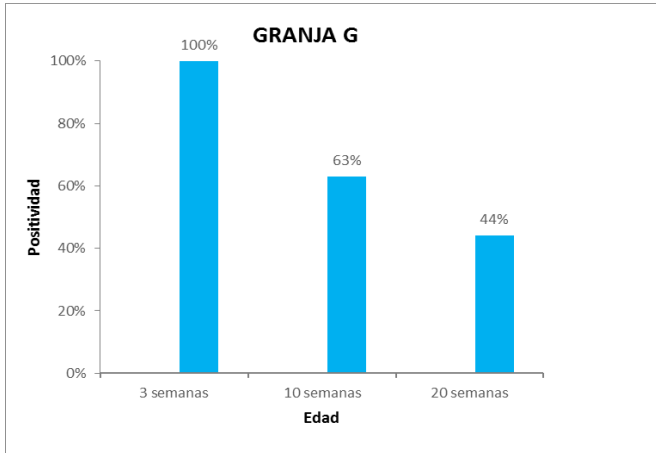
Se recomienda eliminar los reactivos y material contaminado según la legislación en vigor. Las fichas de datos de seguridad para los productos están disponibles bajo petición.



Solo uso veterinario.

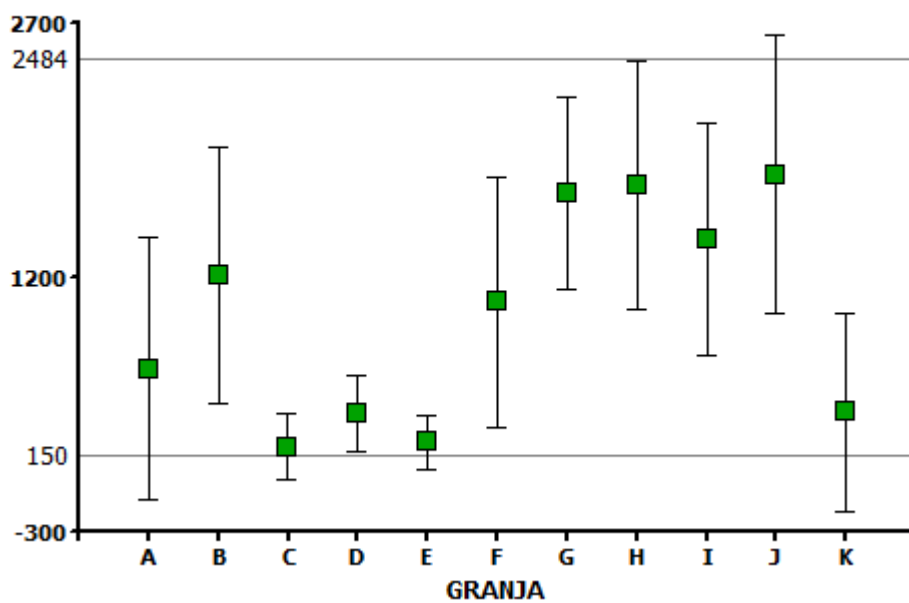
Anexo Nro. 3. Gráficos de porcentajes de positividad por edad para cada granja.



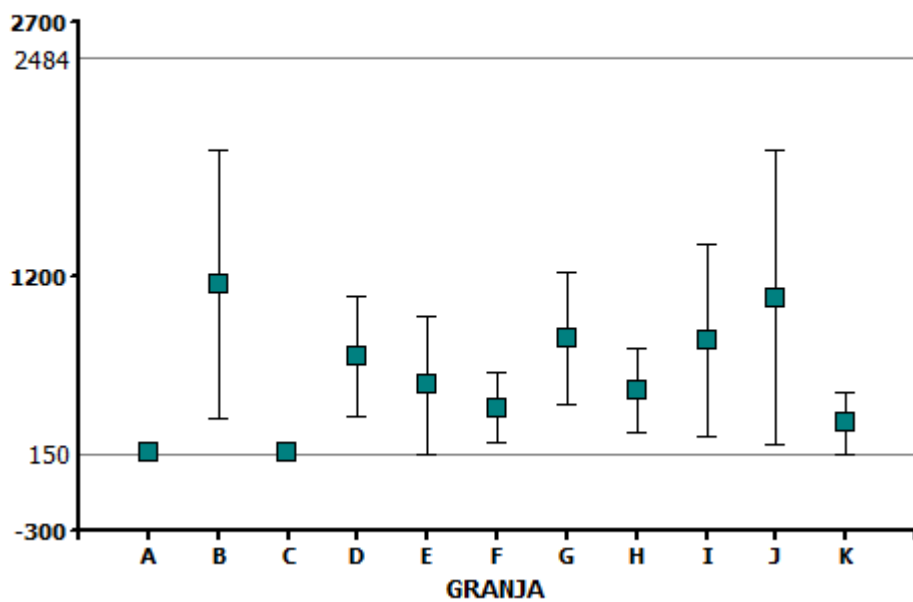


Anexo Nro. 4. Gráficos de títulos de anticuerpos por granja de cada edad.

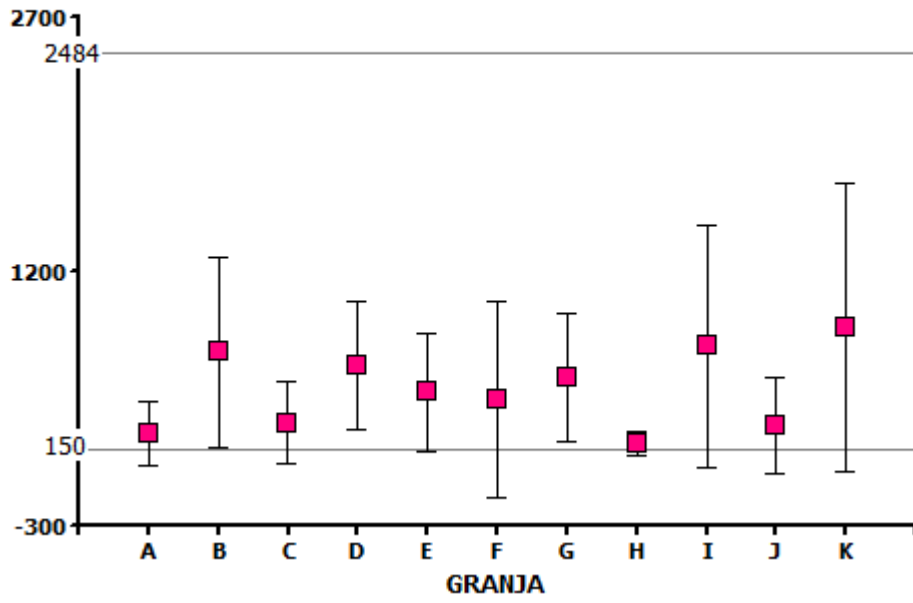
Títulos Ac 3 semanas



Títulos Ac 10 semanas



Títulos Ac 20 semanas



Anexo Nro. 5. Tabla resumen recopilación de información de las granjas analizadas.

Granja	Sistema	Status PRRS	Vacuna madres	Tamaño plantel
A	Monositio	Positivo	No	2400
B	Monositio	Positivo	No	400
C	Monositio	Positivo	No	1010
D	Monositio	Negativo	No	8063
E	Monositio	Negativo	No	7900
F	Multisitio	Positivo	No	3108
G	Multisitio	Positivo	Si	8331
H	Monositio	Negativo	No	850
I	Monositio	Negativo	No	590
J	Multisitio	Negativo	Si	1100
K	Multisitio	Negativo	No	2400

Anexo Nro. 6. Resultados Análisis de Varianza y prueba LSD Fischer (Infostat)

Resultados factores “granja” y “tiempo”:

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
S/N	528	0,39	0,38	42,66

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	22,11	12	1,84	27,75	<0,0001
Granja	21,38	10	2,14	32,22	<0,0001
Tiempo	0,72	2	0,36	5,44	0,0046
Error	34,18	515	0,07		
Total	56,29	527			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,10331

Error: 0,0664 gl: 515

Granja Medias n E.E.

	Medias	n	E.E.	
I	0,37	48	0,04	A
G	0,40	48	0,04	A B
B	0,46	48	0,04	A B C
D	0,50	48	0,04	B C
H	0,52	48	0,04	C
J	0,53	48	0,04	C
F	0,54	48	0,04	C
E	0,65	48	0,04	D
K	0,73	48	0,04	D
A	0,95	48	0,04	E
C	1,01	48	0,04	E

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

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,05395

Error: 0,0664 gl: 515

Tiempo Medias n E.E.

	Medias	n	E.E.	
1,00	0,55	176	0,02	A
2,00	0,61	176	0,02	B
3,00	0,64	176	0,02	B

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

Resultados factor “sistema”:

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
S/N	528	0,02	0,01	53,71

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,93	1	0,93	8,87	0,0030
Sistema	0,93	1	0,93	8,87	0,0030
Error	55,35	526	0,11		
Total	56,29	527			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,05765

Error: 0,1052 gl: 526

Sistema Medias n E.E.

Multi	0,55	192	0,02	A
Mono	0,64	336	0,02	B

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

Resultados factor “status PRRS”:

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
S/N	528	0,04	0,03	53,18

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,02	1	2,02	19,57	<0,0001
status PRRS	2,02	1	2,02	19,57	<0,0001
Error	54,27	526	0,10		
Total	56,29	527			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,05515

Error: 0,1032 gl: 526

status PRRS Medias n E.E.

Negativo	0,55	288	0,02	A
Positivo	0,67	240	0,02	B

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

Resultados factor “vacunación”:

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
S/N	528	0,04	0,04	53,08

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,23	1	2,23	21,71	<0,0001
Vacuna madres	2,23	1	2,23	21,71	<0,0001
Error	54,06	526	0,10		
Total	56,29	527			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,07135

Error: 0,1028 gl: 526

Vacuna madres	Medias	n	E.E.
Si	0,47	95	0,03 A
No	0,63	433	0,02 B

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

Resultados factor “tamaño”:

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
S/N	528	0,35	0,34	43,87

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	19,93	9	2,21	31,55	<0,0001
Tamaño	19,93	9	2,21	31,55	<0,0001
Error	36,36	518	0,07		
Total	56,29	527			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,10347

Error: 0,0702 gl: 518

Tamaño	Medias	n	E.E.
590,00	0,37	48	0,04 A
8331,00	0,40	48	0,04 A B
400,00	0,47	49	0,04 A B C
8063,00	0,50	48	0,04 B C
850,00	0,52	48	0,04 C
1100,00	0,53	48	0,04 C
3108,00	0,54	48	0,04 C
7900,00	0,65	48	0,04 D
2400,00	0,84	95	0,03 E
1010,00	1,01	48	0,04 F

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