

UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE POST GRADO Y POSTITULO

EFEECTO EN LA CARGA VIRAL Y SEROCONVERSIÓN EN CERDOS INMUNIZADOS CON DOS FORMULACIONES DISTINTAS DE VACUNAS CONTRA CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2

OLIVER ANDRÉS BASSA MARCOLETA

**Tesis para optar al Grado de
Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias
Departamento de Ciencias Biológicas Animales**

Profesor Guía: Dr. Sergio Bucarey Vivanco

**Santiago - Chile
2017**

PROYECTO FONDEF IT13I20021

**Esta Tesis de Grado se realizo en el Laboratorio BIOVETEC en el
Departamento de Ciencias Biológicas y Animales de la Facultad de Ciencias
Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, y contó con
financiamiento FONDEF IT13I20021**

DEDICATORIA

El desafío de cualquier postítulo es grande, para mí requirió de todas mis capacidades, tiempo, paciencia, dedicación, y aunque no siempre las cosas resultaron como esperaba, existió algo que nunca cambió, algo incondicional, esa fue la red de apoyo que siempre está a tu lado, la cual hizo que las cosas me resultaran un poco más fáciles.

Quiero agradecer a todas las personas que estuvieron conmigo en esta etapa y contribuyeron de menor o gran medida a poder cumplir con mis objetivos, en especial al Dr. Sergio Bucarey quien fue mi tutor durante toda la época de este magíster, quien no solo se preocupó de lo meramente académico sino también de la parte humana, demostrando ser un excelente profesional y persona. A todos los profesores que conocí y me ayudaron a que creciera como profesional, a mis compañeros que compartieron en todo momento las largas jornadas de investigativas tanto en terreno como en el laboratorio quienes contribuyen mucho con mi trabajo.

Quiero agradecer particularmente a don Toribio Correa, quien permitió poder llevar a cabo esta investigación en su plantel porcino, "Comercial e Industrial el Monte".

Agradezco a mi familia, en especial a mi padre y madre por su ayuda incondicional, por mostrarme que siempre se puede y que con perseverancia se llegan a los objetivos.

Por último quiero agradecer a Daniela, mi esposa, quien se ha convertido en todo momento en mi más grande apoyo y la motivación de muchas de mis aventuras.

Oliver Bassa Marcoleta

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

RESUMEN.....	5
SUMMARY.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	9
HIPÓTESIS.....	16
OBJETIVOS.....	16
MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
1. Inmunización y muestreo de animales.....	17
2. Extracción de DNA a partir de muestras obtenidas.....	18
3. Curva de calibración para cuantificación de carga viral por qPCR..	18
4. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.....	19
5. Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA).....	20
6. Análisis de los resultados obtenidos.....	21
7. Instalaciones.....	21
8. Bioseguridad.....	22
RESULTADOS.....	23
1. Extracción de DNA a partir de muestras obtenidas.....	23
2. Curva de calibración para cuantificación de carga viral por qPCR..	23
3. Cuantificación de carga Viral mediante qPCR.....	24
4. Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA).....	26
DISCUSIÓN.....	27
CONCLUSIONES.....	30
BIBLIOGRAFÍA.....	31
ANEXOS.....	35

RESUMEN

El circovirus porcino tipo 2 (PCV2) es un virus que tiene estrecha relación con importantes enfermedades en el ganado porcino y es por ello que ha sido de gran interés de estudio el buscar las mejores alternativas posibles para poder disminuir el impacto de este agente en la industria porcina. Una de estas alternativas es disponer de mejores vacunas contra PCV2, entregando así una eficaz protección inmunológica frente a este agente. La mayoría de las vacunas contra PCV2 poseen una formulación inyectable y aunque son eficaces, no están exentos de problemas asociados a su administración. Es por ello que resulta de gran interés de estudio el poder evaluar la respuesta de una vacuna experimental de mucosa (oral/intranasal) contra PCV2 en un plantel porcino, midiendo la carga viral y respuesta humoral resultante de la inmunización de cerdos con esta vacuna.

Material y Método: Se utilizaron 4 grupos de cerdos, un grupo control placebo, otro inmunizado con una vacuna comercial inyectable contra PCV2 (Circumvent) y los otros dos grupos fueron inmunizados con una vacuna contra PCV2 basada en extracto crudo de levadura, enriquecida con VLPs de PCV2 microencapsulada con quitosano sulfatado (QS), utilizando la vía oral/intranasal e inyectable. Se analizaron muestras sanguíneas midiendo así la carga viral mediante qPCR y anticuerpos totales por ELISA para cada grupo de tratamiento.

Resultados: La inmunización contra PCV2 bajo una formulación de microencapsulación de antígenos VLPs utilizando quitosano funcionalizado, logró ser más eficaz en bajar la carga viral en su formato inyectable en comparación a los demás grupos. En cuanto a la generación de anticuerpos, si bien los tres grupos inmunizados tuvieron mejores resultados que el grupo placebo, la formulación comercial obtuvo diferencias significativas por sobre el resto.

Conclusión: Si bien la vacuna experimental genera protección contra PCV2, no fue posible en este estudio identificar de manera certera la vía inmunológica con la cual la vacuna protege al animal. Lo más probable es que sea más bien por una respuesta inmune celular contra PCV2.

SUMMARY

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is a virus that is closely related to major diseases in pigs and it has been of great interest to study the find the best possible alternatives to reduce the impact of this agent in the industry swine. One such alternative is for better vaccines against PCV2, thus delivering an effective immune protection against this agent. Most PCV2 vaccines have an injectable formulation and while effective, are not exempt from problems associated with its administration. That is why it is of great Turistic of study to evaluate the response of an experimental vaccine mucosa (oral / intranasal) against PCV2 in a pig campus, measuring viral load and humoral response resulting from immunization of pigs with this vaccine.

Material and Methods: 4 groups of pigs, a placebo control group, another immunized with an injectable commercial vaccine against PCV2 (Circumvent) and the other two groups were used were immunized with a vaccine against PCV2 based crude extract of yeast, enriched with VLPs PCV2 microencapsulated with sulfated chitosan (QS) using oral / intranasal and injectable route. blood samples were analyzed by measuring the viral load so by qPCR and total antibody by ELISA for each treatment group.

Results: Immunization against PCV2 under a microencapsulation formulation VLPs antigens using functionalized chitosan, managed to be more effective in lowering the viral load in its injectable form compared to the other groups. As for the generation of antibodies, although the three immunized groups did better than the placebo group, the commercial formulation obtained significant differences over the rest.

Conclusion: Although the experimental vaccine generates protection against PCV2, it was not possible in this study to accurately identify the immunological pathway with which the vaccine protects the animal. It is more likely to be due to a cellular immune response to PCV2.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día en el exigente y competitivo rubro de la carne, la industria porcina lidera y obtiene uno de los mejores créditos, con una producción de carne de 523.000 toneladas para el 2015, lo que representa el 36% de la producción total de carnes a nivel nacional. Lo anterior proporciona a la producción de carne de cerdo entre los primeros lugares, en comparación con otras carnes (ASPROCER, 2014). Como cualquier otra actividad pecuaria es sumamente importante asegurar la protección contra cualquier amenaza que atente al crecimiento y desarrollo continuo de esta industria. Una de las principales amenazas para cualquier tipo de producción animal son las enfermedades infecciosas, las cuales impactan drásticamente este rubro.

Se conocen numerosos patógenos que afectan a la industria porcina, sin duda, uno de los más importantes es el Circovirus Porcino Tipo 2 (PCV2), el cual está asociado a varias enfermedades que hoy se conocen como Enfermedades Asociadas a Circovirus Porcino (PCVAD), las cuales generan importantes pérdidas a la producción porcina mundial. Una de las PCVAD con mayor impacto económico es el Síndrome Multisistémico de Desmedro Postdestete (PMWS), caracterizado por diarrea, debilidad, ictericia, linfadenopatía, problemas respiratorios, con la consiguiente pérdida de peso y condición corporal deficiente, impidiendo obtener un animal con buen peso de venta.

Existen diferentes medidas que se aplican en conjunto para poder prevenir y controlar las PCVAD en un plantel porcino, desde la exigente bioseguridad hasta la aplicación de diferentes vacunas. Este último método se ha convertido en una alternativa inmunológica esencial para prevenir este tipo de enfermedades. En Chile existen 2 vacunas comerciales autorizadas para PCV2: Circuvent®PCV (Intervet) y CircoFlex® (Boehringer Ingelheim), ambas de formulación inyectable.

Siguiendo esta línea, una alternativa de estudio en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, ha sido el desarrollo de vacunas de mucosas contra cepas nacionales de circovirus porcino. Esta línea de

investigación podría, entre otras cosas, conseguir vacunas más efectivas a nivel local y disminuir costos indirectos asociados a la vacunación por vía parenteral, como son tiempo, trabajo e infraestructura.

Hoy en día, uno de los métodos diagnósticos más eficientes para evaluar la efectividad de vacunas es el qPCR o PCR en Tiempo Real y el Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA).

Bajo este aspecto, sería necesario poder obtener información de esta primera experiencia, respecto al efecto en campo de estas nuevas formulaciones orales desarrolladas contra circovirus porcino, por medio de la medición de la carga viral, a través de qPCR y su posible correlación con anticuerpos anti-PCV2, medidos a través del ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), en cerdos vacunados con dos vacunas (comercial inyectable y experimental oral/intranasal) y compararlos con un grupo control sin inmunizar.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Circovirus Porcino (PCV)

El Circovirus Porcino pertenece a la familia *Circoviridae*, es un virus pequeño, sin envoltura, con un diámetro promedio de 17 nm y de simetría icosaédrica, el cual presenta un genoma de DNA circular, por lo que fue denominado Circovirus porcino (PCV) (Tischer *et al.*, 1982). Hasta la fecha se han descrito dos tipos de PCV, antigénicamente y genómicamente distintos (Meehan *et al.*, 1998), el PCV1 apatógeno y PCV2 clasificado como agente causal principal del Síndrome de Desmedro Multisistémico Post-destete, una de las enfermedades de mayor impacto en la industria porcina mundial (Hernández, 2011). Al Comparar las secuencias genómicas de aislados de PCV2 con respecto a PCV1, presentan sólo un 80% de identidad nucleotídica (Noriega *et al.*, 2007). Con el fin de estandarizar la nomenclatura de los genotipos de PCV2, los miembros del Consorcio de la UE sobre Enfermedades Asociadas a Circovirus Porcino, proponen una nomenclatura que tenga por objetivo, el evitar confusiones con la denominación de las dos especies existentes de circovirus porcino (tipos 1 y 2) y recomienda nombrar a los subgenotipos de PCV2 como PCV2a, PCV2b y PCV2c (Segalés *et al.*, 2008), siendo estos tres los principales subgenotipos de PCV2, (Guo *et al.*, 2010), con una variación subgenotípica probablemente asociada a distintas áreas geográficas. En Chile se han aislado y secuenciado pequeñas variantes de estos subgenotipos, los corresponderían a un híbrido entre PCV2a y PCV2b (Noriega, 2008).

El PCV posee varios marcos de lectura abiertos ó *Open Reading Frames* (ORFs) entre los cuales los más estudiados son el ORF1 y ORF2 (Mankertz *et al.*, 1997). El ORF1 codifica para la proteína necesaria para la replicación viral, en cuanto ORF2 codifica para la proteína de la cápside viral. Esta última al ser una proteína estructural, ha mostrado tener la mayor variación entre los distintos aislados de PCV2 (Noriega *et al.*, 2007).

La presencia de PCV2 está ampliamente extendida en las distintas poblaciones de cerdos a nivel mundial y según estudios, en el 85% de los cerdos destinados a matadero se ha encontrado anticuerpos contra PCV2 (Mankertz *et al.*, 1997).

Patogenia

El PCV2 se considera como un agente infeccioso necesario para el desarrollo del síndrome multisistémico de desmedro postdestete (PMWS), sin embargo por sí solo no podría desencadenar la enfermedad clínica (Hernández, 2011). En general los signos y síntomas mas observados son pérdida de peso, palidez corporal, alteraciones respiratorias, diarrea, ictericia, neumonía intersticial y linfadenopatía generalizada, especialmente en los nódulos linfáticos inguinales superficiales (Segalés *et al.*, 2005). Debido a la naturaleza inmunosupresora de PCV2, los casos menos graves de las enfermedades asociadas a Circovirus porcino (PCVAD) puede tener signos clínicos relacionados con la co-infección con agentes secundarios de origen bacteriano o viral, en lugar de aquellos directamente asociados con la infección por PCV2 (O`Dea, 2010).

Estudios a la fecha, sugieren que el PCV2 es transmitido vía horizontal, por contacto directo, siendo considerada la vía oro-nasal la ruta más frecuente de infección entre animales infectados y susceptibles (Noriega *et al.*, 2007). La evidencia de transmisión vertical del PCV2 se ha surgido como una posible explicación de la alta tasa de portación en lechones (Allan & Ellis, 2000), sin embargo, incluso si los lechones no se infectan en el útero, ellos están continuamente expuestos al virus en el canal del parto, posteriormente por el calostro, la leche y las secreciones orales y nasales de la madre (Dvorak *et al.*, 2013). La asociación de PCV2 con abortos fue determinada bajo la identificación de antígenos y aislamiento de PCV2 de tejidos fetales en fetos abortados (Allan & Ellis, 2000). Por otra parte, experimentalmente, se ha detectado excreción de PCV2 en semen de verracos previamente inoculados con PCV2 (Noriega *et al.*, 2007 y Allberti., 2011).

La infección con este agente se asocia a diferentes patologías, tales como el Síndrome Multisistémico del desmedro post destete, síndrome de dermatitis y nefropatía porcino (SDNP), neumonía proliferativa necrotizante (NPN) y complejo respiratorio porcino (CRP) (Segalés et al., 2005). Hoy en día estas enfermedades se conocen como PCVAD o enfermedades asociadas a circovirus porcino, nombre que la Asociación Americana de Veterinarios de Porcinos (AASV) recomendó para agrupar a todas las enfermedades atribuidas al PCV2, incluido el PMWS (O`Dea, 2010; López *et al.*; sf).

La transmisión de PCV2 es muy eficiente, entre planteles y entre cerdos dentro de un mismo plantel, lo que nos tendería a pensar que sería casi imposible encontrar planteles porcinos seronegativos a PCV2 (Torres, 2007).

La morbilidad puede alcanzar un 50%, aunque por lo general oscila entre el 5 al 20% de los animales. Situaciones de estrés, hacinamiento, mala ventilación e higiene, jugarían un papel importante en la presentación de la enfermedad (Torres, 2007), pero los factores individuales como la edad, la protección inmunitaria pasiva o activa, carga viral individual, situación fisiológica, son también de importancia para la aparición clínica de la enfermedad (Soria y Segalés, 2012).

Diagnóstico

Dado que el Circovirus y las enfermedades asociadas a él, no están dentro de las listas de enfermedades buscadas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), no existe ningún protocolo que nos oriente a que prueba sería válida para el diagnóstico de este agente, sin embargo, hoy en día se describen y utilizan principalmente 3 técnicas diagnósticas para PCV, el aislamiento viral desde células susceptibles, búsqueda de anticuerpos anti-PCV2 mediante ELISA o la detección del virus empleando técnicas de detección del ácido nucleico como el PCR o RT-PCR. Cabe destacar que desde el surgimiento de la reacción de cadena polimerasa en tiempo real (RT-PCR o qPCR), ha destacado por sobre las pruebas serológicas, debido a que es altamente sensible y específica, ahorra tiempo y es fácil de manejar (Zheng *et al.*, 2012).

Por medio de qPCR, cualquier secuencia de ácido nucleico presente en una muestra compleja puede ser amplificada, en un proceso cíclico para generar un gran número de copias idénticas que pueden ser fácilmente analizadas. La cantidad de producto formado (DNA) se controla durante el curso de la reacción mediante la monitorización de la fluorescencia de los fluorocromos introducidos en la reacción que es proporcional a la cantidad de producto formado, y el número de ciclos de amplificación necesarios para obtener una cantidad particular de moléculas de DNA. Asumiendo una eficiencia de amplificación determinado, que normalmente se encuentra cercana a la duplicación del número de moléculas por ciclo de amplificación, es posible calcular el número de moléculas de ADN de la secuencia amplificada que estaban inicialmente presentes en la muestra (Kubista *et al.*, 2006).

Hasta ahora, se han reportados numerosos estudios orientados a estandarizar y poder amplificar DNA PCV2 por medio RT-PCR desde distintos tipos de muestras (Zheng *et al.*, 2012).

Prevención

Debido a la persistencia del PCV2 en el ambiente, su rápida replicación y la resistencia a los agentes químicos utilizados en los planteles porcinos, hacen que la prevención de la enfermedad juegue un papel muy importante. En aquellos países que se han visto afectados por PCV2, las medidas más eficaces en reducir el impacto generado, han sido, en orden de importancia; la vacunación, las medidas de manejo y bioseguridad (Estrada, 2009).

Por este motivo el desarrollo de vacunas anti-PCV-2 ha cobrado mucha relevancia en los últimos años y en general ellas han mostrado tener buenos resultados en la generación de inmunidad en los animales. Lo anterior se respalda en algunos estudios que muestran la efectividad de vacunas aplicadas en forma previa a la exposición al virus, donde los animales presentan menor carga viral que aquellos en que no se aplicó el tratamiento (Reicks y Leuwerke, 2008, Beach & Meng., 2012 y Shen *et al.*, 2010).

Otros estudios realizados en EE.UU., Canadá y Europa, utilizando 4 vacunas (*Ingelvac* de Boehringer; *Suvaxyn* de Fort Dodge; *Circovac* de Merial y Porcilis PCV de Intervet), demostraron ser protectivas frente a PCV2, pero ningún estudio es completamente concluyente (Noriega *et al.*, 2007).

Aunque las vacunas comerciales actuales basados en el genotipo PCV2a han demostrado ser eficaces, las futuras generaciones de vacunas debe estar basada en combinaciones de subgenotipos PCV2a y PCV2b debido a la todavía alta prevalencia de ambos genotipos en las producciones (Beach N & Meng XJ., 2012).

Comúnmente las vacunas se administran por vía parenteral (intramuscular) y aunque esta vía ha demostrado ser muy eficiente, se han presentado dificultades asociados a la inyección en programas de vacunación masiva, tal como, personal capacitado, tiempo, posible contaminación y estrés derivado del manejo animal (Islam *et al.*, 2012). De esta manera, una alternativa que ha sido largamente explorada, es el desarrollo de vacunas orales para la industria porcina. Las vacunas orales, podrían ser potencialmente incorporadas en el alimento y agua de bebida, facilitando su administración, entregando así una mejora tecnológica en el suministro del antígeno, ya que, además de superar los problemas relacionados con el manejo, facilitarían el reforzamiento del antígeno cuando la inmunidad de los animales esté por debajo del umbral protectorio (Bucarey *et al.*, 2009).

Sin embargo, la eficacia de las vacunas orales es todavía variada dada la degradación del antígeno en el tracto gastrointestinal y la baja tasa de incorporación del antígeno en las células del tejido linfoide asociado a mucosas intestinal. Se ha demostrado que mediante la incorporación del antígeno en micropartículas, éste es protegido contra la degradación a lo largo del tubo digestivo y es efectivamente absorbido a nivel de placas de Peyer, en el intestino (Islam *et al.*, 2012). De esta forma, hoy en día, un aspecto fundamental en el desarrollo de vacunas orales es su microencapsulación con polímeros naturales como el quitosano. El quitosano es un polímero biodegradable, no tóxico, que permite aumentar la biodisponibilidad de la vacuna, le otorga resistencia a

proteasas y al pH ácido que existe en el estómago y parte del intestino. Además, este tipo de formulación, le otorga a la vacuna características mucoadhesivas, permitiendo una entrega controlada del antígeno, lo anterior estimularía tanto la inmunidad sistémica y local del animal, ya que crea un ambiente inflamatorio favorable para la presentación del antígeno por parte del sistema inmune asociado a la mucosas (Islam *et al.*, 2012).

HIPÓTESIS

La inmunización con una vacuna experimental de mucosa contra circovirus porcino, será capaz de levantar el título de anticuerpos anti-PCV2 y disminuir los niveles de carga viral de mejor o similar manera que una vacuna comercial inyectable.

OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar el efecto de una vacuna experimental de mucosa sobre la respuesta inmune humoral y la replicación viral en cerdos infectados naturalmente por PCV2.

Objetivo Específicos

1. Determinar y comparar en distintos periodos de tiempo, la carga viral de PCV2 en suero entre cerdos no inmunizados, cerdos inmunizados con la vacuna de mucosa y cerdos inmunizados con la vacuna comercial anti-PCV2.
2. Determinar y comparar en distintos periodos de tiempo, la presencia de anticuerpos totales anti-PCV2 entre cerdos no inmunizados, cerdos inmunizados con la vacuna de mucosa y cerdos inmunizados con la vacuna comercial anti-PCV2.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Inmunización y muestreo de animales

Desde un plantel ubicado en la Región Metropolitana, “Comercial e Industrial el Monte”, como antecedente el plantel es positivo a PCV-2 y a otras infecciones comunes en el cerdo, como Influenza porcina, síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), neumonía enzoótica (*Mycoplasma hyopneumoniae*), entre otras. De un total de 240 cerdos comerciales que fueron utilizados en éste ensayo, desde las 3 semanas de edad hasta su faena, distribuidos en 4 grupos llamados formulación experimental vía oral/intranasal, formulación experimental vía inyectable, placebo y circumvent, se analizaron 128 individuos, correspondientes a 32 animales seleccionados al azar por grupo. Cada animal fue identificado con un crotal único de color (rojo, amarillo, blanco y verde) según tratamiento y vía de administración (Tabla 1). Se utilizó una vacuna desarrollada en el centro biotecnológico veterinario (BIOVETEC), contra PCV-2 basada en extracto crudo de levadura, enriquecida con VLPs de PCV-2 microencapsulada con quitosano sulfatado (QS), utilizando la vía oral/intranasal e inyectable, una formulación placebo, y la vacuna comercial Circumvent™, administrándose en los cerdos a las 4 semanas de edad, seguida de un refuerzo a las dos semanas. La obtención de sangre se llevo a cabo por punción de la vena yugular mediante tubos Vacutainer® con aguja de 21Gx1 durante la semana 3, 7, 11, 19 y se transportaron refrigeradas al laboratorio BIOVETEC, en el cual se centrifugo a 1800 rpm x por 5 minutos para obtener el sobrenadante de suero, el cual fue alicuotado en criotubos de 2 ml estériles y libres de nucleasas, posteriormente rotulados y almacenados a -80°C hasta ser utilizados.

Nº Corral	Grupos en Estudio
1-3	Formulación experimental inyectable
2-4	Formulación experimental oral/intranasal
5-6	Placebo
7-8	Circumvent

Tabla 1: Diseño experimental para la inmunización de los cerdos.



Fig. 2: Distribución de cerdos en grupos de tratamientos y administración de vacuna experimental oral/intranasal contra PCV2, Plantel Comercial e Industrial el Monte.

2. Extracción de DNA a partir de muestras obtenidas

El proceso de purificación de DNA desde suero se llevo a cabo por medio de un kit comercial Quick-gDNATM MicroPrep (sdfhgfgj) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. El DNA obtenido fue cuantificado mediante espectrofotometría UV y de esta manera se calculo la concentración de DNA midiendo la absorbancia (abs) a 260 nm de acuerdo a la siguiente fórmula: $\text{DNA } (\mu\text{g/mL}) = (\text{abs } 260) \times (\text{factor de dilución}) \times (50 \mu\text{g DNA/mL}) / (1 \text{ unidad de abs } 260)$. La pureza del DNA fue estimada de acuerdo a la razón de absorbancia 260/280 nm (Maniatis *et al.*, 1982). Terminada la extracción de ADN, el producto quedó almacenado a -20°C hasta que fue analizado mediante la técnica de qPCR.

3. Curva de calibración para cuantificación de carga viral por qPCR

Se utilizó como estándar el plasmidio pYES2::ORF2-OPTZ, en el cual se encuentra clonado el genoma completo del virus. El DNA plasmidial, fue extraído, desde la cepa bacteriana *E. coli* DH5 α , por medio de un kit comercial (Plasmid

Midi Kit, Qiagen). La concentración de la preparación del plásmido control, se determino midiendo la absorbancia a 260 nm de acuerdo al protocolo descrito con anterioridad. Posteriormente, se calculo la concentración molar de DNA equivalente a los gramos del genoma control que se agregará como templado, considerando un peso molecular promedio de un par de bases igual a 660 g/mol, resultando en un peso molecular promedio para el plásmido control (5200 pb) de $3,12 \times 10^6$ pg/pmol. De esta forma, fueron utilizadas en las reacciones de la curva estándar de amplificación, diluciones seriadas (1/100.000 hasta 1/1.000.000.000) de concentraciones molares conocidas de DNA plasmidial en agua libre de nucleasas.

La carga viral de la infección, se calculó por estimación de la cantidad de DNA viral en los fluidos corporales, como por ejemplo DNA viral por mililitros de suero. Por lo tanto para poder conocer la cantidad efectiva de copias o moléculas de DNA viral contenida en cada una de las muestras problema, se interpolaron los valores Cq de fluorescencia obtenidos, a los valores correspondientes en moles de acuerdo a la curva estándar construida con el genoma control. Esto se realizó con el conocimiento previo de la masa del genoma plasmidial (concentración obtenida en espectrofotometría x volumen total de la muestra) y el peso molecular tanto del genoma del virus como el resto del DNA contenido en el plasmidio.

Para la ejecución de ésta técnica, se realizaron “pooles” con 4 muestras de suero cada uno, de un total de 16 muestras analizadas por grupo.

4. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Se utilizo una pareja de partidores específicos que amplifican una región específica de ORF2 de PCV2.

- PCV2qPCR-F 5`-ATGTCCACCGCCCAGGAGG-3` Posición 1523-1541
- PCV2qPCR-R 5`-CCGYTGGAGAAGGAAAAATGGCATC-3` Posición 1603-1627

Se utilizo un mix de reacción de 20 uL, compuestos por:

- 10 μL 2X KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix2 Universal
- 4,2 μL de agua libre de nucleasas
- 0,4 μL [10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$], de cada partidor específico
- 5 μL de templado de ADN

El PCR en tiempo real, se llevo a cabo en un Termociclador LightCycler® Nano de Roche. La formación de producto fue monitoreado continuamente por medio de la detección de unión fluorescente de SYBR®Green al DNA, en cada paso de elongación. Las condiciones de amplificación que se utilizaron en este estudio, fueron una desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, posteriormente 40 ciclos que constan de una fase de desnaturalización a 95°C por 10 segundos y una fase de alineamiento/extensión a 60°C por 60 segundos, luego se realizo una curva de Melting para confirmar la especificidad de amplificación.

5. Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA)

Para llevar a cabo esta técnica se utilizó el kit comercial SERELISA PCV2 Ab Mono Blocking (SYNBIOTICS, USA) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Para su lectura se realizo en el lector de microplacas (Microplate reader Model 680, BIO-RAD), a una longitud de onda de 450 nm, obteniéndose mediante éste la densidad óptica de cada muestra. Finalmente se realizó el análisis cualitativo de los resultados, donde cada muestra que presente una proporción S/N ratio $\leq 0,4$ es considerada como positiva para la presencia de anticuerpos en suero, mientras que cada muestra que presente una proporción S/N ratio de $> 0,4$ es considerada como negativa.

$$\text{S/N} = \frac{\text{DO lectura de absorbancia de la muestra}}{\text{Promedio DO control negativo}}$$

Promedio DO control negativo

DO: Densidad óptica.

6. Análisis de los resultados obtenidos

se utilizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existen diferencias significativas entre los 4 distintos grupos de tratamiento en cuanto a la diferencia en los resultados de niveles de anticuerpo. Inicialmente se realizó la prueba de ANOVA independiente para cada una de las semanas (3, 7, 11 y 19). En el caso de detectar diferencias significativas entre grupos, se realizó la prueba Post hoc de Tukey para determinar las diferencias específicas entre grupos. Para comparar la diferencia de los valores de ELISA entre grupos utilizando los resultados integrados de todas las semanas, se realizó un modelo lineal mixto considerando la variable ELISA (valor S/N) como la variable dependiente, las variables semanas y la variable grupo como efectos fijos, y la identificación (ID) de cada cerdo como factor al azar, el cual toma en cuenta que no existe independencia de los datos medidos en un mismo individuo. Se utilizó la prueba post hoc de Tukey para determinar la diferencia de los resultados entre grupos. Todos los análisis fueron hechos en el software R v. 3.2.0 (Core Team 2014).

Respecto a la carga viral, los resultados obtenidos se tabularon según número de *pools* positivos por grupo y por semana. Además, estos datos se graficaron según los valores Log PCV2 copias/ml suero en cada uno de los grupos según tratamiento. Para los datos anteriores no se realizaron pruebas estadísticas, ya que el número de muestras positivas obtenidas fueron limitadas y no presentaron un comportamiento paramétrico.

7. Instalaciones

Los procedimientos se llevaron a cabo en las instalaciones del laboratorio BIOVETEC de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

8. Bioseguridad

Los trabajos se realizaron con las siguientes medidas de bioseguridad:

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

RESULTADOS

Para el análisis de estos resultados finalmente se consideraron 32 animales al azar dentro de cada grupo (Experimental Inyectable, Oral/Intranasal, comercial y placebo). Adicionalmente en el caso de los resultados de carga viral, se realizaron 8 “pooles” de 4 muestras cada uno, por cada grupo.

1- Extracción de DNA a partir de muestras obtenidas.

A partir de los suero obtenido, para cada muestra se procedió con un kit comercial (Axyprep Blood Genomic DNA Miniprep kit, AXYGEN Biosciences) a extraer el DNA, obteniendo como producto final un volumen de 50 μ L. Posterior a la extracción, se realizó espectrofotometría en la cual se obtuvieron valores de concentración de DNA cercanos a los 35 ng/ μ l de DNA.

2- Curva de calibración para cuantificación de carga viral por qPCR.

En la Figura 3 y 4 se muestra la curva de calibración, fabricada a partir de los datos obtenidos de las diluciones seriadas (1/10.000 hasta 1/1.000.000.000) de concentraciones molares conocidas de DNA plasmidial en agua libre de nucleasas.

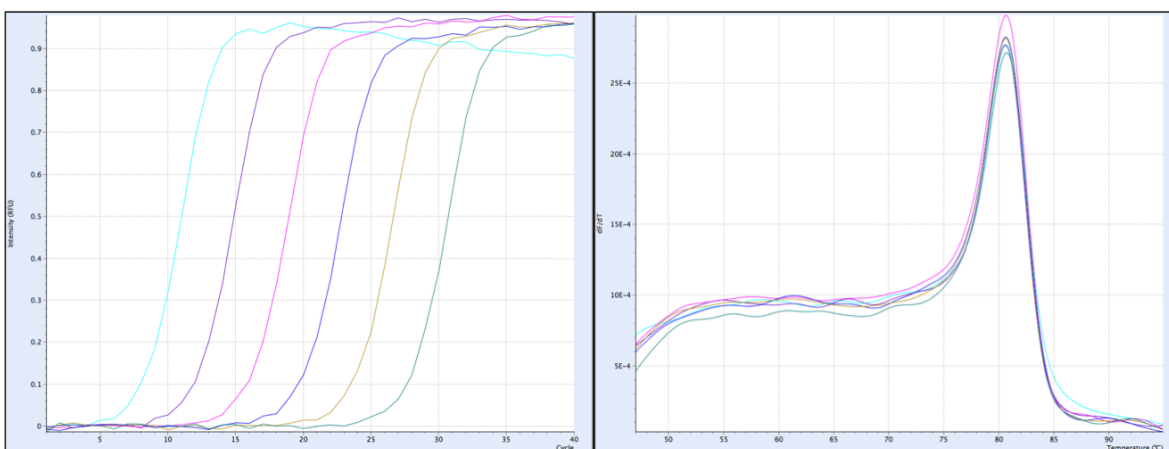


Fig. 3: Diluciones seriadas de DNA plasmidial PVC2 y Curva de Melting, en qPCR, programa Termociclador LightCycler® Nano.

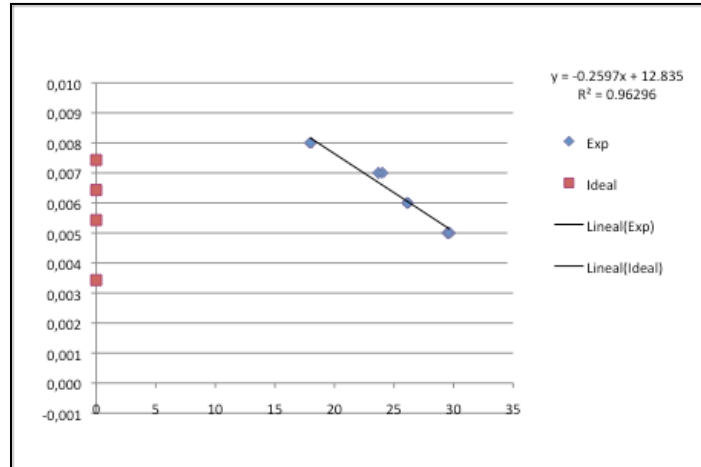


Fig. 4: Curva de calibración o curva estándar. En la parte superior se observa la ecuación de la recta arrojada por el programa: $Y = -0,2597X + 12,835$; donde “X” corresponde a la carga viral e “Y” al valor de “CT”

3- Cuantificación de carga Viral mediante qPCR.

Las muestras positivas presentaron una carga viral que fluctuó entre log 6,29 y 9,39 copias de ADN/mL de suero. Se observa que todos los grupos durante la 3 semana de vida son positivos a PCV2 en al menos uno de sus pooles (Figura 5 y Tabla 2), excepto el grupo formulación experimental inyectable. Durante la semana 7 se evidencia la primera alza de carga viral en todos los grupos y todos sus pooles y a la semana 11 esta carga viral tiene su pick en todos los grupos con una mediana de log 8 copias de ADN/mL, independiente del tratamiento realizado. Finalmente, en la semana 19 se evidencia una disminución en la carga viral en todos los grupos, pero solo la formulación experimental inyectable logra bajar la carga viral a cero en todas sus muestras, disminuyendo en 8 Log su carga viral respecto al grupo placebo. Además, el grupo experimental inyectable bajo en un 100% la carga viral (desde 8 Log a 0) en los 8 “pooles” analizados, al igual que la vacuna comercial, la cual redujo en un 100% la carga viral (desde 7,5 Log a 0) en 7 de los 8 “pooles”.

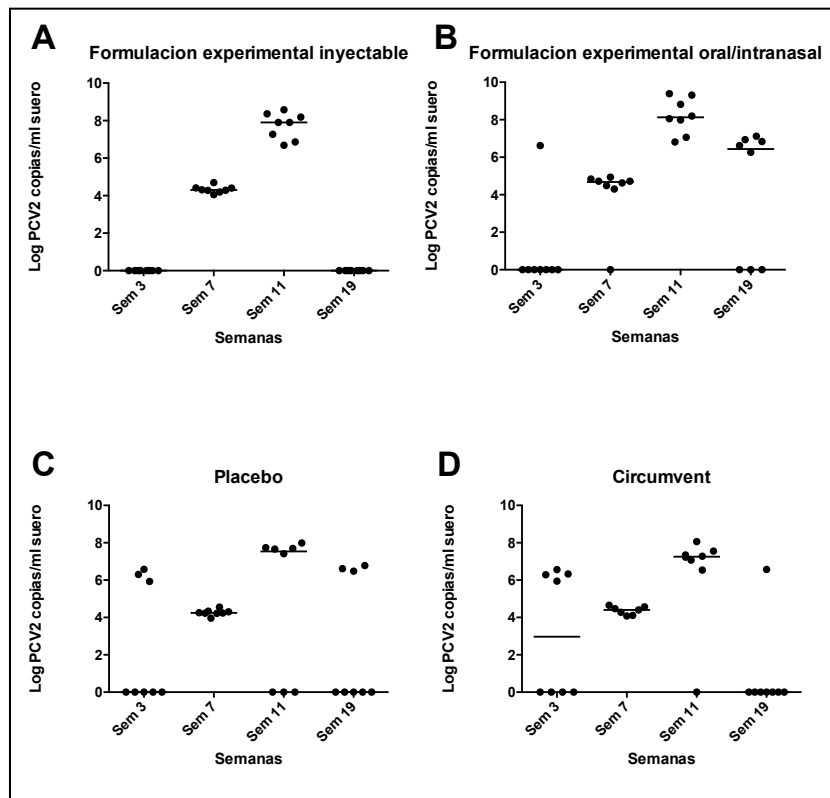


Fig. 5: Evolución de la carga viral en los cerdos inmunizados y no inmunizados contra PCV2, según tratamiento. El gráfico A corresponde a la formulación experimental con administración inyectable, el gráfico B a la formulación experimental con administración oral/intranasal, el gráfico C al grupo placebo y el gráfico D a la vacuna comercial. La barra negra corresponde a la mediana.

Grupo	Semana 3	Semana 7	Semana 11	Semana 19
Formulación inyectable	0/8	8/8	8/8	0/8
Formulación oral/intranasal	1/8	7/8	8/8	5/8
Placebo	3/8	8/8	5/8	3/8
Circumvent	4/8	8/8	7/8	1/8

Tabla 2: Numero de Pooles positivos a PCV2 por grupo, mediante la tecnica de qPCR. Formulación Inyectable, Formulación Oral/Intranasal, Placebo y Circumvent

4- Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA)

Se observa en todos los grupos la presencia de anticuerpos contra PCV2 a las 3 semanas de vida, los cuales disminuyen en todos los grupos a las 7 semanas de vida (Figura 6). Esta disminución del título de anticuerpos, en los grupos experimentales (inyectable y oral/intranasal) y comercial presentó diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo placebo ($p < 0,05$). Por otra parte en la semana 11 no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de la formulación experimental inyectable, oral/intranasal y placebo, sin embargo el grupo vacunado con la formulación comercial marca diferencias significativas respecto a los anteriores ($p < 0,05$). En la semana 19 se apreció un alza marcada en el título de anticuerpos en todos los grupos, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p < 0,05$) (Anexo 1).

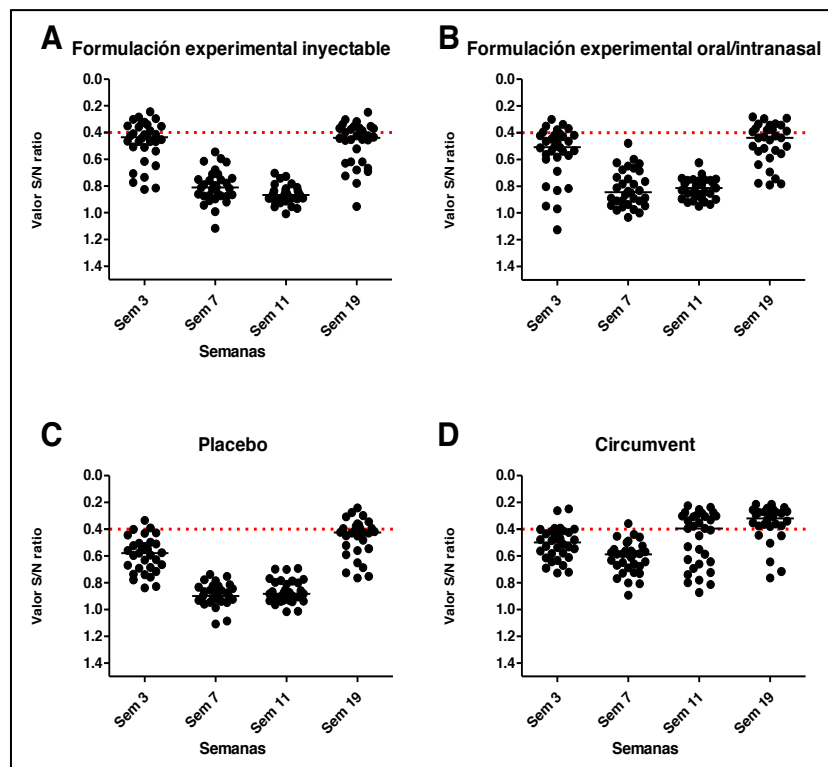


Fig. 6: Perfil serológico de los cerdos inmunizados contra PCV2, según tratamiento. S/N ratio $\leq 0,4$ es considerada como positiva para la presencia de anticuerpos en suero, mientras que cada muestra que presente un S/N ratio de $>0,4$ es considerada como negativa. La línea roja discontinua corresponde al límite de corte y la barra negra a la mediana.

DISCUSIÓN

En esta memoria se analizó el efecto de una vacuna contra PCV2 en base a microencapsulación de antígenos VLPs utilizando quitosano funcionalizado administradas por vía mucosa (oral /intranasal) e inyectable en cerdos comerciales, sobre la carga viral y seroconversión de anticuerpos totales anti PCV2, en cerdos no inmunizados he inmunizados con una vacuna comercial inyectable de amplio uso en el mercado de la producción porcina en Chile.

Varios estudios han reportado que al inmunizar los cerdos con vacunas contra PCV2 es una pieza clave para la prevención frente a este agente y las enfermedades asociadas a él, provocando que los episodios de infección sean mas cortos, las cargas virales logran bajar y se provoque un alza en los títulos de anticuerpos de mejor medida que animales que no han sido vacunados contra este patógeno (Fort *et al.*, 2007, Allberti *et al.*, 2011, Reicks y Leuwerke, 2008, Beach & Meng., 2012 y Shen *et al.*, 2010).

Los valores de carga viral de PCV2 encontradas en las muestras positivas durante este estudio, concuerdan con una infección moderada a severa de PCV2, esto a partir con lo reportado en estudios donde valores superiores a 10,53 copias de ADN/mL de suero serian compatibles con una infección severa que podría impactar la productividad de los animales, como por ejemplo la ganancia diaria de peso (López-Soria *et al.*, 2014). Esta alta carga viral observada, deberia estar relacionada al pobre estado sanitario del plantel, el cual se encontraba infectado con varias enfermedades del ganado porcino al momento del estudio, dada principalmente por el brote de síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) en el plantel. En estudios preliminares en el mismo plantel se observaron cargas virales de PCV2 mas bajas, las cuales fluctuaban entre log 2,81 y 5,75 copias de ADN/mL de suero, (datos no publicados, ver Anexo 2).

En la semana 7 y 11 en el estudio, practicamente todos los cerdos se encontraban positivos a PCV2, lo que concuerda con varias investigaciones, las cuales afirman

que todos los cerdos comerciales se infectan por PCV2 en algún momento de sus vidas (Allan *et al.*, 1999 y Ellis *et al.*, 1999).

Si bien durante la semana 19 todos los grupos logran bajar la carga viral en algunos de sus pooles, es el grupo experimental inyectable el cual exhibió un mejor desempeño al disminuir en todos sus “pooles muestrales” mayor carga viral de PCV2, versus la vacuna comercial durante el mismo periodo. Sin embargo, el grupo experimental oral/intranasal presentó un menor desempeño en bajar la carga viral. Esto puede haber ocurrido porque la vacuna experimental bajo la administración oral/intranasal, debió haber necesitado mayor dosis antigénica o mas numero de refuerzos de la vacuna (Booster), versus la misma vacuna bajo la administración inyectable (vía parenteral). Estudios similares a este, demostraron utilizando dosis antigénicas mayores en el desarrollo de vacunas orales para PCV2, bajar carga viral y aumentar niveles de anticuerpos anti PCV2 en cerdos (Patterson *et al.*, 2015).

Los anticuerpos totales anti PCV2 encontrados en suero a las 3 semanas de vida, corresponden a anticuerpos maternos, los cuales tienden a disminuir en todos los grupos a las 7 semanas de vida, mostrando un comportamiento similar a los observados en estudios de campo, en el cual los anticuerpos maternos comienzan a disminuir desde la lactancia hasta el periodo de recría (Blanchard *et al.* 2003; Carasova *et al.* 2007 y Laroche *et al.* 2003). La evolución de anticuerpos anti PCV2 en la 7 semanas de vida en los grupos experimentales (inyectable y oral/intranasal) y comercial presentó diferencias significativas respecto al placebo ($p < 0,05$). Lo anterior se explicaría por el comienzo de un levantamiento del título de anticuerpos inducido por las formulaciones experimentales y comercial, atenuando de esta forma la visualización del descenso de los anticuerpos maternos.

El hecho que la vacuna experimental exhiba un comportamiento similar al grupo placebo, y menor al desarrollado por la vacuna comercial durante la semana 11, puede ser explicado a que la formulación experimental podría estar generando una respuesta mas bien de tipo celular y no humoral. De cierta manera, esta

hipótesis se comprobó en un estudio publicado por nuestro laboratorio BIOVETEC (Bucarey *et al.*, 2014). En este estudio se demostró que ratones tratados con la vacuna oral experimental contra PCV-2 (Micropartículas cargadas con VLPs PCV2), desarrollaban respuesta inmune celular. Lo anterior quedó en evidencia mediante la inducción de la proliferación de linfocitos T del bazo ($CD4^+$ y $CD8^+$), frente a una exposición al virus, en animales inmunizados con la vacuna oral experimental. También por medio de un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima, se pudo evidenciar que los ratones inmunizados con la vacuna oral experimental mostraron un aumento de los niveles de IFN γ . Esta citoquina es liberada al medio por parte de los linfocitos T, el cual sería un método de regulación de la respuesta inmune celular, (Vergara, 2009).

El alza de anticuerpos anti PCV2 apreciada en todos los grupo en la semana 19 probablemente puede estar generada al constante desafío natural contra PCV2 que experimenta el cerdo en un plantel porcino.

Por ultimo para una mejor comprensión de la vacuna experimental, se sugiere a futuro, enfocarse en el aumento de la dosis antigénica u/o agregar 1 o 2 booster mas en el calendario de vacunación para la administración oral/intranasal, de manera de aumentar su potencia inmunogenica, así como explorar tal vez la combinación de la administración oral/intranasal e inyectable, como una estrategia más efectiva para disminuir la carga viral a nivel productivo. Por otro lado sería de gran ayuda poder medir la respuesta inmune celular a través de una citometría de flujo de esplenocitos de cerdos inmunizados y no inmunizados con la vacuna experimental. Complementariamente también poder medir IgA, anticuerpo mas relacionado con la actividad inmune de mucosas y así poder entregar mayor información sobre el efecto que tienen este tipo de vacuna.

CONCLUSIONES

1. La vacuna experimental oral/intranasal, no logró disminuir en buena medida la carga viral de PCV2 en comparación a la vacuna comercial Circumvent, sin embargo la vacuna experimental bajo la administración inyectable, fue la que logró disminuir en mejor medida la carga viral de PCV2 en un plantel porcino infectado naturalmente.
2. La vacuna experimental oral/intranasal, fue capaz de generar un alza de anticuerpos totales contra PCV2 durante las semanas tempranas de vida al igual que la vacuna comercial Circumvent, sin embargo en semanas tardías, el alza de anticuerpos totales fue mayor en los cerdos inmunizados con la vacuna comercial Circumvent versus la formulación experimental oral/intranasal.

BIBLIOGRAFÍA

ALLBERTI, K.A., ESTIENNE, M.J.; MENG, X.J.; 2011. Effect of vaccination of boars against porcine circovirus type 2 on ejaculate characteristics, serum antibody titers, viremia, and semen virus shedding. *J. Anim. Sci.* 89:1581– 1587.

ALLAN, G.M.; KENNEDY, S.; MCNEILLY, F.; FOSTER, J.C.; ELLIS, J.A.; KRAKOWKA, S.J.; MEEHAN, B.M.; ADAIR, B.M.; 1999. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J. Comp. Pathol.* 121(1), 1–11.

ALLAN, G.; ELLIS, J. 2000. Porcine circoviruses: a review, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12:3–14 .

ASOCIACIÓN GREMIAL DE PRODUCTORES DE CERDOS DE CHILE. 2016. Producción de carne de cerdo en Chile año 2015. [En línea]. <http://www.asprocer.cl/index/plantilla1.asp?id_seccion=2&id_subsecciones=77> [Consulta: 04-01-2017].

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

BLANCHARD, PH.; MAHÉ, D.; CARIOLET, R.; TRUONG, C.; LEDIMNA, M.; ARNAULD, C.; ROSE, N.; EVENO, E.; ALBINA, E.; MADEC, F.; JESTIN, A.; 2003. An ORF2 protein-based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Microbiol.* 94(3):183-94.

BUCAREY, S.; NORIEGA, J.; REYES, P.; TAPIA, C.; SAENZ, L.; ZUÑIGA, A.; TOBAR, A. 2009. The optimized gene of porcine circovirus type 2 expressed in yeast forms virus-like particles and elicits antibody responses in mice fed with recombinant yeast extract. *Vaccine.* 27(42): 5781-5790.

BUCAREY, S.; PUJOL, M.; POBLETE, J.; NUÑEZ, I.; TAPIA, C.; NEIRA-CASTILLO, A.; MARTINEZ, J.; BASSA, O. 2014. Chitosan microparticles loaded with yeast-derived PCV2 virus-like particles elicit antigen-specific cellular immune response in mice after oral administration. *Virology*. 541:149

CARASOVA, P.; CELER, V.; TAKACOVA, K.; TRUNDUVA, M.; MOLINKOVA, D.; LOBOTA, D.; SMOLA, J.; 2007. The levels of PCV2 specific antibodies and viremia in pigs. *Res Vet Sci.* 83(2):274-8.

CORE TEAM. (2014). *R: A Language and Environment for Statistical Computing.* R Foundation for Statistical Computing Vienna, Austria ISBN 3- 900051-07-0.

DVORAK, CH.; LILLA, M.; BAKER, S.; MURTAUGH, M. 2013. Multiple routes of porcine circovirus type 2 transmission to piglets in the presence of maternal immunity. *Veterinary Microbiology* 166: 365–374

ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; LAIRMONE, M.; HAINES, D.; BRATANICH, A.; CLARK, E.; ALLAN, G.; KONOBY, C.; HASSARD, L.; MEEHAN, B.; MARTIN, K.; HARDING, J.; KENNEDY, S.; MCNEILLY, F.; 1999. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11(1), 3–14.

ESTRADA, A. 2009. Síndrome de desmedro multisistémico post destete (PMWS). [En línea]. <http://www2.sag.gob.cl/Pecuaria/bvo/BVO_9_I_semestre_2009/articulos/PMWS.pdf> [Consulta: 12-05-2013].

FORT, M.; SIBILA, M.; ALLEPUZ, A.; MATEU, E.; ROERINK, F.; SEGALÉS, J.; 2007. Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolated of different genotypes and geographic origins. *Vaccine* 26:1063–1071.

GUO, L.; LU, Y.; WEI, Y.; HUANG, L.; LIU, CH. 2010. Porcine circovirus type 2 (PCV2): Genetic variation and newly emerging genotypes in China, *Virology Journal*, 7:273.

HERNÁNDEZ, J. 2011. Actualización sobre Circovirus porcino tipo 2 (PCV2), *Revista Porcicultura Iberoamericana* 1:5

ISLAM, M.; FIRDOUS, J.; CHOI, Y.; YUN CH.; CHO, CH. 2012. Design and application of chitosan microspheres as oral and nasal vaccine carriers: an updated review. *International Journal of Nanomedicine.* 7:6077–6093

KUBISTA, M.; ANDRADE, J.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONAK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJÖBACK, R.; SJÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L.; STAHLBERGA.; ZORIC, N. 2006. The real time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.* 27. 95-125.

LAROCHELLE, R.; MAGAR, R.; D'ALLARE, S.; 2003. Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res.* 67(2):114-20.

LÓPEZ, S.; GRAU-ROMA, L.; SEGALÉS, J. sf. Epidemiología de la circovirosis porcina. [En línea] <<http://francisco47.files.wordpress.com/2010/03/epidemiologia-de-la-circovirosis-porcina.pdf>> [Consulta: 17-04-2013].

LÓPEZ-SORIA, S.; SIBILA, M.; NOFRARÍAS, M.; CALSAMIGLIA, M.; MANZANILLA, E.G.; RAMÍREZ-MENDOZA, H.; MÍNGUEZ, A.; SERRANO, J.M.;

MARÍN, O.; JOISEL, F.; CHARREYRE, C.; SEGALÉS, J. 2014. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) load in serum on average daily weight gain during the postweaning period. *Vet. Microbiolo.* 174(3-4):296-301.

MANKERTZ A.; PERSSON F.; MANKERTZ J.; BLAESS G.; BUHK HJ. 1997. Mapping and Characterization of the Origin of DNA Replication of Porcine Circovirus, *Journal of Virology.* 71:2562–2566

MANIATIS T.; FRITSCH EF.; SAMBROOK J. 1982. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

MEEHAN BM.; MCNEILLY F.; TODD D.; KENNEDY S.; JEWURST VA.; ELLIS JA.; HASSARD LE.; CLARK EG.; HAINES DM.; ALLAN GM. 1998. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *Journal of General Virology.* 79:2171–2179.

NORIEGA J.; REYES.; BUCAREY S. 2007. Circovirus Porcino: Un virus pequeño que genera un gran problema. *Avances. Cs. Vet.* 22:62- 71.

NORIEGA, J. 2008. Detección y caracterización genotípica de circovirus porcino tipo 2 en Chile. Tesis Médico Veterinario. Santiago, Chile. U.Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 74 p.

O`DEA, M. 2010. Porcine circovirus infection. [En línea]. <http://www.scahls.org.au/__data/assets/pdf_file/0005/1915943/anzsdp-porcine.pdf> (consulta: 23-11-2012).

PATTERSON R.; ELEY, T.; BROWNE, CH.; MARTINEAU, HM.; WERLING, D. 2015. Oral application of freeze-dried yeast particles expressing the PCV2b Cap protein on their surface induce protection to subsequent PCV2b challenge in vivo. *Vaccine* (33) 6199–6205.

REICKS, D.; LEUWERKE, B. 2008. The effect of vaccination to porcine circovirus type 2 on detection in serum, blood swab and semen. [En línea] <<http://www.ivis.org/proceedings/ipvs/2008/oral/OR.01.14.pdf?LA=1>> [Consulta: 24-06-2013].

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

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.; FOSUM, C.; TIMMUSK, S.; STOCKHOFER-ZURWIEDEN, N.; BEATTIE, V.; ARMSTRONG, D.; GRASLAND, B.; BAEKBO, P.; ALLA, G.; 2008. PCV-2 genotype definition and nomenclature. [En línea] <<http://veterinaryrecord.bmj.com/content/162/26/867.full.pdf+html>> [Consulta: 01-11-2013].

SORIA, S.; SEGALÉS, J. 2012-2. Efecto de la viremia por circovirus porcino tipo 2 (PCV2) sobre parámetros productivos. [En línea] <http://www.3tres3.com/circovirosis_porcina/efecto-de-la-viremia-por-circovirus-porcino-tipo-2-pcv2_31560/> > [01-11-2013].

SHEN HG.; BEACH NM.; HUANG YW.; HALBUR PG.; MENG XJ.; OPRIESSNIG T. 2010. Comparison of commercial and experimental porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines using a triple challenge with PCV2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), and porcine parvovirus (PPV). *Vaccine* 28:5960–5966.

TISCHER I.; GELDERBLOM H.; VETTEMANN W.; KOCH.; MA. 1982. A very small porcine virus with a circular single-stranded DNA. *Nature* 295:64–66.

TORRES, M. 2007. Enfermedades asociadas al circovirus porcino tipo 2. [En línea] <<http://www.bioline.org.br/request?la07047>> [Consulta: 01-11-2013]

VERGARA, U. 2009. Linfocitos T reguladores y respuesta inmune. *Av. Cs. Vet.* 24:72–79

VICENTE, J.; SEGALÉS, J.; HÖFLE, U.; BALASCH M.; PLANA-DURAN, J.; DOMINGO, M.; GORTÁZAR, C. 2004. Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Vet. Res.* 35: 243–253.

VINCENT, E.; BALMELLI, C.; MEEHAN, B.; ALLAN, G.; SUMMERFIELD, A.; MCCULLOUGH, C. 2007. Silencing of natural interferon producing cell activation by porcine circovirus type 2 DNA. *Veterinary Immunology.* 120: 47 - 56.

ZHENG, L.; WANG, Y.; LI, M.; CHEN, H.; GUO, X.; GENG, J.; WANG, Z.; WEI, Z.; CUI, B. 2012. Simultaneous detection of porcine parvovirus and porcine circovirus type 2 by duplex real time PCR and amplicon melting curve analysis using SYBR Green. *J. Virol. Methods.* 11877 1–5.

ANEXOS

Anexo N° 1 Análisis Estadístico

1. Prueba de ANOVA para determinar las diferencias entre grupos la respuesta de anticuerpos (medias por ELISA) en cada una de las semanas post tratamiento.

Tabla ANOVA. Diferencia de los resultados ELISA entre grupos en cada una de las semanas en que se midió anticuerpos post-tratamiento. Los resultados indican que en todas las semanas hay diferencias significativas entre grupos.

ANOVA semana 7

	Gr. Lib	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Pr(>F)
Grupo	7	1.583	0.22622	18.87	<2e-16
Residual	113	1.355	0.01199		

ANOVA semana 11

	Gr. Lib	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Pr(>F)
Grupo	7	3.755	0.5365	47.33	<2e-16
Residual	113	1.281	0.0113		

ANOVA semana 19

	Gr. Lib	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Pr(>F)
Grupo	7	0.3575	0.05107	2.168	0.0426
Residual	108	2.5443	0.02356		

Para determinar las diferencias significativas entre cada uno de los grupos, se realizó la prueba post hoc de Tukey, los resultados se muestran a continuación.

En la tabla resumen se presenta la comparación entre cada par de grupos de tratamiento utilizando la prueba de ANOVA para los resultados de ELISA obtenidos en cada una de las semanas. La primera columna representa el par de grupos comparados. La primera columna por grupos representa la diferencia promedio entre los resultados ELISA de los grupos comparados, y la segunda el valor p ajustado, los grupos con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) se indican con un *.

Grupos	Semana 7		Semana 11		Semana 19	
	Diferencia	Valor p aj.	Diferencia	Valor p aj.	Diferencia	Valor p adj
2-1	-0.058	0.803	-0.016	1.000	0.026	1.000
3-1	0.019	1.000	-0.003	1.000	0.040	0.997
4-1	0.119	0.068	-0.080	0.444	-0.008	1.000
5-1	0.077	0.491	0.053	0.853	-0.035	0.998
6-1	0.124	0.042*	-0.060	0.774	0.021	1.000
7-1	-0.209	<0.001*	-0.279	<0.001*	-0.113	0.477
8-1	-0.151	0.004*	-0.495	<0.001*	-0.113	0.482

3-2	0.078	0.552	0.014	1.000	0.014	1.000
4-2	0.178	0.001*	-0.064	0.724	-0.034	0.999
5-2	0.136	0.015*	0.069	0.594	-0.061	0.954
6-2	0.182	<0.001*	-0.043	0.949	-0.005	1.000
7-2	-0.150	0.005*	-0.262	<0.001*	-0.139	0.216
8-2	-0.092	0.257	-0.478	<0.001*	-0.139	0.220
4-3	0.100	0.269	-0.078	0.559	-0.049	0.992
5-3	0.058	0.850	0.056	0.855	-0.075	0.899
6-3	0.105	0.198	-0.057	0.852	-0.019	1.000
7-3	-0.228	<0.001*	-0.276	<0.001*	-0.153	0.169
8-3	-0.170	0.002*	-0.492	<0.001*	-0.153	0.172
5-4	-0.042	0.965	0.133	0.019*	-0.027	1.000
6-4	0.005	1.000	0.021	1.000	0.029	1.000
7-4	-0.328	<0.001*	-0.198	<0.001*	-0.105	0.616
8-4	-0.270	<0.001*	-0.414	<0.001*	-0.104	0.622
6-5	0.047	0.933	-0.113	0.074	0.056	0.976
7-5	-0.286	<0.001*	-0.332	<0.001*	-0.078	0.869
8-5	-0.228	<0.001*	-0.548	<0.001*	-0.078	0.873
7-6	-0.333	<0.001*	-0.219	<0.001*	-0.134	0.297
8-6	-0.275	<0.001*	-0.435	<0.001*	-0.134	0.302
8-7	0.058	0.821	-0.216	<0.001*	0.001	1.000

Resultados modelo mixto de regresión

Los coeficientes del modelo de regresión se presentan en la tabla x.

Anexo N°1. Resultados de modelo de regresión lineal

	Value	Std.Error	DF	t-value	p-value
(Intercept)	0.810	0.023	230	34.892	0.000
Semana19	-0.312	0.018	230	17.329	0.000
Semana7	0.018	0.018	230	0.997	0.320
Grupo2	-0.016	0.029	108	-0.553	0.582
Grupo3	0.019	0.031	108	0.613	0.541

Grupo4	0.010	0.030	108	0.334	0.739
Grupo5	0.031	0.030	108	1.025	0.308
Grupo6	0.034	0.030	108	1.131	0.261
Grupo7	-0.205	0.030	108	-6.742	0.000
Grupo8	-0.253	0.030	108	-8.314	0.000

Los valores p se relacionan con diferencias significativas entre cada uno de los grupos y el grupo de referencia (semana 11 y grupo 1 en este caso). Para determinar diferencias significativas entre grupos se utilizó la prueba post hoc de Tukey implementada en el package Multicomp para el software R.

Tabla . Resultados prueba post hoc de Tukey para la comparación de los resultados ELISA entre grupos.

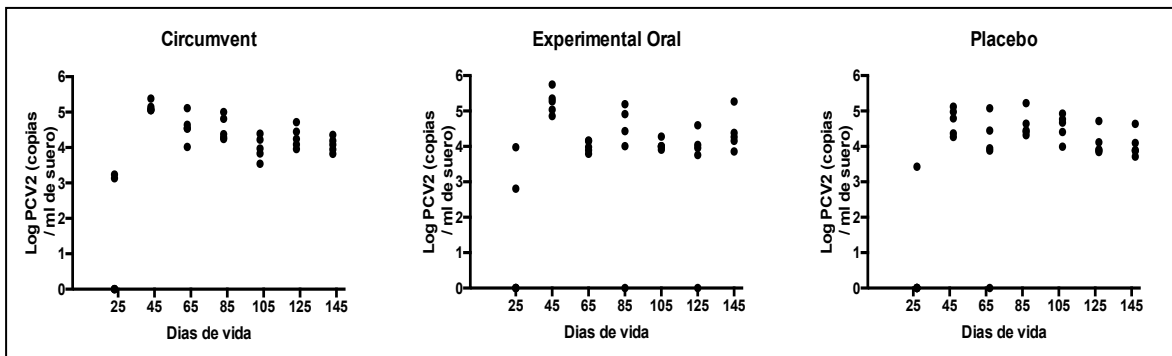
Grupos	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)	
2 - 1	-0.02	0.029	-0.553	0.999	
3 - 1	0.02	0.031	0.613	0.999	
4 - 1	0.01	0.030	0.334	1.000	
5 - 1	0.03	0.030	1.025	0.971	
6 - 1	0.03	0.030	1.131	0.950	
7 - 1	-0.20	0.030	-6.742	<0.001	***
8 - 1	-0.25	0.030	-8.314	<0.001	***
3 - 2	0.04	0.031	1.137	0.949	
4 - 2	0.03	0.030	0.868	0.989	
5 - 2	0.05	0.030	1.569	0.769	
6 - 2	0.05	0.030	1.665	0.710	
7 - 2	-0.19	0.030	-6.208	<0.001	***
8 - 2	-0.24	0.030	-7.780	<0.001	***

4 - 3	-0.01	0.032	-0.277	1.000	
5 - 3	0.01	0.031	0.368	1.000	
6 - 3	0.02	0.032	0.480	1.000	
7 - 3	-0.22	0.032	-7.001	<0.001	***
8 - 3	-0.27	0.032	-8.494	<0.001	***
5 - 4	0.02	0.031	0.662	0.998	
6 - 4	0.02	0.031	0.771	0.995	
7 - 4	-0.21	0.031	-6.852	<0.001	***
8 - 4	-0.26	0.031	-8.374	<0.001	***
6 - 5	0.00	0.031	0.122	1.000	
7 - 5	-0.24	0.031	-7.631	<0.001	***
8 - 5	-0.28	0.031	-9.179	<0.001	***
7 - 6	-0.24	0.031	-7.623	<0.001	***
8 - 6	-0.29	0.031	-9.145	<0.001	***
8 - 7	-0.05	0.031	-1.522	0.796	

Los resultados de la prueba post hoc para este modelo lineal, indican diferencias significativas entre el grupo 8 y los grupos 1,2,3,4,5,6 y entre el grupo 7 y los grupos 1,2,3,4,5 y 6. Adicionalmente se corrió el modelo incorporando las variables “valor ELISA al inicio del estudio” y la variable “peso al inicio del estudio” para controlar por posibles diferencias del estado de los animales al inicio, sin embargo, las conclusiones del modelo fueron las mismas

Anexo N° 2

Datos no publicados de experiencia de campo anterior, desde un plantel ubicado en la Región Metropolitana, “Comercial e Industrial el Monte”. Mismo plantel donde se realizo esta tesis.



Evolución en el tiempo de la carga viral de PCV2 en cerdos bajo 3 tratamientos de inmunización (vacuna Circumvent, Experimental Oral y Placebo).