



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFEECTO EN LOS PARAMETROS PRODUCTIVOS DE CERDOS VACUNADOS
DE MANERA ORAL CONTRA CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2**

IGNACIO ANDRÉS NÚÑEZ OYARZÚN

Proyecto de Memoria para optar
al Título Profesional de Médico
Veterinario

Departamento de Ciencias
Biológicas Animales.

PROFESOR GUÍA: SERGIO BUCAREY VIVANCO

Universidad de Chile

SANTIAGO, CHILE

2014

PROYECTO FONDECYT 11110135



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFEECTO EN LOS PARAMETROS PRODUCTIVOS DE CERDOS VACUNADOS
DE MANERA ORAL CONTRA CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2**

IGNACIO ANDRÉS NÚÑEZ OYARZÚN

Proyecto de Memoria para optar
al Título Profesional de Médico
Veterinario

Departamento de Ciencias
Biológicas Animales.

Nota Final:

		NOTA	FIRMA
Profesor guía :	Sergio Bucarey Vivanco
Profesor corrector:	Andrónico Neira Carrillo
Profesor corrector:	Mario Maino Menendez

Agradecimientos.

Agradecer a Yordanka, a mis padres, Juan Carlos y Marcia, a mis hermanos y a mis amigos, que me apoyaron durante este arduo camino que significó el proyecto de título, contando siempre con su apoyo incondicional y su inmensa ayuda , cada uno contribuyendo a su manera.

Agradecer también a mi profesor guía, el Dr. Sergio Bucarey que me dio la oportunidad de acercarme al mundo de la investigación y que me permitió obtener mi primera publicación gracias al trabajo que realizamos en el laboratorio, asimismo agradecer los consejos de los profesores correctores Dr. Mario Maino y Dr. Andrónico Neira, que fueron siempre receptivos al proyecto y aportaron grandes ideas para investigaciones posteriores.

De la misma manera agradecer a Toribio Correa por permitir llevar a cabo el ensayo en sus instalaciones, dando espacio al desarrollo de la investigación en un rubro cada vez más difícil de acceder con estos propósitos.

RESUMEN

La producción de cerdos representa la mayor producción de carne del país, por lo tanto se hace cada vez más necesario innovar para controlar de manera preventiva las enfermedades prevalentes en los planteles. Una de estas patologías, es el síndrome de desmedro multisistémico post destete (PMWS), este síndrome es multifactorial y uno de sus causantes más importante es el circovirus porcino tipo II (PCV-2), el cual se encuentra en cerca del 100% de los planteles productivos de cerdos a nivel mundial. Esta situación ha elevado la importancia de la vacunación dentro de la producción, siendo hasta el momento la vacunación parenteral la predilecta. Aunque eficaces, las vacunas parenterales tienen ciertas desventajas, incluyendo estrés animal e inmunosupresión concomitante, además de la implicancia de procedimientos laboriosos asociados. Debido a esto, se están explorando rutas alternativas de administración de vacunas, como la oral, para inmunizar contra el PCV-2. Las vacunas orales, potencialmente suministradas en el alimento o agua bebida, representan una mejora tecnológica en el suministro de antígeno, superando los problemas relacionados con el manejo de la inyección y facilitando el reforzamiento del antígeno cuando la inmunidad de los animales está por debajo del umbral protector. En este estudio se prospectó el desarrollo de una vacuna oral contra PCV2, recubriendo el antígeno de la cápside viral con moléculas de quitosano, polímero natural que otorga protección frente a los efectos nocivos del sistema digestivo del cerdo, para una entrega eficiente del antígeno a nivel de la mucosa intestinal. Finalmente, se probó a escala piloto la vacuna oral dentro de un plantel comercial, evaluando dos variables productivas, ECA y GDP, comparándolas versus animales sin inmunizar y animales vacunados con una vacuna comercial intramuscular. Como resultado se obtuvo que la GDP fue mayor en el grupo inoculado con la formulación comercial, y la ECA no mostró diferencias entre los tres grupos.

ABSTRACT

Swine production represents the largest meat production in the country, therefore it becomes increasingly necessary innovate to control the prevalent diseases in the herds. One of this pathologies is the post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), this is a multifactorial syndrome and one of these factors is the porcine circovirus tipe II (PCV-2), which is in almost all the herds in the world. This situation has increased the importance of

the vaccination within the production, being the parenteral way the preferred one. Although effective, parenteral vaccines have certain drawbacks, including stress and concomitant immunosuppression, plus the impicance of associated laborious procedures. Because of this, they are exploring alternative vaccine delivery, such as oral, to immunize against PCV -2. Oral vaccines, potentially provided in the food or drink water represent a technological improvement in the delivery of antigen, overcoming the problems associated with handling of the injection, and facilitating the boosting of the antigen when the immunity is below the protective threshold. In this study the development of an oral vaccine against PCV-2 was prospected, coating the viral antigen capsid with molecules of chitosan, a natural polymer which provides protection against the harmful effects of the digestive system of the pig, for an efficient delivery of the antigen. Finally, it was tested at pilot scale the oral vaccine within a commercial herd, evaluating two production variables, food conversion efficiency and daily weigh gain, comparing them versus unimmunized animals and animals vaccinated with a commercial vaccine intramuscularly. It was observed that the daily weigh gain was higher in the group inoculated with the commercial formulation, and food conversion efficiency showed no difference between the three groups.

INTRODUCCION

En Chile la producción de cerdos representa más de un 35% del total de la producción de carne nacional. Se ha logrado duplicar la cantidad de toneladas de carne de cerdo por año desde los últimos diez años (ASPROCER, 2012). Este incremento significativo en la producción obliga a generar la mayor cantidad de lechones posible, y que estos lleguen a desarrollarse de manera sana, alcanzando posteriormente su peso de venta. Esto depende de diversos factores, dentro de los cuales destaca el estado sanitario general del plantel, cualquier defecto en este sentido puede generar grandes pérdidas productivas, que se traducen finalmente en pérdidas económicas.

Existen diversas patologías que pueden afectar la salud general de un plantel de cerdos, dentro de las cuales se encuentra el Síndrome Multisistémico de Desmedro Post Destete, abreviado PMWS, por su nombre en inglés. Esta enfermedad es producida por un virus llamado Circovirus Porcino Tipo II (PCV-2).

Los circovirus porcinos se clasifican en el género *Circovirus* dentro de la familia *Circoviridae*. Dentro de esta familia se encuentran también una serie de virus con características moleculares similares que afectan a las aves. Estos virus no poseen envoltura, son esféricos con simetría icosaédrica y estructuralmente muy pequeños. Luego de muchos estudios se concluyó que el circovirus porcino presenta dos variantes: PCV-1 el cual demostró ser apatógeno, y PCV-2 que ha sido asociado como el agente causal principal del Síndrome de Desmedro Multisistémico Postdestete o PMWS (del acrónimo: Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome), una enfermedad emergente de alto impacto en la industria porcina mundial (Faurez *et al.*, 2009).

El genoma de PCV está compuesto por DNA circular de hebra simple de aproximadamente de 1.760 nucleótidos de largo. En parte de dicho genoma se han identificado varios marcos de lectura abiertos (ORF, del Inglés *Open Reading Frames*) y otros segmentos no codificantes que han sido relacionados con la regulación de la transcripción y replicación del virus. De los ORFs conocidos, los más estudiados y caracterizados son el 1 y 2. El ORF1 codifica para la enzima replicasa (Rep), esencial para la replicación del DNA viral, mientras que ORF2 codifica para la proteína de la cápside viral, (Cap), la cual juega un

papel fundamental, regulatorio y estructural, en el proceso de ensamblaje de la partícula viral. El ORF2 ha mostrado tener gran variación en los distintos PCVs aislados hasta el día de hoy (Trundova y Celer, 2007).

El síndrome de desmedro multisistémico postdestete (PMWS), producido por el virus circovirus porcino tipo 2 (PCV2), es hoy en día considerado uno de los mayores problemas en la producción porcina alrededor del mundo (Fraile *et al.*, 2012). Sin embargo, no todos los planteles desarrollan la enfermedad, y dentro de planteles infectados hay casos de cerdos que no manifiestan síntomas de la enfermedad, llevando a concluir que la manifestación de la patología no depende únicamente de la presencia del virus, sino que se ven involucrados otros factores secundarios que ayudan a la presentación de la signología completa (O`Dea, 2010).

El PMWS ocurre normalmente en cerdos entre 5 y 12 semanas de edad, con una morbilidad que varía entre un 4 y un 25%, y si se manifiesta de manera severa puede conducir a una mortalidad del 90%. El virus puede transmitirse tanto horizontal como verticalmente, básicamente con el contacto directo entre cerdos infectados, además de transmitirse por fómites, esto es lo que hace difícil la erradicación del virus de los planteles afectados, llevando a una seroprevalencia considerable en los planteles de cerdos a nivel mundial. (O`Dea, 2010).

La patología puede variar desde asintomática hasta lesiones muy graves dependiendo de la severidad de la enfermedad, además se pueden concentrar en uno o más órganos, según si el virus se encuentra en las vías respiratoria, digestiva o distribuido de manera sistémica. (O`Dea, 2010).

Para controlar esta patología se realiza básicamente manejo de factores de riesgo (ventilación, densidad), para evitar que el virus se manifieste y produzca la enfermedad, por ejemplo, contralando las co-infecciones (Fraile *et al.*, 2012).

La persistencia del circovirus en el ambiente, su rápida replicación y la resistencia a los agentes químicos utilizados en los planteles porcinos hacen que la enfermedad se mantenga y se expanda en la industria porcina mundial. Por esta razón el desarrollo de vacunas anti-PCV-2 ha cobrado relevancia en los últimos años y éstas han mostrado tener buenos

resultados en la generación de inmunidad en los animales. Lo anterior se respalda en estudios que muestran la efectividad de vacunas aplicadas en forma previa a la exposición al virus, donde los animales presentan menor carga viral que aquellos en que no se aplicó ningún producto (Reicks y Leuwerke, 2008).

Hoy se conocen varias vacunas en el mercado internacional, cuya acción se basa en la utilización de la proteína de la cápside de PCV-2 como principal agente antigénico. El efecto de estas vacunas tuvo un impacto positivo a nivel económico, dado por menores gastos de producción por cerdo y por lo tanto mayores utilidades para el productor, básicamente debido a que mejora la ganancia diaria de peso y reduce la mortalidad, efectos negativos que impactan directamente en el proceso productivo (Fraile *et al.*, 2012).

Por otra parte, hasta la fecha todas las vacunas contra el PCV2 en el mercado han sido producidas como fórmulas inyectables de manera parenteral. Aunque estas son eficientes, hay problemas asociados con el uso de este tipo de productos, incluidos el tiempo y los procedimientos laboriosos, la inducción de la respuesta inflamatoria en el sitio de inyección, y el estrés derivado del manejo animal (Kim *et al.*, 2009). Tomando en cuenta que la infección por PCV2 y la generación del cuadro clínico asociado depende en gran medida del grado de estrés del animal, se hace imprescindible que tanto la formulación vacunal contra PCV2, como la vía de administración sea la más adecuada, privilegiando una inmunización pasiva y un procedimiento que no implique estrés para el animal (Bucarey *et al.*, 2009).

Una alternativa que ha sido largamente explorada es el desarrollo de vacunas orales para la industria porcina, pues esta vía de administración permitiría entre otras cosas, disminuir costos indirectos asociados a la vacunación por vía inyectable, como son tiempo, mano de obra e insumos. Por otra parte, las vacunas orales, potencialmente mezcladas con el alimento, representan una mejora tecnológica en el suministro de 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 un problema dada la degradación del antígeno en el tracto gastrointestinal y la baja tasa de incorporación en las células del

tejido linfoide asociado a mucosas en el intestino. Las vacunas orales enfrentan los mismos desafíos frente a los mecanismos de defensa del hospedero que un agente patógeno, ellas son diluidas en las secreciones mucosas, capturadas en el mucus del intestino, atacadas por proteasas y nucleasas, y excluidas por las barreras mucosas (exclusión inmunológica). 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).

Un aspecto fundamental en el desarrollo de vacunas orales es su microencapsulación con polímeros naturales como el quitosano. El quitosano es un polímero natural biodegradable que permite aumentar la biodisponibilidad de la vacuna, le otorga resistencia a proteasas y al ambiente ácido que existe en el estómago y parte del intestino, lo cual garantiza que los antígenos lleguen a su destino en la mucosa y sean absorbidas de manera óptima, a nivel de placas de Peyer (Islam *et al.*, 2012). El quitosano además, otorga características mucoadhesivas, lo que es muy ventajoso ya que se absorbe vía mucosa intestinal y permite una entrega controlada del antígeno en sitios específicos. Finalmente, otra ventaja considerable de microencapsular con quitosano, es que se estimula tanto la inmunidad sistémica como la inmunidad local del animal, ya que crea un ambiente inflamatorio que favorece la presentación del antígeno por parte del sistema inmune asociado a la mucosa. (Islam *et al.*, 2012)

Hoy en día la forma más factible y recomendada para evaluar la eficacia de vacunas experimentales contra PCV-2, es su prueba en campo sobre animales infectados naturalmente con el virus, de forma de medir, en el tiempo, parámetros productivos y correlacionar estos valores con su estado serológico anti-PCV2 o con la carga viral en suero.

El objetivo de esta memoria fue determinar los efectos de una vacuna oral experimental contra circovirus en los parámetros productivos de cerdos de criadero. Para esto primero fue necesario formular a escala de laboratorio una vacuna de administración oral contra circovirus porcino microencapsulando antígenos de PCV-2 con quitosano.

Los parámetros productivos a evaluar fueron la ganancia diaria de peso (GDP) y la eficiencia de conversión de alimento (ECA), ya que se ha comprobado que la infección por

PCV-2 afecta de manera negativa sobre la GDP de los cerdos en los planteles (Kixmoller *et al.*, 2008). Además, se compararon estos efectos entre cerdos vacunados con una vacuna intramuscular comercial (Circumvent ®) y cerdos sin inmunizar.

MATERIALES Y METODOS

Preparación y síntesis del antígeno de PCV-2 en levaduras

La cepa de levadura que se utilizó en la elaboración del antígeno vaccinal se denomina N30/pYES::orf2-opt, y corresponde a una cepa de levadura la cual fue transformada con un plasmidio que contiene una secuencia que codifica para la proteína de la cápside de PCV-2, llamada Cap. Una vez incorporado el plasmidio en la levadura silvestre, esta se transformó en una levadura recombinante capaz de expresar la proteína viral.

Se realizó un pre-inóculo en 100 ml medio mínimo (yeast nitrogen base 0,67 %, glucosa 20% y triptofano 0,01%), y se incubó durante 24 h a 30°C, con agitación, con el fin de obtener biomasa. Luego se realizó la inducción de las levaduras cosechadas en 1 litro de medio suplementado con galactosa (yeast nitrogen base 0,67%, galactosa 20% y triptofano 0,01%), y se incubó por 48 h a 30°C, con agitación, con el fin de que las células de levadura expresen la proteína del virus, ya que la transcripción del gen en cuestión, se induce en presencia de galactosa. A continuación, se cosecharon las levaduras mediante centrifugación a 7750 G por 10 min, y luego se resuspendieron en una solución de KCl 0,6 M con liticase para romper las paredes celulares, así se incubaron por 24 h a 37°C con agitación. Luego, se extrajo la liticase mediante una centrifugación a 7750 G por 10 min y los protoplastos (levaduras sin pared), se sonicaron con pulsos de 10 s, con 10 s de descanso, durante dos min. Finalmente, el extracto sonificado, se liofilizó durante 48 h.

Se realizó la microencapsulación de los extractos crudos de levadura enriquecidos con antígenos de PCV-2 con quitosano de bajo peso molecular 1%, mediante el método de gelación iónica, el cual consiste básicamente en hacer una mezcla entre los extractos de levadura y dos sustratos con cargas diferentes (Tripolifosfato y Quitosano), los cuales al someterlos a una agitación mecánica por un tiempo definido, van a interactuar y formar una mezcla que va a encapsular los antígenos presentes en los extractos de levadura (Islam *et al.*, 2012).

Las concentraciones de micropartículas, inicial y final, se midieron por espectrofotometría para luego calcular el porcentaje de microencapsulación.

Finalmente las micropartículas se resuspendieron en 10 ml de PBS estéril y se calculó eficiencia de encapsulación de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Concentración final}}{\text{Concentración inicial}} \times 100$$

(Calero *et al.*, 2008)

Posteriormente se distribuyó en 20 dosis.

Selección y mantención de animales:

En el estudio se evaluó el efecto en los parámetros productivos en un plantel de cerdos ubicado en la región metropolitana, comuna de El Monte.

Predio: Comercial e Industrial el Monte, Avenida Cerrillos 460, comuna El Monte.

Diseño de prueba de campo:

105 cerdos machos raza Landrace, de 25 días de edad, fueron separados en tres grupos diferentes con la siguiente distribución:

Grupo 1: 35 animales, inmunización intramuscular (vacuna comercial Circumvent®).

Grupo 2: 35 animales, grupo experimental, inmunización oral (vacuna oral).

Grupo 3: 35 animales, grupo control, inmunizados oralmente con micropartículas de quitosano sin el principio activo (grupo placebo).

Se les identificó mediante un crotal, al momento del inicio del estudio para poder realizar el seguimiento de los cerdos. De los 35 cerdos de cada grupo, se escogieron 10 al azar para realizar el estudio de los parámetros productivos. Se midió tanto ganancia diaria de peso como eficiencia de conversión de alimento entre los 85 - 159 días, después de los cuales los cerdos se fueron a matadero. Además, los cerdos se pesaron el día 85 y el día 159 para establecer la ganancia diaria de peso. Esta se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Peso al final del periodo (kg)} - \text{Peso al inicio del periodo (kg)}}{\text{Periodo (días)}}$$

(CCSI, 1997)

La eficiencia de conversión de alimento se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Alimento consumido (kg)}}{\text{Peso ganado (kg)}}$$

(Lammers *et al.*, 2007)

Planificación del estudio:

Para la aplicación de las vacunas, en primer lugar la vacuna experimental se aplicó a los 25 días de edad, con un *booster* a los 55 días. De la misma manera, se aplicó a los 25 días con un *booster* a los 55 días de edad la vacuna comercial "Circumvent®", y el grupo control se inmunizó de la misma manera con la formulación sin principio activo el periodo de estudio.

Medición de parámetros productivos

El alimento se dispuso en sacos especiales de 40 kilogramos para llevar un control preciso de la cantidad que se les entregó a los animales, este se pesó al final del periodo productivo, para esto, se barrieron los restos de alimento al final de la etapa productiva y se pesó, para así establecer la cantidad de alimento consumido.

Además, los días 85 y 159 se pesaron los 10 cerdos de cada grupo y se registraron en una planilla. Luego de finalizada la etapa productiva se determinó la GDP y ECA de cada grupo, según las respectivas fórmulas matemáticas.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de cada grupo se analizaron mediante la prueba paramétrica de análisis de varianza de un factor (one way ANOVA), con la prueba *post hoc* de Tukey. Se considerará un nivel de significancia de $p < 0,05$. Este análisis se realizó con el software GraphPad Prism 5.0® .

RESULTADOS

1.- Densidad óptica y tamaño de partícula.

Luego de cultivar la levadura e inducir el gen de la proteína de la cápside viral cap, se midió la densidad óptica como control de calidad y con el fin de estandarizar la partida de la vacuna a sintetizar. Se obtuvo una densidad de 0,35, lo cual es positivo ya que se acepta una densidad óptica, OD_{600} , entre 0,6 - 0,7.

Las micropartículas de quitosano con el antígeno del virus se midieron para establecer el diámetro óptimo. El tamaño de las partículas se midió con Zeta Plus Particle Sizing®, siendo el promedio de diámetro de las partículas de 2 μm , variando entre 1 y 30 μm (Anexo 1). El valor obtenido es promedio debido a que en la partida se realizaron 5 mediciones que luego arrojaron la media, además cabe destacar que la polidispersidad fue de 0,005, es decir, la solución se considera como homogénea. (Imagen 1)

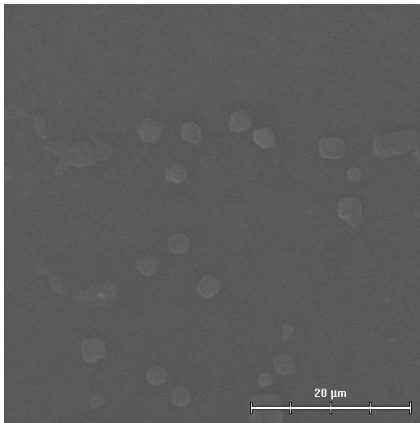


Imagen 1. Micropartículas de quitosano vistas al microscopio electrónico de barrido.

2.- Eficiencia de microencapsulación.

En el proceso de microencapsulación se midió la concentración del extracto de levadura antes de encapsular y posterior a la encapsulación, con el fin determinar qué tan eficiente fue el proceso, de esta manera se obtuvo un 90% de eficiencia, lo que se traduce en que de los 375 mg de extracto crudo que se somete a la agitación 337,5 mg quedó contenido en las micropartículas de quitosano.

3.- Presencia del antígeno viral en las micropartículas

Se realizó una reacción de fluorescencia para comprobar la presencia del antígeno en las micropartículas de quitosano, a mayor fluorescencia, mayor cantidad de antígeno presente. La reacción es antígeno-anticuerpo, y este último se encuentra unido a una molécula de fluoresceína. (Imagen 2)

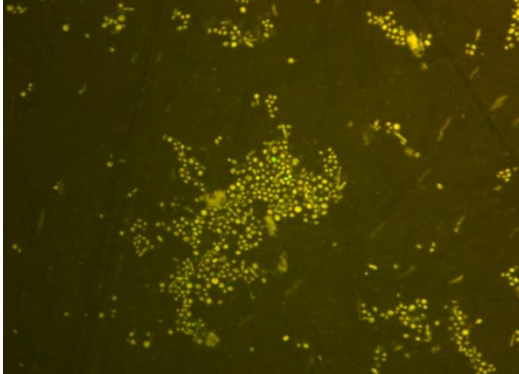


Imagen 2. Reacción antígeno-anticuerpo de la proteína cap contenida en las micropartículas de quitosano (40X).

4.- Cuantificación del antígeno viral

Se realizó una electroforesis y luego un análisis de densitometría. Dependiendo del peso molecular de la proteína es la posición en el gel de agarosa. La proteína cap tuvo un peso aproximado de 30 kDa, lo cual es lo esperable, ya que la proteína de la cápside del circovirus tiene ese peso molecular.

A este gel se le aplicó el análisis de densitometría, el cual consiste en medir el ancho de las bandas obtenidas y estimar la cantidad de la proteína objetivo.

Según este análisis la cantidad de antígeno presente en la mezcla varió entre un 7- 15 %, de la muestra total (Anexo 2).

Además, se realizó un prueba de Dot Blot, con el fin de pesquisar la presencia del antígeno dentro de las micropartículas, esta reacción es muy similar al western blot, sin embargo, en este caso se revela inmediatamente el resultado, y no da cuenta de una cantidad específica, sino sólo de la presencia o ausencia según si hubo o no formación de complejos antígeno-anticuerpo (Imagen 3).

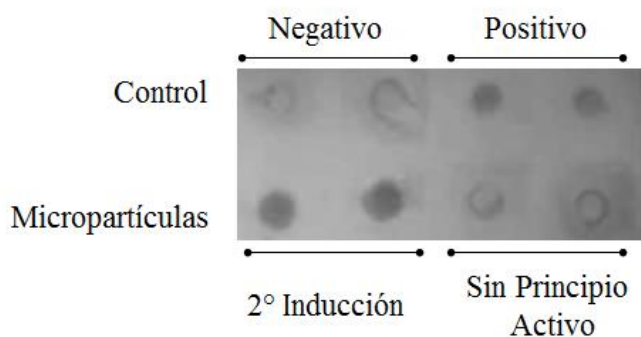


Imagen 3. Dot Blot de las micropartículas; reacción positiva en los pocillos coloreados, los cuales corresponden a las micropartículas utilizadas en el ensayo.

5.1.-Peso ganado durante el periodo.

En un periodo de 74 días de estudio se realizaron dos pesajes, el primero fue con cerdos de 85 días de edad y el segundo con los mismo cerdos a los 159 días de edad. Se obtuvo el peso ganado por cada grupo y se compararon los promedios.

Tabla Nro 1. Resumen grupo "Circumvent®"

Circumvent®			
Nº cerdo	Peso (Kg) 26 sept.	Peso (Kg) 9 dic.	Peso ganado (Kg)
27	40,2	122	81,8
31	39,6	115,5	75,9
17	38,8	120	81,2
13	46	133	87
10	38,8	122	83,2
23	41,4	111,5	70,1
21	41	119	78
9	34,2	107,5	73,3
15	44,4	126	81,6
12	41,8	124,7	82,9
Promedio	40,62	120,12	79,5

Tabla Nro 2. Resumen grupo vacuna oral"

Vacuna oral			
N° cerdo	Peso (Kg) 26 sept.	Peso (Kg) 9 dic.	Peso ganado (Kg)
20	27,4	101,5	74,1
4	38,6	92	53,4
15	32	109,5	77,5
14	29,6	107	77,4
21	39,6	123	83,4
12	28,6	98	69,4
31	41,2	124	82,8
26	35,8	104	68,2
32	31,4	91	59,6
25	34,6	107	72,4
Promedio	33,88	105,7	71,82

Tabla Nro 3. Resumen grupo "placebo"

Placebo			
N° cerdo	Peso (Kg) 26 sept. (+/-0,5%)	Peso (Kg) 9 dic. (+/-0,5%)	Peso ganado (Kg) (+/-0,5%)
24	32,4	106	73,6
18	36	109	73
19	35,4	104,5	69,1
14	36,3	112,5	76,2
4	34,4	103	68,6
34	36,4	104,5	68,1
13	37,2	109,5	72,3
15	31,8	103	71,2
21	35,4	104,5	69,1
25	31,4	98,5	67,1
Promedio	34,67	105,5	70,83

Al comparar el peso ganado entre los tres grupos, existen diferencias significativas ($p = 0,011$), siendo el grupo Circumvent® el que más peso ganó durante el periodo de estudio, con una diferencia de 8 Kg con respecto al grupo inoculado con la vacuna oral experimental, mientras que el grupo "placebo" se mantuvo como el que menos peso ganó, como era lo esperado. Al comparar cada grupo entre sí con la prueba post hoc de Tukey, se

refuerza el resultado del análisis de varianza, ya que el grupo comercial presenta diferencias significativas individualmente tanto con el grupo experimental como con el grupo control. Además, el grupo experimental no presentó diferencias significativas con respecto al grupo control. (Anexo 3)

5.2.- Consumo de alimento.

Con respecto al consumo de alimento durante el periodo de estudio, se obtuvieron los resultados que se muestran a continuación.

Tabla Nro 4. Resumen del consumo de alimento de los tres grupos.

	Circumvent	Vacuna oral	Placebo
Consumo promedio (Kg) (+/-0,5%)	226,8	198,7	203,26

El grupo experimental fue el que menos alimento consumió durante el periodo de estudio, seguido del grupo control y luego el grupo comercial.

5.3.- Ganancia Diaria de Peso (GDP)

Tabla Nro 5. Resumen con las GDP de los tres grupos en estudio

Circumvent		Vacuna oral		Placebo	
N° cerdo	GDP (Kg) (+/-0,5%)	N° cerdo	GDP (Kg) (+/-0,5%)	N° cerdo	GDP (Kg) (+/-0,5%)
27	1,105	20	1,001	24	0,99
31	1,02	4	0,721	18	0,986
17	1,09	15	1,047	19	0,933
13	1,17	14	1,045	14	1,03
10	1,12	21	1,12	4	0,927
23	0,947	12	0,937	34	0,92
21	1,05	31	1,118	13	0,977
9	0,99	26	0,921	15	0,962
15	1,1	32	0,805	21	0,933
12	1,12	25	0,978	25	0,9
Promedio	1,07	Promedio	0,97	Promedio	0,95

Al comparar las GDP de los tres grupos existen diferencias significativas ($p = 0,012$), lo que se traduce en que el grupo Circumvent® fue el grupo con una mayor GDP.

Además, el grupo Circumvent® presentó una mejor GDP al compararlo individualmente con cada uno de los otros dos grupos. (Anexo 4)

5.3.- Eficiencia de conversión de alimento.

Tabla Nro 6. Resumen ECA de los tres grupos.

Circumvent		Vacuna oral		Placebo	
N° cerdo	ECA	N° cerdo	ECA	N° cerdo	ECA
27	2,77	20	2,68	24	2,76
31	2,99	4	3,72	18	2,78
17	2,79	15	2,56	19	2,94
13	2,6	14	2,56	14	2,66
10	2,72	21	2,38	4	2,96
23	3,23	12	2,86	34	2,98
21	2,9	31	2,399	13	2,81
9	3,09	26	2,91	15	2,85
15	2,78	32	3,33	21	2,94
12	2,74	25	2,74	25	3,02
Promedio	2,85	Promedio	2,766	Promedio	2,83

Al analizar las ECA de los tres grupos y compararlas se establece que no existen diferencias significativas entre los grupos, ni al compararse en pares de grupos con la prueba post de Tukey, ($p = 0,88$). (Anexo 5)

DISCUSIÓN

El presente estudio aborda un aspecto esencial en la producción de carne de cerdo a nivel nacional, disminuir la incidencia de enfermedades que perjudican directamente a los productores, aplicando al mismo tiempo técnicas diferentes a las establecidas en el mercado, ya que es una vacuna de administración oral. Si bien es cierto existen vacunas orales contra patógenos en la actualidad, es la primera vez que realiza un estudio con esta

vía de administración contra circovirus porcino, y se ensaya en un plantel comercialmente activo de cerdos.

Por lo tanto hay que considerar que el número de animales en estudio (30/grupo) no puede ser mayor porque si fuese así, perjudicaría el objetivo principal del productor, ya que se exponen cerdos sin inmunizar ante brotes del virus y posiblemente una propagación dentro del plantel, que como se mencionó no tiene un objetivo de investigación ni mucho menos académico.

El hecho de tener un bajo número de animales genera que se ejerzan efectos individuales de los cerdos sobre el parámetro del grupo, como fue el caso del cerdo 4 en el grupo oral, o el cerdo 13 en el grupo comercial, los cuales presentaron características que escapan de la media, y que por lo tanto podrían llevar a sobreestimación o subestimación de los parámetros en estudio.

El objetivo de este proyecto se enmarca dentro de la innovación y pone a prueba el hecho de que aplicar antígenos vía oral con absorción intestinal constituye efectivamente una alternativa a los métodos convencionales de inmunización. Además, utiliza quitosano como agente encapsulante del antígeno, un polímero que resultó ser inocuo para los animales, ya que ninguno presentó alguna reacción adversa a la vacuna, lo cual es positivo si se considera este como el primer estudio. Sin embargo, existen estudios en humanos en que la ingestión de productos con quitosano ha producido reacciones anafilácticas de gran magnitud (Kato *et al*, 2005), por lo tanto es una característica que debe ser evaluada más en profundidad en el sistema animal.

Otro aspecto importante a destacar es que se utilizó la levadura como modelo de expresión de la proteína Cap del virus, ya que presenta ciertas ventajas frente a otros sistemas de expresión como bacterias y baculovirus. Al someter a la proteína Cap a inocular a los diferentes análisis se comprobó que no sufren mayores alteraciones post-traduccionales, y se conservan sus estructuras fundamentales, lo que permite que la proteína Cap se auto ensamble como VLP (virus-like particle) y sea estructuralmente lo más parecida posible al virus completo. De esta manera el antígeno se presenta eficientemente al sistema inmune del cerdo, desencadenando una adecuada respuesta de anticuerpos y celular anti-PCV2.

Sin embargo, si se quiere escalar este proyecto a niveles industriales o semi-industriales se debe contar con mayor equipamiento, ya que los protocolos establecidos actualmente fueron elaborados para una fabricación a escala de laboratorio.

Al haber sido realizado en un predio comercialmente activo, conllevó una serie de manejos extras a la vacunación, además, existen ciertos parámetros ambientales difíciles de controlar y por lo tanto se requieren más estudios sobre la posible incidencia del ambiente en los resultados sobre las variables productivas. De todas formas se redujo el efecto ambiental al mínimo, dado que todos los cerdos estuvieron en las mismas condiciones.

Cuando se comparan las GDP de los tres grupos hay una ventaja significativa del grupo inoculado con la formulación comercial, lo cual se traduce en un efecto positivo sobre la GDP, vale decir, la presencia de este virus efectivamente disminuye la performance de los cerdos como se ha demostrado en estudios anteriores,

Asimismo la inmunización contra el virus se hace necesaria y trae beneficios, ya que mayor GDP es necesariamente mayor peso de venta, y por lo tanto beneficios económicos para los productores.

Con respecto al consumo de alimento, hubo diferencias en la cantidad de alimento consumido, ya que el grupo inmunizado oralmente fue el que menos alimento consumió. Esta situación podría llevar beneficios para el productor ya que, como se mencionó, la alimentación constituye el gasto más grande en la producción porcina, por lo tanto se hace necesario evaluar la relación costo/beneficio para el propietario del plantel, es decir, se debe ejercer la toma de decisión de acuerdo a lo que se prefiere; mayor cantidad de kilos de carne, o menor gasto en alimentación del plantel.

Lo anterior dependerá de distintas variables, por ejemplo, el precio de los insumos para generar el alimento de los cerdos en una determinada fecha. Si resulta más caro el alimento, se prefiere vender más kilogramos de carne de cerdo. Por el contrario, si el precio del kilogramo de cerdo está bajo en determinada semana, entonces se prefiere disminuir los costos de alimentación.

Finalmente el parámetro que mejor refleja la calidad de un plantel es la ECA, ya que explica que tan eficientes son los cerdos al momento de utilizar y metabolizar el alimento que se les suministra y transformarlo en masa corporal. Si este parámetro es el menor posible quiere decir que los cerdos necesitan de una menor cantidad de alimento para aumentar de peso, vale decir, son más eficientes. Según el estudio realizado no existen diferencias significativas en los tres grupos ni entre ellos al compararlos individualmente. Es decir, la incidencia de la inmunización contra este virus respecto a este parámetro es menor, pero se debe tener en cuenta que si se manifiesta la enfermedad, este parámetro de ve inmediatamente perjudicado.

La administración oral hoy en día constituye una vía efectiva de inmunización contra circovirus, sin embargo, se deben realizar más estudios con respecto a la administración oral de antígenos y su respuesta en el modelo animal del cerdo, ya que este estudio es un primer acercamiento a prevenir esta patología por una vía no parenteral. De todas formas se obtuvo resultados que remarcan la importancia del manejo preventivo contra el síndrome de desmedro multisistémico post-detete.

Además, se deben tener en cuenta otros factores que pueden influir sobre las variables productivas, y tener claro que el PMWS no es la única patología que afecta a los cerdos. Por lo tanto se debe considerar la presencia de otras patologías que, a veces de manera subclínica, van a afectar la performance del cerdo, pudiendo atribuirse de manera errónea como un efecto negativo del experimento que se está llevando a cabo.

BIBLIOGRAFÍA

-ASOCIACIÓN GREMIAL DE PRODUCTORES DE CERDOS DE CHILE. 2012. Producción de carne de cerdo en Chile año 2011. [En línea]. <http://www.asprocer.cl/index/plantilla1.asp?id_seccion=2&id_subsecciones=77> [Consulta: 14-01-2013].

-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.

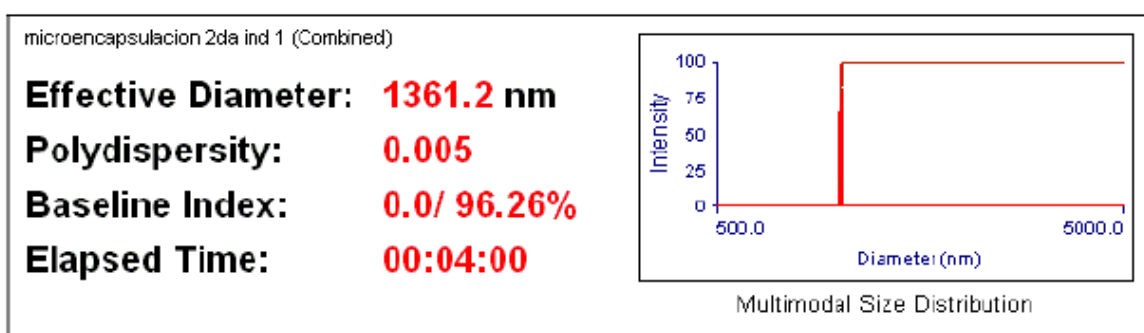
- CALERO, J.; SANCHEZ, Y.; TORREZ, R.; HERNANN, E.; LOPEZ, K.** 2008. Elaboración y caracterización de microcápsulas gastrorresistentes de Diclofenaco obtenidas por Gelificación iónica. *Universitas*. 1(2): 27-30.
- CALSAMIGLIA, M.; OLVERA, A.; SEGALÉS, J.; DOMINGO, M.** 2004. Quantification of PCV2 in different routes of excretion: possible transmission routes and correlation with presence of PMWS characteristic lesions. *Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress*. p. 11.
- CANADIAN CENTRE FOR SWINE IMPROVEMENT INC.** 1997. Estimating average daily gain from weight and age. [En línea]. <http://www.ccsi.ca/main.cfm?target_page=adg_pred> [Consulta: 30-05-2013]
- 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: 12-01-2013].
- FAUREZ, F.; DORY, D.; GRASLAND, B.; JESTIN, A.** 2009. Replication of porcine circovirus. *Virologia*. 6(60): 1-8.
- FRAILE, L.; GRAU-ROMA, L.; LÓPEZ-SORIA, S.; LÓPEZ-JIMÉNEZ, R.; NOFRARÍAS, M.; SRASOLA, P.; SEGALÉS, J.; SIBILA, M.; SINOVAS, N.** 2012. Inactivated PCV2 one shot vaccine applied in 3-week-old piglets: Improvement of production parameters and interaction with maternally derived immunity. *Vaccine*. 30: 1986-1992.
- 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
- KATO, Y.; YAGAMI, A.; MATSUNAGA, K.** 2005. A case of anaphylaxis caused by the health food chitosan. *Japanese journal of allergology*. Vol. 54: 1427- 1429
- KIXMOLLER, M.; RITZMANN, M.; EDDICKS, M.; SAALMULLER, A.; ELBERS, K.; FACHINGER, V.** 2008. Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine* 26, 3443-3451.
- KIM, T.; TOAN, NT.; SEO, J.; JUNG, B.; LEE, J.; LEE, B.** 2009. Bordetella bronchiseptica aroA mutant as a live vaccine vehicle for heterologous porcine circovirus type 2 major capsid protein expression. *Veterinary Microbiology*. Vol. 138: 318 - 324.
- LAMMERS, P.; STENDER, D.; HONEYMAN, M.** 2007. Improving feed conversion. Niche pork production. Iowa State University.
- O`DEA, M.** 2010. Porcine circovirus infection. [En línea]. <http://www.scahls.org.au/__data/assets/pdf_file/0005/1915943/anzsdp-porcine.pdf> [Consulta: 03-01-2013].

-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: 13-01-2013].

-TRUNDOVA, M.; CELER, V. 2007. Expression of porcine circovirus 2 ORF2 gene requires codon optimized E. coli cells. [En línea] <<http://www.prairieswine.com/pdf/8601.pdf>> [Consulta: 13-01-2013].

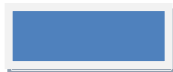
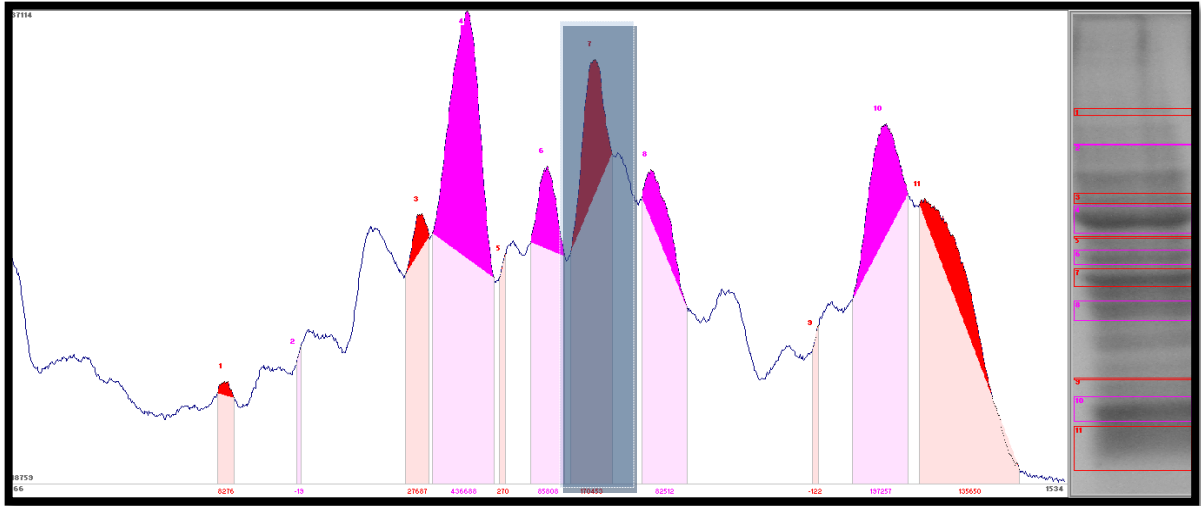
ANEXOS

Anexo 1.



Run	Eff. Diam. (nm)	HalfWidth (nm)	Polydispersity	Baseline Index
1	1560.3	110.3	0.005	0.0 / 97.79%
2	1550.2	109.6	0.005	0.0 / 95.58%
3	1915.7	135.5	0.005	0.0 / 95.59%
4	2181.4	154.2	0.005	0.0 / 96.10%
5	3004.8	1734.9	0.044	0.67499 -0.0%
Mean	1801.9	127.4	0.005	0.0 / 96.27%
Std. Error	152.4	10.8	0.000	0.0 / 0.52
Combined	1361.2	96.3	0.005	0.0 / 96.26%

Anexo 2.



Area demarcada corresponde a un 7 - 15% del antígeno en la muestra total.

Anexo 3.

1 way ANOVA Tabular results					
Table Analyzed	Peso ganado				
One-way analysis of variance					
P value	0.0113				
P value summary	*				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	3				
F	5.320				
R squared	0.2827				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	11.26				
P value	0.0036				
P value summary	**				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes				
ANOVA Table					
	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	450.4	2	225.2		
Residual (within columns)	1143	27	42.34		
Total	1594	29			
Tukey's Multiple Comparison Test					
	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Grupo comercial vs Grupo experimental	7.680	3.732	Yes	*	0.4598 to 14.90
Grupo comercial vs Grupo control	8.670	4.214	Yes	*	1.450 to 15.89
Grupo experimental vs Grupo control	0.9900	0.4811	No	ns	-6.230 to 8.210

Anexo 4.

Table Analyzed	GDP				
One-way analysis of variance					
P value	0.0121				
P value summary	*				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	3				
F	5.218				
R squared	0.2788				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	10.97				
P value	0.0041				
P value summary	**				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes				
ANOVA Table					
	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	0.07961	2	0.03981		
Residual (within columns)	0.2060	27	0.007629		
Total	0.2856	29			
Tukey's Multiple Comparison Test					
	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Grupo comercial vs Grupo experimental	0.1019	3.689	Yes	*	0.004981 to 0.1988
Grupo comercial vs Grupo control	0.1154	4.178	Yes	*	0.01848 to 0.2123
Grupo experimental vs Grupo control	0.01350	0.4888	No	ns	-0.08342 to 0.1104

Anexo 5.

Table Analyzed	ECA				
One-way analysis of variance					
P value	0.8884				
P value summary	ns				
Are means signif. different? (P < 0.05)	No				
Number of groups	3				
F	0.1189				
R squared	0.008730				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	13.91				
P value	0.0010				
P value summary	***				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes				
ANOVA Table					
	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	0.01816	2	0.009078		
Residual (within columns)	2.062	27	0.07635		
Total	2.080	29			
Tukey's Multiple Comparison Test					
	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Grupo comercial vs Grupo experimental	0.04710	0.5390	No	ns	-0.2595 to 0.3537
Grupo comercial vs Grupo control	-0.009000	0.1030	No	ns	-0.3156 to 0.2976
Grupo experimental vs Grupo control	-0.05610	0.6420	No	ns	-0.3627 to 0.2505