



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR Y HUMORAL EN UNA
GRANJA POSITIVA A PEDV, USANDO VACUNACION Y FEEDBACK

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SAUD ANIMAL

PRESENTA

GUADALUPE CHÁVEZ FLORES

Tutor:

Dr. José Ivan Sánchez Betancourt-FMVZ

Comité Tutor: Dr. Humberto Ramírez Mendoza-FMVZ

Dr. José Francisco Rivera Benítez-INIFAP

Ciudad Universitaria Cd. Mx. Septiembre 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

A CONACYT, al proyecto “Aislamiento, genotipificación y caracterización de las cepas virales que producen el Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS) circulantes en México”, con el número de proyecto 254244.

Al CEIEPP, por el apoyo brindado durante el manejo y cuidado de los animales que participaron en el estudio.

A la Unidad de Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM por el préstamo de equipos para la realización de las pruebas diagnósticas.

A mi comité tutor por la orientación durante el proyecto, por sus consejos y por los conocimientos que compartieron conmigo.

A mi familia por brindarme un apoyo incondicional, los quiero.

A mis amigos, a mis compañeros del grupo de investigación y del CEIEPP, y a la Dra. Carmen y al Dr. Rolando del DMZC

RESUMEN

La diarrea epidémica porcina (DEP) es una enfermedad que afecta a los lechones y los signos clínicos que la caracterizan son: diarrea, vómito, deshidratación y alta mortalidad, provocando pérdidas económicas significativas. El aumento en la virulencia de las cepas circulantes en la actualidad hace necesaria la utilización de vacunas para prevenir brotes que afecten a la producción porcina. Sin embargo, existen otras prácticas que se han utilizado como el “*feedback*”, que consiste en obtener el contenido intestinal y/o diarrea de lechones en la fase aguda de la infección y exponer al pie de cría de la granja (Carvajal, 2016), por lo que el objetivo del presente estudio fue comparar la respuesta inmune celular y humoral entre animales vacunados contra animales inmunizados con “*feedback*”. El estudio se realizó en una granja positiva a DEP, utilizando 16 cerdas de diferente etapa de gestación, las cuales se dividieron en 4 grupos: Grupo A. Testigo sin inmunización, Grupo B. Vacuna contra la Diarrea Epidémica Porcina con un virus inactivado, Grupo C. Inoculación con 1 ml de “*feedback*” y Grupo D. Inoculación con 2 ml de “*feedback*”. Se obtuvieron muestras de suero e hisopos rectales, así como de calostro de las cerdas cada 7 días desde la inmunización hasta después del parto. A los hijos de las hembras se les dio seguimiento a través de la obtención de muestras de hisopos bucales, rectales y muestras de sangre en los días 1, 3, 7 y 14 de edad.

Las muestras obtenidas se utilizaron para realizar ELISA de IgG e IgA, RT-PCR para el virus de diarrea epidémica porcina (DEPv) y cuantificación de las citocinas IL2, IL4, IL10, IL12, TNF α , IFN γ .

La cantidad de anticuerpos encontrados en las cerdas, mostró un mayor nivel en el grupo A y B con respecto a los grupos C y D para ambas inmunoglobulinas. En los cuatro grupos se obtuvo un mayor porcentaje de positividad de IgA.

La mayoría de las muestras obtenidas fueron positivas por RT-PCR en los 4 grupos, siendo el grupo D que fue positivo en ciclos de amplificación más bajos.

La cantidad del IFN γ fue la de mayor concentración en todos los grupos, ya que es la principal interleucina antiviral.

ABSTRACT

Porcine epidemic diarrhea (PED) is a disease characterized by clinical signs such as diarrhea, vomiting, dehydration and high mortality in piglets, which cause significant economic losses. The increase in virulence of circulating strains at present makes the use of vaccines necessary to prevent outbreaks that affect the production of pigs. However, there are other practices that have been used as “*feedback*” that consists in obtaining the intestinal content and / or diarrhea of the piglets in the acute phase of the infection and exposure to the reproductive foot of the farm, so that the objective of this It was to compare the cellular and humoral immune responses generated by these two options. It was carried out in a positive farm for DEP, using 16 sows of different stages of gestation, which were divided into 4 groups: Group A. Witness without immunization. Group B. Vaccine with inactivated virus. Group C. Inoculation with 1 ml of “*feedback*”. Group D. Inoculation with 2 ml of “*feedback*”. Samples of the sows were obtained every 7 days from the immunization until after the supply of serum and rectal swabs, as well as colostrum. Later the litters were used to continue with the evaluation, taking samples on days 1, 3, 7 and 14 of oral swabs, rectal swabs and blood samples.

The obtained samples were used to perform IgG and IgA ELISA, RT-PCR for DEPV and quantification of the cytokines IL2, IL4, IL10, IL12, TNF α , IFN γ .

The amount of antibodies found in the sows showed a high level in groups A and B, in the groups with C and D for both immunoglobulins, in the same way for the piglets and in the colostrum, obtaining a greater positivity of IgA than of IgG for the four groups.

During the experimental period, most of the samples were positive by RT-PCR, with group D receiving the lowest Ct.

The quantified cytokines obtained a higher concentration in group B, followed by A. Of these cytokines, IFN γ was the one that obtained a higher concentration for all groups, being the main antiviral interleukin.

Índice

AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN.....	III
ABSTRACT	IV
INTRODUCCIÓN	1
Antecedentes de la enfermedad.....	1
Agente etiológico.....	3
Transmisión.....	4
Replicación del vDEP	4
Patogenia	5
Inmunidad.....	6
Calostro.....	10
Prevención	11
Control de la enfermedad	12
Vacunación.....	12
“Feedback”	13
JUSTIFICACIÓN	14
HIPÓTESIS	15
OBJETIVO GENERAL.....	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
MATERIAL Y MÉTODOS	17
Granja	17
“Feedback”	17
Hembras gestantes.....	17
Lechones	20
Pruebas.....	21
Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA).....	21
RT-PCR	21

Cuantificación de Interleucinas	21
RESULTADOS	23
“Feedback”	23
Signos clínicos	23
Evaluación productiva	23
ELISA	25
Calostro	25
Cerdas	26
Lechones	27
RT-PCR	30
Citocinas	32
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIÓN	40
REFERENCIAS	41
ANEXOS	46

INTRODUCCIÓN

La diarrea epidémica porcina (DEP) es una enfermedad que se presenta en lechones y los signos clínicos que se presentan son diarrea, vómito, deshidratación y alta mortalidad, provocando pérdidas económicas significativas. Su distribución es mundial y su diseminación es rápida afectando a los diferentes eslabones de la cadena productiva de la industria porcina. En el año 2013, en Estados Unidos de América (E.U.A.) la mortalidad por el brote de la enfermedad provocó una disminución del 10% en la población de cerdos (7 millones de lechones) (Okda *et al.*, 2018). Desde su aparición hasta el momento, se han detectado cepas del virus de Diarrea Epidémica Porcina (vDEP) con diferente virulencia , lo cual hace necesaria la utilización y actualización constante de vacunas para minimizar la afección en la producción porcina (Song, Moon and Kang, 2015)(Guo *et al.*, 2017).

Los brotes de DEP se observan con frecuencia durante el invierno y el virus es transmitido a través de la ingesta de alimento o material contaminado con heces que contengan virus infeccioso. El virus se replica en el citoplasma de los enterocitos del intestino delgado, ocasionando la destrucción masiva de las vellosidades causando su atrofia y la reducción de la superficie del epitelio intestinal, disminuyendo la capacidad de absorción y enzimática en el intestino delgado, lo cual genera diarrea. La lesión macroscópica se caracteriza por un adelgazamiento de la pared del intestino delgado, microscópicamente se observa atrofia multifocal de las vellosidades que va de moderada a severa en el yeyuno e íleon del intestino delgado.

Antecedentes de la enfermedad

La enfermedad fue identificada por primera vez en cerdos a principios de 1970 en Europa, aunque no se le dio el nombre DEP hasta 1978, año en que fue identificado el vDEP en Bélgica como un coronavirus, (cepa CV777). La

enfermedad se diseminó por Europa entre los años 1970 y 1980, posteriormente la prevalencia del virus disminuyó y solo se presentaban brotes esporádicos con mortalidades bajas (Song and Park, 2012). En Asia, la enfermedad se reportó en 1982, la prevalencia de la infección de DEP fue relativamente baja, con brotes esporádicos. Sin embargo, a partir de finales de 2010, se produjo un aumento notable en brotes de DEP en las provincias productoras de cerdo en China, mismos que resultaron en grandes pérdidas de lechones lactantes (Jung and Saif, 2015). Los cerdos afectados de 3 y 10 días de edad presentaban diarrea acuosa, deshidratación, vómito y adelgazamiento de la pared intestinal con severa atrofia de las vellosidades y congestión, con 100% de morbilidad y del 80 al 100% de mortalidad en el plazo de una semana. En cerdos de otras edades se observan, ocasionalmente estos signos clínicos o son esporádicos (Chen *et al.*, 2014). Las cepas existentes en Asia, especialmente en Corea y China, parecen originarse de mutaciones de las cepas europeas, y causan una enfermedad más grave (Huang *et al.*, 2013).

El virus de la diarrea epidémica porcina en los E.U.A. había sido exótico hasta hace unos años. El 10 de mayo de 2013, el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Universidad Estatal de Iowa confirmó la presencia del vDEP en cerdos de Iowa, el principal productor de cerdo en E.U.A. Posteriormente, el laboratorio analizó muestras tomadas con anterioridad, encontrando una muestra positiva del 16 de abril de 2013 en Ohio, que es actualmente el caso más antiguo detectado en los E.U.A. de acuerdo con el patólogo Gregory Stevenson (Crawford *et al.*, 2016).

Los hallazgos demuestran que las cepas emergentes en E.U.A. están estrechamente relacionadas con las cepas presentes en China, lo cual sugiere que las cepas que se encuentran en occidente, tienen origen Chino. El vDEP descubierto en los Estados Unidos presenta una identidad mayor al 99% con la cepa china, y produce la enfermedad más grave (Li *et al.*, 2016). Sin embargo, la fuente exacta del origen es difícil de determinar. Se ha reportado que las cepas

emergentes en E.U.A. comparten características genéticas únicas con un coronavirus de murciélago, lo que sugiere una posible evolución de vDEP en especies de murciélagos y el potencial de transmisión entre especies (Jung and Saif, 2015).

En México, los primeros casos sospechosos se reportaron a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (SAGARPA) en agosto del 2013 en el estado de Guanajuato, Jalisco y Michoacán. Para marzo del 2014 se reportaron un total de 99 casos sospechosos siendo positivas a RT-PCR el 32% de las muestras analizadas (Sosa, 2014).

Agente etiológico

El virus de DEP pertenece al Reino: *Riboviria* › Orden: *Nidovirales* › Suborden: *Cornidovirineae* › Familia: *Coronaviridae* › Subfamilia: *Orthocoronavirinae* › Género: *Alphacoronavirus* › Subgenero: *Pedacovirus* › Especie: Porcine epidemic diarrhea. Los virus pertenecientes a los coronavirus y que afectan a los cerdos son cinco. Dentro de los alfacoronavirus se encuentra el virus de DEP, el virus de Gastroenteritis Transmisible (GET) y el Coronavirus Respiratorio (PRCV). En los betacoronavirus está el virus de la Encefalomiелitis Hemaglutinante (HEV) y dentro de los deltacoronavirus está el deltacoronavirus porcino (PDCoV)(Zhang and Yoo, 2016).

El vDEP está constituido por una hebra de ARN de sentido positivo de aproximadamente 28 kb. Su genoma está conformado por el ORF1a-ORF1b-S-ORF3-E-M-N.

El ORF1 mide aproximadamente veinte mil nucleótidos, se divide en a y b para generar dos poliproteínas de 16 proteínas no estructurales, el ORF1a contiene proteasas, mientras que el ORF1b codifica a la ARN polimerasa, exonucleasa, endonucleasa y metiltransferasa. Posteriormente el genoma continúa con la codificación de la proteína S o spike, la cual se divide en dos subunidades, S1 y

S2 siendo esta proteína la más variable de todo el genoma. El ORF3 se considera una proteína accesoria que hasta el momento se podría involucrar dentro de la patogénesis, replicación y adaptación del virus. Siguiendo con el orden del genoma, la proteína E se involucra en el ensamblaje del virón junto con la proteína M, que también se relaciona en el cambio de iones para inducir la liberación del virus después de su replicación. La proteína M, además de involucrarse en el ensamblaje, puede llegar a inducir la producción de interferón alfa después de la infección. Por último, se encuentra la proteína N que es una fosfoproteína que está asociada al genoma del virus. De estas proteínas la S es la que provoca una mayor cantidad de anticuerpos neutralizantes seguida de la proteína M (Wongthida *et al.*, 2017) (Song, Moon and Kang, 2015)(Lee, 2015).

Transmisión

La transmisión se genera por vía oral, al consumir restos de heces o vómito de cerdos enfermos. La infección también se presenta por alimento o fomites contaminados, además de transmitirse por aerosoles (Kim *et al.*, 2017).

Replicación del vDEP

El vDEP ingresa por vía oral hasta llegar al intestino delgado de los cerdos donde su célula blanco es el enterocito, aunque se ha observado su replicación en las células caliciformes (Jung and Saif, 2015).

Una vez dentro de la luz del intestino la proteína S del vDEP, con su subunidad S1, hace contacto con los receptores de los enterocitos, principalmente con la aminopeptidasa N, uniéndose a ella por medio de la S2, la cual provoca la fusión del virus a la membrana. El vDEP puede entrar al enterocito por fusión de membranas del virus con la del enterocito o por endocitosis y posteriormente una fusión de la membrana del virus con la del endosoma. Una vez integrado el virus,

el genoma es liberado en el citoplasma de la célula donde comienza su traducción para generar una poliproteína y codificar su propia polimerasa. Esta polimerasa comienza la traducción para generar una cadena en sentido negativo y seguir con la transcripción, posteriormente se comienza con la codificación de las proteínas estructurales (S, E, M, N) en el citoplasma. Las proteínas estructurales S, E y M viajan al retículo endoplásmico donde son glicosiladas. Por otro lado, la proteína N se une a al genoma del virus para comenzar con el ensamblaje en el retículo endoplásmico, posteriormente se termina el ensamblaje en el compartimento intermedio del retículo endoplásmico y aparato de Golgi. Finalmente, las partículas virales son transportadas en vesículas hacia la membrana celular y son expulsadas por exocitosis (Figura1).

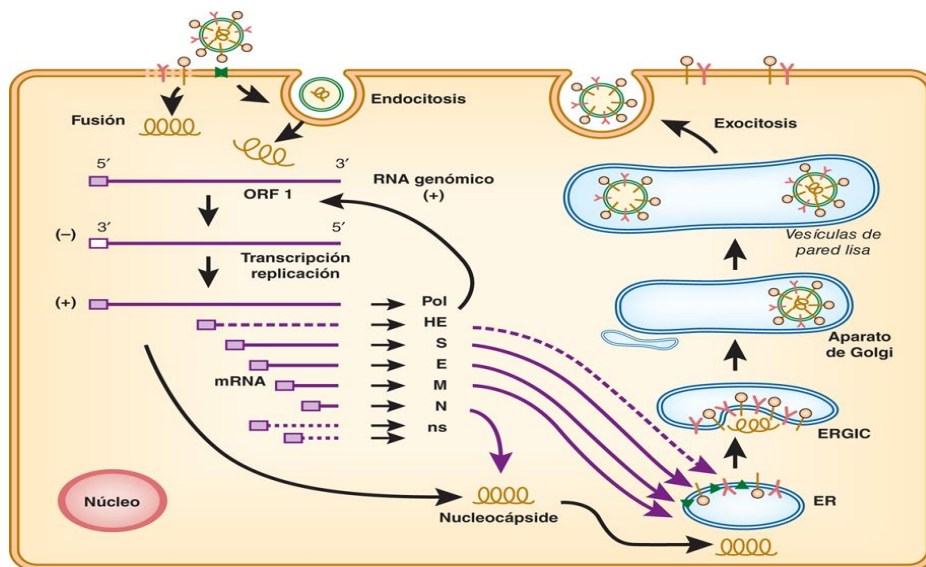


Figura 1. Replicación de Coronavirus (Brooks *et al.*, 2011)

Patogenia

El vDEP infecta a los enterocitos provocando su destrucción y el adelgazamiento de la pared intestinal, esto lleva a una mala absorción y diarrea (Curry *et al.*, 2017). Como consecuencia los animales presentan una marcada deshidratación, en ocasiones esta deshidratación se ve agravada por la presencia de vómito (Jung and Saif, 2015). La infección de los cerdos lactantes en los primeros 10 días de

vida, es la más agresiva, ya que el remplazo de sus enterocitos es más lento que en los cerdos adultos, además de la falta de nutrientes no absorbidos por la mala absorción, finaliza con hipotermia, emaciación y la muerte (Huang *et al.*, 2013).

Inmunidad

El vDEP lleva a cabo su replicación en los enterocitos, provocando la afectación y destrucción de estos; sin embargo, los enterocitos tienen a su alrededor mecanismos de defensa que podrían ayudarlos a controlar la infección. Estos mecanismos de defensa están mediados por varios tipos de células que se encuentran en el epitelio intestinal, éstas se encargan de producir moco, de generar sustancias antimicrobianas y enzimas, además de los movimientos peristálticos del intestino y del pH de los ácidos gástricos. Si el virus logra pasar estas barreras, se enfrenta a la inflamación provocada por la destrucción del epitelio, la cual favorece la llegada de leucocitos como neutrófilos, macrófagos, células asesinas naturales (NK), células dendríticas, así como el sistema del complemento y la producción de interferón (IFN) que ayudan a la eliminación del virus (Pabello, 2010) .

Por otra parte existen células pertenecientes a la respuesta inmune adquirida, la cual es más específica, y se encargan de neutralizar los antígenos, de eliminarlos y proceder a su presentación a los linfocitos para iniciar la generación de anticuerpos (Abbas Abul, 2004).

Las células presentadoras de antígeno como las células dendríticas, macrófagos y linfocitos, se encuentran en el epitelio del intestino, estas células capturan el antígeno y viajan a los linfonodos más cercanos o bien a las placas de Peyer, donde presentan los antígenos. Los antígenos endocitados se presentan en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo 2 y los antígenos resultantes de la replicación viral intracelular son presentados en MHC tipo 1 (Tizard, 2009).

En la respuesta de tipo celular, cuando los antígenos son presentados, se estimula la diferenciación y producción de linfocitos T, el MHC 2 estimula a linfocitos T

cooperadores (CD4) los cuales activan a los macrófagos y linfocitos B, mientras que el MHC1 estimula a linfocitos T citotóxicos (CD8), los cuales eliminan a las células diana infectadas causándoles apoptosis. Estos dos tipos de linfocitos T al ser activados proliferan y se separan en linfocitos efectores y linfocitos de memoria (Abbas Abul, 2004).

La respuesta de tipo humoral está mediada por los linfocitos B, estos son estimulados en los linfonodos por los linfocitos T cooperadores o por otros linfocitos B vírgenes. Al ser activados, los linfocitos B proliferan y se diferencian en células plasmáticas y en linfocitos B de memoria. Inicialmente la producción de anticuerpos de las células plasmáticas se comienza por inmunoglobulinas M (IgM), posteriormente, por la presencia de citocinas hay un cambio de isotipo a IgG, IgE o IgA (Pabello, 2010).

Las inmunoglobulinas tipo A (IgA) son las de mayor dominancia en mucosas, se pueden encontrar de dos formas, la primera es en forma monomérica, estas provienen de las células plasmáticas derivadas de los linfocitos B que fueron activados en algún linfonodo y tienen una mayor concentración en sangre. El segundo tipo de IgA tiene una presentación en forma de dímero, uniendo dos IgA por una cadena J; estas son expresadas por las células secretoras del epitelio. La IgA dimérica es transportada a través de los enterocitos inmaduros de la bases de las criptas por medio del receptor de inmunoglobulina polimérico que transporta la IgA por medio de transcitosis para llegar a la luz del intestino y así poder neutralizar los antígenos (Figura 2) (Murphy Kenneth, Travers Paul, 2008).

Dentro de la respuesta inmune, las células que participan en la inmunidad innata y adaptativa secretan una serie de proteínas llamadas citocinas (Cuadro 1). Durante estas dos etapas las citocinas activan algunas células efectoras para eliminar al microorganismo o antígenos. Por otro lado, las citocinas estimulan el crecimiento y diferenciación de los linfocitos durante la activación de la respuesta inmune adaptativa (Figura 3).

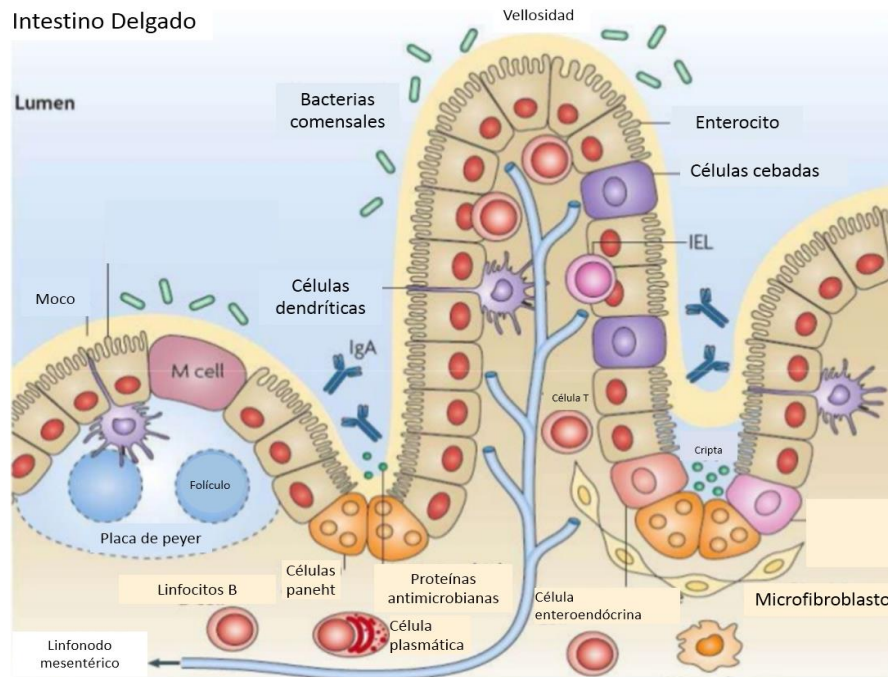


Figura 2. Respuesta inmune del intestino delgado. Modificado (Abreu, 2010)

Cuadro 1. Principales citocinas de la respuesta Inmune.

Citocina	Acción
IL-2	Sirve como factor de crecimiento para los linfocitos T sensibilizados por la presencia de algún antígeno. Proliferación de Linfocitos NK. Potencia la apoptosis en LT-CD4.
IL-4	Desarrollo de Linfocitos TH2 a partir de CD4. Supresión de reacciones provocadas por macrófagos. Inhibe la reacción inmunitaria celular.
IL-10	Inhibidor de macrófagos y células dendríticas activadas. Inhibe producción de IL12 y de expresión de CPH de clase 2 en estas células.

IL-12	Síntesis de IFN γ Diferenciación de Linfocitos T CD4 a TH1. Potencia función de NK y LTCD8.
IFN γ	Activación de macrófagos para eliminar partículas fagocitadas. Expresión de moléculas CPH 1 y 2. Diferenciación de CD4 aTH1 y TH2. Favorece el cambio de isotipo de inmunoglobulinas en los linfocitos B.
TGF α	Causa los signos cardinales de la inflamación que incluyen calor, rubor, dolor y edema. Favorece la adherencia, migración, atracción y activación de los leucocitos. Potencia la presentación de antígenos y estimular a los linfocitos T.

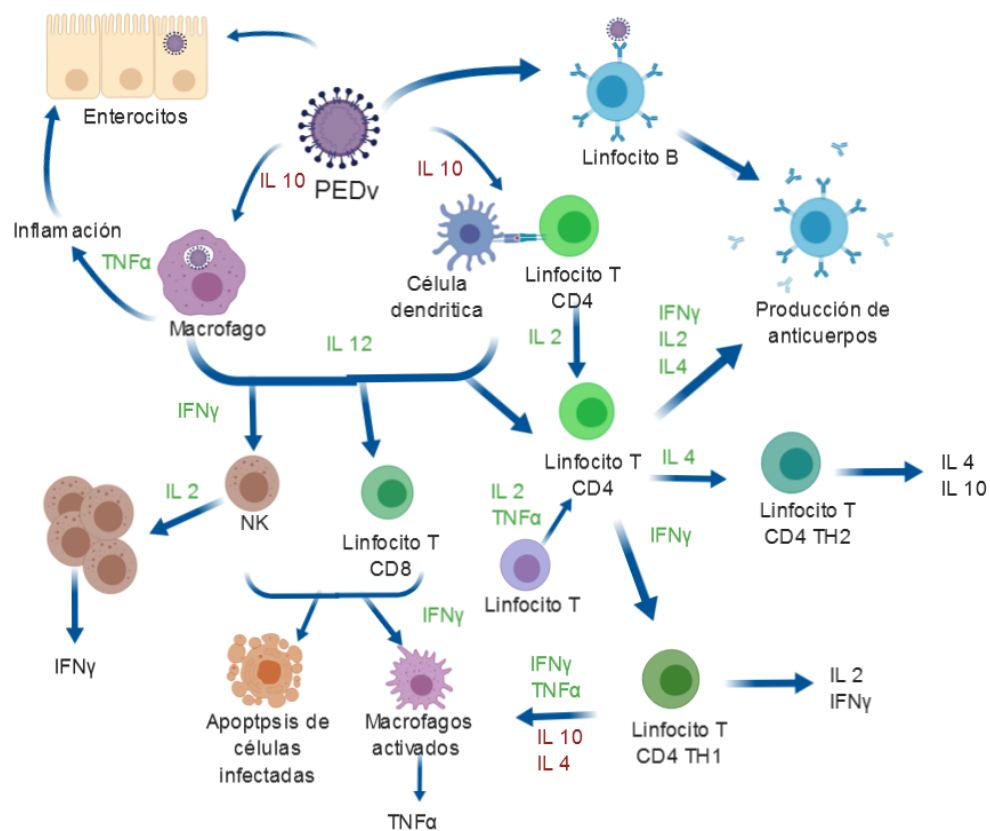


Figura 3. Participación de las citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IFN γ y TNF α en la respuesta inmune frente a la infección con el vDEP

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa del huésped en respuesta a la infección viral. Inicia con la producción de IFN Tipo I (IFN- α / β) y citocinas proinflamatorias a través del reconocimiento de antígenos por receptores de las células. El IFN tipo I desempeña un papel importante en la respuesta inmune antiviral; sin embargo, informes recientes mostraron que vDEP tiene la capacidad de suprimir la respuesta antiviral del IFN identificándose once proteínas virales responsables de esta supresión, que incluyen nsp1, nsp3, nsp5, nsp7, nsp14, nsp15, nsp16, ORF3, E, M y N (Xing *et al.*, 2013). Por otro lado, se ha detectado que la respuesta inmune depende de la edad de los cerdos, produciendo una menor cantidad de células NK, IFN- γ TNF α e IL-8 en lechones infectados con vDEP que en cerdos destetados (Xing *et al.*, 2013).

La proteína S es el principal objetivo de la respuesta inmune humoral durante una infección. Recientemente se demostró que la inmunización de cerdas gestantes con la proteína S1 de vDEP proporciona inmunidad pasiva contra el vDEP a lechones a través del consumo de calostro y leche (Oh *et al.*, 2014). Se ha comprobado que el ectodominio de proteína S contiene al menos dos epítomos reconocidos por las células B neutralizantes (Cruz, Joong and Shin, 2006).

Calostro

La placenta de las cerdas es epiteliochorial difusa, la cual es impermeable al paso de anticuerpos de la cerda a los lechones durante la gestación, llegando al momento de parto agammaglobulínicos. Cuando los lechones nacen, carecen de anticuerpos, por esto es importante que durante sus primeras horas de vida tomen calostro, el cual contiene una mayor cantidad sustancias nutritivas y de anticuerpos que la leche (Blanco Camacho and Ortega, 2009).

El intestino de los lechones aumenta su permeabilidad durante las primeras horas de vida y esto permite el paso de nutrientes y de anticuerpos IgG, IgM e IgA al torrente sanguíneo del lechón (Langel *et al.*, 2016).

El calostro contiene de 950 a 1050 mg/dl de IgA, 250 a 320 mg/dl de IgM y de 3000 a 7000 mg/ml de IgG, posteriormente el porcentaje de inmunoglobulinas cambia (cuadro 2) (Langel *et al.*, 2016).

Cuadro 2. Porcentaje de anticuerpos en calostro y leche (Blanco Camacho and Ortega, 2009).

	IgG	IgA	IgM
Calostro	54%	8.3%	2.7%
Leche a las 24 h.	46.40%	75%	7.1%
Leche a los 7 días	22.20%	47.6%	14.3%

Prevención

La propagación del vDEP se presenta de manera rápida, y es necesaria la utilización de medidas de bioseguridad para el control de la infección:

- Delimitación del área con otras granjas (bardas, cercas o muros).
- Control de accesos (puertas, ventanas, pasillos, etc.).
- Contar con arcos, vados y tapetes sanitarios (entradas, salidas y por áreas y secciones de la granja).
- Control de entrada de personas, material, equipo y enseres; así como en embarcaderos de cerdos (entrada y salida).
- Utilización de ropa y calzado exclusivo para el personal de la granja, tomando en cuenta las distintas áreas de producción y control.
- Lavado y desinfección de botas y calzado.

- Uso de overoles desechables para visitas.
- Baños y regaderas para personas que ingresen a la unidad de producción.
- Limitar el tránsito de personal y equipo dentro de la granja.
- Limpiar y desinfectar rigurosamente enseres que ingresen a la granja.
- Los visitantes, deben cumplir con los períodos de descontaminación entre visitas de una granja a otra.
- Manipular, de manera adecuada los cadáveres para evitar que sean una fuente de contaminación, especialmente si se está utilizando el método de eliminación en fosa común.
- Contar con fosa séptica de desechos, que no permita el acceso de otras especies animales (fauna nociva), ya que la transmisión es fecal-oral y por alimentos contaminados, incluyendo el agua.
- Realizar cuarentenas a los animales recién llegados y mantener comunicación entre veterinarios, con relación a la situación sanitaria de las granjas de origen (Sosa, 2014).

Control de la enfermedad

Vacunación

Desde 1999 se han creado varias vacunas para controlar la DEP. En la actualidad existen pocas opciones de vacunación, ya que muy pocas están realizadas con los virus que circulan recientemente. En México se autorizó el ingreso de una vacuna elaborada con un virus inactivado aislado en EUA en Colorado en el 2013 (Vacuna contra la Diarrea Epidémica Porcina de ZOETIS). Aunque la vacuna está realizada con un virus genéticamente parecido a los circulantes en el país, puede que no sea la mejor opción, dado que la inmunización de un virus activo desencadena

gran parte de la respuesta inmune innata y adaptativa y las vacunas inactivadas inducen protección limitada y por menos tiempo (Abbas Abul, 2004).

“Feedback”

La exposición controlada al vDEP o *“Feedback”* consiste en obtener el contenido intestinal y/o diarrea de lechones en la fase aguda de la infección, es decir, las primeras 24 o máximo 48 horas después de la primera presentación de signos clínicos. Se realiza una suspensión y se suministra vía oral a todos los animales. Existen varios métodos de administración, esto depende de las capacidades y preferencias de la granja, la vía de administración puede ir desde el suministro del material por medio de una jeringa, hasta el que se realiza remojando una escoba y pasándola directamente por la nariz y boca de cada uno de los animales en todos los corrales. La práctica consiste en aplicar el *“feedback”* a todas las hembras de cría, de preferencia solo una vez (Porcicultores, 2015) (Schwartz *et al.*, 2013), esto tiene como finalidad generar una infección que produzca una respuesta inmune previa al parto, para generar anticuerpos que puedan ser transmitidos a los lechones a través del calostro.

JUSTIFICACIÓN

La mortalidad en lechones ocasionada por el vDEP se ha intentado controlar inoculando “*feedback*” a las cerdas gestantes como método de infección-inmunización activa, como se hizo con gastroenteritis transmisible (GET), sin embargo, no ha generado el resultado esperado, por ello, es importante evaluar la vacuna comercial que se usa en México y compararlo con esta práctica, para determinar cuál es el mejor método de control.

HIPÓTESIS

La respuesta inmune en cerdas durante una exposición controlada con “*feedback*” de vDEP será más exacerbada y protectora, comparado con la respuesta inmune generada al utilizar una vacuna comercial con virus inactivado.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta inmune generada en cerdas gestantes posterior a la inmunización con una vacuna comercial y la inoculación con “*feedback*”.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar la inmunización en cerdas gestantes con una vacuna comercial y la inoculación con “*feedback*”.
- Evaluar la concentración de anticuerpos IgA e IgG generados en cada uno de los grupos.
- Cuantificar mediante RT-PCR la carga viral en los lechones.
- Cuantificar las principales interleucinas que participan en la respuesta inmune.

MATERIAL Y MÉTODOS

Granja

La evaluación se realizó en el Centro de Enseñanza e Investigación en Producción Porcina (CEIEPP), ubicado en Jilotepec, Estado de México, con coordenadas 19°51' y 20°11' latitud norte; 99°25' y 99°44' longitud oeste a una altitud de 2,200 m.s.m. y una temperatura media de 13°C. Esta granja presentó un rebrote de DEP en el mes de enero del 2018, en la cual se requirió implementar medidas para poder controlar la enfermedad como vacunación y administración de “*feedback*”. Anteriormente la granja había tenido un brote en el año 2014.

“Feedback”

Se recibieron en congelación para diagnóstico, cuatro intestinos de lechones con cuadro sugerente a DEP procedentes del CEIEPP. Se procedió a licuar los órganos con un litro de medio para cultivo (MEM). Se centrifugó y se obtuvo el sobrenadante. Se filtró y se obtuvieron un total de 300 ml y se hicieron alícuotas. Posteriormente se realizó RT-PCR tiempo real para verificar la presencia del vDEP, además se verificó la ausencia de otros agentes etiológicos entéricos.

Grupos experimentales

Hembras gestantes

Se seleccionaron 16 cerdas gestantes de diferente parto, mismas que fueron inmunizadas o inoculadas durante la gestación. La inoculación se realizó cuando las cerdas se encontraban entre los 46 y 79 días de gestación.

Se formaron 4 grupos de cerdas, el diseño experimental se muestra en los Cuadros 3 y 4.

Grupo A. Grupo testigo sin inmunización.

Grupo B. Se aplicó la vacuna con virus inactivado en dos aplicaciones de 2 ml por vía intramuscular, con diferencia de 15 días (Vacuna Contra La Diarrea Epidémica Porcina® Zoetis SAGARPA B-1196-007).

Grupo C. Se administró 1 ml de “*feedback*” vía oral en dos aplicaciones con diferencia de 15 días.

Grupo D. Se inoculó con 2 ml de “*feedback*” vía oral en dos aplicaciones con diferencia de 15 días.

Cuadro 3. Grupos experimentales, número de cerdas utilizadas por grupo

Subgrupo	Días de gestación	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
1	46-49	-	2	1	2
2	63-64	-	2	1	1
3	71	-	2	1	2
4	79	2	-	-	-

Cuadro 4. Edad de gestación al momento de la inmunización

Subgrupo	Grupo A		Grupo B		Grupo C		Grupo D	
	1 Inm. Dia GX	2 Inm. Dia GX	1 Inm. Dia GX	2 Inm. Dia GX	1 Inm. Dia GX	2 Inm. Dia GX	1 Inm. Dia GX	2 Inm. Dia GX
1	-	-	46	61	49	64	46	61
2	-	-	63	78	64	79	64	79
3	-	-	71	86	71	86	71	86
4	79	94	-	-	-	-	-	-

Inm= Inmunización

Colecta de muestras

Se obtuvieron muestras de suero cada siete días desde la primer inmunización durante tres meses, después del parto. A las hembras se les dio un seguimiento clínico diario durante los primeros siete días post vacunación (Figura 4).



Figura 4. Cronograma de muestreo en cerdas

Durante los muestreos se obtuvieron hisopos rectales de cada una de las cerdas (Anexo 1). Además, se obtuvieron muestras de calostro durante las primeras horas de parto (Cuadro 5).

Cuadro 5. Muestras obtenidas de cerdas gestantes

Tipo de muestra	Total de cerdas	Número de muestreos	Total de muestras
Sangre	16	8	128
Hisopos rectales	16	7	112
Calostro	16	1	16

Lechones

Los lechones nacidos de todas las cerdas de los grupos experimentales se mantuvieron con sus madres durante la lactación y durante ese periodo se tomaron muestras de sangre el día 1, 7 y 14 de vida (Figura 5).



Figura 5. Cronograma de muestreo en lechones.

Se tomaron muestras de hisopos orales (Anexo 2) y rectales de lechones de cada camada el día 1, 3, 7 y 14 (Cuadro 6).

También se observó la presencia de signos clínicos como secreción nasal, diarreas, vómitos durante los primeros 7 días, así como la mortalidad durante la lactación.

Cuadro 6. Muestras obtenidas de lechones.

Tipo de muestra	Número de muestreos	Total de muestras
Sangre	3	447
Hisopos rectales	4	596
Hisopos orales	4	596

Pruebas

Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA)

Para evaluar la presencia de IgG en suero e IgA en suero, hisopos orales y calostro, se realizó una prueba de ELISA cualitativa casera (Anexo 3). La cual se desarrolló en la UNAM en colaboración con SAGARPA con número de convenio 38445-1635-30-VI-14.

RT-PCR

Para la realización de la extracción se utilizó el kit QIAamp[®] viral RNA de QIAGEN (Anexo 4), para la obtención del material genético, posteriormente se realizó la RT-PCR en el cual se utilizó un kit comercial (POCKIT PEDV[®]) de RT-PCR en tiempo real cualitativo dirigido a una región del gen M del vDEP (Anexo 5) (Beltran-Alcrudo *et al.*, 2007).

Cuantificación de Interleucinas

La cuantificación de interleucinas IL2, IL4, IL10, IL12, TNF α , IFN γ se llevó a cabo por medio del sistema Luminex MAGPIX[®] y el panel multi-analitos basado en

perlas magnéticas MILLIPLEX® de MERCK, (PCYTMAG-23K-06) este sistema puede detectar hasta 50 analitos en su superficie en regiones diferentes, estas esferas son magnéticas y se procesan en una placa de 96 pozos siguiendo un procedimiento similar a un ELISA, cuando se finaliza el ensayo, se realiza la lectura en el equipo MAGPIX® el cual funciona con dos láseres diferentes uno para identificar regiones de la esfera y otro para cuantificar la fluorescencia emitida por esa región. Dando así un informe de la cuantificación de cada una de las interleucinas a medir (Anexo 6).

RESULTADOS

“Feedback”

El *“feedback”* fue analizado por RT-PCR en tiempo real para asegurar que contenía vDEP, descartando GET y Deltacoronavirus. Así mismo, se realizó el análisis para detectar la presencia de diferentes virus como PRRS, PCV2 e IP a los cuales fue negativo, de igual manera se realizó un cultivo bacteriológico donde no se encontró presencia de bacterias.

Signos clínicos

Se registró la presencia de signos clínicos en las cerdas gestantes, y se observó una ligera depresión y anorexia, ninguna presentó vómito o diarrea sugerente a vDEP.

De igual manera, los lechones no presentaron diarreas, ni signos clínicos sugerentes a vDEP y la mortalidad registrada fue asociada a aplastamientos por las madres.

Evaluación productiva

Dentro de la producción se obtienen los pesos de los lechones al momento del nacimiento y al destete, estos datos se muestran en la Figura 6 donde se observa el promedio de peso por grupo experimental. En la gráfica, los pesos al nacimiento no difieren entre los grupos. Sin embargo, en los pesos al destete se observa un ligero incremento en el grupo A comparado con los demás grupos, el grupo B se encuentra por debajo por un kilo aproximadamente, mientras que los grupos con *“feedback”* (Grupos C y D) tienen un valor similar entre ellos, encontrándose entre el grupo A y el B (Figura 6).

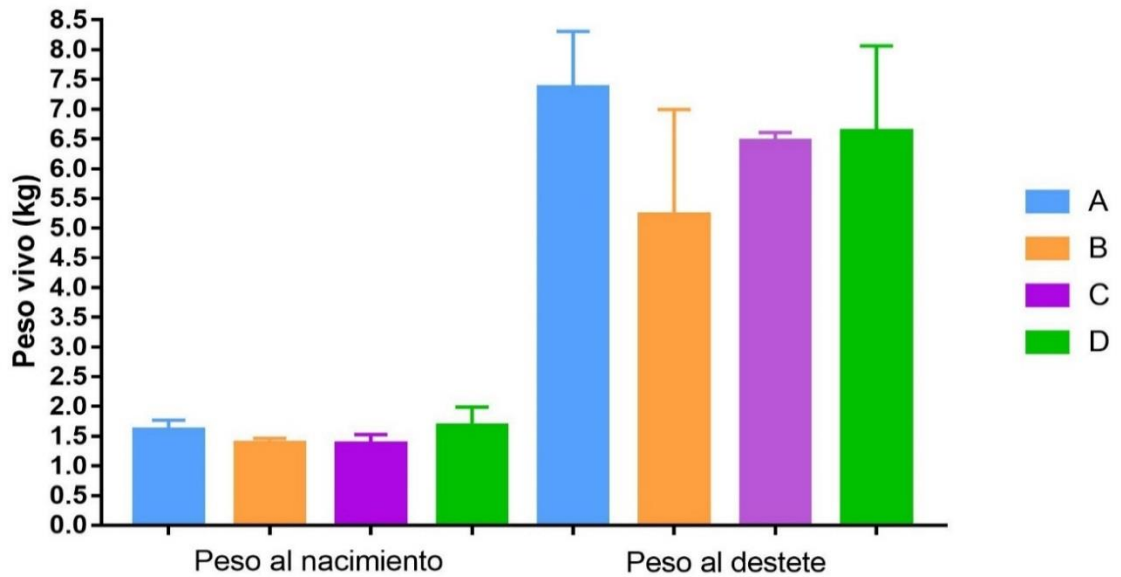


Figura 6. Comparación de peso al nacimiento y al destete en las camadas de los cuatro grupos

La mortalidad que se presentó durante la lactancia de las 16 cerdas fue del 22% en promedio, atribuyendo el 90% por aplastamiento y 10% por emaciación, no asociada a la DEP. El grupo B obtuvo una mortalidad del 15%, seguido del grupo A con el 20%, los grupos con C y D tuvieron una mortalidad por arriba del promedio de todas las cerdas, siendo el grupo C el que presentó la mortalidad más alta (28%) (Figura 7).

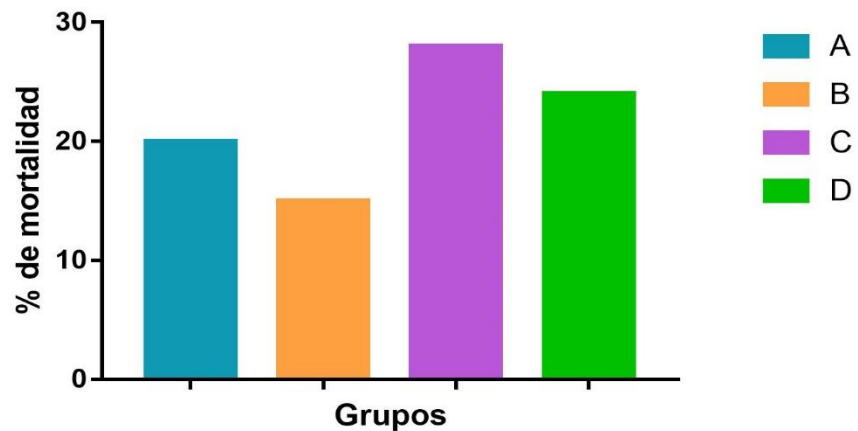


Figura 7. Porcentaje de mortalidad en maternidad

ELISA

A partir del punto de corte emitido en densidades ópticas, se obtuvo el porcentaje de positividad (pp) para facilitar el análisis de los resultados, el cual se obtuvo dividiendo la densidad óptica de cada muestra entre el punto de corte y posteriormente se multiplicó por 100, así, cada valor por arriba de éste será positivo (OIE, 2004).

Calostro

La ELISA de IgA en calostro muestra que la mayoría de las muestras fueron positivas, excepto dos calostros del grupo D (Figura 8). De los cuatro grupos, el grupo A con un promedio mayor en el porcentaje de positividad seguido de los grupos experimentales B, C y D.

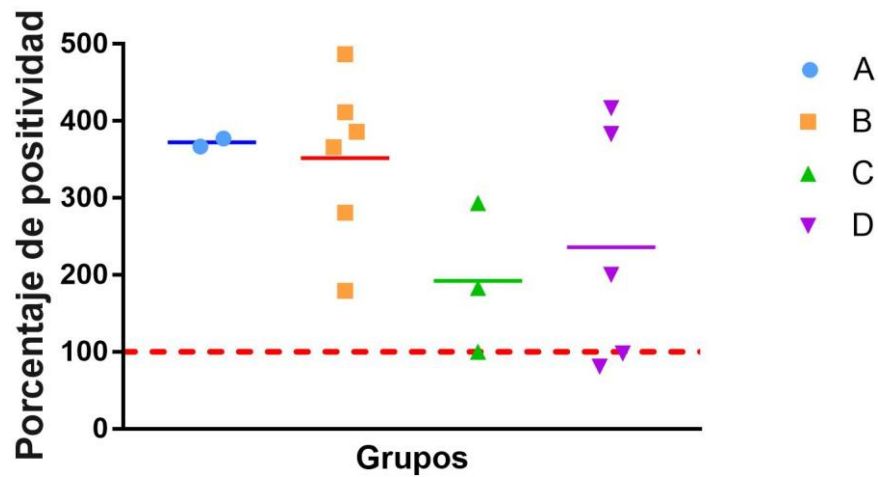


Figura 8. IgA en calostro de lechones

Cerdas

En los sueros de las cerdas se obtuvo que el grupo A, fue el más elevado de anticuerpos IgA llegando a 428 de pp, mientras que de los grupos experimentales el grupo B obtuvo 358 pp de IgA posterior a la inmunización en el subgrupo 3, seguido de los grupos inoculados con “*feedback*”, teniendo un ligero incremento el grupo C de 50 pp de diferencia con el grupo D. Alrededor de la séptima semana post inmunización todos los grupos registraron un declive alrededor de 100 pp de anticuerpos.

En la figura 9 se observan, los grupos por edad de gestación, donde se puede ver que al momento del parto las cerdas del grupo A tienen 428 pp de IgA. Los tres grupos experimentales restantes tienen una curva de anticuerpos que disminuye antes del momento del parto, en general el nivel de anticuerpos durante el parto es alrededor de 100.

La cantidad de IgG encontrada en el suero de todas las cerdas es bajo, comparada con el ELISA de IgA, aun así, estas mantienen la misma distribución, siendo el grupo B con el de mayor cantidad de IgG, teniendo su máxima

concentración entre la tercera y cuarta semana después de la primera inmunización.

Las concentraciones de IgG al momento del parto son bajas, las cerdas en su mayoría negativas a la presencia de anticuerpos, con excepción de las cerdas del grupo B y del grupo A, ese último con 200 de pp.

En general el nivel de anticuerpos IgA en suero de cerdas gestantes es mayor que IgG para los cuatro grupos aumentando el número de anticuerpos siete días después de la segunda inoculación, sin embargo, el grupo A fue el que llegó con la mayor positividad de anticuerpos al momento del parto. En las otras tres etapas de gestación, el grupo B fue el que obtuvo niveles altos de anticuerpos seguido de los grupos C y D.

Lechones

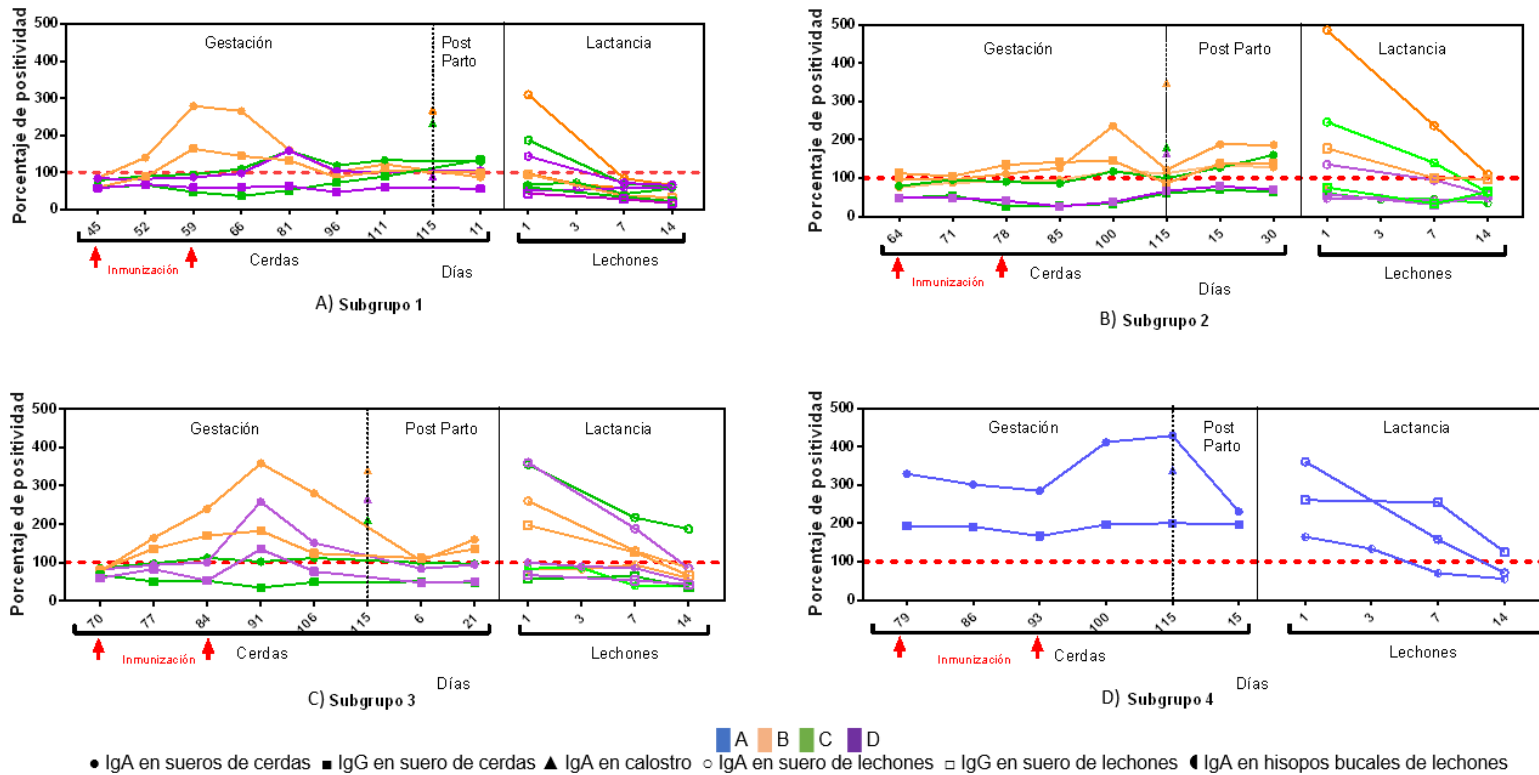
En la gráfica 9, cada punto en la parte de lactancia, representa el promedio por camada de cada uno de los grupos, de esta manera se puede observar que la cantidad de IgA en suero de lechones es elevado durante los primeros días y disminuye conforme pasa el tiempo, esto sucede para los 4 grupos, sin embargo la cantidad de anticuerpos del grupo B es mayor que el C y el D, con excepción del subgrupo 3, donde el grupo C y D tienen un mayor porcentaje de positividad que el B.

Las camadas con mayor concentración de IgG corresponden a las del grupo A (260 de pp) y B (156 de pp en promedio de los tres subgrupos), seguido de los lechones de los grupos C y D. En estos últimos, los sueros fueron negativos para todas las etapas de inoculación durante la gestación, contrario al grupo B, el cual mantuvo positividad los primeros días de los subgrupos 1, 2 y 3.

En los fluidos orales (obtenidos mediante hisopo) se encontró una menor cantidad de muestras positivas a la presencia de IgA comparado con las muestras de

suero, sin embargo, existió positividad en el grupo A en la primera toma de muestra de 164 de pp que disminuyó hasta ser negativo al día 7 de vida.

Figura 9. Anticuerpos contra DEPV



Anticuerpos. En las cuatro graficas se presenta en el eje X los días de gestación, se encuentra dividido en los anticuerpos encontrados en cerdas del lado izquierdo, mientras que del derecho se encuentran los anticuerpos en sus lechones. Además, se marca el día 115 con una línea punteada del lado de las cerdas para representar el día del parto, y con dos flechas rojas los días de la inmunización. En el eje Y se encuentra el porcentaje de positividad (PP) y especificando el 100 como el punto de corte de la ELISA. Se utilizaron cuatro estadios de gestación a) Inoculación a los 45 días de gestación b) Inoculación a los 64 días de gestación. c) Inoculación a los 70 días de gestación. d) Inoculación a los 79 días de gestación

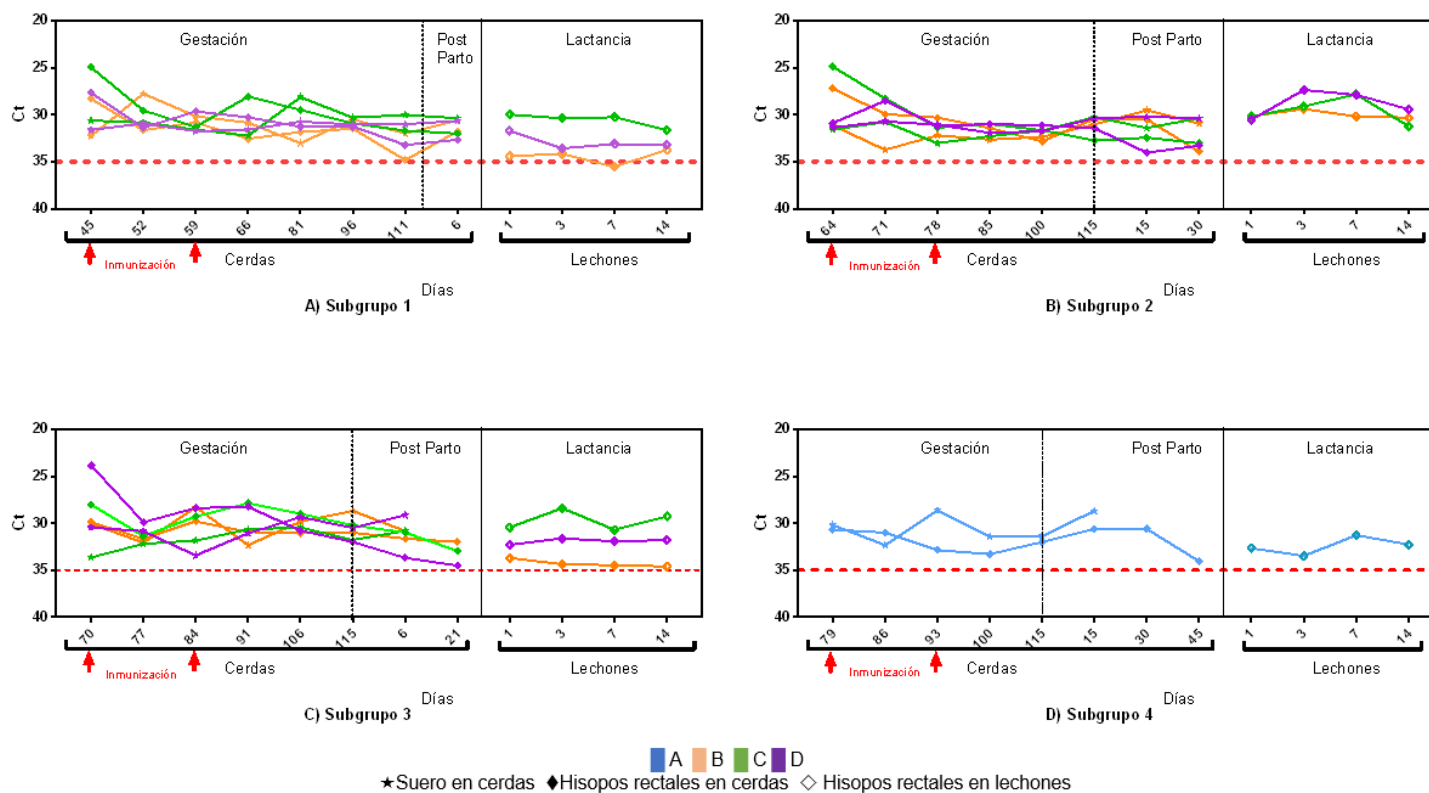
RT-PCR

La RT-PCR empleada no es cuantitativa, el punto de corte para definir muestras positivas se estableció para muestras que cruzaron el umbral antes del ciclo 35, a partir de este ciclo y hasta el ciclo 40, se consideró muestra sospechosa. Se atribuye una mayor cantidad de virus en muestras donde la amplificación se presenta en los primeros ciclos.

En la figura 10 se muestran los resultados de la RT-PCR mostrando cuatro gráficas, una para cada subgrupo, representando cada punto como promedio de cada grupo. En estas gráficas se observa que durante todo el experimental, las cerdas fueron positivas en las muestras obtenidas. Los CT en que los hisopos rectales amplificaron durante la inmunización fueron alrededor de 30 para el grupo A, 28 para el grupo B y 26 para el grupo C y D, después de la inmunización los cuatro grupos se mantienen amplificando alrededor del ciclo 32. Los sueros amplificaron alrededor del CT 32 para los cuatro grupos al principio del muestreo, y se mantiene entre el ciclo 30 y 34 para el resto del muestreo.

Posterior al parto, las muestras de hisopos rectales tomadas a los lechones resultaron positivas en los cuatro grupos en los diferentes tiempos de gestación, siendo las camadas del grupo D las que amplificaron primero durante los muestreos, independientemente de la edad de gestación al momento de la inmunización, seguido del grupo C, el grupo A y finalmente el grupo B, el cual en el subgrupo 1 y 3, amplificó alrededor del ciclo 35, el cual se considera sospechoso para la prueba.

Figura 10. Resultados de RT-PCR en los diferentes grupos de animales, en diferentes tiempos de muestreo



RT-PCR. En las cuatro graficas se presenta en el eje X los días de gestación, se encuentra dividido en dos recuadros, en el primero están representadas las cerdas y en el segundo los lechones. Además, se marca el día 115 con una línea punteada del lado de las cerdas para representar el día del parto. En el eje Y se encuentra el ciclo en que comenzó la amplificación del material genético, especificando el ciclo 35 como el límite para considerar la muestra sospechosa, y el ciclo 40 como negativa. Se utilizaron cuatro estadios de gestación a) Inoculación a los 45 días de gestación b) Inoculación a los 64 días de gestación. c) Inoculación a los 70 días de gestación. d) Inoculación a los 79 días de gestación

Citocinas

Las citocinas incluidas fueron seis, las cuales se presentan en la Figura 11, se muestran los promedios de la cuantificación en ng/ml por grupo, a lo largo de cinco muestreos, siendo el día cero y el día 14, los días de inmunización.

Interferón gamma (IFN_γ)

La cantidad de IFN_γ en el grupo A se mantuvo alrededor de los 30 ng/ml durante el muestreo con un ligero declive en el último muestreo sin bajar de 20 ng/ml, por otro lado, el grupo B, después de la primera inmunización registró un incremento de 18 ng/ml hasta 54 ng/ml, que posteriormente bajó y se mantuvo entre 45 y 50 ng/ml para los últimos dos muestreos. Los grupos de “*feedback*”, obtuvieron niveles inferiores al grupo A. El grupo D obtuvo 18 ng/ml y bajó conforme avanzaron los muestreos hasta llegar a los 5 ng/ml para el último muestreo, mientras que C se mantuvo cerca de 3 ng/ml y para el cuarto muestreo tuvo un pico de concentración llegando a los 28 ng/ml, posteriormente bajó a 3 ng/ml.

Interleucina 2 (IL-2)

El grupo A y el B obtuvieron las mismas concentraciones de IL-2 durante los muestreos, aumento ligeramente en el segundo y tercer muestreo y posteriormente un decremento leve, el grupo A se mantuvo cerca de 1.5 ng/ml, mientras que el grupo B obtuvo en promedio 2 ng/ml. Los grupos de “*feedback*” comenzaron con una concentración de 7 ng/ml y terminaron con una concentración de 4 ng/ml, la única diferencia, fue que el grupo C tuvo un incremento en el cuarto muestreo, llegando a los 1.4 ng/ml.

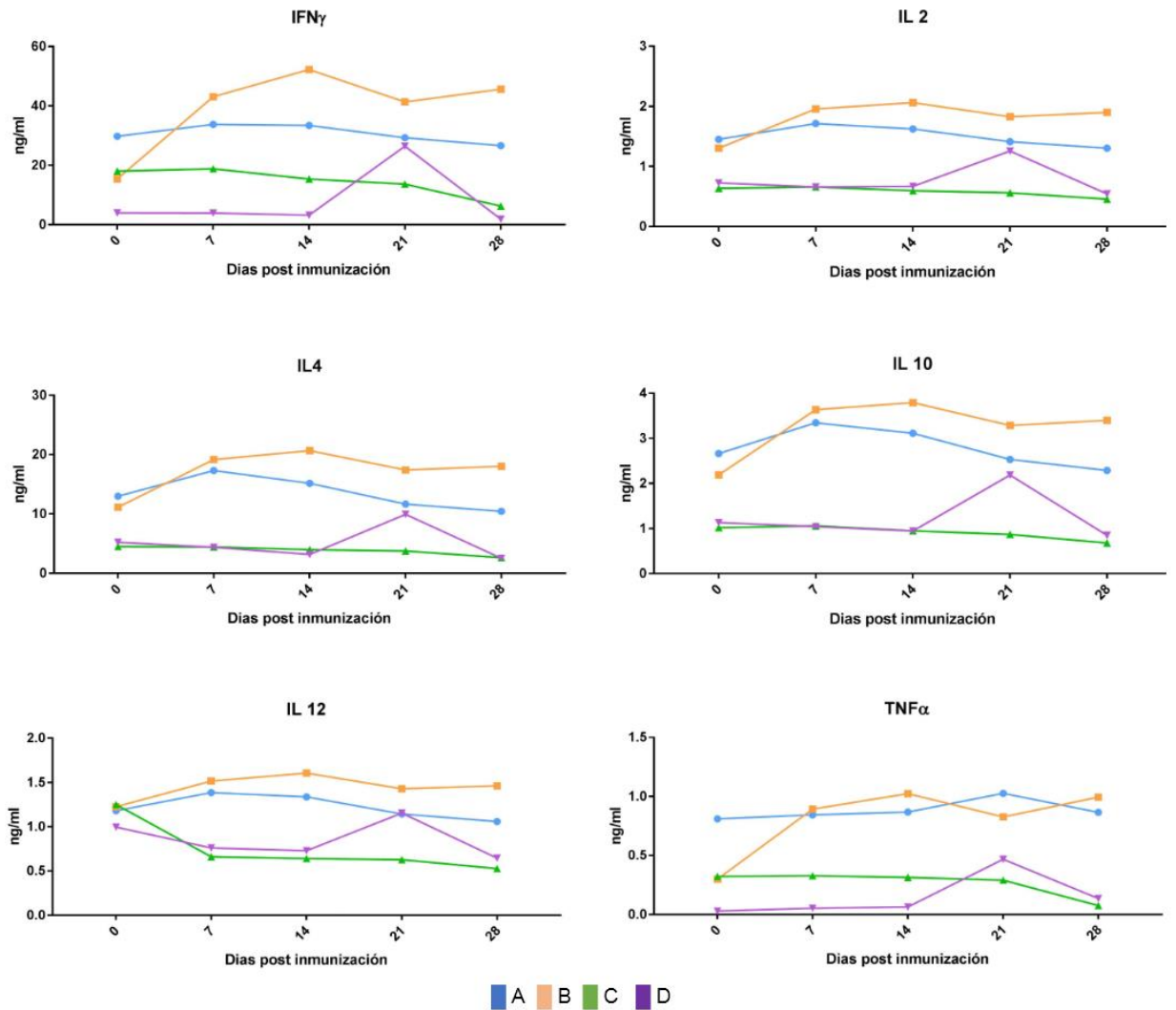


Figura 11. Cuantificación de citocinas en sueros de cerdas gestantes

Interleucina 4 (IL-4)

La distribución de los grupos para la concentración de IL-4 es similar que la IL-2, la única diferencia es la concentración obtenida, las cuales, en el grupo A se mantuvieron entre 12 y 17 ng/ml, en el grupo B comenzaron en 10 ng/ml hasta llegar a los 20 ng/ml, posteriormente terminaron alrededor de 18 ng/ml en los últimos dos muestreos. Por otro lado, los grupos “feedback” comenzaron con 6

ng/ml disminuyendo a 3 ng/ml para el último muestreo, la única excepción, fue el muestreo 4 del grupo C que obtuvo cerca de 10 ng/ml.

Interleucina 10 (IL-10)

En el grupo A la IL-10 comenzó con 2.7 ng/ml, tuvo un ligero incremento a 3.4 ng/ml y bajó gradualmente hasta 2.3 ng/ml. El grupo B comenzó con 2 ng/ml, aumentó hasta 3.8 ng/ml en el tercer muestreo y posteriormente bajó a 3.5 ng/ml. Los grupos “*feedback*” comenzaron con 1 ng/ml y disminuyeron a 0.8 ng/ml para el último muestreo, la diferencia fue que el grupo C en el cuarto muestreo llegó a los 2.1 ng/ml

Interleucina 12 (IL-12)

Los grupos A y B comenzaron en una concentración de 1.3 ng/ml, posteriormente incrementaron el A a 1.4 ng/ml y el grupo B a 1.6 ng/ml, posteriormente disminuyó, terminando en 1 ng/ml el grupo A y en 1.4 ng/ml el grupo B. El grupo D comenzó igual que los anteriores en 1.3 ng/ml y disminuyó a 0.6 ng/ml para el segundo muestreo, manteniendo la misma concentración para los siguientes muestreos. La concentración inicial en el grupo C fue de 1 ng /ml llegando a 1.8 ng/ml para los muestreos dos y tres, en el cuarto se incrementa a 1.2 n g/ml y en el último muestreo disminuyó alrededor de 0.7 ng/ml.

TNF α

El grupo A comenzó con una concentración de 0.8 ng/ml que se mantuvo hasta el cuarto muestreo donde se elevó a 1 ng/ml, posteriormente bajó cerca de 0.8 ng/ml para el último muestreo. El grupo B comenzó con una concentración aproximada de 0.35 ng/ml la cual incrementó en los siguientes dos muestreos alrededor de 1

ng/ml, en el cuarto muestreo bajó a 0.8 ng/ml y finalmente se elevó alcanzando 1 ng/ml. El grupo D comenzó en 3.5 ng/ml al igual que el grupo B, en los muestreos siguientes se mantuvo y disminuyó para el último muestreo a 0.1 ng/ml. La concentración de TNF α comenzó con una concentración cercana al cero, la cual fue incrementando ligeramente en los siguientes dos muestreos, llegando al cuarto muestreo donde se incrementó súbitamente de 0.5 ng/ml y bajó a 0.2 ng/ml para el último muestreo.

DISCUSIÓN

En la preparación de “*feedback*” se utilizó medio para cultivo celular, a diferencia de algunas publicaciones donde recomienda el uso de agua caliente, agua destilada o solución salina fisiológica (Schwartz *et al.*, 2013). La administración del “*feedback*” fue de 1 y 2 ml a diferencia de lo que se recomienda, 25 ml por cerda, sin hacer referencia a la concentración de virus (Carvajal, 2016).

Durante la fase experimental, algunas cerdas al momento de la inmunización presentaron inapetencia y depresión, esto fue disminuyendo en los siguientes días, por otro lado se realizó la infección con “*feedback*” y siete días después se realizó otra inmunización para igualar a la aplicación de la vacuna, sin embargo las cerdas con “*feedback*” no presentaron signos clínicos como anorexia, diarrea o vómito como sugieren algunos protocolos de control (Porcicultores, 2015), donde se recomienda aplicar el “*feedback*” doce horas después de la primera inoculación si el 80% de los animales no presenta signos clínicos, y en algunas ocasiones, realizar la infección durante tres días seguidos (Matthew, 2013).

La positividad de la prueba de ELISA de IgG en suero en cerdas gestantes fue menor que IgA, a diferencia de lo encontrado recientemente por Okda (Okda *et al.*, 2018), donde encontró un mayor número de IgG de suero que en IgA y aunque el experimental solo se realizó a una sola edad de gestación (62 días de gestación), los máximos niveles de anticuerpos IgG e IgA se presentaron 15 días después de la inoculación, un resultado similar a lo obtenido en este experimento donde, independientemente de la edad de gestación los anticuerpos son más altos 15 días después de la segunda inmunización. Siendo así, el tercer tercio de la gestación el ideal para la inmunización de las cerdas para asegurar un máximo nivel de anticuerpos para el paso de inmunidad pasiva a los lechones.

Los anticuerpos IgA encontrados en el calostro de las cerdas, muestran una cantidad similar en el grupo A y el B, y por debajo de estos los grupos C y D, lo

cual es contrario a lo esperado ya que se cree que habría una mejor respuesta inmune en cerdas expuestas al virus por “*Feedback*” por ser un virus activo con la capacidad de infectar enterocitos, replicarse y generar una respuesta inmune en mucosas, aumentando la producción de anticuerpos tipo IgA, a diferencia de la vacuna que es un virus inactivo y solo podría activar el sistema inmune sin replicarse, generando una respuesta inmune con mayor cantidad de IgG (Tizard, 2009) . Las razones por las cuales los resultados no concuerdan incluyen desde el manejo del “*feedback*” que pudiera inactivar al virus, o bien la presencia de tolerancia inmunogénica por una baja concentración de virus que pudiera desencadenar la respuesta inmune, o una dosis alta, que después de la infección de la granja más el “*feedback*”, rebasará el umbral de la respuesta inmune que inhiba una respuesta específica (Murphy Kenneth, Travers Paul, 2008).

En los lechones la detección de IgA en hisopados orales fue menor a la encontrada en suero, esto se podría deber a diferentes variantes como la toma de muestra y conservación de la misma, ya que estas podrían contener proteasas de la saliva de los lechones, además que en los primeros días de vida los únicos anticuerpos IgA que se pudieran encontrar son los que contienen la leche de la madre los cuales tienen una vida media de 2 a 3 días (Curtis and Bourne, 1973), además de que el lechón no es capaz de producir niveles tan altos de anticuerpos en los primeros días de nacido (Zmmerman J.J., Karriker Loke A., Ramirez Alejandro, Schwartz Kent, 2012).

Aunque el RT-PCR no es cuantitativo, se puede inferir la cantidad de virus por medio del ciclo en el que amplifican las muestras. Durante todo el estudio, la mayoría de las muestras fueron positivas, esto debido a que la granja era positiva al virus, el cual pudo estar circulando durante todo el experimento, aumentando la exposición a este en todos los grupos. Según lo publicado por Srijangwad (Srijangwad *et al.*, 2017) la cantidad de ARN viral detectado en RT-PCR aumenta entre mayor sea la dosis de “*feedback*” o virus en las cerdas, lo cual concuerda con el grupo que tiene la mayor concentración de virus en los grupos con

“*feedback*”, que además de la dosis experimental podrían estar expuestos a una mayor dosis por la circulación en granja.

En las cerdas gestantes, los grupos A y B, obtuvieron en suero un Ct menor que en los hisopos rectales, esto contrario a los grupos con “*feedback*”, los cuales tuvieron una mayor Ct en suero que en los hisopos rectales. Esto se puede asociar a que en los grupos con “*feedback*” hay una mayor replicación viral que mantiene la viremia, mientras que en el grupo B y en el A, el virus tiene una menor replicación manteniendo su viremia por debajo de los grupos con “*feedback*”.

Independientemente de la edad de gestación en la que las cerdas fueron inmunizadas, sus lechones fueron positivos a la RT-PCR, el grupo B y A amplificaron tardíamente, en comparación con los grupos con “*feedback*”, esto concuerda con la exposición de las cerdas hacia los lechones, o bien por la generación de una mayor cantidad de anticuerpos que pudieron neutralizar el virus de una manera más eficaz.

Interleucinas

El nivel de interleucinas en los grupos experimentales marca una desigualdad entre el grupo B y el A con los grupos con “*feedback*”, siendo mayor su concentración en los primeros, para todas las interleucinas cuantificadas en este experimental, demostrando que la actividad de las interleucinas para la respuesta inmune celular y humoral es mayor que con “*feedback*”.

La IL- 2 ayuda a la diferenciación de NK, linfocitos CD4, y a la síntesis de anticuerpos, lo cual justifica una mayor cantidad de anticuerpos en el grupo B y en el A. Por otro lado, la IL-12 induce la activación de macrófagos y la apoptosis de células infectadas, lo cual repercute en la disminución del virus. Estas dos interleucinas ayudan a la síntesis de IFN γ , el cual obtuvo una mayor cantidad en esta evaluación.

La secreción de IFN γ aumenta la síntesis de enzimas que evitan la replicación viral, la activación de macrófagos, la apoptosis de células infectadas, la proliferación de linfocitos B y la generación de anticuerpos de estas. Este es la principal interleucina antiviral, la cual obtiene una cantidad mayor en el grupo B, seguido del grupo A, explicando por qué la cantidad de virus es menor encontrada a través del PCR tiempo real, así como la cantidad de anticuerpos es mayor para estos grupos.

La IL-4 además de evitar la activación de los macrófagos, ayuda a la proliferación de linfocitos, lo cual explicaría por qué la cantidad de esta es mayor que IL10, los cuales participan principalmente como inhibidores del IFN γ .

La cuantificación de estas interleucinas no ha sido bien identificada en cerdos y en menor medida en cerdos infectados con DEPV, de los reportes sobre estas interleucinas en cerdos sin ningún tipo de exposición a algún agente o estímulo de estrés, se identificaron los niveles de IFN γ a 0.1 ng/ml, TNF α a 0.2 ng/ml, IL-4 0.1 ng/ml e IL-10 a 0.15 ng/ml (Yeh and Ga, 2018). Estos niveles difieren de las cantidades obtenidas, las cuales son mayores, siendo TNF α el más cercano a los valores encontrados en la bibliografía, sugiriendo que en general la producción de este fue menor que otras interleucinas, disminuyendo la actividad inflamatoria por la inmunización, y que, de los cuatro grupos, el grupo C fue el único con valores debajo a lo encontrado en la bibliografía.

CONCLUSIÓN

Los resultados muestran una circulación de virus dentro de la granja, haciéndose notoria en el grupo A (testigo) que durante todo el experimento fue positivo a la presencia de virus, así como a anticuerpos dirigidos contra PEDV.

La protección conferida a las camadas por medio del calostro proporciona gran cantidad de anticuerpos en los diferentes tiempos de inmunización durante la gestación, encontrándose un mayor número de IgA en suero que IgG e IgA en mucosas.

Los grupos tratados con “*feedback*” contienen una menor cantidad de anticuerpos comparados con los grupos B en IgA en suero, mientras que en IgA en mucosas e IgG en suero las muestras fueron negativas.

En los RT-PCR realizados a las muestras de las camadas, las muestras pertenecientes al grupo B y C (*feedback* 1 ml), amplificación en ciclos posteriores a las muestras del grupo D (*feedback* 2ml).

De las interleucinas cuantificadas, la de IFN γ es la de mayor cantidad, y de los grupos experimentales, el grupo B seguido del A, obtuvieron una mayor cantidad para todas las interleucinas, haciéndose notar que el “*feedback*” tuvo una menor cantidad de interleucinas y es probable que por esto se encuentre una cantidad menor de anticuerpos y una mayor circulación del virus por alguna intolerancia antigénica por una exposición mayor al agente.

Se concluye que bajo un brote de DEPV, esta granja obtuvo mayor nivel de anticuerpos en el grupo A, y de los grupos experimentales, el grupo B en diferentes etapas de gestación, mientras que el “*feedback*” en diferentes dosis, proporciona menor cantidad de anticuerpos con una circulación más evidente del virus.

REFERENCIAS

Abbas Abul, L. A. (2004) *Inmunología Celular y molecular*. 5ta edn. Madrid, España: Elsevier.

Abreu, M. T. (2010) 'Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: How bacterial recognition shapes intestinal function', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 10(2), pp. 131–143. doi: 10.1038/nri2707.

Beltran-Alcrudo, D. *et al.* (2007) 'Focus on porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)', *Fao Empress*, 2(September 2006), pp. 1–5. doi: 10.1089/vim.2005.18.381.

Blanco Camacho, L. C. and Ortega, D. (2009) *Análisis cuantativo de IgG en el calostro de cerdas de primer a quinto parto mediante prueba ELISA en una granja porcícola en Cudinamarca*. Universidad de la Salle, Bogotá.

Brooks, G. *et al.* (2011) *Microbiología medica*. 25th edn, *Microbiología medica*. 25th edn. México: Mc Graw Hill. Available at: https://books.google.com.mx/books?id=GOaVDgAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.

Carvajal, A. (2016) *Recomendaciones para el control de la diarrea asociada a Coronavirus Porcinos (Diarrea Epidémica Porcina y Delta Coronavirus Porcino)*. Available at: <https://www.porcicultura.com/destacado/Recomendaciones-para-el-control-de-la-diarrea-asociada-a-Coronavirus-Porcinos-%28Diarrea-Epidémica-Porcina-y-Delta-Coronavirus-Porcino%29>.

Chen, Q. *et al.* (2014) 'Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 disease outbreak among swine in the united states', *Journal of Clinical Microbiology*, 52(1), pp. 234–243. doi: 10.1128/JCM.02820-13.

Crawford, K. *et al.* (2016) 'Status of vaccines for porcine epidemic diarrhea virus in

the United States and Canada', *Virus Research*. Elsevier B.V., 226, pp. 108–116. doi: 10.1016/j.virusres.2016.08.005.

Cruz, D. J., Joong, K. C. and Shin, H. J. (2006) 'Phage-displayed peptides having antigenic similarities with porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) neutralizing epitopes', *Virology*, 354(1), pp. 28–34. doi: 10.1016/j.virol.2006.04.027.

Curry, S. M. *et al.* (2017) 'Effects of porcine epidemic diarrhea virus infection on nursery pig intestinal function and barrier integrity', *Veterinary Microbiology*. Elsevier, 211(July), pp. 58–66. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.09.021.

Curtis, J. and Bourne, F. J. (1973) 'Half-lives of immunoglobulins IgG, IgA and IgM in the serum of new-born pigs.', *Immunology*, 24(1), pp. 147–155. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4685369> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1422873>.

FAO (2017) *Collection of Specimens from Swine for the Detection of Influenza A Virus by Molecular Assays or Virus Isolation*.

Guo, X. *et al.* (2017) 'Porcine Epidemic Diarrhea Virus Induces Autophagy to Benefit Its Replication', *Viruses*, 9(3), p. 53. doi: 10.3390/v9030053.

Huang, Y. W. *et al.* (2013) 'Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States', *MBio*, 4(5), pp. 1–13. doi: 10.1128/mBio.00737-13.

Jung, K. and Saif, L. J. (2015) 'Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis', *Veterinary Journal*. Elsevier Ltd, 204(2), pp. 134–143. doi: 10.1016/j.tvjl.2015.02.017.

Kim, Y. *et al.* (2017) 'Evaluation of biosecurity measures to prevent indirect transmission of porcine epidemic diarrhea virus', *BMC Veterinary Research*. BMC Veterinary Research, 13(1), p. 89. doi: 10.1186/s12917-017-1017-4.

Langel, S. N. *et al.* (2016) 'Lactogenic immunity and vaccines for porcine epidemic

diarrhea virus (PEDV): Historical and current concepts', *Virus Research*. Elsevier B.V., 226, pp. 93–107. doi: 10.1016/j.virusres.2016.05.016.

Lee, C. (2015) 'Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus', *Virology Journal*. Virology Journal, 12(1), pp. 1–16. doi: 10.1186/s12985-015-0421-2.

Li, W. *et al.* (2016) 'Cellular entry of the porcine epidemic diarrhea virus', *Virus Research*. Elsevier B.V., 226, pp. 117–127. doi: 10.1016/j.virusres.2016.05.031.

Matthew, A. (2013) *Casos agudos de diarrea epidémica porcina en una granja de cerdas y una de transición*. Available at: https://www.3tres3.com/caso-clinico-del-mundo/casos-agudos-de-diarrea-epidemica-porcina-en-cerdas-y-transicion_32690/.

Murphy Kenneth, Travers Paul, W. M. (2008) *Inmunobiología de Janeway*. septima. Mc Graw Hill.

Oh, J. *et al.* (2014) 'Immunogenicity and protective efficacy of recombinant S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein', *Archives of Virology*, 159(11), pp. 2977–2987. doi: 10.1007/s00705-014-2163-7.

Okda, F. A. *et al.* (2018) 'Passive immunity to porcine epidemic diarrhea virus following immunization of pregnant gilts with a recombinant orf virus vector expressing the spike protein', *Archives of Virology*. Springer Vienna, 163(9), pp. 2327–2335. doi: 10.1007/s00705-018-3855-1.

Pabello, A. G. (2010) *Inmunología Veterinaria*. México: Manual Moderno.

Porcicultores, A. colombiana de (2015) *Protocolo de Manejo para Granjas Positivas al PEDv (Fase Aguda de la enfermedad) (FEEDBACK)*. Edited by F. nacional de Porcicultura. Colombia. Available at: [https://asociados.porkcolombia.co/porcicultores/images/porcicultores/home/2.Protocolo de manejo granjas positivas \(FEEDBACK -Fase Aguda\) .pdf](https://asociados.porkcolombia.co/porcicultores/images/porcicultores/home/2.Protocolo%20de%20manejo%20granjas%20positivas%20(FEEDBACK%20-Fase%20Aguda).pdf).

- Schwartz, K. J. *et al.* (2013) 'Infective material, concepts and procedures for intentional sow herd exposure to Porcine Epidemic Diarrhea virus', *AASV PEDv web page*, p. 8. Available at:
<http://aasv.org/members/only/PED/Conceptsforherdexposure121713.pdf>.
- Song, D., Moon, H. and Kang, B. (2015) 'Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines.', *Clinical and experimental vaccine research*, 4(2), pp. 166–176. doi: 10.7774/cevr.2015.4.2.166.
- Song, D. and Park, B. (2012) 'Porcine epidemic diarrhoea virus: A comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines', *Virus Genes*, 44(2), pp. 167–175. doi: 10.1007/s11262-012-0713-1.
- Sosa, I. R. (2014) 'Simposio Internacional de Bioseguridad PRRS-PED México 2014', in *PERSPECTIVAS SANITARIAS DE LA DIARREA EPIDÉMICA PORCINA (DEP)*. México. Available at:
http://www.amvec.com/pdfs/IGOR_PERSEPECTIVAS_SANITARIAS.pdf.
- Srijangwad, A. *et al.* (2017) 'Immune response of gilts to single and double infection with porcine epidemic diarrhea virus', *Archives of Virology*. Springer Vienna, 162(7), pp. 2029–2034. doi: 10.1007/s00705-017-3307-3.
- Tizard, I. (2009) *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. 8 va. España: Elsevier.
- Wongthida, P. *et al.* (2017) 'The role of ORF3 accessory protein in replication of cell-adapted porcine epidemic diarrhea virus (PEDV)', *Archives of Virology*. Springer Vienna, 162(9), pp. 2553–2563. doi: 10.1007/s00705-017-3390-5.
- Xing, Y. *et al.* (2013) 'The papain-like protease of porcine epidemic diarrhea virus negatively regulates type I interferon pathway by acting as a viral deubiquitinase', *Journal of General Virology*, 94(PART7), pp. 1554–1567. doi: 10.1099/vir.0.051169-0.
- Yeh, J. and Ga, A. (2018) 'Systemic cytokine response in pigs infected orally with a *Lawsonia intracellularis* isolate of South Korean origin', pp. 13–19. doi:

10.1292/jvms.17-0036.

Zhang, Q. and Yoo, D. (2016) 'Immune evasion of porcine enteric coronaviruses and viral modulation of antiviral innate signaling', *Virus Research*. Elsevier B.V., 226, pp. 128–141. doi: 10.1016/j.virusres.2016.05.015.

Zimmerman J.J., Karriker Loke A., Ramirez Alejandro, Schwartz Kent, S. G. (2012) *Diseases of swine*. 10th edn. Iowa USA: Wiley Blackwell.

ANEXOS

Anexo 1. Hisópos Rectales

Se utilizaron hisopos estériles de aproximadamente 10 cm de longitud, para la toma de muestras, estos se introdujeron suavemente en el ano del animal y se realizó un ligero movimiento circular, después de la toma de muestra se colocaron en tubos de 1.5 ml, cortando la base del hisopo para que pudiera cerrar y se mantuvieron a -20°C. Posteriormente se les colocó 1 ml de solución amortiguada de fosfatos por tubo, se mezcló y se dejaron reposar toda la noche. Al día siguiente se retiró el hisopo del tubo, pegándolo a las paredes para poder dejar todo el líquido posible, y se centrifugó el tubo a 5,000 rpm por 10 minutos. Se tomó el sobrenadante de cada muestra para realizar la prueba de ELISA (FAO, 2017).

Anexo 2. Hisópos orales

La toma de muestra se realizó con hisopos estériles, los cuales se introdujeron en la boca de los lechones, frotándolo sobre el paladar y las encías, posteriormente se depositó en un tubo de 1.5 ml, se cortó la base del hisopo, y se mantuvo a -20°C. Posteriormente se agregó a cada tubo 1 ml de PBS con BSA al 1%, se mezcló y se dejó incubar a 37°C por una hora, posteriormente se sacó el hisopo y se centrifugó el tubo a 4,000 rpm por 10 minutos. Se utilizó el sobrenadante para la realización de la prueba de ELISA (FAO, 2017).

Anexo 3. ELISA

Para la prueba de ELISA para IgA e IgG se utilizó un virus completo inactivado aislado en México, el cual se encontraba purificado.

- Se sensibilizaron las placas a utilizar con este virus con una solución amortiguadora de carbonatos y se dejó incubar a 4°C 12 horas.
- Se desechó el líquido y se lavó la placa con PBS-Tween al 0.3% tres veces y se procedió a bloquear con PBS-BSA 1% y se incubó a 37°C por una hora.
- Se realizaron tres lavados con Tween al 0.3% y se colocaron las muestras. Por cada placa se utilizó un pozo como blanco y se colocaron dos controles positivos y cinco controles negativos, todas las muestras incluyendo los controles y el blanco se realizaron por duplicado. Se dejaron incubar por una hora a 37°C y se lavó tres veces con Tween al 0.03%. Posteriormente se procedió a colocar el conjugado, el cual fue un anticuerpo anti-IgA y anti-IgG, según el caso.
- Se procedió a lavar tres veces y se agregó TMB después de 10 minutos, se procedió a detener la reacción con ácido sulfúrico
- Se obtuvieron las densidades ópticas y se realizó el punto de corte por placa a partir del promedio de los controles negativos, con dos desviaciones estándar.

Anexo 4. Extracción de ARN

Se utilizó el kit comercial QUIAmp Viral RNA de QUIAGEN®

- Colocar en un tubo 560 µl de Buffer AVL + 5.6 µl de Carrier RNA
- Agregar 140 µl de muestra
- Mezclar por 15 segundos
- Incubar a 15-25°C durante 10 minutos
- Agregar 560 µl de etanol al 100%
- Mezclar por 15 segundos
- Transferir 660 µl a una columna
- Centrifugar a 8000 rpm durante un minuto

- Descartar líquido y eliminar tubo colector
- Pasar a otro tubo colector y colocar el resto de la muestra
- Centrifugar a 8000 rpm durante un minuto
- Descartar líquido y eliminar tubo colector
- Agregar 500 µl de Buffer AW1
- Centrifugar a 8000 rpm durante un minuto
- Descartar líquido y eliminar tubo colector
- Pasar a otro tubo colector
- Agregar 500 µl de Buffer AW2
- Centrifugar a 14000 rpm durante 3 minutos
- Colocar en otro tubo de colección
- Centrifugar a 13000 rpm por un minuto (secar)
- Pasar a microtubos de 2 ml y agregar 60 µl de Buffer AVE equilibrado a temperatura ambiente
- Incubar a temperatura ambiente por un minuto
- Centrifugar a 8000 rpm durante un minuto
- Se retira el tubo colector.

Anexo 5. RT-PCR

El kit utilizado fue POCKIT PEDV® de Gene Reach Biotechnology Corporation en un termociclador Rotor Gene

- Se reconstituyó el control positivo con 100 µl de buffer para el control positivo. Posteriormente se agregaron 50 µl de buffer B en el tubo con el pre-mix liofilizado. Posteriormente se agregó a cada muestra 15 µl de mix, incluyendo al control positivo, control negativo y al NTC
- La temperatura a la que se comenzó fue a 42°C por 30 minutos, posteriormente se realizaron 40 ciclos de 93°C por 15 segundos y 60°C por 60 segundos.

Anexo 6. Cuantificación de interleucinas

La cuantificación de interleucinas se hizo por el kit Milliplex® Map Kit (porcine cytokine)

- Se agregó 200µl de assay buffer a cada uno de los pozos y se agitó por 10 min a temperatura ambiente, posteriormente se decantó el contenido.
- Se agrego 25µl de control estándar a los pozos correspondientes
- Se agregaron 25µl de assay buffer en los pozos correspondientes a las muestras y al background
- En este caso las muestras utilizadas fueron sueros, por lo cual se utiliza el suero matrix, utilizando 25µl en los pozos background, los pozos de los estándares y los controles.
- Posteriormente se agregó 25µl de muestra por pozo
- Se agregaron 25µl de mixing bottle, el cual contiene las perlas magnéticas, este se tiene que mezclar durante la aplicación para evitar la sedimentación de las perlas.
- Se incubó “all night” en refrigeración en un agitador de placa, cubierto de la luz.
- Se retiró el contenido de la placa y se realizaron 3 lavados con buffer de lavado, utilizando 200µl por pozo
- Cada lavado se realizó agregando 200µl del buffer de lavado, y se agitó por 30 segundos, posteriormente la placa se colocó en una placa magnética y después de 1 minuto, se decantó el contenido.

- Se agregaron 50µl por pozo de anticuerpo de detección y se incubó 2 horas a temperatura ambiente en agitación.
- Se agregaron 50µl de streptavidin-phycoerythrin en cada pozo y se incubó 30 min en agitación a temperatura ambiente.
- Se realizaron 3 lavados con buffer de lavado.
- Se agregaron 100µl de sheath fluid (contenido en el equipo de lectura) por pozo y se procedió a la lectura.