

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA**

**CONSTATACIÓN DE UNA VACUNA SUBUNITARIA
INACTIVADA QUE CONTIENE LA PROTEÍNA ORF2 DEL
CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2 (CVP₂).**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

P.M.V.Z. BRENDA HERNÁNDEZ CHÁVEZ

**ASESORES: M.V.Z., Ph.D., Cert. Pedro Juan Bautista dela
Salle Fernando Pradal Roa.
M.V.Z. Octavio Cruz Chávez.**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

Con mucho cariño principalmente a mis padres que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento. Gracias Mamá y Papá por darme una carrera para mi futuro, gracias por haber fomentado en mí el deseo de superación, el anhelo de triunfo en la vida y por creer en mí, aunque hemos pasado momentos difíciles siempre han estado apoyándome y brindándome todo su amor, por todo esto les agradezco de todo corazón el que estén conmigo, los quiero con todo mi corazón y este trabajo que llevó un año en hacerlo; es para ustedes, por ser la más chica de sus hijos aquí está lo que ustedes me brindaron, solamente les estoy devolviendo una pequeña parte de lo que ustedes me dieron desde un principio.

A mis hermanos Karina y Erick, gracias por apoyarme y pasar momentos inolvidables y ser uno de los seres más importantes de mi vida los quiero mucho.

A mis tíos, primos y abuelos, por darme sus consejos y apoyo, cuando los necesitaba.

A mis Asesores: M.V.Z., Ph.D., Cert. Pedro Juan Bautista de la Salle Fernando Pradal Roa y M.V.Z. Octavio Cruz Chávez, por su colaboración, motivación, y asesoramiento a la realización de este proyecto

Mil palabras no bastarían para agradecerles su ayuda, su comprensión y sus consejos, en los momentos difíciles.

A todos, espero no defraudarlos y contar siempre con su valioso apoyo, sincero e incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Por brindarme la oportunidad de ser estudiante de la máxima casa de estudios del país y obtener una preparación profesional y humana que me ayuden a mi superación en la vida.

Todos sabemos que una tesis es el fruto del conocimiento y la colaboración de mucha gente, que brinda apoyo incondicional, por ello quiero agradecer:

A mis Asesores: M.V.Z., Ph.D., Cert. Pedro Juan Bautista de la Salle Fernando Pradal Roa y M.V.Z. Octavio Cruz Chávez, por dedicar su tiempo, orientación, por sus grandiosas enseñanzas y los medios para llegar al final de este proyecto.

A todos los M.V.Z's del Departamento de Vacunas y Reactivos del CENASA por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias, pero sobre todo por brindarme su amistad.

A mis padres, por ser los co-autores de todo este proceso y por darme todos los recursos para finalizar la carrera la cual me llena de orgullo.

A mi novio Víctor por creer en mi, estar a mi lado, por su comprensión y ayuda en todo momento tanto en el campo profesional como el personal

A mis amigos: Alex, Luis, Paola y Camilo, por estar en los mejores años de mi vida, en las buenas y en las malas sobre todo por brindarme su amistad incondicional.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC-CCL33	<i>American Type Culture Collection- CCL 33</i> (Colección de cultivo tipo americano CCL-33).
Cap	Proteína estructural de la cápside
CD4	Linfocitos T cooperadores
CD8	Linfocitos citotóxicos
CD	Diluyente de Conjugado
CFR	Código Federal de Regulaciones de los Estados Unidos de América.
CJ	Dilución Concentrado
CRP	Complejo Respiratorio Porcino
CVP	Circovirus Porcino
CVP ₁	Circovirus Porcino tipo 1
CVP ₂	Circovirus Porcino tipo 2
DC	Células Dendrítica
DNA	<i>Desoxiribonucleic acid</i> (ácido desoxiribonucleico).
DO	Densidad Óptica
ELISA	Prueba de Inmunoensayo Ligado a Enzimas
HIS	Hibridación <i>in situ</i>
ICTV	<i>The International Committee on Taxonomy of Viruses</i> , (Comité internacional de Taxonomía de Virus)
IA	Inseminación Artificial
IF	Inmunofluorescencia
IG	Inmunoglobulina
IH	Inmunohistoquímica
IPMA	Técnica de Inmunoperoxidasa en Monocapa Celular.
kB	Kilobases
kDa	Kilodalton
MDCK	<i>Mandin Darby Canine Kidney</i> (línea celular de riñón de canino)
ME	Microscopia Electrónica
nm	Nanómetros
nt	Nucleótidos
ORF	<i>Open Reading Frames</i> (fragmentos de lectura abierta)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
pH	Potencial de Hidrogeniones
PI	Post Infección
PK-15	<i>Porcine Kidney</i> (línea celular de riñón de porcino)

PMWS	<i>Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome</i> (Síndrome Multisistémico de Adelgazamiento Postdestete)
ppm	Partes por millón
PS	Substrato de peroxidasa tamponada
S	Solución de detención
SNDP	Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina
ST	<i>Swine Testis</i> (línea celular de testículo de porcino)
VERO	Células Epiteliales de Mono Verde Africano
vPPRS	<i>Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome</i> (Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino)
W	Solución concentrada de lavado

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

	Página
Figura 1. Circovirus Porcino tipo 2 (Microscopía electrónica).....	7
Figura 2. Patogenia del CVP ₂	14
Cuadro 1. Medios, temperaturas e inocúlos para la prueba de esterilidad.....	26
Cuadro 2. Distribución de sueros en microplaca.....	28
Cuadro 3. Prueba de esterilidad.....	32
Cuadro 4. Prueba de esterilidad para <i>Mycoplasma</i> spp.....	33
Cuadro 5. Prueba seguridad.....	34
Cuadro 6. Resultados generales de ELISA.....	35
Cuadro 7. Resultados de las densidades ópticas.....	36

CONTENIDO

	Página
Título.....	I
Dedicatorias.....	II
Agradecimientos.....	IV
Lista de Abreviaturas.....	VI
Lista de Figuras y Cuadros.....	VIII
Resumen.....	1
Abstract.....	3
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	5
a) Reseña histórica del Circovirus Porcino (CVP).....	5
b) Clasificación taxonómica.....	5
c) Circovirus Porcino tipo 2 (CVP) ₂	6
d) Epidemiología.....	8
e) Transmisión.....	9
f) Respuesta Inmune.....	9
g) Patogenia.....	11
h) Lesiones macroscópicas y microscópicas.....	15
i) Otros Síndromes Asociados al CVP ₂	16
j) Diagnóstico del CVP ₂ y SEMP.....	18
k) Control y prevención.....	21
l) Objetivo general.....	23
m) Objetivos específicos.....	23

CAPÍTULO 2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
1) Descripción de la Vacuna.....	24
2) Prueba de pH.....	24
3) Prueba de esterilidad.....	25
4) Animales.....	27
5) Prueba de seguridad.....	27
6) Prueba de inmunogenicidad.....	27
CAPÍTULO 3. RESULTADOS.....	31
1) pH.....	31
2) Esterilidad.....	31
3) Seguridad.....	31
4) Inmunogenicidad.....	35
CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN.....	37
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.....	40
CAPÍTULO 6. LITERATURA CITADA.....	42

RESUMEN

BRENDA HERNÁNDEZ CHÁVEZ. CONSTATAción DE UNA VACUNA SUBUNITARIA INACTIVADA QUE CONTIENE LA PROTEÍNA ORF2 DEL CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2 (CVP₂) (BAJO LA SUPERVISIÓN DEL: M.V.Z., Ph.D., CERT. PEDRO JUAN BAUTISTA DE LA SALLE FERNANDO PRADAL ROA Y EL M.V.Z. OCTAVIO CRUZ CHÁVEZ).

La infección por Circovirus Porcino tipo 2 (CVP₂), se asocia con el Síndrome de Emaciación Multisistémico Postdestete (SEMP/PMWS), y está vinculado con el Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina (PDNS). La circovirosis está distribuida mundialmente en todas las poblaciones porcinas y en México se encuentra diseminada en varios estados. Como parte de su control y prevención se han utilizado varias vacunas, las cuales están elaboradas con ingeniería genética, algunas son de: a) virus quimérico inactivado que contiene la proteína ORF2 insertada en el virus CVP₁, b) virus recombinantes que utilizan un *Baculovirus* inactivado y c) virus inactivado. Para evaluar que las vacunas sean inmunogénicas en los cerdos, se deben constatar por medio de pruebas fisicoquímicas y biológicas, verificando que cumplan con los estándares de calidad. Dentro de las Normas Oficiales Mexicanas no están contempladas las vacunas contra CVP₂, y la constatación se lleva a cabo con el protocolo de calidad del laboratorio productor y los estándares establecidos por el Código Federal de Regulaciones (CFR/USA). En este estudio se llevó a cabo la constatación general de una vacuna subunitaria inactivada, que contiene la proteína ORF2 del CVP₂. Los requisitos para su uso en cerdos, se verificaron al realizar las pruebas físicas y biológicas, y se concluyó que cumple con las pruebas de control de manera satisfactoria para su registro y uso; resultando

efectiva por seroconversión del 80% en los cerdos vacunados, del mismo modo se pudo corroborar que es inocua y segura al no haber efectos adversos atribuibles a la vacuna, en los cerdos y cobayos utilizados.

ABSTRACT

BRENDA HERNÁNDEZ CHÁVEZ. TESTING OF AN INACTIVATED SUBUNIT VACCINE CONTAINING THE ORF2 PROTEIN FROM THE PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 (PCV2) (UNDER THE DIRECTION OF: M.V.Z., Ph.D., CERT. PEDRO JUAN BAUTISTA DE LA SALLE FERNANDO PRADAL ROA AND M.V.Z. OCTAVIO CRUZ CHÁVEZ).

Infection with Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) is associated with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) and it is also related to the Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome (PDNS). Circovirus is distributed worldwide in all pig populations and in Mexico is prevalent in several states. As part of its control and prevention several vaccines have been used, which are made with genetic engineering, including: a) inactivated chimeric virus, b) inactivated recombinant viruses and c) inactivated viruses. To assess immunogenicity of the vaccines in pigs, physicochemical and biological tests should be performed in order to verify that it meets quality standards. Within the Mexican Official Standards PCV2 vaccines are not included, so the protocol for testing this biological was verified with the laboratory quality producer protocol and the standards set by the Code of Federal Regulations (CFR/USA). In this study it was carried out the general testing of an inactivated subunit vaccine containing the ORF2 protein from the Porcine Circovirus type 2 (PCV2). The requirements needed for their use in pigs were verified by performing physical and biological tests, and it was concluded that meets the quality control tests satisfactorily for registration and use, resulting effective through positive seroconversion of up to 80% of the vaccinated pigs, as well as it probed to be

safe and secure in the absence of adverse effects attributable to the vaccine in the pigs and guinea pigs used in the study.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

a) Reseña histórica del Circovirus Porcino (CVP)

Fue descrito por primera vez hace treinta y nueve años como un virus contaminante de la línea celular de riñón de cerdo PK-15 (ATCC-CCL33) (Tischer, *et al.*, 1974). Denominándose *Pircornavirus-like* y se aislaba de manera sistemática en los subcultivos de todas las líneas celulares PK-15 y en grandes cantidades.

Estudios posteriores revelaron que el *Pircornavirus-like* era un virus DNA de cadena sencilla circular, sin envoltura, icosaédrico y un diámetro de 17 nm (Tischer, *et al.*, 1982). Este virus no había sido descrito previamente y fue denominado como Circovirus Porcino (CVP) por Allan, *et al.*, y Meehan, *et al.*, en 1998. Posteriormente estudios epidemiológicos y de patogenicidad, demostraron que los cerdos tenían anticuerpos séricos contra este virus, sin presentar ningún signo clínico de enfermedad. En el año de 1997 el CVP fue asociado a una enfermedad, que afectaba a cerdos en crecimiento conocida como Síndrome de Emaciación Multisistémica post-destete (SEMP/PMWS) (Clark, *et al.*, 1997). Esta enfermedad ya era conocida desde 1991 en Canadá, pero sin haberse establecido su etiología (Harding, 1996; Clark, 1997; Harding, *et al.*, 1997; Harding, *et al.*, 1998).

b) Clasificación taxonómica

El CVP está clasificado por el Comité Internacional Taxonómico de virus (ICTV) en una nueva familia *Circoviridae* (Lukert, *et al.*, 1995). Estudios posteriores de secuenciación demostraron que el CVP presente en los cerdos afectados con SEMP era diferente al CVP contaminante de la línea celular PK-

15 (Hamel, *et al.*, 1998; Meehan, *et al.*, 1998); Por ello se sugirió la denominación del CVP₁ para el contaminante de la línea celular considerado apatógeno y CVP₂ asociado con el SEMP (Allan, *et al.*, 1998; Meehan, *et al.*, 1998). Los circovirus porcinos pertenecen a la familia *Circoviridae*, la cual está dividida en dos géneros *Gyrovirus* (Gyro es una derivación del griego giro, lo que significa anillo o circuito) y *Circovirus* (Circo, que el genoma viral tiene una conformación circular) (Segalés, 2006). El género *Circovirus* contiene el CVP₁ y CVP₂, se reconocen tres subtipos del CVP₂: CVP_{2a}, CVP_{2b} y CVP_{2c}, el subtipo a y b se reconocen en todo el mundo mientras que el subtipo c sólo se reconoce en algunas partes de Europa (Segalés, *et al.*, 2008; Gagno, *et al.*, 2007).

c) Circovirus Porcino tipo 2 (CVP₂)

Características Físicoquímicas

Los circovirus porcinos son virus sin envoltura de 15-24 nm, con simetría icosaédrica (ver Figura 1). (Tischer, *et al.*, 1982; Mankertz, *et al.*, 2000). Su genoma consiste en cadena de DNA sencilla, circular, con un tamaño de 1.76 kb (Tischer, *et al.*, 1982; Hamel, *et al.*, 1998; Meehan, *et al.*, 1998; Fenaux, *et al.*, 2000), su peso molecular es de 36 ± 2 kDa, sin capacidad para hemoaglutinar, es resistente al cloroformo y a la inactivación a un pH3, estable a 70°C durante 15 minutos (Segalés, *et al.*, 2005a). La exposición de CVP₂ durante 10 minutos a temperatura ambiente y varios desinfectantes como la clorhexidina, formaldehído, yodo y alcohol inactivan la infectividad (Royer, *et al.*, 2001).

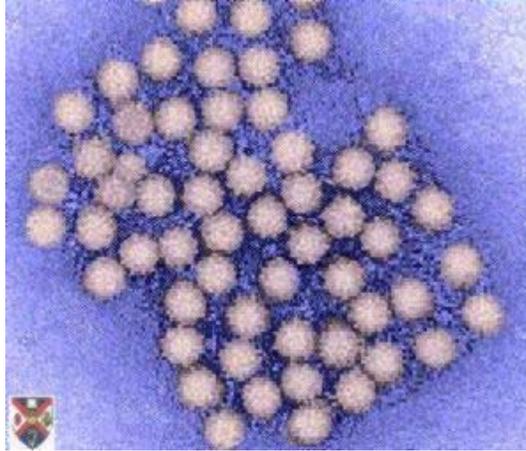


Figura 1. Circovirus Porcino tipo 2 (Microscopía electrónica). Fuente: www.syva.es

Características del genoma

El genoma del CVP₂ contiene 1767 a 1768 nucleótidos de largo (Hamel, *et al.*, 1998; Meehan, *et al.*, 1998; Fenaux, *et al.*, 2000; Makertz, *et al.*, 2000). Se han descrito entre 95-99% de identidad nucleotídica entre los CVP₂ aislados de cerdos enfermos y sanos en Canadá y USA y un 95-96% en Europa (Meehan, *et al.*, 1998; Makertz, *et al.*, 2000; Larochelle, *et al.*, 2002).

El genoma de CVP₂ tienen un 69% de similitud con el CVP₁ observándose en la primera mitad de la cadena entre los nucleótidos (nt) 1 al 900 que existe un 82% de similitud, mientras que en la segunda mitad de la cadena entre los nt 901 al 1768 existe un 62% de similitud (Hamel, *et al.*, 1998; Meehan, *et al.*, 1998; Morozov, *et al.*, 1998).

Se caracteriza por tener marcos de lectura abierta: Open Reading Frames (ORF_s), se han descrito hasta 11 ORF_s potenciales en el genoma. Dos marcos principales de lectura abierta han sido reconocidos de especial interés en la inmunidad y diagnóstico, ORF1 que codifica proteínas de 35,7 kDa que participan en la replicación viral y ORF2 que codifica una proteína estructura de 28,7 kDa para la cápside y la producción de anticuerpos (Liu, *et al.*, 2006;

Gagnon, *et al.*, 2007 (Hamel, *et al.*, 1998).). Se ha identificado una nueva proteína ORF3 de 315 pares de bases (pb) que codifica una proteína la cual induce la apoptosis, pero no se ha comprobado (Liu, *et al.*, 2005; Liu, *et al.*, 2006; Gagnon, *et al.*, 2007).

Se ha observado que la ORF2 del CVP1 y del CVP2 presenta una similitud nucleotídica en sus secuencias de entre un 65 a 67% por lo que el ORF2 o su proteína podría ser útil en la elaboración de pruebas de diagnóstico para diferenciar los dos virus (Liu *et al.*, 2006). La variación entre los genomas de CVP1 y CVP2 sería, aparentemente la causa de la diferencia en la virulencia (Hamel, *et al.*, 1998).

d) Epidemiología

Distribución geográfica

El CVP₂ es considerado un virus ubicuo en los cerdos domésticos y salvajes. (Taylor, 2013; Segalés, *et al.*, 2002; Vincent, *et al.*, 2004; Allan, *et al.*, 2000). Se han determinado anticuerpos circulantes contra CVP₂ en cerdos de Norteamérica, Europa (España, Francia, Reino Unido, Bélgica, Irlanda, Italia), Asia, África, con excepción de Australia en Oceanía. Estudios retrospectivos mostraron que el CVP₂ ha estado presente en cerdos de Europa desde 1969 y en Canadá desde 1985 (Noriega, *et al.*, 2007).

En México la primera descripción de la enfermedad fue realizada por Trujano y Col., en el 2002, y el primer aislamiento se llevó a cabo en el 2004 por Ramírez y Col. Hasta el momento se han reportado casos de CVP₂ en cerdos de granjas de ciclo completo en diferentes estados de la república (García y col., 2003; Torres y col., 2006). Actualmente no hay informes de la

prevalencia que existe en el país y el impacto económico que genera (Guillermo y col., 2009).

e) Transmisión

La ruta de infección y transmisión es horizontal por contacto directo, siendo considerada la vía oro-nasal la ruta más frecuente de infección de entre animales infectados y susceptibles (Segalés, *et al.*, 2005a; Noriega, *et al.*, 2007). Estudios experimentales ha determinado CVP₂ en heces entre 4 - 24 días Post Infección (PI). En lechones infectados de forma natural y/o experimental se ha determinado la presencia en heces, orina, saliva y secreciones oculares, siendo probables vías de excreción del virus (Resendes, *et al.*, 2001; Krakowka, *et al.*, 2000). Puede atravesar barrera placentaria, se determinó en muestras de semen por lo que la Inseminación Artificial (IA) y la monta natural son consideradas como una vía para diseminar el CVP₂ (Opriessnig, *et al.*, 2007).

f) Respuesta Inmune

Inmunidad humoral frente al CVP₂

La seropositividad frente a CVP₂ de los anticuerpos calostrales se mantiene aproximadamente hasta la 12va semana de edad. Los cerdos infectados seroconvierten en promedio entre el día 14 y 28 PI, es importante resaltar que la detección de anticuerpos totales no es un factor que permita predecir el desarrollo de la infección, ya que se ha observado que no todos los anticuerpos que un animal produce tienen actividad neutralizante. La respuesta de anticuerpos neutralizantes aparece a partir del día 15 de infección y

comúnmente son de la clase IgG (Resendes, *et al.*, 2001; Blanchard, *et al.*, 2003).

Efecto del CVP₂ frente a las células del sistema inmune

El CVP₂ se localiza principalmente en células de la línea mononuclear monocito/macrófago, así como algunas células presentadoras de antígeno tales como las células dendríticas (DC). La interacción entre el CVP₂ y estas células es lo que contribuyen a la modulación de la respuesta inmune, la transmisión de la enfermedad y la persistencia, se puede determinar por periodos prolongados de hasta 3 años con baja o nula actividad replicativa (Clark, 1997; Rosell, *et al.*, 1999; Kennedy, *et al.*, 2000; Shibahara, *et al.*, 2000).

Las células dendríticas son importantes para el sistema inmune ya que son responsables de dirigir y modular la respuesta frente patógenos, sin embargo son el blanco fácil para que el CVP₂ pueda evadir la respuesta inmune, infectando células dendríticas en estado maduro e inmaduro y una de las principales consecuencias de la infección es el bloqueo de las células dendríticas para presentar antígenos, ya que disminuye la expresión de las moléculas responsables de estimular a los linfocitos. En sangre y órganos linfoides las alteraciones son similares, se observa una disminución en los linfocitos T (CD4⁺), (CD8⁺), B y un aumento de los linfocitos circulantes (Vincent, *et al.*, 2005; Segalés, *et al.*, 2005a). Se sabe que parte de este efecto es causado por el DNA viral de doble cadena que se forma en la replicación viral dentro de la célula infectada (Segalés, *et al.*, 2001; Darwich, *et al.*, 2002; Vincent, *et al.*, 2003). En suma estos efectos se traducen en una incapacidad

del sistema inmune para responder adecuadamente ante el virus u otros agentes infecciosos (Hernández, 2011, Opriessnig, *et al.*, 2007).

En cerdos infectados sin inmunidad, por no estar vacunados o porque han perdido la inmunidad materna, la interacción que tiene el virus con las DC será clave en el desarrollo de una inmunidad protectora. Es interesante resaltar que este escenario (interacción CVP₂ con célula dendrítica) se presenta en situaciones diferentes: animal sano que se infecta y desarrolla signos clínicos de la enfermedad, animal sano que se infecta y no desarrolla signos clínicos, animal vacunado que se infecta y animal vacunado que no se infecta (Hernández, 2011).

Los anticuerpos neutralizantes son importantes en la eliminación del virus en circulación, esto se demuestra por el hecho de que los cerdos sin anticuerpos neutralizantes anti-CVP₂ o con bajos niveles, desarrollan el SEMP/PMWS (Fort, *et al.*, 2007; Meerts, *et al.*, 2006). La inmunidad materna es crítica en el control del SEMP, por ello es importante que las cerdas, en especial las de reemplazo tengan buenos niveles de inmunidad para que ésta sea transferida eficientemente a sus crías (Hernández, 2011).

g) Patogenia

El circovirus es causante del SEMP, pero generalmente no es suficiente para desencadenar la enfermedad clínica, los factores que favorecen que este virus induzca el SEMP son; el Síndrome Dermatítico y Nefropático Porcino (SNDP), Enfermedad del Complejo Respiratorio Porcino, virus del Síndrome Reproductivo Respiratorio Porcino (vPRRS) y Parvovirus Porcino. El CVP₂

afecta a los cerdos de todas las edades y el SEMP se presenta generalmente en animales de 8 a 16 semanas de edad, la morbilidad en las poblaciones de cerdos afectadas es del 30% y la mortalidad oscila entre el 4-20%. La seroprevalencia en las poblaciones porcinas oscila entre el 15 y 100% independientemente de la existencia del SEMP. Se observa que los cerdos de engorda, las cerdas y verracos presentan una prevalencia prácticamente del 100%, mientras que en los cerdos de 8 a 16 semanas de vida presentan una seroprevalencia más baja (Allan, *et al.*, 2000; Segalés, *et al.*, 2005a).

Las proteínas virales se encuentran principalmente en el citoplasma de los histiocitos, células gigantes multinucleadas, macrófagos alveolares, células de Kupffer y células dendríticas foliculares de los tejidos linfoides, esporádicamente se detecta el CVP₂ en citoplasma de las células epiteliales del riñón, células del endotelio vascular, hepatocitos, músculo liso y enterocitos (Darwich, *et al.*, 2004). Se desconoce como el CVP₂ entra a las células y realiza su replicación viral, se asume que el CVP₂ llega al citoplasma de las células mononucleares resultado de la fagocitosis de células infectadas o por endocitosis antes de la presentación del antígeno. Se postula que hay un receptor específico del CVP₂ en la superficie de los macrófagos que permite que el virus penetre hasta el citoplasma, tal receptor no se ha identificado pero parece razonable pensar que el CVP₂ pueda llegar al citoplasma de las células usando ambas vías (Darwich, *et al.*, 2004).

Como el CVP₂ no codifica su propia DNA polimerasa para su replicación viral, depende de la polimerasa celular presente en el núcleo durante la mitosis celular. Cuando se da la infección vertical por placenta, la replicación del CVP₂ se lleva a cabo en los tejidos o células con mayor actividad mitótica como los

miocardiocitos fetales. En los lechones se encuentra en el citoplasma de las células del sistema mononuclear fagocitario y DC. El gran número de CVP₂ encontrados en los macrófagos de cerdos enfermos es el resultado de la acumulación de partículas virales liberadas durante la infección persistente, probablemente algunas semanas antes del inicio de los signos clínicos. En condiciones experimentales el periodo de incubación del CVP₂ puede durar de 2 a 4 semanas y durante ese tiempo se va acumulando el virus en los linfonodos hasta los primeros signos de la enfermedad (Darwich, *et al.*, 2004).

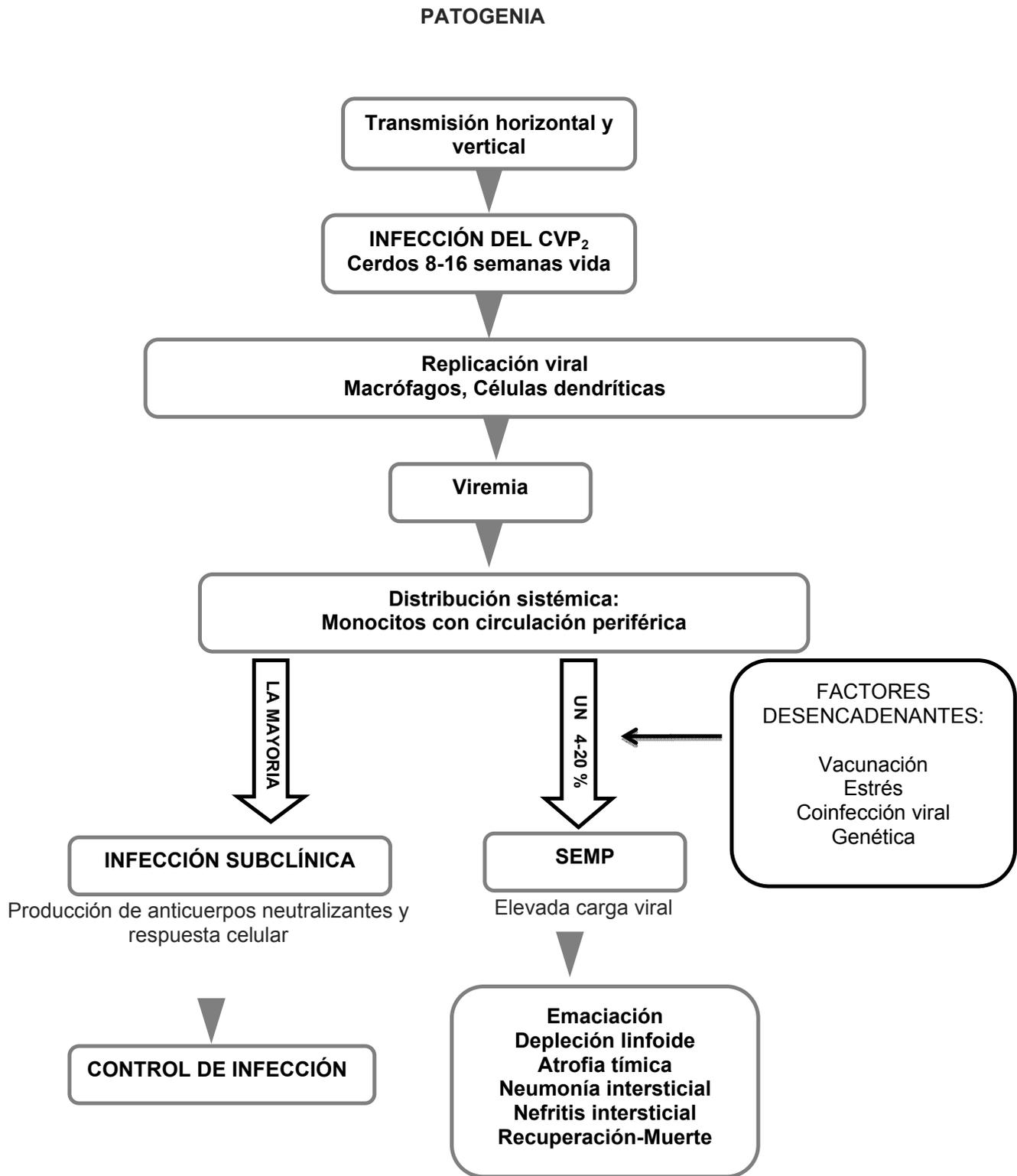


Figura No. 2. Representación de la patogenicidad del CVP₂

h) Lesiones macroscópicas y microscópicas

Las lesiones más frecuentes en cerdos de 8 a 16 semanas son neumonía intersticial y linfadenopatía generalizada, especialmente en linfonodos inguinales y en animales de más de 16 semanas se observan lesiones en hígado, riñón y estómago (Tanja, *et al.*, 2007; Segalés, *et al.*, 2005b; Cano, *et al.*, 2004; Ellis, *et al.*, 1998; Clark, 1997; Clark, *et al.*, 1998).

Los linfonodos se observan aumentados de tamaño con coloración blanquecina (Rosell, *et al.*, 1999).

En los pulmones se observa ausencia de colapso pulmonar con un marcado patrón lobulillar y algunas zonas de consolidación pulmonar en lóbulos diafragmático y apical, atribuidas a infecciones bacterianas (Segalés, *et al.*, 2004; Clark, *et al.*, 1997).

El hígado se observa atrofiado, con áreas de decoloración en el parénquima con presencia de prominente tejido conjuntivo. En los riñones se observan múltiples focos blanquecinos en la corteza renal. En el estómago es frecuente encontrar la presencia de úlceras en el pars oesophagica y la pared puede estar ligeramente edematosa, aunque este hallazgo no se asocia propiamente a la infección por CVP₂, sino a efectos colaterales de la enfermedad (Taylor, 2013).

Las principales lesiones microscópicas se observan en los órganos linfoides y consisten en atrofia linfoide, inflamación granulomatosa y necrosis, en donde 30 a 35% de los casos presentan cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos como racimos de uvas en macrófagos.

En los pulmones se observa neumonía intersticial linfocitocítica con hiperplasia de moderada a severa de neumocitos tipo II, los alvéolos contienen

un material eosinofílico con detritus celulares y macrófagos, los lóbulos consolidados muestran bronconeumonía supurativa de moderada a severa caracterizada por necrosis del epitelio e hiperplasia del tejido linfoide (Cano, *et al.*, 2004; Segalés, *et al.*, 2006; Tanja, *et al.*, 2007).

Se observa hepatitis periportal linfocítica característica, en los casos severos hay lipidosis hepática, desorganización de los sinusoides y necrosis difusa de hepatocitos con fibrosis perilobulillar (Krakowka, *et al.*, 2004).

En los riñones la lesión característica es nefritis intersticial linfoplasmohistiocítica multifocal (Cano, *et al.*, 2004; Ellis, 2003; Segalés, *et al.*, 2006).

i) Otros síndromes asociados al CVP₂

Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina (SDNP/PDNS)

El SDNP se describió por primera vez en Reino Unido en 1993 (Smith, *et al.*, 1993). Puede afectar a cerdos en destete, crecimiento y adultos, la prevalencia del SDNP usualmente es menor de 1%, la mortalidad es cercana al 100% en los cerdos mayores de 3 meses, en comparación con los cerdos jóvenes en donde la mortalidad es del 50% (Pradal-Roa, 2001; Segalés, *et al.*, 2004).

Los signos clínicos del SDNP, se caracterizan por emaciación, depresión, pérdida de condición y fiebre, algunos pueden presentar claudicación, postración, incoordinación y ocasionalmente diarrea de color negruzca (Trujano y col., 2002).

Macroscópicamente las lesiones de la piel consisten en máculas redondas, irregulares púrpuras principalmente en miembros posteriores y zona

caudoventral del abdomen que coalescen fuera del perineo y distal a los miembros en forma de parches irregulares. Los riñones se observan aumentados de tamaño y coloración blanquecina o rojo oscuro con múltiples hemorragias petequiales en el parénquima (White, *et al.*, 1993). Los linfonodos se observan aumentados de tamaño, edematosos o congestionados y hemorragias superficiales (Ramos Vara, *et al.*, 1997; Segalés, *et al.*, 1997). Otro hallazgo menos frecuente son las úlceras en el estómago en la región esofágica como en la fúndica (Durán, *et al.*, 1997).

Las lesiones histológicas se caracterizan por dermatitis perivascular linfocistihiocítica o neutrofilica y hemorragias multifocales difusas. Las lesiones renales son glomerulonefritis fibrinoide, vasculitis necrozante y cumulos de eritrocitos en el lumen de los túbulos renales. Las lesiones en otros órganos se caracterizan por vasculitis necrozante, principalmente en linfonodos, hígado, bazo, estómago, pulmón, y cerebro (Thompson, *et al.*, 2002).

Complejo Respiratorio Porcino (CRP)

En la actualidad sabemos que el CVP₂ tiene un papel importante en el CRP observada principalmente en cerdos de 8-26 semanas de edad, se asocia a una combinación de agentes virales y bacterianos tales como vPRRS, Influenza porcina, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuroneumoniae* y *Pasteurella multocida* (Halbur, 1998; Thacker, 2001).

Se caracteriza principalmente por disminución de la tasa de crecimiento, letargo, anorexia, fiebre, disnea y resistencia a la terapia con antibióticos. La identificación de CVP₂ en la neumonía proliferativa necrotizante ha hecho que

algunos autores sugieran que el CVP₂ predispone al CRP (Halbur, 1998; Ellis, *et al.*, 1999).

Enfermedades Reproductivas

Los daños en la reproducción causados por el CVP₂ ocurren de modo esporádico durante brotes del SEMP se manifiestan en forma de abortos, aumento en el número de mortinatos y momias, pudiendo identificar al CVP₂ en hígado y corazón, sugiriendo la posibilidad de mecanismos de persistencia y el desarrollo de la inmunotolerancia en los lechones (West, *et al.*, 1999; Harms, *et al.*, 1999, Jolie, *et al.*, 2000; Harding, *et al.*, 2004). Sin embargo el CVP₂ asociado a la enfermedad reproductiva en condiciones de campo es poco frecuente (Pensaert, *et al.*, 2004). Las lesiones causadas son congestión pasiva hepática e hipertrofia cardíaca y áreas multifocales con decoloración del miocardio. La lesión microscópica principal corresponde a una miocarditis fibrosa (West, *et al.*, 1999).

j) Diagnóstico del CVP₂ y SEMP

El diagnóstico se basa en tres criterios:

1. Signos clínicos
2. Presencia de las lesiones histopatológicas.
3. Determinación del CVP₂ en los órganos linfoides (Harding, *et al.*, 1998; Sorden, *et al.*, 2000).

Existen diversas técnicas para el diagnóstico de la infección por CVP₂, por lo que es importante resaltar que la detección del virus no es equivalente a la existencia de SEMP. Estudios epidemiológicos realizados en Francia, UK y España, han demostrado que es posible encontrar numerosas granjas porcinas

con un alto porcentaje de animales con virus y/o anticuerpos contra CVP₂ sin evidencia de signos clínicos o lesiones. Por ello, la interpretación de resultados de diagnóstico deben ser evaluados cuidadosamente, ya que ni la presencia de virus en sangre o/y órganos linfoides, ni la presencia de anticuerpos específicos contra CVP₂ es indicativo de la presencia del SEMP. En todos los casos el diagnóstico definitivo sobre la presencia o no SEMP está relacionada con los tres criterios (Agüero, *et al.*, 2000; Segalés, *et al.*, 2005b; Tanja, *et al.*, 2007).

Inmunohistoquímica (IH)

La IH es la prueba donde se utiliza un anticuerpo monoclonal o policlonal para detectar el antígeno del CVP₂ en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina (Rosell, *et al.*, 1999; Segalés, *et al.*, 2004 y 2005; McNeilly, *et al.*, 1999; Allan, *et al.*, 2000).

Hibridación *in situ* (HIS)

Es la prueba que se realiza para la detección de ácido nucleico del CVP₂, en secciones de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina. La HIS permite detectar la ubicación de ácido nucleico viral dentro de la célula y su distribución en los tejidos, así como correlacionar las lesiones microscópicas observadas con la presencia de CVP₂ (Rosell, *et al.*, 2000b; Segalés, *et al.*, 2004). Utilizando sondas de DNA específicas que hibridan con fragmentos de genoma presentes en muestras sospechosas de CVP₂. La sonda normalmente lleva una molécula diana anclada, que posteriormente es reconocida por un anticuerpo monoclonal específico conjugado con una enzima (Allan, *et al.*, 1998; Rosell, *et al.*, 2000a; Choi, *et al.*, 1999).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR múltiple permite la detección simultánea y la caracterización del CVP₁ y CVP₂ en una sola reacción de PCR, se amplifican productos específicos de 703 pb del ORF1, a partir del DNA del CVP₂ (Carrera, *et al.*, 2012; Fort, *et al.*, 2007; Liu, *et al.*, 2006; Rovira, *et al.*, 2002). Los genomas determinados también pueden ser secuenciados mediante la utilización de la técnica de poliformismo de longitud de un fragmento de restricción (RFLP), es posible la caracterización y la clasificación de cada CVP en estudio (Segalés, *et al.*, 2005b; Fenaux, *et al.*, 2000; Hamel, *et al.*, 2000; Agüero, *et al.*, 2000;).

Microscopía Electrónica (ME)

Técnica de uso ocasional en el diagnóstico del CVP₂ debido a que solo permite evidenciar la presencia de partículas víricas compatibles morfológicamente con el CVP₂ mediante tinción negativa (Ellis, *et al.*, 1998; Kiupel, *et al.*, 1998).

Aislamiento viral

El aislamiento de CVP₂ se realiza por inoculación de macerados de muestras sospechosas sobre líneas celulares sensibles, células de riñón de cerdo (PK15), células de testículo de cerdo (ST); aunque también es posible su replicación en otras líneas como las células epiteliales de mono verde africano (VERO) y células de riñón de canino *Madin-Darby* (MDCK). El tratamiento de las células infectadas con glucosamina es importante para lograr una adecuada replicación del CVP₂. Al no producir efecto citopático, la replicación viral se observa mediante el empleo de técnicas de detección viral, IH,

Inmunofluorescencia (IF) o PCR (Agüero, *et al.*, 2000; Segalés, *et al.*, 2005b; Liu, *et al.*, 2006).

Detección de anticuerpos contra CVP₂

Algunas técnicas para la detección de anticuerpos específicos contra CVP₂, la técnica de inmunoperoxidasa en monocapa de células (IPMA) se lleva a cabo con la infección de un cultivo celular con CVP₂ y la adición de un anticuerpo monoclonal específico que actúa como reactivo competitivo, inmunofluorescencia indirecta e inmuno ensayos ligados a enzimas indirectas (ELISA) donde se emplea como antígeno una proteína de la cápside (ORF2) del CVP₂ y ELISA de competencia utiliza un anticuerpo monoclonal específico que actúa como reactivo competitivo (Rodríguez-Arriola, *et al.*, 2000; Nawagitgul, *et al.*, 2002; Fort, *et al.*, 2007; Chevez, *et al.*, 2012).

k) Control y prevención

Se considera que la infección por CVP₂ ocurre de forma subclínica en el 100% de los cerdos en destete y engorda. Ya que es una enfermedad multifactorial en el que intervienen agentes infecciosos (bacterianos y virales) y otros factores no infecciosos. El éxito del tratamiento y control de las enfermedades asociadas al CVP₂ se ha centrado principalmente en asegurar prácticas que reduzcan en mínimo de estrés, en la eliminación de coinfecciones y reducir al mínimo su efecto (Guillermo, y col., 2009). Un plan de control de 20 puntos fue propuesto por Francois Madec en el año 2000, para reducir al mínimo el impacto del SEMP en los cerdos de granjas porcinas afectados severamente (Madec, *et al.*, 2000; Guillermo, y col., 2009).

Son un grupo de 20 medidas perfectamente aplicadas a la mayoría de granjas que cursan con los procesos clínicos del SEMP, independientemente de la causa que lo provoca. El plan sería el siguiente; Aplicar estas medidas en las Unidades de pie de cría, Unidades de destete y Unidades de crecimiento y finalización. Además, se debe considerar un buen programa de vacunación; (Madec, *et al.*, 2000). También es recomendable el uso de desinfectantes eficaces en los edificios y vehículos de transporte (Royer, *et al.*, 2001).

Vacunas disponibles contra CVP₂

En la actualidad existen diferentes vacunas comerciales que han utilizado la proteína *Cap* por su capacidad inmunogénica como: a) vacunas recombinantes que utilizan un *baculovirus* inactivado, actuando como vector para expresar la proteína *Cap*; estas vacunas son recomendadas para su uso en lechones y cerdos en crecimiento (Blanchard, *et al.*, 2003; Progranichniy, *et al.*, 2004), b) vacuna a base de virus inactivado, recomendada para su uso en hembras gestantes. En términos generales todas las vacunas han permitido la protección de los cerdos por inmunidad activa, han sido capaces de disminuir la mortalidad y aumentar la ganancia de peso.

Algunas investigaciones han sugerido un posible efecto de las líneas genéticas sobre la susceptibilidad al CVP₂, especialmente relacionadas con líneas de machos. Han descubierto mayor susceptibilidad en líneas de tipo Landrace al compararlos con Duroc o Large-White (Opriessning, *et al.*, 2004a).

I) OBJETIVO GENERAL

Evaluar una vacuna subunitaria inactivada que contiene la proteína ORF2 del CVP₂, verificando que se cumpla con las especificaciones para prevención y control de la enfermedad.

m) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.** Realizar de acuerdo a lo establecido las pruebas de pH y esterilidad.
- 2.** Efectuar la prueba de seguridad en cerdos y cobayos.
- 3.** Evaluar la inmunogenicidad por la prueba de ELISA.

CAPÍTULO 2. MATERIAL Y MÉTODOS

1) Descripción de la Vacuna

Es una vacuna subunitaria inactivada contiene la proteína ORF2 del CVP₂ como antígeno con adyuvante oleoso, para su uso en cerdos destetados en dosis de 2 mL intramuscular en la tabla del cuello.

La constatación fue realizada en el Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA), organismo del Sistema Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, ubicado en el Km 37.5 de la carretera México-Pachuca libre, en Santa Ana Tecámac, Estado de México; las características de calidad requeridas para su uso, se verificaron al realizar las pruebas físicas y biológicas en el departamento de vacunas y reactivos, con el protocolo de control de calidad de las pruebas del laboratorio productor, lo establecido por la NOM-063-ZOO-1999 “Especificaciones que deben de cumplir los biológicos empleados en la prevención y control de enfermedades que afecta a los animales domésticos” y el Código Federal de Regulaciones de los Estados Unidos de América (CFR).

2) Prueba de pH

El **pH** (potencial de hidrógeno) es una medida de acidez o alcalinidad de una disolución. El pH indica la concentración de hidrogeniones $[H_3O^+]$ presentes en determinadas sustancias. Se requiere la determinación de pH para su estabilidad durante su vigencia.

PROCEDIMIENTO

- Efectuar la determinación a $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Enjuagar el electrodo del potenciómetro en un vaso de precipitado Pirex de 50 mL con agua destilada, dejando que escurra el agua y secar con papel absorbente el exceso.
- Verificar el pH con soluciones estándares 4 - 7 y 9.
- Sumergir el electrodo en el vaso de precipitado Pirex de 50 mL que contiene la vacuna.
- El procedimiento se realiza por duplicado.
- Registrar la lectura de pH de la vacuna.

Interpretación de resultados: Se considera satisfactorio cuando cumpla con las especificaciones marcadas (6.0-7.5) e insatisfactorios cuando estén fuera del rango permisible.

3) Prueba de esterilidad

Consiste en determinar que la vacuna se encuentra libre de microorganismos contaminantes.

PROCEDIMIENTO

- Desinfectar el frasco de la vacuna con alcohol al 70%.
- Extraer el líquido del envase con una jeringa estéril, y transferir asépticamente el volumen especificado (ver Cuadro 2) a cada medio de cultivo.

- Los tubos y cajas de medio de cultivo se incuban en una incubadora bacteriológica a 37°C y 22°C ± 2°C. Se incluyen medios de cultivo que serán el control negativo de la prueba, incubándose durante 14 días a 37°C.
- Para la determinación de micoplasmas, se requiere incubación con CO₂, durante 28 días a 37°C, en medios sólidos y líquidos.

Cuadro No. 1. Medios de cultivo, temperaturas e inóculos para la prueba de esterilidad.

MEDIOS	CANTIDAD DE INÓCULO A PROBAR	Aerobiosis 37°C	Aerobiosis 22°C	DURACIÓN (DÍAS)
CALDO TIOGLICOLATO Control	1 mL 2 mL 0 mL	1 tubo 1 tubo 1 tubo	1 tubo 1 tubo 1 tubo	14
CALDO SOYA TRIPTICASEINA Control	1 mL 0 mL	1 tubo No	1 tubo 1 tubo	14
AGAR NUTRITIVO Control	0.2 mL 0 mL	1 caja 1 caja	No	14
AGAR SABOREAUD Control	0.2 mL 0 mL	No	1 caja 1 caja	14
GELOSA SANGRE Control	0.2 mL 0 mL	1 caja 1 caja	No	14
Micoplasmas Líquido Medio Frey	20 µl 0 µl	1 tubo 1 tubo	No	28
Micoplasmas Sólido Medio Hayflick Control	20 µl 0 µl	1 caja 1 caja	No	28

Lectura de la prueba

- Se requieren 14 y 28 días de observación, registrando los hallazgos.
- Cualquier cambio por presencia de contaminación, requiere de una resiembra hasta su aislamiento e identificación.

Interpretación de resultados

Si no se observa turbidez, ni crecimiento de contaminantes al término del período de incubación, se considerará que el producto cumple satisfactoriamente la prueba.

4) Animales

Se utilizaron 17 cerdas híbridas (Y x L) de 4 semanas de edad libres de anticuerpos contra CVP2 y 2 cobayos de 250 gr de la cepa Hartley albina.

5) Prueba de seguridad

Se determinó realizar la prueba en 2 cerdas aplicando 2 dosis (2 mL) de la vacuna por vía intramuscular en dos sitios distintos (tabla del cuello), se realiza de manera paralela la prueba en 2 cobayos hembras inoculando una con 2 mL por vía subcutánea. Los cerdos se observaron diariamente durante 21 días para descartar alguna reacción adversa contra la vacuna. Se tomaron diariamente las temperaturas rectales de cada uno durante el periodo de observación y se llevó a cabo la inspección clínica de cada uno de ellos.

6) Prueba de inmunogenicidad

Esta prueba se realizó en 15 cerdas híbridas de 4 semanas susceptibles, libres de anticuerpos específicos contra CVP₂, de los cuales 10 se inocularon 2 mL por vía intramuscular en la tabla del cuello y 5 cerdas se dejaron como controles.

Se midió la respuesta serológica obteniendo una muestra sanguínea al día 0 y a los 14 y 28 días post-vacunación, midiendo la inmunogenicidad con la prueba de ELISA (kit SERELISA PCV₂ Ab Mono Blocking SYNBIOTICS Lote No. 11 SCIRCO 134).

PROCEDIMIENTO

Pasos preliminares

Cuidadosamente configurar la distribución y la identificación de los controles y sueros.

Para la preparación de los sueros, se realizan diluciones logarítmicas base 10 (-1 y -2) en tubos de ensayo, de manera individual en el diluyente de la muestra **(SD)**.

Procedimiento de la prueba

- **Distribución de los sueros testigos:** agitar los frascos, con una micropipeta unicanal (20-200 µl Lapnet) añadir 100 µl de control negativo **(NC)** a los pocillos A1, A2 y A3 y 100 µl de control positivo **(PC)** a los pocillos B1, B2 y B3.
- **Distribución de los sueros:** Tomar 100 µl de cada suero diluido 1/100 y depositarlo en los pocillos, de la siguiente manera; suero No. 1 depositarlo en los pozos C1 y C2 (cada suero será probado por duplicado), y así sucesivamente hasta llegar al último suero (ver Cuadro 3).

Cuadro No. 2. Distribución de sueros en microplaca

	1	2	3	4	5
A	NC	NC	NC	S7	S13
B	NP	NP	NP	S8	S14
C	S1	S1	S7	S9	S15
D	S2	S2	S8	S10	S15
E	S3	S3	S9	S11	Vacío
F	S4	S4	S10	S12	Vacío
G	S5	S5	S11	S13	Vacío
H	S6	S6	S12	S14	Vacío

Clave: **CN:** Control Negativo

CP: Control Positivo

S: Suero

Incubación de los sueros y de los testigos

- Cubrir las microplacas con el film adhesivo
- Agitar las microplacas durante un minuto en un agitador para microplacas (Micro Mixer).
- Incubar las microplacas durante 1 hora \pm 5 min a $37 \pm 3^{\circ}\text{C}$.
- Diluir la solución concentrada de lavado (**W**) 1/10 de agua destilada (1.6 mL W y 14.4 mL de agua destilada por placa)
- Retirar con cuidado el film adhesivo y lavar 4 veces con una micropipeta multicanal (20- 200 μl Labnet).

Adición del conjugado: diluir el diluyente concentrado (**CJ**) 1/100 en el diluyente del conjugado (**CD**) (0.4 mL CJ y 3.7 mL CD por placa).

- Con una micropipeta multicanal añadir 100 μl de solución conjugada a todos los pocillos y cubrir la microplaca con un nuevo film.
- Incubar las microplacas durante 1 hora \pm 5 min a $37 \pm 3^{\circ}\text{C}$.
- Retirar el film con cuidado y lavar 4 veces con W.

Revelado

- Añadir 100 μl del substrato de peroxidasa tamponada (**PS**) por pocillo.
- Agitar las microplacas durante un minuto en un agitador para microplacas.
- Incubar las microplacas durante 30 min \pm 5 min a $23 \pm 5^{\circ}\text{C}$ protegidas de la luz.

- Añadir 50 µl de solución detención (**S**) por pocillo.
- Agitar las microplacas durante un minuto
- Decantar la solución S y secar con una toalla de papel absorbente.

Medición de la Densidad Óptica

Medir con un espectrofotómetro (Biotek) la densidad óptica (**DO**) bicromáticamente a 450 y 630 nm.

Se considera como suero negativo a anticuerpos contra CVP₂ con una **DO ≥ 0.800** y positivo a anticuerpos contra CVP₂ con una **DO ≤ 0.500**.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS

1) Prueba de pH

Se obtuvo un promedio de 6.5, siendo este SATISFACTORIO.

2) Prueba de esterilidad

Fue SATISFACTORIA, ya que no se observó cambio de color ni crecimiento de bacterias, hongos y micoplasmas, durante los 28 días de incubación (ver Cuadro 4 y 5), de acuerdo a lo establecido en la farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 8ª, Edición. 2004.

3) Prueba de seguridad

Reportándose como SATISFACTORIA, al no causar reacciones adversas en sitio de aplicación en los cerdos y cobayos, siendo inocua y segura para su uso (ver Cuadro 6), de acuerdo a lo establecido en el CFR 2006, 113.33 y 113.38.

Cuadro No. 3. Prueba de esterilidad.

Duración de la prueba: **14 días**

MEDIO	INOCULACIÓN	TEMPERATURA	DÍAS DE OBSERVACIÓN													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
CALDO TIOGLICOLATO CONTROL	1 ml 2 ml	37°C 22°C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C
CALDO SOYA TRIPTICASEINA CONTROL	1 ml	22°C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C
AGAR SABOUREAUD CONTROL	Asada	22°C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C
AGAR NUTRITIVO CONTROL	Asada	37°C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C
GELOSA SANGRE CONTROL	Asada	37°C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C
CONTROL DE PIPETA	NA	37°C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C

Clave: S/C= Sin Contaminación NA= No Aplica

Resultado: Satisfactorio

Referencia técnica: Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 8ª, Edición. 2004

Cuadro No. 4. Prueba de esterilidad para *Mycoplasma* spp.

Duración de la prueba: **28 días**

Inoculación: 20 µl

Incubación: 22°C

		DÍAS DE OBSERVACIÓN																											
MEDIOS		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HAYFLICK		S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C
FREY		S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C
CONTROL		S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C

Clave: S/C= Sin Contaminación

Resultado= Satisfactorio

Referencia técnica: Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 8ª, Edición. 2004

Duración de la prueba: **21 días**

No. de Animal	DÍAS DE OBSERVACIÓN																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Porcino <u>16</u>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Porcino <u>17</u>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cobayo <u>1</u>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cobayo <u>2</u>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Duración de la prueba: **21 días**

Clave: S: Sano E: Enfermo M: Muerto

Referencia técnica: **9 CFR 2006 113.14-113.38**

4) Prueba de inmunogenicidad

En esta prueba la vacuna tuvo un 80% de seroconversión en los cerdos inmunizados con 2 mL en la tabla del cuello con una revacunación a los 15 días identificados con los números **6 al 15** y 0% de seroconversión para los cerdos controles identificados con los números **1 al 5** (ver Cuadro 6).

Obteniendo datos cualitativos por la prueba serológica de ELISA para la detección de anticuerpos contra CVP₂ (ver Cuadro 7).

Cuadro No. 6. Resultados generales de la prueba de ELISA

GRUPO	ARETE	PREVACUNALES Día 0	15 VACUNAL Día 14	15 REVACUNA Día 28
Controles CVP ₂	1	-	-	-
	2	-	-	-
	3	-	-	-
	4	-	-	-
	5	-	-	-
Vacunados CVP ₂	6	-	+	+
	7	-	+	+
	8	+	+	-
	9	-	+	+
	10	-	+	+
	11	-	+	+
	12	+	+	-
	13	-	+	+
	14	-	+	+
	15	-	+	+

CLAVE: +: Anticuerpos -: Anticuerpos
 +: **Anticuerpos maternos**

Cuadro No. 7. Resultados de las Densidades Ópticas

GRUPO	ARETE	PREVACUNALES 17/01/12	15 POSVACUNAL 1 ^{ra} 31/01/12	15 POSVACUNAL 2 ^{da} 14/02/12
Controles CVP₂	1	0.849	0.832	0.800
	2	1.24	1.635	1.927
	3	0.834	0.982	1.429
	4	1.413	1.801	1.87
	5	1.543	1.677	1.856
Vacunados CVP₂	6	0.906	0.396	0.500
	7	0.885	0.500	0.485
	8	0.372	0.451	0.808
	9	0.819	0.423	0.496
	10	0.859	0.486	0.403
	11	1.2	0.426	0.485
	12	0.405	0.415	0.861
	13	0.823	0.409	0.500
	14	1.07	0.5	0.447
	15	0.860	0.422	0.482
Control - Validación		2.07	1.719	1.969
Control + Validación		0.275	0.271	0.296

La prueba se valida con los siguientes resultados del ensayo

La DO del control negativo (N) debe ser ≥ 0.800 y

La DO del control Positivo (P) debe ser ≤ 0.500 .

CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN

La circovirus se ha convertido en una enfermedad grave de los cerdos a nivel mundial, por lo que existe la necesidad urgente para el desarrollo de vacunas contra la enfermedad. Para llevar a cabo su autorización y uso, las vacunas contra CVP₂ deben llevar a cabo un proceso de constatación para obtener su registro, y México no es la excepción. Para la prevención y control del SEMP (PMWS), las vacunas no están incluidas en la normatividad mexicana vigente y su evaluación se lleva a cabo de acuerdo al CFR 113.33-113.38 2006⁽¹¹⁾ y los protocolos del laboratorio productor. Sin embargo, no se tiene acceso a estudios similares al que aquí llevamos a cabo, que pudieran servir de punto de comparación con los resultados obtenidos.

Las vacunas contra CVP₂ están elaboradas a partir de ingeniería genética, algunas son de virus quimérico inactivado, otras son vacunas recombinantes y otras son a base de virus inactivado (Blanchard *et al.*, 2003; Progranichniy *et al.*, 2004). En este estudio se decidió llevar a cabo la evaluación de la vacuna recombinante subunitaria por tener características de importancia económica e inmunogénica para los productores de cerdos, siendo el principal objetivo evaluar su inmunogenicidad.

En este modelo experimental los resultados obtenidos coinciden con algunos autores quienes demostraron que la vacuna tuvo éxito al no inducir signos clínicos de SEMP en ninguno de los cerdos inmunizados, la temperatura rectal se encontraba dentro del rango normal (38.5°C 39.2°C), no hubo

diferencias en su condición física general durante toda la prueba, observándose homogeneidad en su crecimiento y peso, a diferencia de otros estudios donde se revela que se produce una reacción sistémica y vómito, después de la inmunización (Petrini, *et al.*, 2012; López, *et al.*, 2012; Joisel, *et al.*, 2012; Ubeda, 2010).

Estudios de campo demuestran que antes del desafío con una cepa de campo, ninguno de los cerdos vacunados y los cerdos no vacunados desarrollaron viremia. Posterior al desafío la detección de viremia y la excreción viral (hisopos nasales y heces) en cerdos no vacunados fue positiva al día 6, 13 y 20 PI por RT-PCR. Se demuestra que la vacuna es capaz de prevenir la viremia en los animales vacunados, sin importar la cepa de desafío, en contraste, no se pudo evitar por completo la excreción viral nasal y en heces, aunque hubo una reducción de la excreción, en los animales vacunados contra los no vacunados (Fort, *et al.*, 2008).

Asimismo, los resultados de este estudio se asemejan a los de otros autores, en los que se reporta que aplicando la vacuna subunitaria inactivada a cerdos de 4 semanas de edad, se logró una seroconversión del 80%, utilizando la prueba de ELISA y sin seroconversión en las muestras de los cerdos control; el otro 20% se comportó diferente al dar resultados positivos durante la prevacunación debido a trazas de anticuerpos maternos, posterior a la revacunación se obtienen resultados negativos a causa de factores propios del cerdos (Petrini *et al.*, 2012; Deguchi *et al.*, 2012; O'Neill., 2011; Ubeda., 2010).

Estudios donde se evaluó la vacuna frente a un desafío con cepas de diferente origen geográfico, indican que la vacuna puede ser igual de efectiva contra diferentes cepas de desafío del CVP₂ genotipos a, b y c, obteniendo títulos de anticuerpos mediante la prueba de IPMC (Fort, *et al.*, 2008).

Esta vacuna fue inocua y segura al no inducir ninguna reacción negativa local y sistémica, al aplicar el doble de la dosis de la vacuna en cerdos y cobayos. Estos resultados son similares a los reportados por Petrini *et al.*, 2012; Deguchi *et al.*, 2012; CFR 113.33- 113.38 2006; Alexander *et al.*, 2010.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

La constatación de la vacuna subunitaria inactivada que contiene la proteína ORF2 del CVP₂, logró ser segura e inocua, además de generar una seroconversión del 80% y contar con las especificaciones que la hacen eficaz para su uso en cerdos y prevenir la Circovirus.

Después de la aplicación de la vacuna las reacciones fueron favorables para cada uno de los cerdos, no presentaron efectos adversos para su salud, y no se observó reacción en el sitio de inmunización.

En cuanto a las pruebas de control de calidad para la vacuna, se pudo comprobar que si cumple con cada una de las especificaciones requeridas para su registro en México.

La vacuna constatada contra el CVP₂ resultó inmunogénica para los cerdos, se puede sugerir que la vacuna puede ser útil para infecciones de control CVP₂ en de manera individual y de población.

Existen diferentes marcas comerciales de kits de ELISA utilizados para la constatación de las vacunas contra CVP₂, sin embargo, no se ha llevado a cabo un estudio comparativo donde se demuestre la sensibilidad y especificidad de dichos kits, a pesar de esto no debería ser la prueba de ELISA quien determine el registro o rechazo de las vacunas contra CVP₂, ya que por

ser una prueba cualitativa no se obtienen datos suficientes. Para verificar que se genera una buena inmunidad protectora ante un desafío, obteniendo resultados confiables.

En México, aún no se cuenta con una prueba serológica cuantitativa como la suero neutralización por interferencia viral, que ayude a la detección y cuantificación de anticuerpos, que se generan durante la utilización de las vacunas. Asimismo, se necesitan llevar a cabo estudios comparativos de sensibilidad y especificidad con otras pruebas como ELISA e IPMC.

Para la prevención y control del CVP₂ no se deben limitar los recursos: Materiales, humanos y financieros ya que se recomienda que las constataciones de todos y cada uno de los lotes de las vacunas contra CVP₂, producidos por laboratorios nacionales y extranjeros, se lleven a cabo para verificar que cumplan con los estándares de calidad y garantizar su eficacia.

CAPÍTULO 6. LITERATURA CITADA

1. Agüero M, Arias M and Sánchez-Vizcaíno J. Development of a novel Multiplex PCR for porcine Circoviruses detection and preliminary field testing. Proceedings of the 5 International Congress of Veterinary Virology. Brescia, Italy. 2000: 27-30.
2. Allan G, McNeilly F and Kennedy S. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. J Vet Diagn Invest. 1998; 10: 3-10.
3. Allan G, Ellis JA. Porcine circoviruses: a review. J Vet Diagn Invest. 2000; 12: 3-14.
4. Alexander AE, Jos Smeets K. Kühnel J and Ellert. Safety of single 2mL dose of Porcilis® PCV administered to pigs of 3 weeks of age under field conditions on with confirmed. PMWS. 21st International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress. Vancouver, Canada. 2010: 344.
5. Blanchard P, Mahe D, Cariolet R, Keranflec'h A, Baudouard MA, Cordioli P, Albina E and Jestin A. Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. Vaccine. 2003; 21(31): 4565-4575.
6. Cano P, Rodríguez C, Sogbe E, Segalés J, Utrera V y Díaz C. Coinfección de circovirus porcino tipo 2 con el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino en Venezuela. Rev. Fac. Cs. Vets. UCV. 2004; 45(1): 19-29.

7. Carrera SE, Socci EG, Martínez LA, Corona BE y Diosdado VF. Optimización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para la detección del ORF V1 del circovirus tipo 2. Memorias del XLVII Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos (AMVEC) Guadalajara, Jalisco (Julio 18-21). 2012: 163.
8. Clark E. Postweaning multisystemic wasting syndrome. Proceedings of the American Association of Swine Practitioners. 1997; 28: 499-501.
9. Choi C and Chae C. *In situ* Hybridization for the detection of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. J. Comp. Path. 1999; 121: 265-270.
10. Chevez JC, Alcántar P, Pinal F y Díaz E. Análisis de la prevalencia de PCV2. Memorias del XLVII Congreso Nacional AMVEC, Guadalajara, Jalisco (Julio 18-21). 2012: 204.
11. Code Federal of Regulations. Animals and Animal Products parts 9 to 133.33-38. National Archives and Records Administration. USA 2006.
12. Darwich L, Segalés J, Domingo M and Mateu E. Changes in CD4 (+), CD8(+), and immunoglobulin M-positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age matched in infected wasted and healthy pigs correlate with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues. Clin Diagn Lab Immunol. 2002; 9: 236-242.

13. Darwich L, Segalés J and Mateu E. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by porcine circovirus 2: an immune riddle. *Arch. Virol.* 2004; 149: 857-874.
14. Deguchi E, Tshering C, Kanome J, Takagi M and Nakamura K. Investigation of porcine circovirus type 2 (PCV2) antibodies and DNA in serum of pigs born from PCV2-vaccinated sows in a farm where PCV2 is under control. 22nd IPVS, Congress/Satellite Meril Symposium, Jeju Island, South Korea. 2012.
15. Durán C, Ramos-Vara J and Reder J. Porcine and nephropathy syndrome a new condition to include in the differential diagnosis list for skin discoloration swine. *Swine Health and Production.* 1997; 5: 241-245.
16. Ellis J, Hassard L, Clark E, Harding J, Allan G, Willson P, Strokappe J, Martin K, McNeilly F, Meehan B, Todd D and Haines D. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can. Vet. J.* 1998; 39: 44-51.
17. Ellis J, Spinato M, Yong C, West K, McNeilly F, Meehan B, Kennedy S, Clark E, Krakowka S and Allan G. Porcine circovirus 2 associated disease in Eurasian wild boar. *J. Vet. Diag. Invest.* 2003; 15: 364–368.
18. Fenaux, M, Halbur PG and Gill M. Genetic characterization of type porcine circovirus (PCV2) 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 PCV1 and PCV2. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 2494-2503.

19. Ferreira D, Sansot B and Laval A. Attempt to use serotherapy to control mortality in PMWS. In: Proc Conf ssDNA Viruses, St. Malo, France. 2001: 144.
20. Fort M, Olvera A, Sibila M, Segalés J and Mateu E. Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected and non-PMWS affected pigs. *Vet Microbiol.* 2007; 125: 244-255.
21. Fort M, Sibila M, Allepuz A, Mateu E, Roenink F and Segalés J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins. *Vaccine.* 2008; 26: 1063-1071.
22. García P, Rodríguez R, Ugalde V, Romero S y Quintero R. Estudio histopatológico de tejidos de cerdos destetados sugestivos al circovirus porcino tipo 2. *Vet. Rec.* 2003; 148 (25): 792.
23. Gagnon CA, Tremblay D, Tijssen P, Venne MH, Houde A and Elahi S. The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. *Can Vet J.* 2007; 48: 811–819.
24. Guillermo C y Torres MA. Epidemiología del circovirus porcino tipo 2. *Bioagrocencias.* 2009; 2(2): 4-16.
25. Hamel A, Lin L and Nayar G. Nucleotide sequence of porcine circovirus associate with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J. Virol.* 1998; 72: 5262-5267.
26. Hamel A, Lin LL and Sachvic C. PCR detection and characterization of type 2 porcine circovirus. *Can J. Vet. Res.* 2000; 64: 44-52.

27. Harding J. Postweaning multisystemic wasting syndrome: Preliminary epidemiology and clinical findings. Proc West Can Assoc Swine Pract. 1996: 21.
28. Harding J and Clark E. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). J Swine Health Prod. 1997; 5: 201-203.
29. Harding, J, Clark E and Strokapp E. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): epidemiology and clinical presentation. J Swine Health Prod. 1998; 6: 249-254.
30. Harding JC. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. Vet. Microbiol. 2004; 98:131-135.
31. Harms PA. Hepathopathy associated with spontaneous type 2 porcine circovirus infection in caesarian derived colostrum deprived pigs. Proceedings of the American Association on Veterinary Laboratory Dignostics. 1999; 4.
32. Hernández J. Actualización sobre circovirus porcino tipo 2 (PCV2). Rev Porcicul Iberoame. 2011; 1: 5.
33. Jolie R, Runnels P and McGavin D. Postweaning multisystemic wasting syndrome in group of caesarian derived colostrum deprived pigs. 16th IPVS Congress, Melbourne, Australia. 2000: 639.
34. Joisel F, Augusto P, Bordin E, Cozette V, Delvecchio A and Pasini M. Additional benefits of sow PCV2 vaccination with CIRCOVAC® in a farm where piglets are vaccinated with a PCV2 subunit vaccine: 2- impact on pig post-weaning performance. 22nd IPVS, Congress/Satellite Merial Symposium, Jeju Island, South Korea. 2012.

35. Kennedy S, Moffett D, McNeilly F, Meehan B, Ellis J, Krakowka S and Allan GM. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. *J Comp Pathol.* 2000; 122: 9-24.
36. Kiupel M, Stevenson W, Mittal S, Clark E.G, and D. M. Haines. Circovirus-like viral associated disease in weaned pigs in Indiana. *Vet. Pathol.* 1998; 35: 303-307.
37. Krakowka S, Ellis J, Meehan B, Kennedy S, McNeilly F and Allan G. Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Vet. Pathol.* 2000; 37: 254-263.
38. Krakowka S, Ellis F, Mcneilly B, Meehan M, Oglesbee M, Alldinger S and Allan G. Features of cell degeneration and death in hepatic failure and systemic lymphoid depletion characteristic of PCV2 associated postweaning multisystemic wasting disease. *Vet. Pathol.* 2004; 41 (5): 471-481.
39. Larochelle R, Magar R and Allaire S. Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions. *Virus Res.* 2002; 90: 101-112.
40. Liu J, Chen I and Kwang J. Characterization of previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2 infected cells and its role in virus induced apoptosis. *J Virol.* 2005; 79 (13): 8262-8274.
41. Liu J, Chen I, Du Q, Chua H and Kwang J. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis *in vivo*. *J Virol.* 2006; 80 (10): 5065-5073.

42. Lopez S, Perreul G, Herin JB, Longo S and Vila T. Comparative efficacy of two PCV2 vaccines in piglets. 22nd IPVS Congress/Satellite Merial Symposium Jeju Island, South Korea. 2012.
43. Lukert P, De Boer G, Dale J, Keese P, McNulty M, Randles J and Tischer I. The Circoviridae. In: Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, eds. Virus Taxonomy. 6th Rep Int Committee Taxon Viruses. Vienna: Springer-Verlag. 1995: 166-168.
44. Madec F, Eveno E, Morvan P, Hammon L, Blanchard P, Cariolet R, Amenna N, Morvan H, Truong C, Mahé D, Albina E and Jestin A. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: Clinical observations from follow-up studies on affected farms. *Livest Prod Sci.* 2000; 63: 223-233.
45. Mankertz A, Domingo M, Folch J, Lecann P, Jestin A, Segalés J, Chmielewicz B, Durán J and Soike D. Characterization of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Res.* 2000; 66: 65-77.
46. McNeilly F, Kennedy S, Moffett D, Meehan B, Foster J, Clarke E, Ellis J, Haines D, Adair B and Allan G. A comparison of *in situ* hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J. Virol. Methods.* 1999; 80: 123-128.
47. Meehan BH, McNeilly F and Tood D. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J Gen Virol.* 1998; 79: 2171-2179.

48. Meerts P, Misinzo G, Lefebvre D, Nielsen J, Bøtner A, Kristensen C and Nauwynck H. Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus type 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV-2 associated diseases. *BMC Vet. Res.* 2006; 2: 1-6.
49. Morozov I, Sirinarumitr T and Sorden SD. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 2535–2541.
50. Noriega J, Reyes P y Bucarey S. Circovirus Porcino: Un virus pequeño que genera un gran problema. *Avances en Ciencias Veterinarias.* 2007; 22: 62-71.
51. Nawagitgul, P, Harms A, Morozov I, Thacker B, Sorden S, Lekcharoensuk C and Paul P. Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2 based and recombinant capsid protein (ORF2) based enzyme linked immunosorbent assay for detection of antibodies to PCV. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2002; 9: 33–40.
52. NOM-063-ZOO-1999. Especificaciones que deben cumplir los biológicos empleados en la prevención y control de las enfermedades que afectan a los animales domésticos. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 2 de Junio de 2003.
53. Opriessnig T, Meng X and Halbur, P. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2007; 19: 591–615.

54. Opriessnig T, Anderson M, Rothschild M, Evans R, Fenaux M, Meng X and Halbur P. Evaluation of differences in host susceptibility to PCV2 associated diseases. Proc Congr Int Pig Vet Soc. 2004a: 12.
55. Pradal-Roa P. J. PNDS ¿Otra enfermedad emergente de los cerdos? Los Porcicultores y su Entorno. Año 4 Septiembre-Octubre 2001: 23.
56. Pensaert B, Sánchez E, Ladehjaer-Mikkelsen A, Allan G and Nauwynck H. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. Vet Microbiol. 2004; 98: 175-183.
57. Petrini S, Paniccia M, Cagiola M, Briscolini S, Fortunati M, Sensi M, Ferrari M, Manuali M and De Mia GM. Evaluation of an inactivated PCV2 vaccine inoculated in three-week-old piglets. 22nd IPVS Congress/Satellite Merial Symposium, Jeju Island, South Korea. 2012.
58. Progranichniy R, Yoon K, Yaeger M, Vaughn E, Stammer R and Roof M. Efficacy of experimental inactivated PCV2 vaccines for preventing PMWS in CDCD pigs. Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Swine Vet. 2004: 443-444.
59. Ramírez M, Fort M, Rosales E, Hernández L, Mercado, G. C., Allan G, McNair I y Segalés J. Primer aislamiento y detección de anticuerpos frente a circovirus porcino tipo 2 (PCV2) en México. Memorias del Congreso XXXIX AMVEC. Mazatlán, Sinaloa (Julio 28-1 Agosto). 2004: 191.
60. Ramos Vara J, Durán O, Render J and Craft D. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in the USA. Vet Rec. 1997; 147: 479-480.

61. Resendes A, Balasch M, Calsamiglia M, Segalés J, Sibila M; Mankertz A; Durán J and Domingo M. Experimental co-inoculation of porcine circovirus type 2 (PCV-2) and a vaccine adjuvant in conventional pigs. Proceedings of the ssDNA Viruses of Plants, Birds, Pigs and Primates: Porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome. European Society of Veterinary Virology. 2001: 134.
62. Rodríguez-Arriola G, Segalés J, Balasch M, Rosell C, Quintana J, Folch J, Durán J, Mankertz A and Domingo M. Serum antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2 in pigs with and without PMWS. Vet Rec. 2000; 146: 762-764.
63. Rosell C, Segalés J, Plana-Durán J, Balasch M, Rodríguez-Arriola G, Kennedy S, Allan G, McNeilly F, Latimer K and Domingo M. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. J Comp Path. 1999; 120: 59-78.
64. Rosell C, Segalés J, Ramos-Vara J, Folch J, Rodríguez-Arriola G, Durán C, Balasch M, Durán J and Domingo M. Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. Vet. Rec. 2000a; 146: 40–43.
65. Rosell C, Segalés J and Domingo M. Hepatitis and staging of hepatic damage in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. Vet. Pathol. 2000b; 37: 687–692.

66. Rovira A, Balasch M, Segalés J, García L, Durán J, Rosell C, Ellerbrok H, Mankertz A and Domingo M. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J. Virol.* 2002; 76: 3232-3239.
67. Royer RL, Nawagitgul P, Halbur PG and Paul PS. Susceptibility of porcine circovirus type 2 to commercial and laboratory disinfectants. *J Swine Health Prod.* 2001; 9: 281-284.
68. Smith W, Thomson and Done J. Dermatitis/ nephropathy syndrome of pigs. *Vet Rec.* 1993; 132: 47.
69. Segalés J, Sitjar M, Domingo M, Dee S, Noval R, Sacristan C, De las H, Ferro A and Latimer K. First report of postweaning multisystemic wasting syndrome in pig in Spain. *Vet. Rec.* 1997; 141: 600-601.
70. Segalés J, Alonso F, Rosell C, Pastor J, Chianini F, Campos E, López-Fuertes L, Quintana J, Rodríguez-Arrijo G, Calsamiglia M, Pujols J, Domínguez J and Domingo M. Changes in peripheral blood leukocyte populations in pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2001; 81: 37-44.
71. Segalés J and Domingo M. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *Vet Q.* 2002; 24: 109-124.
72. Segalés J, Rosell C and Domingo M. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Vet Microbiol.* 2004; 98: 137-149.
73. Segalés J, Allan GM and Domingo M. Porcine circovirus diseases. *Animal Health Res. Rev.* 2005a; 6: 299-3077.

74. Segalés J, Calsamiglia M, Olvera A, Sibila M, Badiella L and Domingo M. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Microbiol.* 2005b; 111: 223–229.
75. Segalés J. Actualización sobre las enfermedades asociadas a Circovirus porcino tipo 2 (PCV2). *Memorias del XLI Congreso Nacional de AMVEC.* Ixtapa, Guerrero, México (Julio 16-19). 2006: 112-116.
76. Segalés J, Olvera A, Grau-Roma L, Charreyre C, Nauwynck H, Larsen L, Dupont K, McCullough K, Ellis J, Krakowka S, Mankertz A, Fredholm M, Fossum C, Timmusk S, Stockhofe-Zurwieden N, Beattie V, Armstrong D, Grassland B, Baekbo P and Allan G. PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Vet. Rec.* 2008; 162: 867-868.
77. Shibahara T, Sato K, Ishakawa Y, Kadota K. Porcine circovirus induces B lymphocyte depletion in pigs with wasting disease syndrome. *J. Vet. Med. Sci.* 2000; 62: 1125-1131.
78. Sorden S. Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health Prod.* 2000; 8: 133-136.
79. Tanja O, Xiang-Jin M and Patrick G. Porcine circovirus type 2 associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J. Vet. Diagn Invest.* 2007; 19: 591-615.

80. Taylor, D. J. Porcine Circovirus (Porcine Circovirus Associated Disease, Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome). In Pig Diseases, Ninth Edition. Wymant Print & Publishing Solutions Ltd. 4edge Ltd., Hockley, Essex, UK. 2013; 72-78.
81. Thacker E. Porcine respiratory disease complex- what is it and why does remain a problem. Pig J. 2001; 48: 66-70.
82. Tisher I, Rasch R and Tochtermann G. Characterization of papovavirus and picornavirus particles in permanent pig kidney cell lines. Zentralbl Bakteriol. 1974; 226: 153-167.
83. Tisher I, Gelderblom H, Vettermann W and Koch MA. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. Nature. 1982; 295: 64-66.
84. Thompson J, Higgins S and Smith D. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome. Clinical and pathological features of cases in the United Kingdom (1993-1998). J. Vet. Med. 2002; 49:430-437.
85. Torres M, Rodríguez J, Guillermo L y Ruiz P. Informe de casos compatibles con una infección con el circovirus porcino tipo 2 en Yucatán. Memorias del XIV Congreso Nacional de Patología Veterinaria (Junio 24-26) 2005; 265-278.
86. Trujano CM, Piña R, Bernal G, Villegas MF y Vieyra RP. Síndrome dermatítico nefropático porcino en México. Memorias del XXVII Congreso Nacional de AMVEC, Puerto Vallarta, Jalisco, México (Julio 17-21). 2002: 114-115.

87. Ubeda, J.L., Menjón, R., Bollo J.M., Jimenez, M., López J.V. and Rodriguez, J. Comparison of the efficacy of Porcilis® PCV and alternative PCV vaccine under field conditions. 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada. 2010; II: 398.
88. Vincent E, Carrasco C, Herrman B, Meehan M, Allan G, Summerfield A and McCullough K. Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus. *J. Virol.* 2003; 77: 13288-13300.
89. Vicent J, Segalés J, Hofle U, Balasch M, Durán J, Domingo M and Gortazar C. Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Vet. Res.* 2004; 35: 243-253.
90. Vincent I, Carrasco E, Guzylack-Piriou L, Herrmann B, MacNeilly F, Allan G, Summerfield A and McCullough K. Subset-dependent modulation of dendritic cell activity by circovirus type 2. *Immunology. J. Virol.* 2005; 115: 388-398.
91. White M and Higgins R. Dermatitis nephropathy syndrome of pigs. *Vet. Rec.* 1993: 1999.
92. West K, Bystrom J, Wonjnarowicz C, Shantz N, Jacobson M, Allan G, Haines D, Clark E, Krakowka S, McNeilly F, Konoby C and Martin K, Ellis J. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1999; 11: 530-532.