



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTECNIA**

**Efecto del extracto dializable leucocitario en lechones infectados  
con el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino en  
una granja de crianza intensiva en Hidalgo, México.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:**

**HUGO CÉSAR SÁNCHEZ RIVERA**

**ASESORES:**

**Dra. Laura Cobos Marín**

**Dr. José Iván Sánchez Betancourt**

**M en C. Teresa de Jesús López Pérez**





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.

## **DEDICATORIAS**

A mi madre Guillermina Rivera M. por todo el cariño, amor, dedicación y esfuerzo.

A mis abuelos Ilafira y Darío por sus cuidados, cariño y enseñanzas que no encontrare en ningún otro lugar.

A mis padrinos Guísela Sierra O. y Carlos García L. por todo su cariño y apoyo.

A mi hermano Alexander Rivera, por tener siempre una determinación inquebrantable y acompañarme.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mí querida UNAM máxima casa de estudios por brindarme las herramientas necesarias para mi desarrollo personal e intelectual.

A el programa México Nación Multicultural y por supuesto a la Mtra. Evangelina Mendizábal por todo el apoyo que me brindaron.

A la FMVZ por todos los excelentes profesores con los que tuve la dicha de tomar clase y que son parte de mi formación.

A la Dra. Laura Cobos Marín, mi querida asesora, por sus inestimables atenciones, consejos, conocimiento y amistad.

Al Dr. José Iván Sánchez Betancourt, gracias por sus consejos, revisiones y amabilidad; un ejemplo a seguir.

A Giovanni Amador por todo el apoyo brindado.

A la M.C. Teresa López por enseñarme el arte de cultivar células, hacer alineamientos y mucho más.

A los miembros de mí jurado por su tiempo y observaciones.

A Julio Manuel M. por sus valiosos y acertados comentarios, consejos y pláticas interesantes que son la base de este trabajo.

A Eduardo Aguilar y Luz Selene Gonzales por todo su apoyo, son parte fundamental y les estoy muy agradecido.

A Pablo Hernández P. por mostrarme el camino de la estadística y asesorarme en el análisis e interpretación de los datos obtenidos.

A Ana Delia R.C. por ser tan genial, brindarme su ayuda en momentos inesperados y ser tan Anita.

A Esther Carrillo mi querida amiga, guía y consejera de vida, gracias por ser tan sincera siempre.

A la Dra. Rosa Elena por hacer un ambiente tan familiar en el laboratorio, todo su apoyo y su comprensión.

A la Dra. Liliana por ser siempre tan amable y velar por nuestra seguridad.

Al Dr. Iturbe por esas pláticas vespertinas que te ponen a reflexionar.

A Erika Alonso, Ettean; y todos los que son o fueron parte del programa México Nación Multicultural.

A Rebeca y Brenda por guiarme en mi estadía en el departamento de cerdos.

A Salvador, Rodrigo, Manuel Saavedra y a todos aquellos de quienes he aprendido.

A. Aubague Cárdenas Cl. gracias por todo.

A las personas que me han acompañado y que ahora no están.

A mis amigos y compañeros del departamento de microbiología.

A todas las personas que laboran en el departamento.

A Don Mario, Armando y Rosy.

Este trabajo fue financiado por el proyecto “Factor de transferencia” (FTV/IB/14/001) de la Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioprocesos (UDIBI) del Instituto Politécnico Nacional (IPN).

## CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Porcicultura en México.....	2
1.2 Síndrome respiratorio y reproductivo porcino .....	2
1.2.1 Importancia económica-sanitaria .....	2
1.2.2 Historia .....	3
1.2.3 Agente etiológico .....	4
1.2.4 Patogenia .....	8
1.2.5 Respuesta de citocinas ante el PRRSV.....	10
1.2.6 Diagnóstico .....	11
1.3 Reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa en tiempo real (qRT-PCR).....	12
1.4 Extracto dializable de leucocitos (EDL).....	13
2. JUSTIFICACION .....	15
3. HIPÓTESIS .....	16
4. OBJETIVO.....	16
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
5. MATERIAL Y METODOS .....	17
5.1 Diseño experimental .....	18
5.2 Obtención del extracto dializable de leucocitos humano (EDLh).....	18
5.3 Tratamiento y toma de muestras .....	19
5.4 Iniciadores .....	20
5.5 Extracción y purificación del ARN .....	21
5.6 Reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa .....	22
5.7 Purificación del fragmento del gel de agarosa .....	24
5.8 Generación de los estándares de cuantificación.....	25
5.9 PCR Transcriptasa reversa cuantitativa (qRT-PCR).....	27
5.9.1 Condiciones de RT-PCR en tiempo real.....	27
5.9.2 Especificidad del ensayo .....	29
5.9.3 Sensibilidad del ensayo .....	31
5.9.4 Precisión del ensayo.....	31
5.10 Evaluación de citocinas mediante técnica de ELISA .....	31

5.10.1	Protocolo de ELISA para interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) .....	32
5.10.2	Protocolo de ELISA para Interleucina 10 (IL-10) .....	33
5.10.3	Protocolo de ELISA para Interleucina 4 (IL-4) .....	35
5.11	Evaluación del peso .....	36
5.12	Análisis estadístico .....	36
6.	RESULTADOS .....	37
6.1	Amplificación de la secuencia parcial del ORF7 del PRRSV vacunal.....	37
6.2	Generación de los estándares de cuantificación.....	37
6.3	Estandarización de la técnica de qRT-PCR.....	40
6.4	Determinación de la progresión de la viremia en los lechones .....	45
6.5	Determinación de citocinas .....	48
6.6	Ganancia de peso.....	50
6.7	Extracto dializable leucocitario.....	51
7.	DISCUSIÓN.....	52
8.	CONCLUSIONES.....	56
9.	PROSPECTIVA .....	56
	ANEXO 1.....	57
	ANEXO 2.....	58
	REFERENCIAS.....	59

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Organización del genoma del PRRSV.....	6
<b>Figura 2.</b> Estructura del PRRSV.....	7
<b>Figura 3.</b> Patogenia del PRRS .....	10
<b>Figura 4.</b> Esquema de inoculación y toma de muestras.....	19
<b>Figura 5.</b> Condiciones de ciclado para qRT-PCR del ORF 7 del PRRSV. ....	29
<b>Figura 6.</b> MCA. ....	30
<b>Figura 7.</b> Producto de la RT-PCR punto final del ORF7 del PRRSV.....	37
<b>Figura 8.</b> Plásmido GM-pTZ57-ORF7-PRRSV.....	38
<b>Figura 9.</b> Plásmido en gel de agarosa.....	39
<b>Figura 10.</b> Curvas de amplificación en qRT-PCR.....	40
<b>Figura 11.</b> Curva estándar de amplificación .....	41
<b>Figura 12.</b> Amplificación de la vacuna VR-2332 del PRRSV, muestras positivas y negativas en qRT-PCR. ....	42
<b>Figura 13.</b> Diluciones del estándar de cuantificación en gel de agarosa.....	43
<b>Figura 14.</b> Análisis de la Melt curve para qRT-PCR basado en Sybr Green. ....	44
<b>Figura 15.</b> Lechones positivos al inicio del estudio.....	45
<b>Figura 16.</b> Lechones positivos al final del estudio. ....	45
<b>Figura 17.</b> Prueba de Shapiro-Wilk de los cerdos positivos al PRRSV. ....	46
<b>Figura 18.</b> Número de copias promedio del PRRSV. ....	47
<b>Figura 19.</b> Prueba de Tukey-Kramer para los cerdos positivos al PRRSV.....	48
<b>Figura 20.</b> Curva estándar para IFN- $\gamma$ porcino. ....	49
<b>Figura 21.</b> Curva estándar para IL-4 porcino.....	49
<b>Figura 22.</b> Curva estándar para IL-10 porcino.....	49
<b>Figura 23.</b> Promedios de peso entre los grupos. ....	50
<b>Figura 24.</b> Prueba de Tukey-Kramer para el peso.....	51
<b>Figura 25.</b> Huella espectrofotométrica del EDLh .....	52

## Índice de cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Iniciadores para el ORF7 del PRRSV.....	21
<b>Cuadro 2.</b> Mezcla de reacción para RT-PCR.....	23
<b>Cuadro 3.</b> Condiciones de ciclado para RT-PCR.....	23
<b>Cuadro 4.</b> Mezcla de reacción para qRT-PCR.....	28
<b>Cuadro 5.</b> Calculo de número del plásmido.....	40



## ABREVIATURAS UTILIZADAS

°C	Grados Celsius
µl	Microlitro
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
DO	Densidad Óptica
EDL	Extracto Dializable de Leucocitos
EDLh	Extracto Dializable de Leucocitos Humano
EDLp	Extracto Dializable de Leucocitos Porcino
ELISA	Ensayo Inmuno Enzimático
FRW	Forward
FT	Factor de transferencia
IFN	Interferón
IL	Interleucina
IPTG	Isopropil-b-D-tiogalactosidasa
Kda	KiloDaltones
Kg	Kilogramos
LB	Luria Bertani
MAP's	Macrofagos alveolares porcinos
MCA	Análisis de la curva Melt
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mM	Micromolar
MP	Marcador de peso molecular
nM	Nanomolar
nps	Proteína no estructural
ORF	Marco de lectura Abierta
pb	Pares de base
PI	Pos infección
PRRSV	Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino
PRRSV-1	PRRSV genotipo 1
PRRSV-2	PRRSV genotipo 2
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa
qRT-PCR	RT-PCR Cuantitativa
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	PCR transcriptasa reversa
RVS	Reverse
SSF	Solución Salina Fisiológica

## RESUMEN

SÁNCHEZ RIVERA HUGO CÉSAR. Efecto del extracto dializable leucocitario en lechones infectados con el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino en una granja de crianza intensiva en Hidalgo, México. (Bajo la dirección de la Dra. Laura Cobos Marín, el Dr. José Iván Sánchez Betancourt y la M.C. Teresa López Pérez)

**Palabras clave:** PRRSV, Factor de transferencia, EDL, viremia, citocinas.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la administración del extracto dializable de leucocitos humanos (EDLh) sobre la cantidad del PRRSV (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus) presente en el suero colectado de lechones de 20, 34, y 49 días de edad durante la etapa de destete en una granja de crianza intensiva mediante la técnica de PCR transcriptasa reversa en tiempo real (qRT-PCR). De una granja positiva al PRRSV, se tomaron 52 lechones destetados los cuales se distribuyeron aleatoriamente en 2 grupos. Un grupo recibió 7 dosis de EDLh por vía intradérmica, mientras que al otro se le administró el mismo volumen de solución salina fisiológica (SSF). Se obtuvieron muestras de suero a los 20, 34 y 49 días de edad para determinar la presencia viral en suero mediante qRT-PCR, así mismo se midieron niveles de IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-4 mediante la técnica ELISA en los días 20 y 49 de edad. En el análisis comparativo entre los grupos, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la cantidad de virus ( $P < 0.05$ ) al día 49 de edad, sin embargo no se encontró diferencia en la concentración de citocinas o en ganancia de peso semanal ( $P > 0.05$ ). En este trabajo se encontró que la administración de EDLh a lechones en etapa de destete disminuye la cantidad del PRRSV a los 49 días de edad con respecto al grupo control tratado con SSF.

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1 Porcicultura en México**

La carne de cerdo es una de las fuentes de proteína de origen animal de mayor ingesta en el mundo, los principales países consumidores son Hong Kong, Union Europea, Taiwan y China, cuyos consumos per cápita en el año 2008 fueron de 65.2, 42.4, 41.8 y 36.1 Kg respectivamente (Oh S.-H & Whitley NC, 2011). En México la ingesta de carne de cerdo para ese mismo año fue de 1,741,996 toneladas de las cuales el 62.5% fueron producidas en el territorio nacional y el 37.5% provino de las importaciones. Además, el consumo nacional per cápita de carne de cerdo fue de 16.3 kg, solo después de la carne de ave y bovino. Los estados de Sonora y Jalisco concentran el 40% de la producción nacional, el primero con la finalidad de exportar y el segundo para cubrir la demanda nacional (SAGARPA, 2009). En el año 2014 se produjeron 4,384,686 cabezas de cerdo en México, lo que representó la producción de 309 233 toneladas de carne en canal con un valor de 11,276,485 pesos (INEGI, 2016).

## **1.2 Síndrome respiratorio y reproductivo porcino**

### **1.2.1 Importancia económica-sanitaria**

El síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) es, a nivel mundial, una de las enfermedades de mayor impacto económico para la industria porcina. En los Estados Unidos de América (EUA) se estima una pérdida anual de 560 millones de dólares (Neumann et al., 2005). En México no hay una cifra oficial de pérdidas económicas; sin embargo, algunos estudios estiman de 250 a 500 dólares por

hembra. Éstas se han atribuido principalmente a un aumento de la tasa de mortalidad perinatal, disminución en la ganancia de peso; y aumento en los costos por concepto de vacunación y medicación. Se han implementado actividades como la despoblación y la repoblación que han mostrado ser efectivos para eliminar al PRRSV de granjas infectadas, sin embargo vuelven a ser reinfectadas por otros virus del PRRS circulantes complicando su control (Lager et al., 2002).

### **1.2.2 Historia**

La enfermedad comúnmente llamada PRRS (por sus siglas en inglés «Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome») es causada por el virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV) que se caracteriza por causar falla reproductiva en cerdas gestantes; y alteraciones respiratorias en lechones y cerdos en crecimiento (Christianson et al., 1993; Goyal, 1993; Rossow et al., 1994). La enfermedad fue descrita y catalogada por primera vez en 1987 como una nueva enfermedad de cerdos en EUA a través del cumplimiento de los postulados de Koch (Terpstra et al., 1991) y subsecuentemente llegó a ser endémica en Norteamérica, Europa y Asia. Actualmente sólo Noruega, Finlandia, Suecia, Suiza, Nueva Zelanda y Australia se consideran libres de la enfermedad (Canon et al., 1998; OIE; 2008)

El PRRSV fue identificado prácticamente al mismo tiempo en Europa y EUA, sin embargo fue aislado por Wensvoort y col. en 1991 en los países bajos usando macrófagos alveolares porcinos (MAPs) y fue designado como virus Lelystad (LV), europeo o genotipo tipo 1 (PRRSV-1) (Wensvoort et al., 1991; Wensvoort et al., 1992). Por otro lado en EUA el PRRSV fue aislado y caracterizado en una línea continua celular ATCC-CL2621 designándolo como norteamericano o genotipo tipo

2 (PRRSV-2) al que pertenece la cepa de referencia VR-2332 (Collins et al., 1992). Se han identificado cuatro subtipos dentro del genotipo europeo (Stadejek et al., 2006).

Aunque el PRRS es similar clínicamente en Norteamérica y Europa, las respectivas cepas difieren en patogenicidad (Halbur et al., 1995), antigenicidad (Nelson et al., 1993) y en sus propiedades genéticas (Meng et al., 1994; Murtaugh et al., 1995). Esta heterogéncidad es uno de los principales obstáculos para la prevención y control de la enfermedad cuando se usan vacunas comerciales ya que no confieren protección cruzada entre ellas (Díaz et al., 2006).

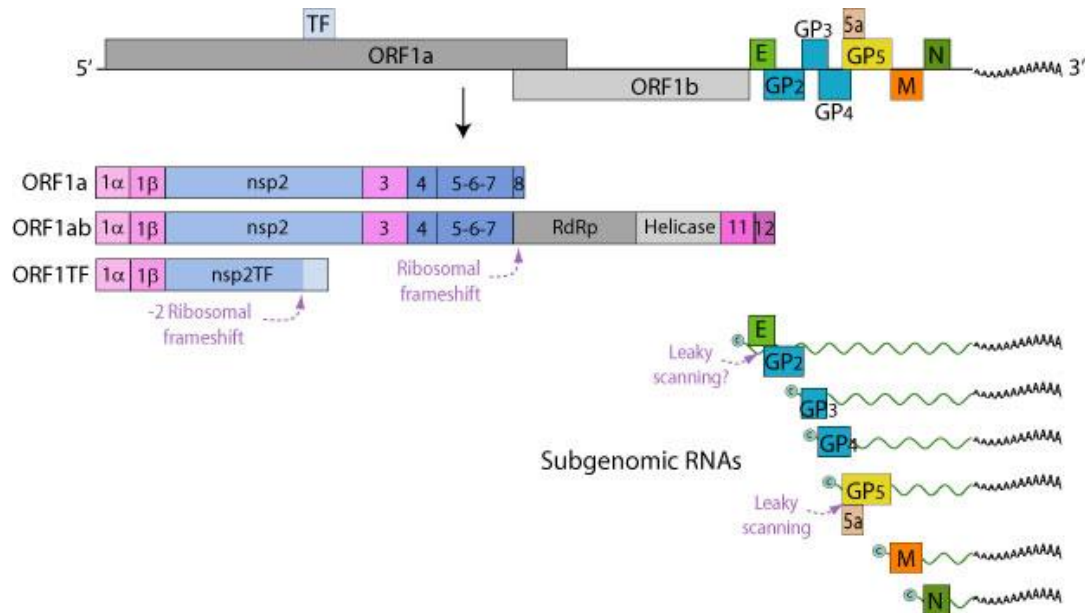
En el año 2006 una variante del PRRSV altamente patógena (HP-PRRV) afectó severamente la industria porcina en China, dando como resultado más de un millón de cerdos muertos (Zhou & Yang, 2010; Tornimbene et al., 2014).

### **1.2.3 Agente etiológico**

El PRRS es causado por un virus ARN de una sola cadena, sentido positivo, envuelto, de aproximadamente 60 nm de diámetro (Benfield et al., 1992), clasificado dentro del género de los *Arterivirus*, Familia *Arteriviridae*, Orden *Nidovirales*. A esta familia también pertenecen el virus de la arteritis equina, el virus de la elevación de lactato deshidrogenasa del ratón, el virus de la fiebre hemorrágica del simio y recientemente el virus de la zarigüeya tambaleante (Dunowska et al., 2012). Estos presentan varias similitudes incluyendo replicación en macrófagos, una prolongada viremia en la fase de anticuerpos circulantes e infección asintomática persistente (Conzelmann et al., 1993; Brinton & Snijde, 2008; Wills et al., 2003). Aunque en el

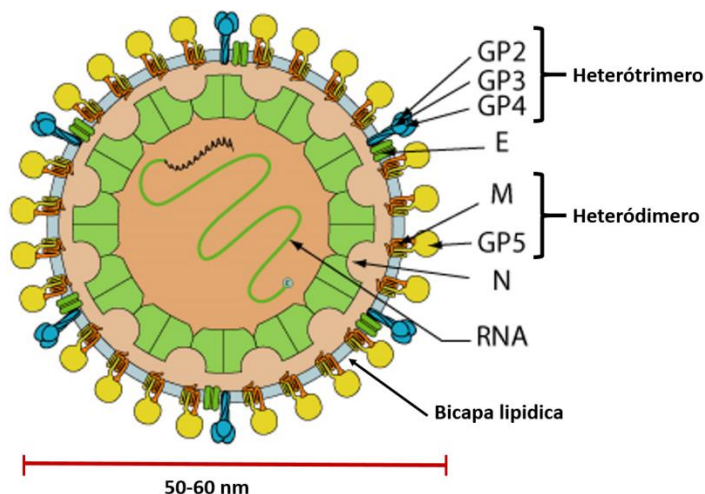
caso del PRRSV se ha sugerido la replicación del virus en bajas concentraciones y no un verdadero estado de persistencia (Allende et al, 2000).

El genoma del PRRSV es de aproximadamente 15.4 Kb de longitud con diez marcos de lectura abierta (ORFs) flanqueados por regiones no traducidas (UTRs) en los extremos 5' y 3' (Wootton, Yoo & Rogan, 2000). El ORF1a y ORF1b comprenden el 80% del genoma viral y codifican para proteínas virales no estructurales (nsp) involucradas con la replicación del virus. El resto de los ORFs: 2a, 2b, 3, 4, 5a, 5b, 6, y 7 codifican para las proteínas estructurales: GP2, E, GP3, GP4, GP5, 5a, M, y N (Mardassi et al., 1996; Meulenbergh et al., 1993; Meulenbergh et al., 1995). El PRRSV es considerado uno de los virus ARN más variables. Esta variación se incrementa entre otras cosas por el alto rango de mutación resultante de la falla de la polimerasa viral para corregir errores. Las dos regiones altamente conservadas del genoma del PRRSV son la región ORF1b, que codifica la polimerasa viral y la región ORF7 que codifica la nucleoproteína (N) (**Ver figura 1**).



**Figura 1. Organización del genoma del PRRSV.** ARN de cadena simple (SS), sentido positivo, flanqueado en los extremos 3' y 5' por UTRs. Los ORFs 1a y 1b codifican para proteínas no estructurales (nps) involucradas en la replicación, mientras los ORFs restantes codifican proteínas estructurales del virión. (de [viralzone.expasy.org](http://viralzone.expasy.org))

La nucleocapside constituye entre el 20% y el 40% del contenido proteínico del virión, ésta envuelve al ARN viral y a su vez ambos están envueltos por una bicapa lipídica. Las proteínas estructurales glicosiladas GP2, GP3, GP4, y GP5 están presentes sobre esta envoltura viral, junto con las proteínas no glicosiladas M y E. La glicoproteína más abundante en la envoltura del virus es la GP5 que forma un complejo heterodímero con la proteína M, mientras que las menos abundantes son la GP2, GP3, y GP4 que forman un complejo heterotrímero entre ellas (Han & Yoo, 2014). **(Ver figura 2)**



**Figura 2. Estructura del PRRSV.** Virus (RNA+, SS) envuelto de aproximadamente 60 nm de diámetro, estructura icosaédrica. El virion está compuesto de un núcleo isométrico de 20-30 nm rodeado por una capa lipídica. (Modificado de [viralzone.expasy.org](http://viralzone.expasy.org))

La GP5 es una proteína glicosilada transmembranal que se divide en varios dominios: un péptido señal, un ectodominio (con un número variable de sitios potenciales de glicosilación), una región transmembranal y un endodominio. El ectodominio tiene dos epítopos (A y B) que inducen la producción de anticuerpos, sin embargo, sólo los que van dirigidos al epítipo B son neutralizantes. Este epítipo está localizado en el ectodominio N-Terminal (aminoácidos 37-44) de GP5 tanto en las cepas Americanas como Europeas. El A tiene las características de un epítipo señuelo, es inmunodominante e hipervariable y está localizado en el ectodominio N-terminal (aminoácidos 27 y 31) de GP5. Éste puede interferir con la respuesta inmune al epítipo B, resultando en un fallo en la respuesta de anticuerpos neutralizantes (AN). El epítipo señuelo no es la única manera por la que el PRRSV puede evadir la respuesta inmune humoral. Los cerdos infectados con el PRRSV primero desarrollan anticuerpos no neutralizantes contra el epítipo A y



aproximadamente cuatro semanas después anticuerpos neutralizantes contra el epítipo B (Ostrowski et al. 2002; Plagemann 2004)

Las pruebas de diagnóstico serológico detectan principalmente anticuerpos contra la proteína N. Estos anticuerpos aparecen alrededor de la primera semana post infección (PI) y persisten por varios meses pero no se correlacionan con protección.

#### **1.2.4 Patogenia**

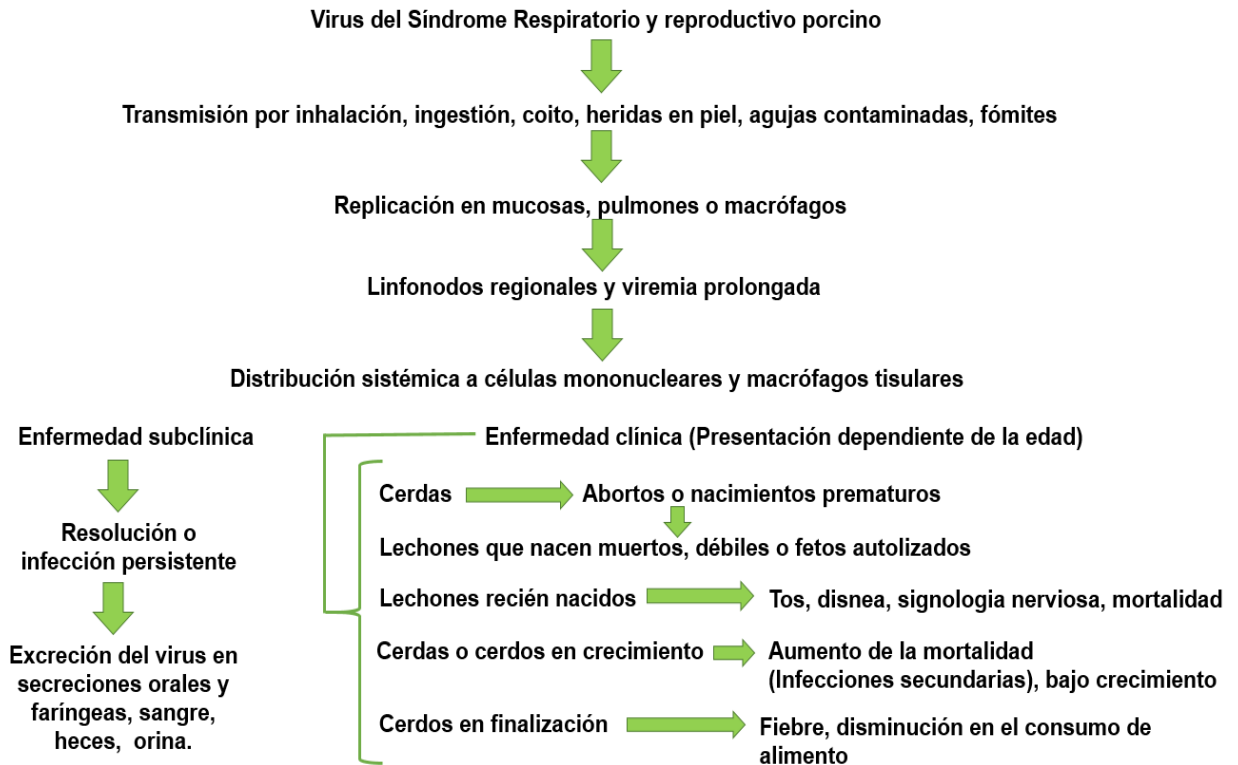
El PRRSV tiene una distribución multisistémica (Rossow et al., 1995), se ha demostrado la presencia del virus en macrófagos, pulmón, linfonodos, corazón, timo, vasos sanguíneos, bazo, hígado, glándulas adrenales, riñones, intestino y cerebro (Pol et al, 1991; Rossow et al., 1996). Sin embargo, se multiplica preferentemente en macrófagos alveolares porcinos (MAPs) inmaduros o recientemente activados (Bautista et al., 1993; Yoon; 1997). Los principales signos clínicos de la enfermedad incluyen cuadros respiratorios en cerdos jóvenes, así como edema periorcular, conjuntivitis y aumento de tamaño de los linfonodos (Rossow et al., 1994; Rossow et al., 1995).

El PRRSV causa enfermedad respiratoria en lechones y cerdos en crecimiento además de abortos en cerdas (Collins et al., 1992). Éstos abortos ocurren usualmente al tercer tercio de gestación dando como resultado el nacimiento cerdos débiles y partos de fetos muertos o momificados (Christianson et al., 1993; Terpstra et al.1991; Wensvoort et al., 1991).

Los cerdos recién nacidos infectados con el PRRSV manifiestan marcada disnea, edema periorbital y fiebre prolongada (Rossow et al., 1994; Collins et al., 1992;

Halbur et al., 1995). Cuando el PRRSV se ha establecido en una granja, el número de abortos declina y la infección se manifiesta en cerdos destetados y de crecimiento. Esta infección puede ser subclínica o con signos de enfermedad (Stevenson et al., 1993). El PRRSV daña el epitelio pseudoestratificado ciliado del tracto respiratorio, afectando el sistema de transporte mucociliar, lo que evita la expulsión de microorganismos en el sistema respiratorio. También infecta los MAPs y su replicación afecta directamente las funciones básicas de estas células, incluyendo fagocitosis, presentación del antígeno y producción de citocinas, por lo que comúnmente se presentan infecciones bacterianas secundarias. (Loving et al., 2008) A menudo hay un marcado incremento en mortalidad pre y post destete (Lager & Mengeling 1995).

Las rutas de transmisión del PRRSV incluyen contacto directo o semen de cerdos infectados (Christopher-Hennings et al., 1995), fómites contaminados (Otake et al., 2002) e insectos (Otake et al., 2002; Otake et al. 2003), también puede ser introducido a una granja a través de vacunación ya que esta es capaz de producir signología clínica, compra de animales infectados o vacunados, el uso de equipo contaminado, o visitantes en contacto con granjas infectadas con el PRRSV (Montensen et al., 2002). También pueden estar implicados el contacto directo cerdo con cerdo, ya que se ha descrito la eliminación del virus a través de la orina, saliva y semen (Wills et al., 1997). **(Ver figura 3)**



**Figura 3. Patogenia del PRRSV.** Patogenia propuesta para la infección del virus del síndrome respiratorio y reproductivo.

### 1.2.5 Respuesta de citocinas ante el PRRSV

Las citocinas son proteínas fundamentales en la inducción y regulación de la respuesta inmune y están fuertemente correlacionados con el curso clínico y resolución final de las enfermedades virales (Biron, 1998; Samuel 2001). Está demostrado que varios virus inducen producción de IL-10 para inhibir la respuesta inmune del hospedador y dificultar su proceso de eliminación (Fickensher et al., 2002). El PRRSV puede disminuir la producción citocinas en macrófagos infectados experimentalmente (López-Fuentes et al., 2000) y causar severos desórdenes en la respuesta inmune del hospedador. La infección de cerdos con diferentes cepas del PRRSV conllevan a cambios en la producción de citocinas incluyendo INF- $\alpha/\beta$ , IFN- $\gamma$  y IL-4, IL-10 (Wang et al., 2011), IL-6 y TNF- $\alpha$  (Liu et al., 2010; Peng et al., 2009).

Se ha documentado que durante la infección del PRRSV en células dendríticas plasmocitoides se genera menos cantidad de INF- $\alpha$  que con otros virus como pseudorrabia (PrV), virus de influenza porcina (SIV), y el virus de Gastroenteritis transmisible (TGEV) (Albina et al., 1998; Calzada et al., 2010), además de inhibir la producción de interferones tipo 1 (Calzada et al., 2011). El desbalance de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias puede modular la expresión de CD163, que es un componente de un complejo de receptores requeridos para la entrada del PRRSV, además de heparan sulfato y la sialoadhesina (Delputte et al., 2005; Van Gorp et al., 2008). La expresión de CD163 es regulada positivamente por IL-10 e IL-6, lo que promueve la entrada y replicación del PRRSV, pero regulada negativamente por TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e INF- $\gamma$  (Patton et al., 2009). Van Reeth y colaboradores mostraron por primera vez la ausencia de una respuesta inmune antiviral clásica, caracterizada por la producción de interferón y citocinas proinflamatorias hacia la infección del PRRSV (Van Reeth et al., 1999). Datos recientes muestran que la proteína no estructural 1 del PRRSV (nsp1), nsp 2, nsp11 entre otras, bloquean la activación de factores de transcripción necesarios para la inducción de interferon (Chen et al., 2010; Sun et al., 2010; Kim et al., 2010)

### **1.2.6 Diagnóstico del PRRSV**

El diagnóstico del PRRSV se puede realizar por aislamiento del virus (VI) o detectando los anticuerpos, antígenos o ácido nucleico en tejidos infectados o fluidos corporales (Kleiboeker et al., 2005; Mengeling et al., 1996; Benson et al., 2002). Se han desarrollado herramientas basadas en la biología molecular tales como la reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa (RT-PCR) para

la detección rápida y específica del PRRSV. Sin embargo, estos ensayos convencionales de RT-PCR tienen un alto riesgo de contaminación debido al análisis en geles de agarosa posterior a la PCR.

El RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) tiene varias ventajas sobre los métodos convencionales: bajo riesgo de contaminación, la medición cuantitativa de RNA, mayor rapidez con alta sensibilidad y el análisis de la amplificación en un sistema cerrado (Yang; 2013).

Para detectar la presencia de fragmentos generados por PCR se han usado colorantes intercalantes tales como el SYBR Green. La detección con SYBR Green es tan sensible como una PCR en tiempo real basada en sondas, sin la necesidad de una sonda específica. Los ensayos de PCR para la detección de virus RNA de una sola cadena son difíciles de desarrollar debido al alto rango de mutación, en la que se produce una alta variabilidad genética, por lo que resulta difícil el diseño de un sistema de detección iniciador-sonda universal.

### **1.3 Reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa en tiempo real (qRT-PCR)**

La qRT-PCR se basa en la emisión de fluorescencia de sondas o colorantes intercalantes en el DNA que son medidas en cada ciclo de amplificación. Ponchel et al. (2003) propuso un método alternativo a las sondas para el análisis de la RT-PCR tiempo real usando SYBR Green I (Ponchel et al., 2003). El SYBR Green I es un colorante que se une en la ranura menor en cualquier DNA de cadena doble sin tomar en cuenta la secuencia del DNA, evitando fallas potenciales al detectar el amplicón debido a la variación de la secuencia. Aunque el colorante intercalante

tiene la desventaja al ser un colorante inespecífico detectando dímeros o estructuras secundarias de los iniciadores y cuyo proceso de estandarización puede ser largo (Martínez et al., 2008; Tian et al., 2010). El análisis de la curva de asociación-disociación (MCA) ha sido reportado como una manera simple y directa para determinar reacciones del SYBR Green con artefactos y para garantizar la especificidad de la reacción (Ririe et al., 1997). Los métodos de RT-PCR en tiempo real basados en SYBR Green y el análisis de la curva de disociación se han usado exitosamente para la detección del PRRSV (Kleiboeker et al., 2005; Martinez et al., 2008; Tian et al., 2010).

#### **1.4 Extracto dializable de leucocitos (EDL)**

El extracto dializable de leucocitos (DLE), anteriormente conocido como factor de transferencia (FT) fue descrito por primera vez por Sherwood Lawrence en 1949. Es una mezcla heterogénea de péptidos de bajo peso molecular (menores a 10 KDa) (Rozzo & Kirkpatrick; 1992) con secuencias consenso conservadas entre diversas especies que son liberados después de la destrucción de leucocitos sanguíneos. Su característica principal es la de ser de bajo peso molecular (Kirkpatrick; 2000), por lo que no contienen sustancias que podrían causar efectos adversos, tales como antígenos de histocompatibilidad, antígenos de grupos sanguíneos, proteínas séricas y virus. En su carácter bioquímico constituye un polipéptido sensible al calor y a proteasas, pero puede ser preservado por años si es guardado en frío entre -20 °C y -70 °C (Homberg et al., 2015)

Aunque el efecto del EDLh aún no está esclarecido completamente, se ha observado que aumenta el periodo de vida de ratones BALB/C infectados experimentalmente con Herpesvirus 1 simple (Merchand-Reyes et al., 2014), al igual que infectados con *Mycobacterium tuberculosis* (Fabre et al., 2004). Su efecto está asociado con la inducción de citocinas como la interleucina 2 (IL-2), interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) (Bravo-Blasa et al., 2010; Hernández-Peralta et al., 2014) y TNF $\alpha$  (Fabre et al., 2004). Dentro de las citocinas antes señaladas el IFN- $\gamma$  es de particular importancia por sus funciones biológicas como: la actividad antiviral, actividad anti proliferativa, estimulación de la actividad citotóxica de la células T y modulación de la respuesta inmune.

Existen tres tipos de interferones. En humanos, los interferones tipo uno incluyen IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\varepsilon$ , IFN- $\kappa$ , e IFN- $\omega$ . Además el, IFN- $\delta$ , IFN- $\tau$ , e IFN- $\zeta$  han sido identificadas como interferones tipo I en cerdos, rumiantes, y ratón, respectivamente. Prácticamente todos los tipos de células son capaces de producir IFN- $\alpha/\beta$ . Sin embargo, las células denditricas plasmocíticas (pDC), son consideradas el mayor origen de la producción de IFN- $\alpha$  durante la infección viral (Liu, 2005). Los interferones tipo II contienen únicamente INF- $\gamma$ , y la producción es restringida a células T activadas, células asesinas naturales y macrófagos.

El EDL ha sido usado exitosamente solo y combinado con varios fármacos para el tratamiento de diversas enfermedades como infecciones producidas por virus (Cabezas-Quiroga et al., 1985), bacterias (Fabre et al., 2004), alergias (Sandoval et al., 2005), neoplasias (Franco-Molina et al., 2008; Pineda et al., 2005) y algunas

enfermedades autoinmunes en medicina humana y veterinaria (Sánchez-Gonzaleza et al., 2011).

En cerdos, el uso del EDL ha sido probado como tratamiento para la peste porcina clásica (animales tratados con EDL tuvieron un periodo de incubación más largo y tardaron más en morir) (Chávez, 1988). En infecciones con *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Pasterella multocida* (disminuyendo el tamaño de lesiones en pulmón, la incidencia de signos de neumonías y de mortalidad) (Torres, 1994). En la enfermedad de Aujeszky (confiriendo inmunidad específica y prolongando su vida ante el desafío) (Rodríguez, 1987), y en la prevención de rinitis atrófica (Arellano, 1988) y la colibacilosis neonatal en lechones con resultados favorables (aumento de ganancia de peso y reducción en la mortalidad) (Rojas, 1987). Recientemente se probó que dosis altas de EDLp en lechones aumenta significativamente la concentración de IFN- $\gamma$  en suero (Hernández-Peralta et al., 2014) y en lechones infectados experimentalmente con el PRRSV reduce significativamente los signos clínicos, la mortalidad y su presencia en órganos como pulmón y ganglios linfáticos (Huerta; 2013).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Debido a que el PRRS es una enfermedad que genera cuantiosas pérdidas económicas en las granjas de cerdos en todo el mundo, por el aumento de la tasa de mortalidad perinatal, la disminución de la tasa de crecimiento y el aumento de los costos por concepto de vacunación y medicación. Además de que las vacunas comerciales disponibles no confieren protección completa contra la enfermedad, es



importante hacer uso de nuevos productos que puedan ofrecer una mejoría en el control de esta enfermedad en las granjas porcinas.

### **3. HIPÓTESIS**

La administración intradérmica de siete dosis de EDLh a lechones de entre 20 y 47 días de edad disminuye la cantidad de virus circulante en suero, modula las citocinas IL-4, IL-10 e INF- $\gamma$  y aumenta la ganancia de peso al ser aplicado en una granja positiva al PRRSV.

### **4. OBJETIVO**

Estudiar el efecto de la administración del extracto dializable de leucocitos humano (EDLh) sobre la cantidad del PRRSV presente en el suero de lechones de 20, 34, y 49 días de edad durante la etapa de destete en una granja de crianza intensiva mediante la técnica de PCR cuantitativa.

#### **4.1 Objetivos específicos**

- Estandarizar la técnica de RT-PCR cuantitativa para emplearla en la Identificación de muestras positivas al PRRSV en suero.
- Comparar la progresión de la viremia en lechones positivos al PRRSV tratados con el EDLh y el grupo control durante la etapa de destete, utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (qRT-PCR).
- Identificar la correlación entre la presencia de IL-4, IL-10 e INF- $\gamma$  mediante la técnica de ELISA entre el grupo con EDLh y el grupo control sin EDLh.

- Comparar las diferencias en la ganancia de peso entre los lechones tratados con EDLh y con SSF durante la etapa de destete en una granja positiva al PRRSV.

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

Se realizó un estudio doble ciego en lechones tratados con extracto dializable leucocitario humano en una granja de ciclo completo positiva al PRRSV. Se amplificó y cuantificó la secuencia parcial del marco de lectura abierta siete (ORF7) del PRRSV mediante una prueba de RT-PCR tiempo-real basado en SYBR Green (qRT-PCR SYBR Green). Se determinaron las citocinas IL-10, IL-4 e IFN- $\gamma$  en suero mediante la técnica de ELISA tipo sándwich y se registró la ganancia de peso durante el periodo de estudio.

El experimento se realizó en una granja de producción porcina de ciclo completo ubicada en el estado de Hidalgo. La cuantificación viral y la determinación de citocinas se realizaron en el Laboratorio de Virología que pertenece al Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Este estudio fue aprobado por el Comité Institucional para Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (CICUAE) de la FMVZ de la UNAM

## 5.1 Diseño experimental

**Ubicación espacio-tiempo:** el estudio se llevó a cabo en una granja de producción porcina ubicada en el estado de Hidalgo, en un periodo de 7 semanas.

**Condiciones ambientales:** el área de destete tenía un sistema de corraletas elevadas protegidas contra el viento. Estas corraletas contaban con piso de rejilla o slats, comederos de metal a libre acceso y bebederos automáticos de embolo. También se contaba con aislantes y calentadores de gas que mantuvieron la temperatura de la caseta en 27°C. Los lechones recibieron alimento comercial iniciador etapa 2 marca Vimifos®, tres veces al día y agua *ad libitum* durante todo el periodo del estudio. Ningún lechón recibió ningún tipo de tratamiento adicional al estipulado en el experimento. Las camadas se dividieron en cuatro corraletas, en todas había animales tratados y sin tratar en contacto directo.

**Estatus sanitario de la granja:** la granja contaba con un inventario de 170 cerdas en producción. En estudios serológicos previos se encontraron anticuerpos contra a las siguientes enfermedades: síndrome respiratorio y reproductivo porcino e influenza porcina, parvovirus porcina, erisipelosis y pasterelosis. El calendario de vacunación de las cerdas en producción contemplaba inmunizar 15 días antes del parto con una vacuna triple (parvovirus porcino, leptospira y erisipela).

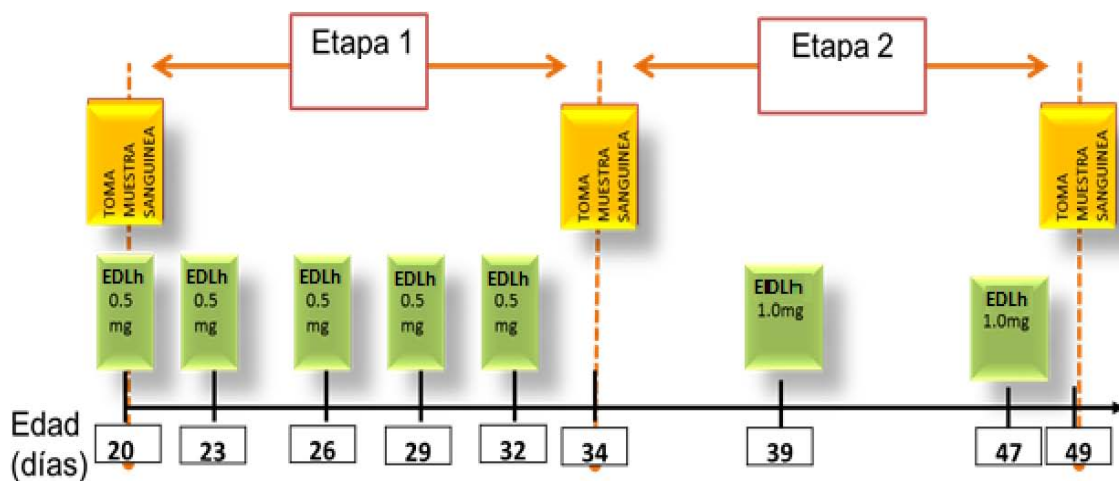
## 5.2 Obtención del extracto dializable de leucocitos humano (EDLh)

El extracto dializable leucocitario humano fue proporcionado por la Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioprocesos (UDIBI), de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, México D.F. El producto fue

proporcionado en un frasco en forma líquida junto con otro frasco de SSF. Estos se identificaron como A y B. Al término del análisis estadístico se supo a que correspondía cada uno.

### 5.3 Tratamiento y toma de muestras

Al inicio del estudio los 52 lechones de 20 días de edad fueron divididos aleatoriamente en dos grupos de 26 individuos. El grupo A recibió un total de siete dosis intradérmicas de extracto dializable leucocitario. Las primeras 5 dosis con un intervalo de tres días se administró 0.5 mg de EDLh (1 mg/ml) y en las últimas 2 dosis con un intervalo de siete días se administró 1.0 mg (1 mg/ml). En el grupo B se administró solución salina fisiológica (SSF) siguiendo el mismo esquema de inoculación. Se tomaron muestras de suero en tres tiempos: al inicio del estudio (20 días de edad), al finalizar las primeras 5 dosis (día 34 de edad) y al finalizar el estudio (49 días de edad) (**Ver figura 4**).



**Figura 4. Esquema de inoculación y toma de muestras.** Los cuadros verdes muestran el tiempo y la dosis de administración del EDLh en los cerdos. Los cuadros amarillos muestran el tiempo en el que se obtuvieron las muestras sanguíneas. El

estudio inicio con lechones de 20 días de edad recién destetados y finalizo a los 49 días de edad.

En cada muestreo se colectaron 52 muestras clínicas de sangre obtenidas de la vena yugular con tubos vacutainer® sin anticoagulante. Posteriormente se separó el suero y se fraccionó en tres, fueron identificados y guardados directamente a -70 °C hasta su procesamiento.

#### **5.4 Iniciadores**

Se utilizó un par de iniciadores diseñados con base a la secuencia del marco de lectura abierta 7 (ORF7) del gen de la nucleoproteína N del PRRSV (**Cuadro 1**). Estos fueron designados como sigue: forward (PRRS FW1) 5' GCC AAA TAA CAA CGG CAA GCA G 3' y Reverse 5' ATG CGT MGG CAA ACT AAA CTC C 3' (PRRS RV1). Los iniciadores fueron evaluados utilizando el software **MEGA 5**, usando los siguientes criterios: porcentaje de G/C entre 45 y 60 %, no más de 5°C de diferencia en temperatura de alineación para cada iniciador y no complementariedad. Una vez realizada la alineación de por lo menos 50 secuencias reportadas en la base de datos del Genbank. Los iniciadores fueron utilizados en el programa Basic Local Alignment Sequence tool (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) para evaluar la especificidad de alineación. Posteriormente fueron sintetizados comercialmente (UNIPARTS, S.A. Integrated DNA Technologies, Inc.).

Iniciadores utilizados		
RT-PCR punto final-Región del ORF7		
Identificación	Iniciadores	Nucleótidos
PRRS FW1	5' GCC AAA TAA CAA CGG CAA GCA G 3'	22
PRRS RV1	5' ATG CGT MGG CAA ACT AAA CTC C 3'	22
		Tamaño de amplicón: 325 pb

**Cuadro 1. Secuencias de los iniciadores.** Secuencia de los iniciadores utilizados para amplificar la secuencia parcial del ORF7 del PRRSV por RT-PCR punto final.

## 5.5 Extracción y purificación de ARN

El ARN viral fue extraído del suero usando QIAamp Viral RNA Mini Kit (**Qiagen**®, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para obtener el ARN viral, se utilizaron 200 µl del buffer AL (conteniendo 28 µg/ml de carrier ARN) y 25 µl de proteasa **QIAGEN**® que se añadieron a 200 µl de muestra y los componentes fueron completamente mezclados y calentados a 56 °C en un termoblock (**Eppendorf**®, thermomixer confort) durante 15 minutos. La muestra fue centrifugada brevemente para remover las gotas en la tapa. Se añadieron 250 µl de etanol absoluto grado molecular, se mezclaron y se incubaron por 5 min a temperatura ambiente (15-25°C). El líquido fue transferido a la columna QIAGEN® QIAamp MinElute. El procedimiento restante de extracción fue hecho de acuerdo a las instrucciones provistas en el kit: se centrifugo a 6000 x g (8000 rpm) durante un minuto, se desechó el tubo colector y se ensambló la columna en un colector nuevo. Se adicionó 500 µl de buffer AW1, después se centrifugo a 6000 x g (8000 rpm) durante

un minuto, se volvió ensamblar la columna en un tubo colector nuevo, se adicionó 500 µl de buffer AW2, se centrifugo a 6000 x g (8000 rpm) durante un minuto, se desechó el tubo colector y la columna se ensambló en otro colector y se agregó 500 µl de etanol absoluto grado molecular que se centrifugo a 6000 x g (8000 rpm) durante un minuto, se decantó el sobrenadante del tubo colector y la columna se centrifugo a 20 000 x g (14 000 rpm) durante tres minutos, posteriormente se incubó tres minutos en un termoblock (**Eppendorf**®, thermomixer confort) a 56 °C, se desechó el tubo colector y la columna con la membrana seca se ensambló en un tubo nuevo ependorf de 1.5 ml y se agregó 30 µl de agua grado PCR, se dejó incubar a temperatura ambiente durante un minuto y despues fue centrifugado a 20 000 x g (14 000 rpm) durante 1 minuto y fue conservado a -70 °C.

## **5.6 Transcriptasa reversa de la reacción en cadena de la polimerasa**

A partir de la vacuna de referencia VR-2332 del PRRSV se amplificó un fragmento de 325 pb de la secuencia del marco de lectura abierta 7 (ORF7) usando el par de iniciadores PRRS FW1 y PRRS RV1. En un volumen final de 21 µl se utilizaron las siguientes condiciones: 0.8 µl de enzima **QIAGEN**® OneStep RT-PCR, 4 µl de Buffer 5X (2.5 mM de ClMg), 0.8 µl de DNTps (100µM), 0.8 µl de PRRS FW1 (900 nM), 0.8 µl de PRRS RV1 (900 nM), 3 µl de muestra ARN y 10.8 µl de agua DEPC (**Cuadro 2**).

<b>Mezcla de reacción para RT-PCR</b>		
<b>Reactivo</b>	<b>Vol.</b>	<b>Concentración final</b>
Buffer 5X	4 µl	2.5 mM ClMg
DNTp's	0.8 µl	100µM
PRRSV FW1	0.8 µl	900 nM
PRRSV RV1	0.8 µl	900 nM
Enzima	0.8 µl	1-5 U
Agua DEPC	10.8 µl	
RNA	3 µl	
Vol. Final	21 µl	

**Cuadro 2.**Mezcla de reacción para RT-PCR

El procedimiento de ciclado involucró una RT de 30 min a 50°C, una desnaturalización inicial de 15 minutos a 95 °C, seguida por 40 ciclos: 30 segundos de desnaturalización a 94 °C, 59 segundos de alineamiento de los iniciadores a 58.5 °C, y 60 segundos de extensión a 72 °C y por último una extensión final de 20 min a 72°C (**Cuadro 3**)

<b>Condiciones para RT-PCR</b>		
<b>Etapas</b>	<b>Temp.</b>	<b>Tiempo</b>
RT	50°C	30 Min.
Desnt. Inicial	95°C	15 Min.
<b>40 ciclos</b>		
Desnat.	94°C	30 Seg.
Alineamiento	58.5 °C	59 Seg.
Extensión	72°C	60 Seg.
Ext.Final	72°C	20 Min

**Cuadro 3.**Condiciones de ciclado para RT-PCR



## 5.7 Purificación del fragmento del gel de agarosa

El producto de PCR fue colocado en un gel de agarosa al 2% con TBE 1X y puesto en una cámara de electroforesis a 100 volts por 40 minutos. Posteriormente se tiñó 10 minutos con bromuro de etidio y se observó sobre una lámpara de luz ultravioleta (UV).

El fragmento de 325 pb fue cortado y purificado del gel utilizando QIAquick Gel Extraction Kit (N° de catálogo 28704) Qiagen® siguiendo las instrucciones del fabricante: Se cortó el fragmento de gel que contenía al amplicon específico para depositarlo en un tubo ependorf de 1.5 ml y pesarlo. Se añadieron 3 volúmenes de Buffer QG por cada uno de gel (100 mg de gel~100 µl). Se incubó a 50 °C en agitación en un termoblock (Eppendorf®, thermomixer confort) hasta que el fragmento de gel de agarosa se disolvió completamente. Se le agregó un volumen de isopropanol a la muestra y se mezcló. El líquido fue transferido a una columna QIAquick Gel Extraction con tubo colector y fue centrifugado a 20 000 x g (14 000 rpm) durante 3 minutos. Se eliminó el líquido del tubo colector y la columna se colocó en un tubo colector nuevo, después de añadieron 500 µl de buffer QG y se centrifugó a 6000 x g (8000 rpm) durante un minuto. Se cambió el tubo colector por uno nuevo y se le agregó 750 µl de buffer PE, se dejó incubar a temperatura ambiente 5 minutos y después se centrifugó a 6000 x g (8000 rpm) durante un minuto. La columna se colocó en un tubo ependorf de 1.5 ml y se le agregó 50 µl de buffer EB (10 mM Tris·CL, pH 8.5), se dejó incubar 4 minutos a temperatura ambiente y después de centrifugó a 20 000 x g (14 000 rpm) durante 2 minutos.

## 5.8 Generación de los estándares de cuantificación

El producto de RT-PCR purificado fue clonado dentro de un vector pTZ57R/T (**Thermo Scientific**® InsTAclone PCR Cloning Kit) de acuerdo con los lineamientos del fabricante. La mezcla para ligar el producto de RT-PCR se realizó de la siguiente manera: 3  $\mu$ l de vector, 4  $\mu$ l de producto de RT-PCR, 6  $\mu$ l de buffer 5X (solución amortiguadora de ligación), 1  $\mu$ l de ligasa DNA T4 y 16  $\mu$ l agua grado PCR, los componentes fueron mezclados gentilmente. Se dejó incubar 60 minutos a temperatura ambiente (22°C) y posteriormente se incubó en baño de hielo. La construcción resultante se utilizó para transformar *Escherichia coli DH5 $\alpha$* , siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para cada transformación, un vial con 50  $\mu$ l de *Escherichia coli DH5 $\alpha$*  se le agregaron 5  $\mu$ l de reacción de ligado mezclando gentilmente. La reacción se incubó 30 minutos en hielo. Posteriormente se le dio un choque térmico de 60 segundos a una temperatura de 42°C. La reacción fue transferida inmediatamente a hielo; se añadieron 1500  $\mu$ l de medio LB a temperatura ambiente y se incubó 1 hr a 37 °C, en posición horizontal, con una agitación de 200 rpm. Por último se sembraron 100  $\mu$ l de células transformadas en agar LB atemperado a 37 °C y adicionado con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina, 2 mg de X-Gal y 1 mg de IPTG. Las cajas de Petri, con las células transformadas, se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Después del periodo de incubación, fueron refrigeradas a 4 °C. Se verificó que las clonas fueran apropiadas mediante la selección de color blanco/azul de las colonias.

El plásmido ADN fue recuperado de la *Escherichia coli DH5α* transformada usando el Zyppy Plasmid Miniprep (Zymo research) como es especificado por el fabricante:

Una colonia bacteriana fue cultivada en 10 ml de caldo LB con ampicilina a una concentración de 100 µg/ml, a 37 °C y agitación 150 rpm, durante 24 horas. El cultivo se centrifugo durante 5 min a 3000 x g (4000 rpm). El sobrenadante se decantó y el líquido restante se eliminó por aspiración. Una vez seca la pastilla bacteriana se agregó 600 µl de agua y se mezcló gentilmente. Se agregaron 100 µl de buffer de lisis 7X (Azul) y se mezcló por inversión 6 veces, se incubó 6 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se le añadió 350 µl de buffer de neutralización (Amarillo) y se mezcló. Después la mezcla se centrifugo a 12 000 rpm durante 3 minutos a 4 °C y 800 µl del sobrenadante fue transferido a una columna Zyppy-Spin™ INN con tubo colector. Se centrifugo a 6000 x g (8000 rpm) por 50 segundos, se eliminó el líquido del tubo colector y se le añadió 200 µl de Buffer de lavado a la columna. Se centrifugo a 6000 x g (8000 rpm) por 30 segundos, se cambió el tubo colector y se añadió 400 µl de buffer de lavado. Se centrifugo a 6000 x g (8000 rpm) por 60 segundos. Se transfirió la columna a un tubo ependorf de 1.5 ml y se dejó secar la membrana a temperatura ambiente 5 minutos. Por último se añadieron 30 µl de Buffer de elución directamente a la membrana y se centrifugo 1 min a 6000 x g (8000 rpm).

El plásmido ADN recuperado fue evaluado en un gel de agarosa al 1% con TBE 1X teñido con bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador de luz UV.

El plásmido ADN recuperado fue cuantificado por análisis espectrofotométrico y se realizó un stock con una concentración de 1 ng/ µl.

El número de copias de la concentración de ADN del plásmido fue calculado usando la siguiente ecuación:

$$\text{CopiasDNA} = \frac{(6.2 \times 10^{23} \text{ (copia/mol)}) \times \text{Cantidad DNA (g)}}{(\text{Longitud DNA (pb)} \times 660 \text{ (g/mol/pb)})}$$

Un stock maestro que contenía  $28 \times 10^7$  copias/µl fue usado para la preparación de diluciones décuples seriadas para generar las curvas estándar y para probar la sensibilidad y la reproducibilidad del ensayo.

## **5.9 PCR Transcriptasa reversa cuantitativa**

### **5.9.1 Condiciones de PCR en tiempo real:**

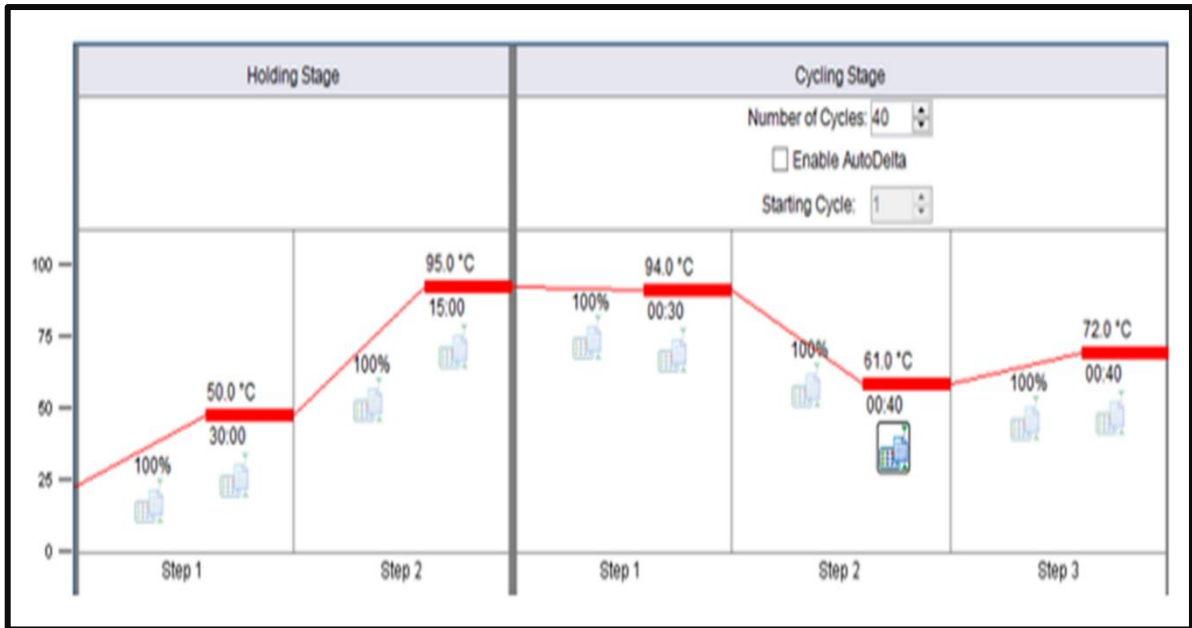
El ensayo de PCR en tiempo real basado en SYBR Green fue realizado en el sistema PCR tiempo-real Applied Biosystems StepOne. El ensayo fue hecho en un volumen total de 10 µl de mezcla de reacción preparándose en triplicado en MicroAmp® optical tubes (Applied Biosystems). Las condiciones de reacción fueron optimizadas previamente probando concentraciones variables del PRRSV vacunal, iniciadores y temperaturas de alineación. La mezcla de reacción estándar contenía: 2 µl de QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer 5X (2.5 mM de ClMg), 0.4 µl de DNTps (400 µM), 0.4 µl de PRRS FW1 (100 nM), 0.4 µl de PRRS RV1 (100 nM), 0.4 µl de Enzima QIAGEN OneStep RT-PCR Mix, 0.5 µl de SYBRGreen, 0.5 µl de ROX como agente normalizador, 1 µl de muestra ARN y 4.4 µl de agua grado PCR (**Cuadro 4**).

<b>Mezcla de reacción para qRT-PCR</b>		
<b>Reactivos</b>	<b>Vol. <math>\mu</math>l</b>	<b>Conc.final RX</b>
QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer 5X (MgCl <sub>2</sub> )	2	2.5 mM MgCl <sub>2</sub>
dNTPs (10 mM)	0.4	400 $\mu$ M
Primer 5'	0.4	100 nM
Primer 3'	0.4	100 nM
Enzima QIAGEN OneStep RT-PCR Mix	0.4	1-2 U
SYBRGreen	0.5	
ROX	0.5	2 $\mu$ M
ARN	1	
Agua CBP 10 $\mu$ l	4.4	

**Cuadro 4.** Mezcla de reacción para qRT-PCR

El procedimiento de ciclado involucró una RT de 50°C por 30 min, un activación inicial a 95 °C por 15 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineamiento de los iniciadores a 61 °C por 40 segundos, y extensión de 72 °C por 40 segundos, y la fluorescencia fue medida en cada ciclo.

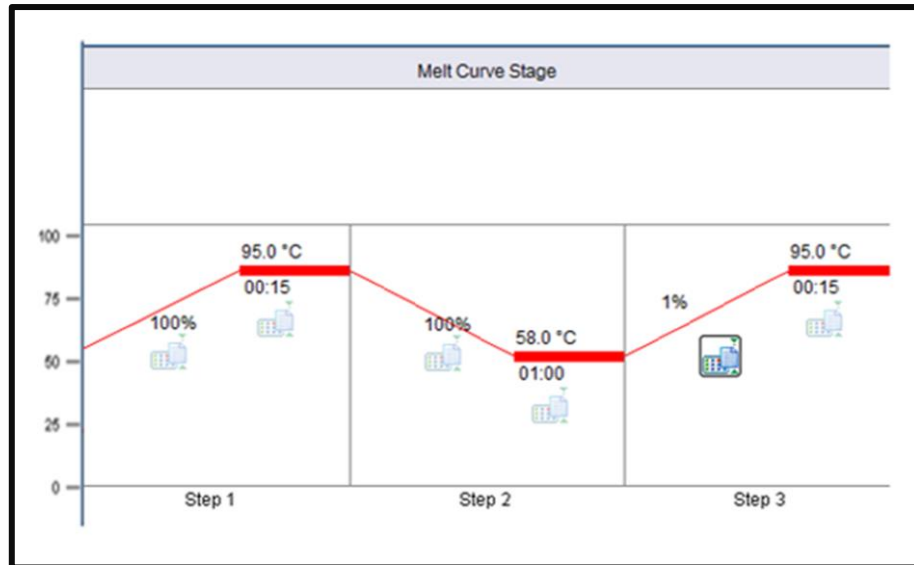
**(Ver figura 5).**



**Figura 5. Condiciones de ciclado para qRT-PCR del ORF 7 del PRRSV.**

### **5.9.2 Especificidad del ensayo**

Después de la amplificación, se hizo el análisis de la curva de asociación-disociación para verificar la especificidad de los productos amplificados por sus temperaturas melting específicos ( $T_m$ ). El análisis de la curva melting consistió de una etapa de desnaturalización a 95 °C por 15 segundos, disminución a 58°C durante 1 minuto, y después se incrementó gradual de la temperatura a 95 °C a un rango de 1% con lectura de la fluorescencia (**Ver figura 6**).



**Figura 6. MCA.** Condiciones para el análisis de la curva de disociación para determinar la especificidad del ensayo de PCR cuantitativa para el ORF7.

La colección de datos y análisis de los resultados fueron hechos usando el software de Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System versión 2.2.2 (Applied Biosystems). Cada señal reportera de fluorescencia fue medida contra la señal del colorante interno de referencia (ROX) que normaliza para la fluctuación de fluorescencia no relacionada con la PCR entre pozos. El límite umbral de fluorescencia del sistema Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR fue puesto en 0.02 como es recomendado por el fabricante.

Para determinar la especificidad analítica del ensayo se probaron otros agentes virales patógenos porcinos (circovirus, virus de influenza, y parvovirus) y no porcinos (virus de diarrea viral bovina, virus de rinotraqueitis infecciosa bovina y virus de moquillo canino). La especificidad analítica se estableció realizando el análisis de la curva de disociación y la electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR incluyendo controles negativos de agua grado PCR.

### **5.9.3 Sensibilidad del ensayo**

Para estandarizar los métodos se usó la cepa vacunal INGELVAC® PRRS VR-2332. El ARN viral fue cuantificado en NanoDrop obteniendo un valor de 130 ng/μl. La sensibilidad del ensayo se determinó corriendo diluciones decuples seriadas del ARN viral y los plásmidos estándar en duplicados. El límite de detección más bajo fue definido como la mayor dilución en la que hubo amplificación.

### **5.9.4 Precisión del ensayo**

Para evaluar la reproducibilidad del ensayo se probó repetidamente el DNA estándar que va desde  $28 \times 10^7$  a  $28 \times 10^1$  copias/reacción. Se analizaron tres diluciones seriadas en una sola corrida para la evaluación de las variaciones intra-ensayo. Las variaciones inter-ensayo fueron medidas probando cada dilución en tres corridas separadas. El promedio, desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (CV) fueron calculados por separado para cada dilución estándar de DNA basado sobre sus valores de Ct (threshold cycle-ciclo de umbral de detección) usando el software Microsoft Excel.

### **5.10 Evaluación de citocinas mediante técnica de ELISA**

Se utilizaron tres pruebas de ELISA comercial *invitrogen* (KSC4021, KSC0101 y KSC0041) para determinar la concentración de interferón gamma (IFN-γ), interleucina 10 (IL-10) e interleucina 4 (IL-4) respectivamente. Para estos ensayos se probaron los sueros del primer y último muestreo, de aquellos cerdos que resultaron con viremia positiva. Cada ensayo fue hecho por duplicado de acuerdo a las especificaciones del fabricante:



### 5.10.1 Protocolo de ELISA para interferón gamma (IFN- $\gamma$ )

1. Determinar el número de tiras que necesita para el ensayo
2. Añadir 100  $\mu$ l de Buffer de dilución de estándares a los pozos estándar cero.  
Los pozos reservados para el blanco cromógeno deberán estar vacíos.
3. Para la curva estándar, añadir 100  $\mu$ l de estándares al pozo apropiado. Para las muestras (controles, suero, plasma, solución bufferada y medio de cultivo celular), añadir 50  $\mu$ l de buffer de para dilución de estándares a cada pozo seguido de 50  $\mu$ l de muestra.
4. Añadir 50  $\mu$ l de solución de conjugado biotinado **SW IFN- $\gamma$**  a cada pozo excepto en el blanco cromógeno. Tapar y homogeneizar gentilmente.
5. Cubrir la placa e incubar 2 horas a 37 °C.
6. Brevemente aspirar o decantar la solución de los pozos y descartar el líquido (lavar cuatro veces).
7. Añadir **100**  $\mu$ l de solución de trabajo Streptavidina-HRP a cada pozo excepto en blanco cromógeno
8. Cubrir la placa e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
9. Brevemente aspirar o decantar la solución de los pozos y descartar el líquido (lavar cuatro veces).
10. Añadir 100  $\mu$ l de estabilizador de cromógeno a cada pozo. El líquido en los pozos se volverá azul.
11. Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente y en la obscuridad. Nota: No cubrir la placa con papel aluminio o metalizado. (Si se utiliza un lector de 2 DO detener el ensayo después de los 20 a 25 minutos).

12. Añadir 100 µl de solución de paro a cada pozo. Mezclar gentilmente. La solución en los pozos deberá cambiar de azul a amarillo.
13. Leer la absorbancia de cada pozo a 450 nm incluyendo la placa contra el blanco cromógeno compuesto de 100 µl estabilizador de cromógeno y 100 µl de solución de paro. Leer la placa dentro de las 2 horas después de haber añadido la solución de paro.
14. Usar el software Assay zap versión 3.0 para generar la curva estándar.
15. Leer las concentraciones de las muestras desconocidas y controles de la curva estándar. Multiplicar los valores obtenidos por 2 para la dilución ½.
16. Determinar la cantidad basándose en la curva estándar.

### **5.10.2 Protocolo de ELISA para Interleucina 10 (IL-10)**

1. Determinar el número de tiras que necesita para el ensayo
2. Añadir 100 µl de Buffer de dilución de estándares a los pozos estándar cero. Los pozos reservados para el blanco cromógeno deberán estar vacíos.
3. Para la curva estándar, añadir 100 µl de estándares al pozo apropiado. Para las muestras de suero añadir 50 µl de buffer de para dilución de estándares a cada pozo seguido de 50 µl de muestra. Tapar y mezclar gentilmente.
4. Cubrir la placa e incubar por 1 hora a temperatura ambiente.
5. Brevemente aspirar o decantar la solución de los pozos y descartar el líquido (lavar cuatro veces).
6. Añadir 100 µl de solución de conjugado biotinado **SW IL-10** a cada pozo excepto en el blanco cromógeno. Tapar y homogenizar gentilmente.
7. Cubrir la placa e incubar por 1 hora a temperatura ambiente.

8. Brevemente aspirar o decantar la solución de los pozos y descartar el líquido (lavar cuatro veces).
9. Añadir **100** µl de solución de trabajo Streptavidina-HRP a cada pozo excepto en blanco cromógeno
10. Cubrir la placa e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Brevemente aspirar o decantar la solución de los pozos y descartar el líquido (lavar cuatro veces).
12. Añadir 100 µl de estabilizador de cromógeno a cada pozo. El líquido en los pozos se volverá azul.
13. Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente y en la obscuridad. Nota: No cubrir la placa con papel aluminio o metalizado (Si se utiliza un lector de 2 DO detener el ensayo después de los 20 a 25 minutos).
14. Añadir 100 µl de solución de paro a cada pozo. Mezclar gentilmente. La solución en los pozos deberá cambiar de azul a amarillo.
15. Leer la absorbancia de cada pozo a 450 nm incluyendo la placa contra el blanco cromógeno compuesto de 100 µl estabilizador de cromógeno y 100 µl de solución de paro. Leer la placa dentro de las 2 horas después de haber añadido la solución de paro.
16. Usar el software Assay zap versión 3.0 para generar la curva estándar.
17. Leer las concentraciones de las muestras desconocidas y controles de la curva estándar. Multiplicar los valores obtenidos por 2 para la dilución ½.
18. Determinar la cantidad basándose en la curva estándar.

### 5.10.3 Protocolo de ELISA para Interleucina 4 (IL-4)

1. Determinar el número de tiras que necesita para el ensayo
2. Añadir 50 µl de Buffer de dilución de estándares a los pozos estándar cero.  
Los pozos reservados para el blanco cromógeno deberán estar vacíos.
3. Añadir 50 µl de estándares, muestras o controles a los pozos apropiados.
4. Añadir 50 µl de solución de conjugado biotinado **anti-IL-4** a cada pozo, excepto en el blanco cromógeno. Tapar y homogeneizar en gentilmente.
5. Cubrir la placa e incubar por 2 horas a temperatura ambiente.
6. Brevemente aspirar o decantar la solución de los pozos y descartar el líquido (lavar cuatro veces).
7. Añadir 100 µl de solución de trabajo Streptavidina-HRP a cada pozo excepto en blanco cromógeno
8. Cubrir la placa e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
9. Brevemente aspirar o decantar la solución de los pozos y descartar el líquido (lavar cuatro veces).
10. Añadir 100 µl de estabilizador de cromógeno a cada pozo. El líquido en los pozos se volverá azul.
11. Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Nota: No cubrir la placa con papel aluminio o metalizado. (Si se utiliza un lector de 2 DO detener el ensayo después de los 20 a 25 minutos).
12. Añadir 100 µl de solución de paro a cada pozo. Mezclar gentilmente. La solución en los pozos deberá cambiar de azul a amarillo.

13. Leer la absorbancia de cada pozo a 450 nm incluyendo la placa contra el blanco cromógeno compuesto de 100 µl estabilizador de cromógeno y 100 µl de solución de paro. Leer la placa dentro de las 2 horas después de haber añadido la solución de paro.
14. Usar el software Assay zap versión 3.0 para generar la curva estándar.
15. Leer las concentraciones de las muestras desconocidas y controles de la curva estándar.
16. Determinar la cantidad basándose en la curva estándar.

### **5.11 Evaluación del peso**

Los lechones se pesaron a individualmente cada semana durante el periodo de estudio. Las seis mediciones obtenidas se compararon entre los grupos tratados con el EDLh y los que recibieron SSF.

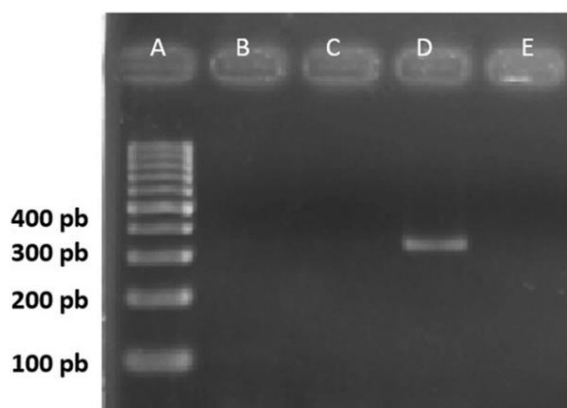
### **5.12 Análisis estadístico**

Se utilizó el Software de JMP de SASP. Los datos de viremia y ganancia de peso fueron sometidos a la prueba de Shapiro-wilk para evaluar la distribución normal y la prueba de Levene para homogeneidad de varianzas. La diferencia entre los dos grupos de estudio fue analizado por medio de la prueba estadística ANDEVA, <0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Amplificación de la secuencia parcial del ORF7 del PRRSV Vacunal VR-2332

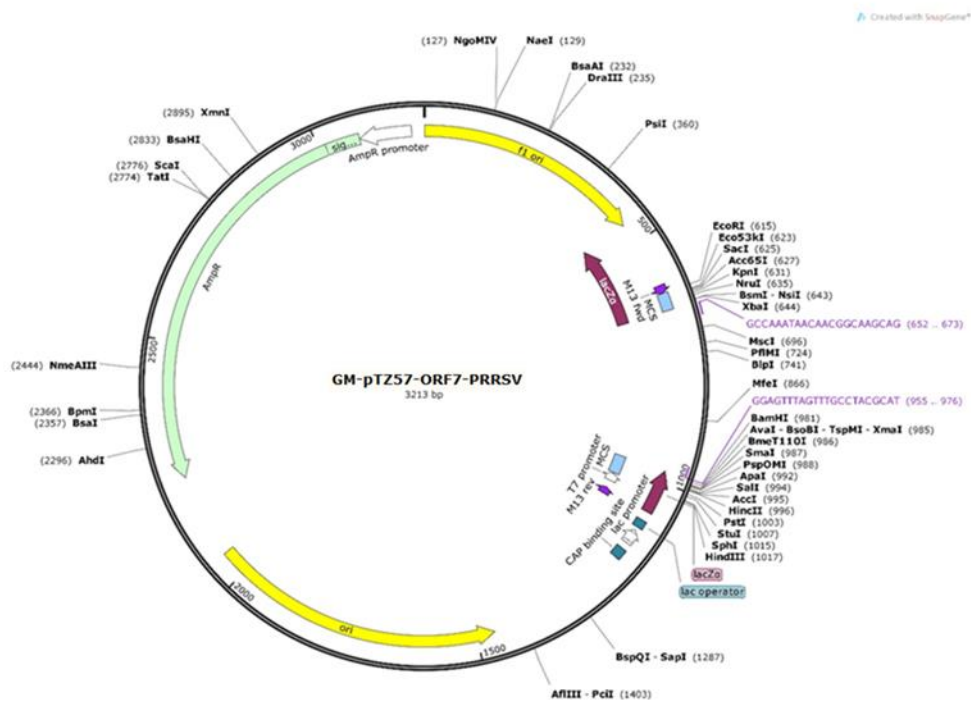
Se realizó PCR transcriptasa reversa en punto final a partir de ARN proveniente de la vacuna de virus activo cepa de referencia VR-2332. Se obtuvo una banda única de 325 pares de bases con los iniciadores FW1 y RV1 previamente descritos, verificando así las alineaciones determinadas por el BLAST (**Ver figura 7**).



**Figura 7. Producto de la RT-PCR punto final del ORF7 del PRRSV.** Gel de agarosa 2%, TBE 1X. Carriles: A. Marcador de peso molecular 100 pb, B. Control negativo, C. Vacío, D. Amplicón de 325 pb generado a partir de la cepa vacunal VR-2332.

### 6.2 Generación de los estándares de cuantificación

**Construcción del plásmido y determinación del número de copias:** el fragmento de 325 pb de DNA específico para el ORF7 del PRRSV fue amplificado e insertado dentro de un vector pTZ57 R/T (**Ver figura 8**).

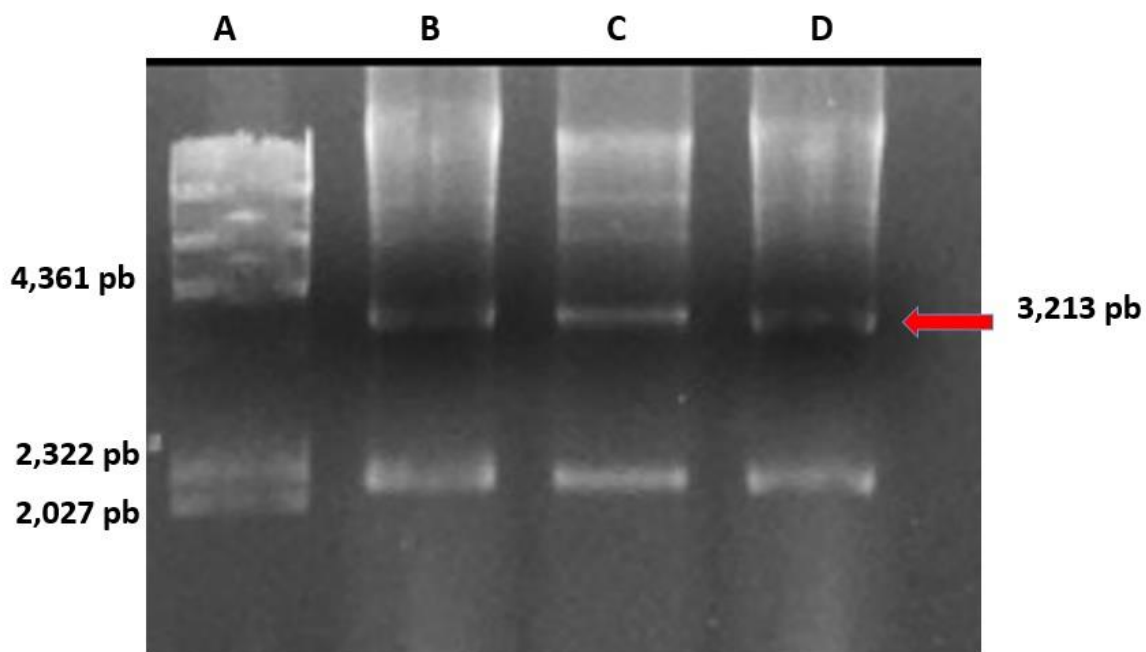


**Figura 8. Plásmido GM-pTZ57-ORF7-PRRSV.** Representación del plásmido de 3,213 pb generado a partir del vector pTZ57 t/a

El vector ligado fue introducido en células competentes DH5α por el método de choque térmico. El cultivo transformado fue replicado en placas de petri con medio Luria Bertani (LB) y se seleccionaron las colonias blancas. Las colonias seleccionadas fueron colectadas y usadas en PCR punto final para corroborar la presencia del plásmido con la secuencia específica para el ORF7 del PRRSV

Una vez seleccionada la colonia fue replicada en 10 ml de medio LB/ampicilina. El medio con bacterias fue fraccionado en tubos ependorf de 1.5 ml y preservados con 10% de glicerol a -80 °C.

El plásmido ADN recuperado fue evaluado en un gel de agarosa al 1% con TBE 1X teñido con bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador de luz UV. **(Ver figura 9)**



**Figura 9. Plásmido en gel de agarosa.** Fotografía de gel de agarosa al 1% con TBE 1X. A. Marcador de peso molecular Lambda DNA-HindIII, B, C y D. Plásmido esperado de 3213 pb generado a partir de la incorporación del fragmento de 325 pb del ORF7 del PRRSV al vector pTZ57 R/T.

El peso molecular del plásmido fue calculado multiplicando su longitud (pb) por el promedio del peso de un par de base doble cadena (660 g/mol/pb). El número de copias fue calculado de la concentración del plásmido (g), la constante de Avogadro ( $6.02 \times 10^{23}$  copia/mol) y el peso molecular (g/mol). El plásmido clonado fue cuantificado y calculado como los números de copia del gen parcial del ORF7 del PRRSV. La curva estándar de la PCR cuantitativa del gen ORF7 del PRRSV fue generada por diluciones decuples seriadas del plásmido. **(Cuadro 5)**



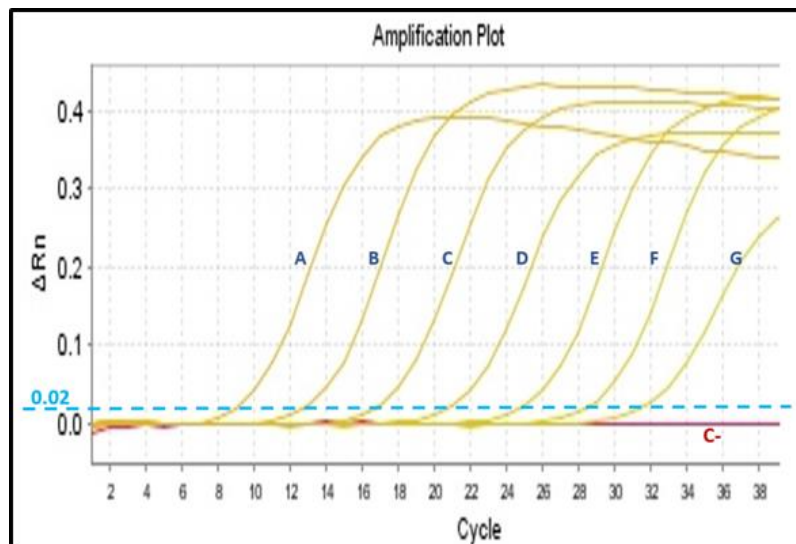
Cálculo del número de copias del plásmido					
Gen	Plásmido	Longitud del plásmido (pb)	Concentración de DNA (ng/μl)	Peso molecular	Número de copias
ORF7	GM-pTZ57-ORF7-PRRSV	3,211	1	2,119,260	284,061,417.70

**Cuadro 5.** Cálculo de número de copias

### 6.3 Estandarización de la técnica de qRT-PCR

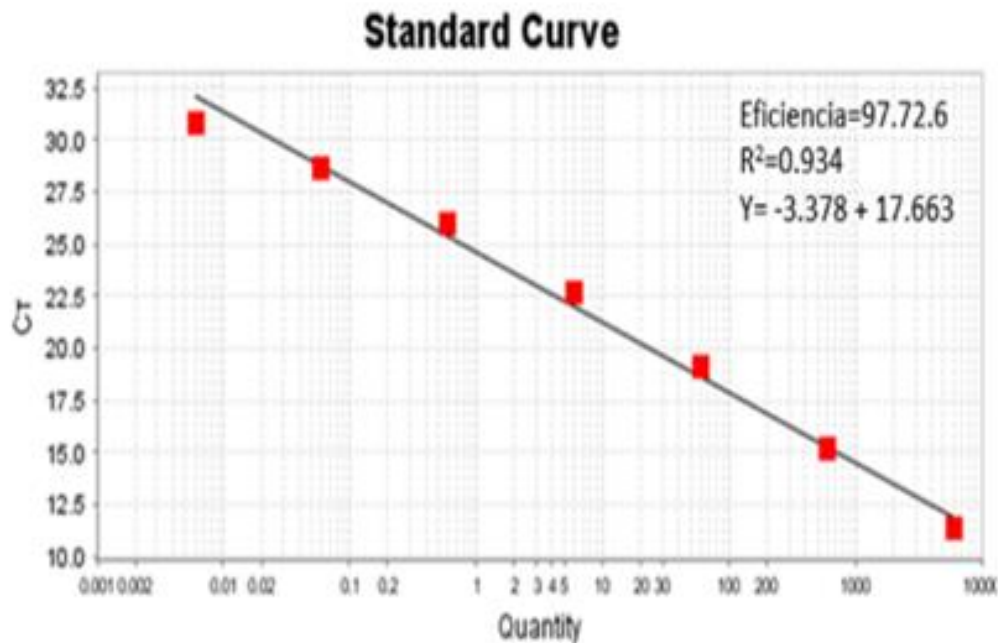
#### Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

El ensayo de PCR tiempo real fue estandarizado en cuanto a la concentración de iniciadores, mezcla de reacción, temperatura de desnaturalización, alineamiento, extensión y tiempo de reacción. Se probaron diluciones decuples seriadas de plásmido (iniciando en 1 ng/ μl) y ARN del PRRSV para determinar la sensibilidad del ensayo y su eficiencia (**Ver figura 10**).



**Figura 10. Curvas de amplificación en qPCR.** En la imagen se muestran las curvas de amplificación de las diluciones decuples seriadas del plásmido (líneas amarillas A-G), en el punto A se muestra la amplificación de 1 ng/ μl. La línea discontinua color azul muestra el punto de corte y la línea roja muestra el patrón obtenido del control negativo.

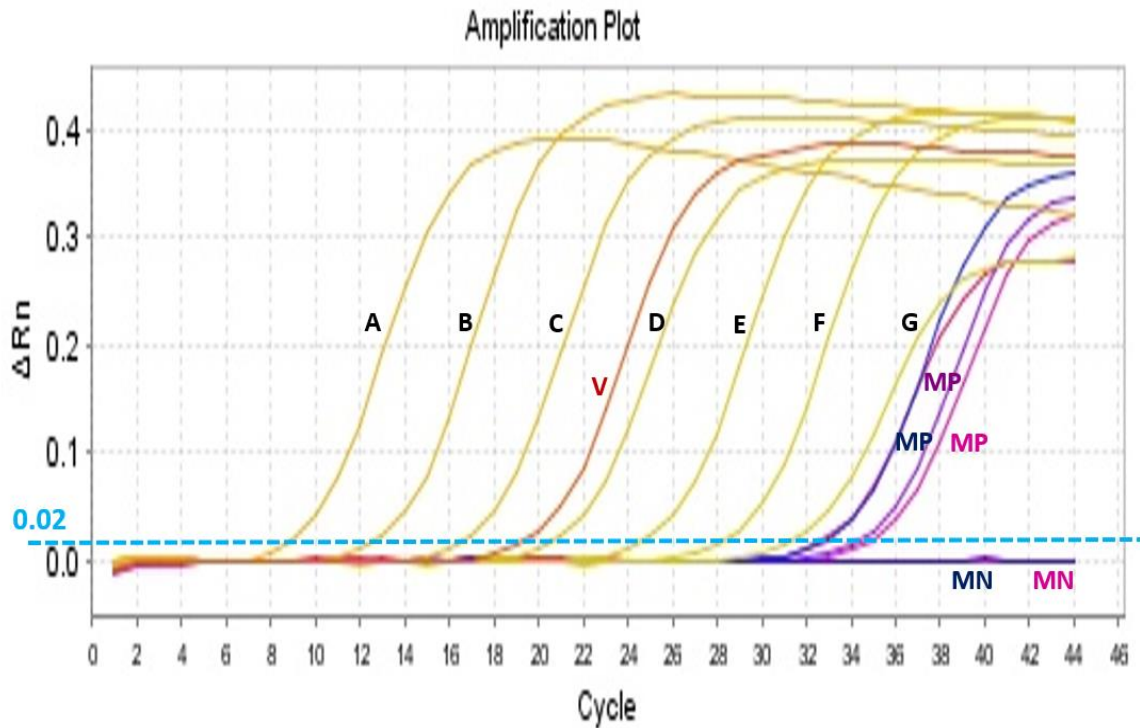
La curva estándar fue evaluada por el software del equipo Onestep plus® calculando la regresión lineal para los Ct de los estándares contra la cantidad inicial de cada estándar. (Ver figura 11)



**Figura 11. Curva estándar de amplificación.** Los puntos de la curva estándar de amplificación muestran la equidistancia de cada valor de punto de referencia, además se muestra la eficiencia de la reacción (97.72%), el coeficiente de correlación ( $R^2=0.934$ ) y la pendiente de la curva ( $Y=-3.378$ ).

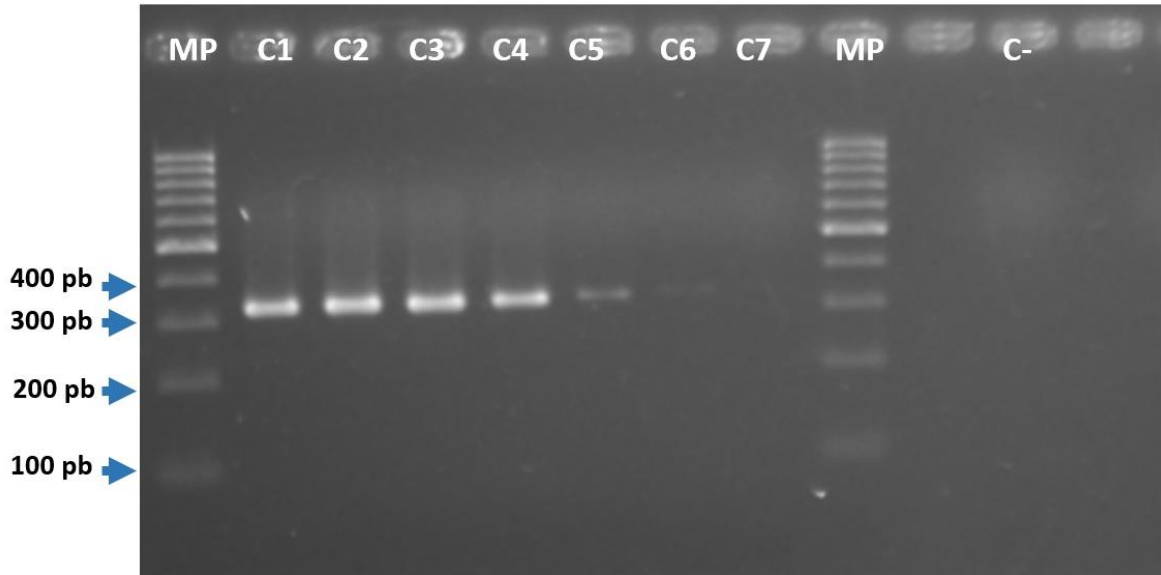
La grafica representa la cinética de amplificación del ensayo de PCR en tiempo real “grafica de amplificación” (amplificación plot). En esta observamos, en el eje de las “X” el tiempo o los ciclos y en el eje de las “Y” la intensidad de la fluorescencia ( $R_n$ ). Así mismo la amplificación de cada estándar, así como las muestras positivas y control positivo, mostraron una cinética exponencial en donde se pueden distinguir tres fases: geométrica, lineal y estacionaria (Plateau). Por el contrario ninguna de las muestras negativas mostro este comportamiento. La línea discontinua color azul

en la figura muestra el límite umbral de fluorescencia del sistema Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR puesto en 0.02 como es recomendado por el fabricante. **(Ver figura 12)**



**Figura 12. Amplificación de la vacuna VR-2332 del PRRSV, muestras positivas y negativas en qPCR.** En la imagen se muestran las curvas de amplificación de las diluciones décuples seriadas del plásmido (líneas amarillas A-G), la amplificación de la vacuna del PRRSV (línea roja V), muestras positivas (MP color azul, morado y rosa) y muestras negativas (MN color azul y rosa). La línea discontinua color azul muestra el punto de corte.

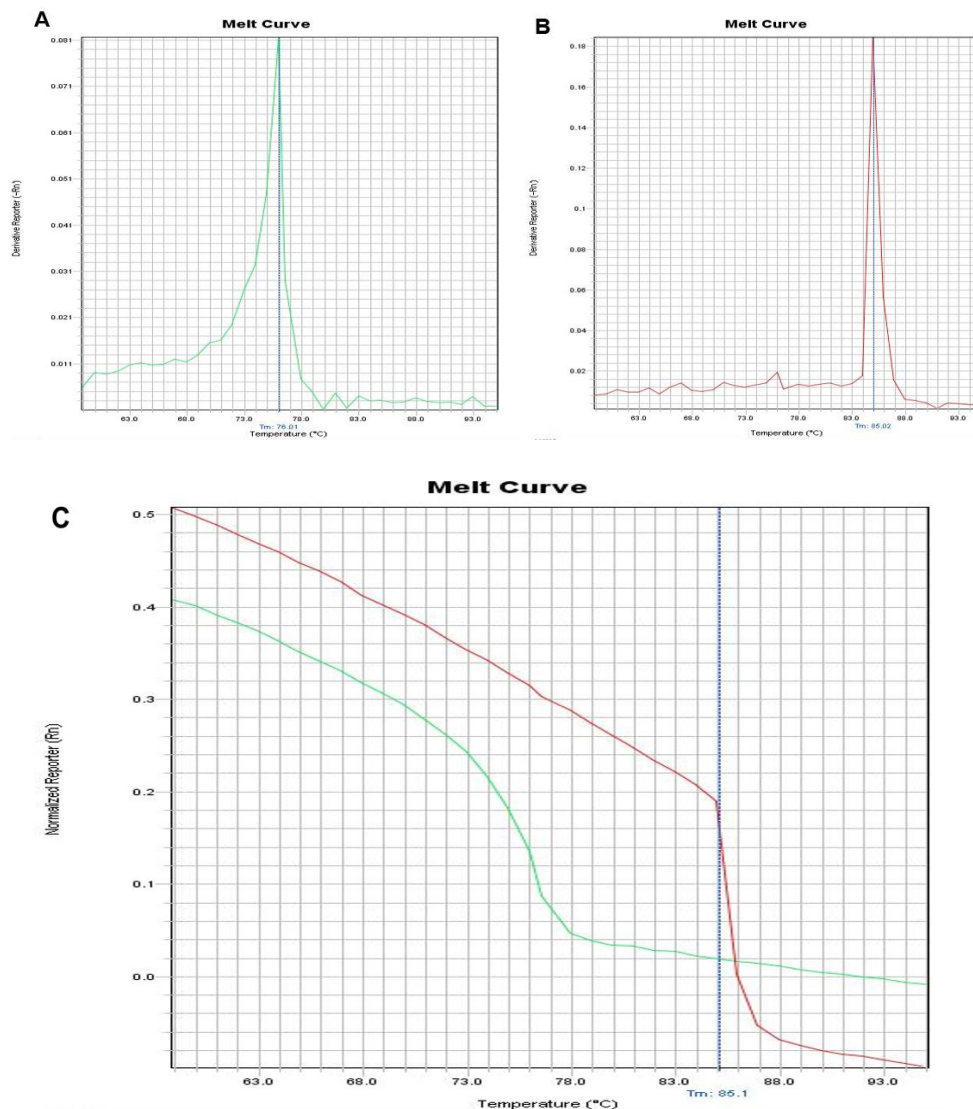
Posterior a la amplificación por qRT-PCR los productos de la curva estándar así como el control negativo fueron puestos en gel de agarosa al 2% para comprobar el tamaño del fragmento esperado y la lectura de un solo producto específico. **(Ver figura 13)**



**Figura 13. Diluciones del estándar de cuantificación en gel de agarosa.** Fotografía de gel de agarosa 2% en TBE 1X. MP. Marcador de peso molecular de 100 pb, C1-C7. Diluciones de plasmido de  $28 \times 10^7$  a  $28 \times 10^1$ . C-. Control negativo.

**Sensibilidad y precisión del ensayo:** La sensibilidad del ensayo se determinó corriendo diluciones decuples seriadas del ARN viral y los plásmidos estándar en duplicados. El límite de detección más bajo fue definido como la mayor dilución en la que hubo amplificación. De esta manera se determinó una sensibilidad menor a  $28 \times 10^1$  copias/reacción. Se analizaron tres diluciones seriadas en una sola corrida para la evaluación de las variaciones intra-ensayo. Las variaciones inter-ensayo fueron medidas probando cada dilución en tres corridas separadas. El coeficiente de variación fue menor a 2%. en ambos (Ver anexo 2).

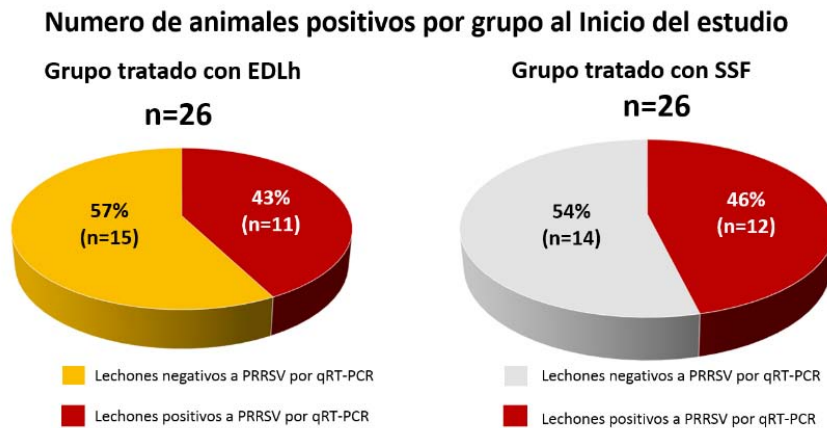
**Especificidad del ensayo:** el amplicón de qRT-PCR fue detectado usando el análisis de la curva de asociación-disociación. Los amplicones específicos de la secuencia parcial del ORF7 del PRRSV son fácilmente distinguidos de dímeros por el valor de la temperatura de disociación específica debido a su longitud. **(Ver figura 14)**



**Figura 14. Análisis de la Melt curve para el qPCR basado en Sybr Green.**  
**A.** Temperatura de disociación correspondiente a dímeros (verde)  $T_m$  76 °C **.B.** Temperatura de disociación correspondiente a amplicon específico de 325 pb (rojo)  $T_m$  85 °C. **C.** Melt curve normalizada.

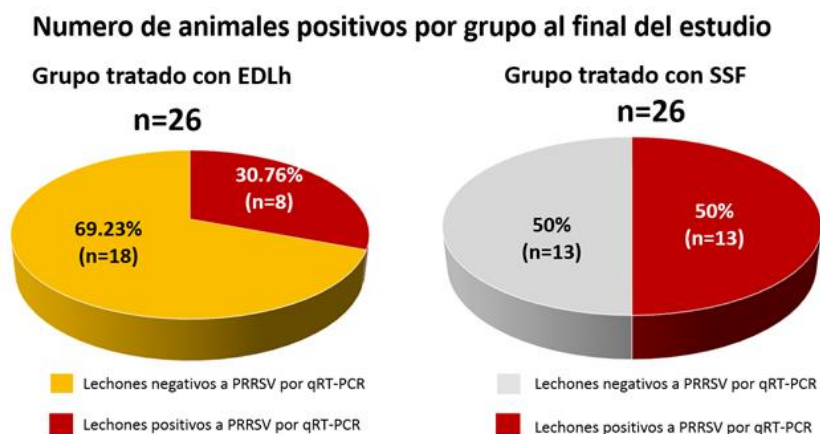
## 6.4 Determinación de la progresión de la viremia en los lechones

De las 52 muestras analizadas se encontró que al inicio del estudio 23 lechones eran positivos y 29 negativos al PRRSV. De estos 23 lechones positivos 11 pertenecían al grupo tratado con EDLh y 12 al grupo tratado con SSF. (Figura 15)



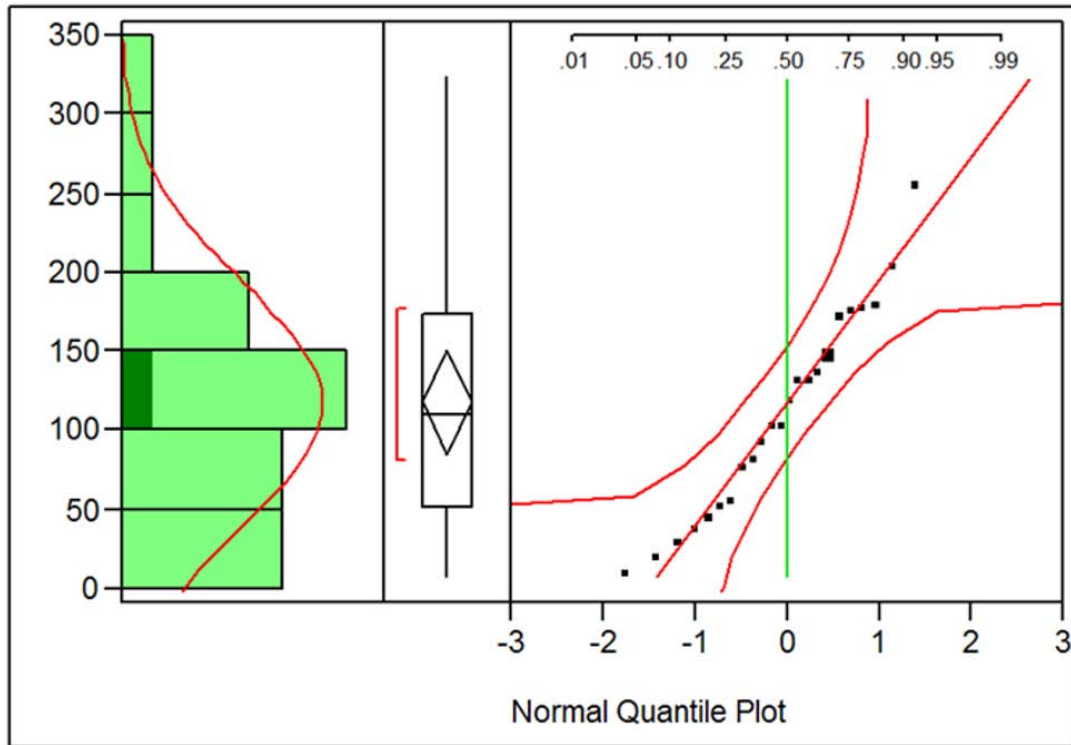
**Figura 15. Lechones positivos al PRRSV al inicio del estudio.** Número de lechones positivos al inicio del estudio (20 días de edad) por grupo.

En el último muestreo a los 49 días de edad la proporción de animales positivos se mantuvo en el grupo tratado con SSF. En contraste el grupo que fue tratado con EDLh mostro una disminución. (Ver figura 16)



**Figura 16. Lechones positivos al PRRSV al final del estudio.** Número de lechones positivos al final del estudio (49 días de edad) por grupo.

Los valores de viremia sometidos a la prueba de Shapiro-wilk mostraron distribución normal y la prueba de Levene mostro homogenidad de varianzas. **(Ver figura 17)**

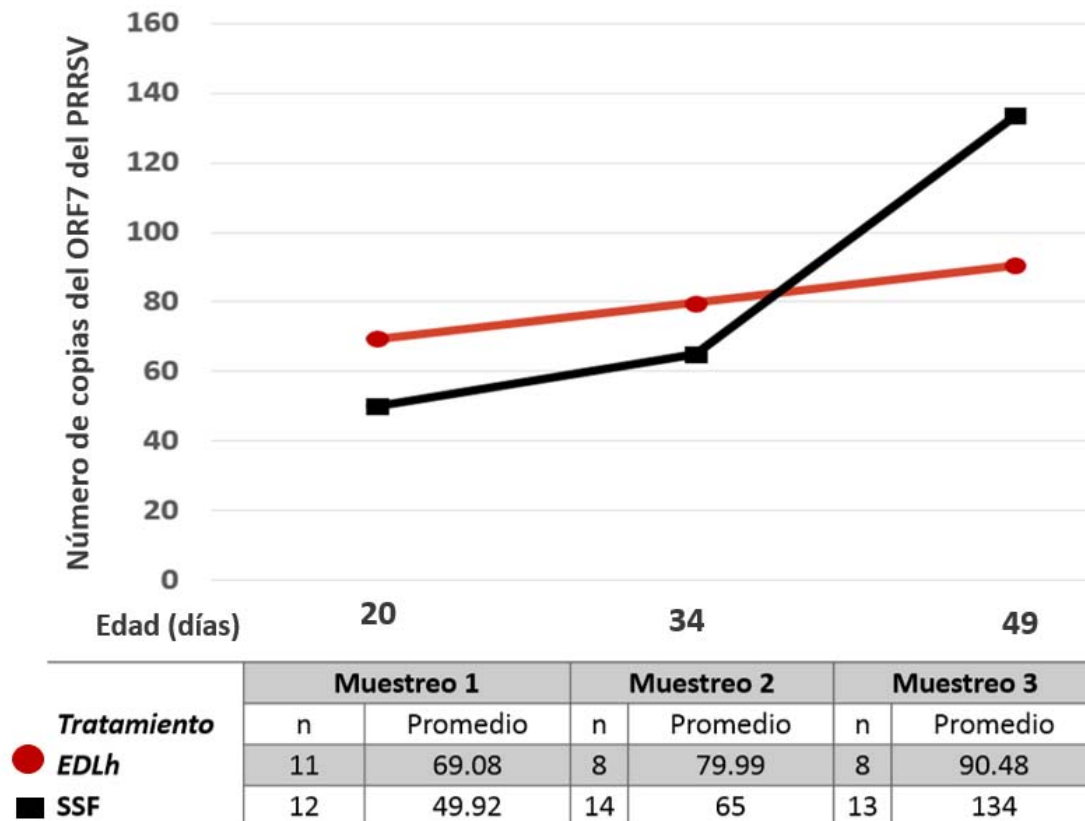


**Figura 17. Prueba de Shapiro-Wilk.** Distribución normal de los cerdos positivos al PRRSV en el tercer muestreo (49 días de edad).

En el grupo tratado con EDLh el promedio de número de copias estimado fue de 68.08, 79.99 y 90.48 para los 20, 34 y 49 días de edad respectivamente. Por otra parte en el grupo tratado con SSF los promedios fueron 49.92, 65 y 134 para los mismos días. **(Ver figura 18)**



### Número de copias promedio para el ORF7 del PRRSV por tratamiento

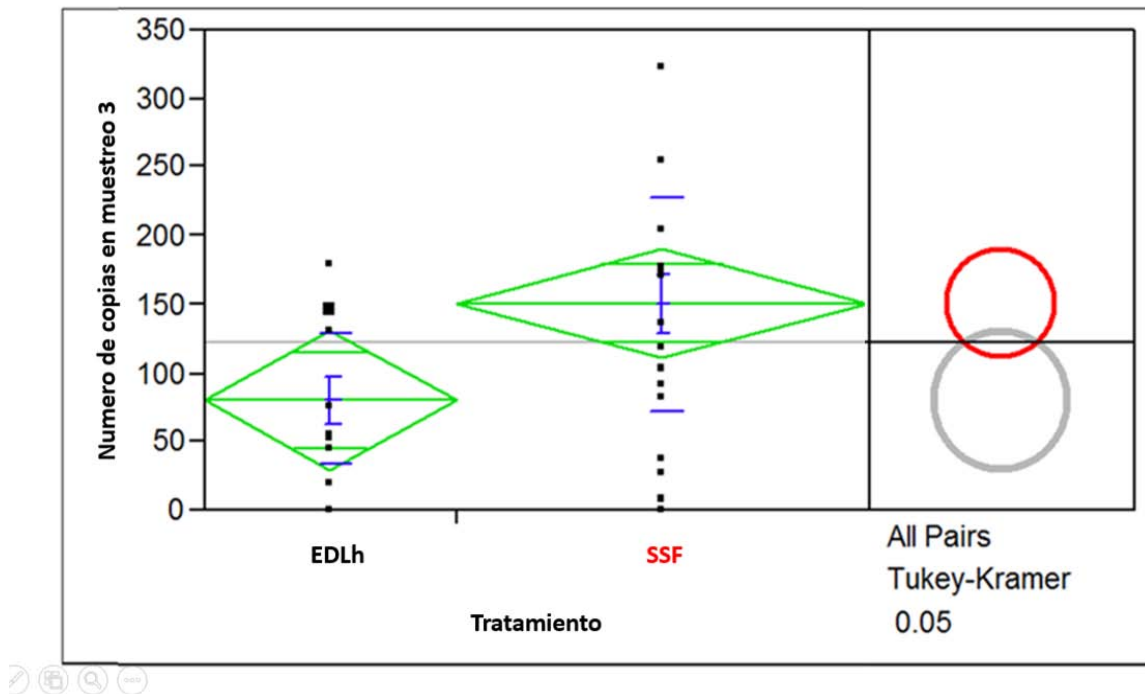


**Figura 18. Número de copias promedio del PRRSV.** Progresión de la viremia en el tiempo de los grupos tratados con EDLh y SSF

En el análisis cuantitativo se observó que no hay diferencia estadísticamente significativa al inicio del estudio (20 días de edad) y al segundo muestreo (día 34 de edad) entre grupos de cerdos positivos al PRRSV tratados con el EDLh y SSF. Sin embargo, se muestra diferencia estadísticamente significativa en el número de copias del gen ORF7 del PRRSV en el tercer muestreo entre el grupo tratado con EDL y con SSF ( $p < 0.05$ ). (Ver figura 19)



## Estadística diferencial para el número de copias del ORF7 del PRRSV entre grupos

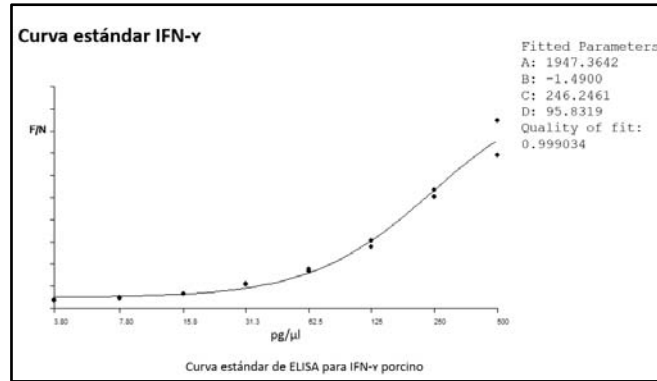


**Figura 19. Prueba de Tukey-Kramer.** Número de copias calculado para el ORF7 del PRRSV en lechones al día 29 de estudio (49 días de edad). Distribución y comparación de los promedios por prueba estadística de Tukey-Kramer.

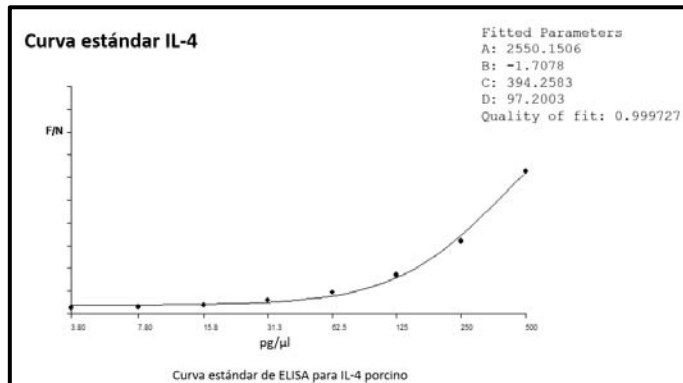
La cantidad del PRRSV en el grupo tratado con EDLh fue menor en comparación con el grupo que recibió SSF los 49 días de edad (prom\_EDLh=90.48, prom\_SSF=134).

### 6.5 Determinación de citocinas

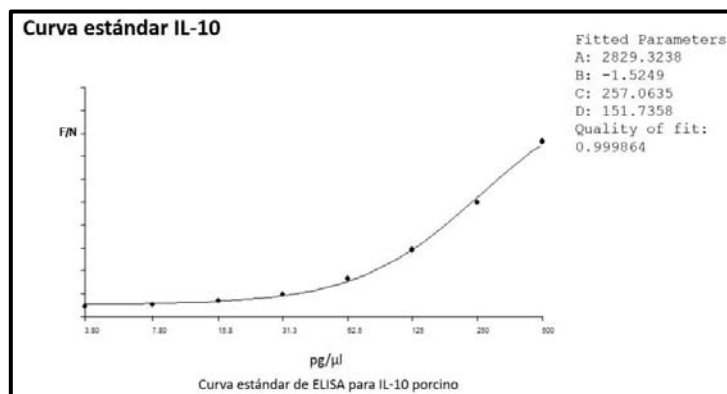
Los sueros colectados de cerdos positivos al PRRSV de 20 y 49 días de edad fueron evaluadas por duplicado en cada una de las ELISAS comerciales para determinar IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10. Los valores de cada muestra fueron comparados con la curva estándar de los controles para IFN- $\gamma$  (**Ver figura 20**), IL-4 (**Ver figura 21**) e IL-10 (**Ver figura 22**). Sin embargo no fue posible detectar menos de 7.8 pg/  $\mu$ l de estas citocinas



**Figura 20. Curva estándar para IFN-γ porcino.** Curva estándar de los controles del kit de ELISA para IFN-γ porcinos medidas a 450 nm a partir del software Assay zap versión 3.0



**Figura 21. Curva estándar para IL-4 porcino.** Curva estándar de los controles del kit de ELISA para IL-4 porcinos medidas a 450 nm a partir del software Assay zap versión 3.0



**Figura 22. Curva estándar para IL-10 porcino.** Curva estándar de los controles del kit de ELISA para IL-10 porcinos medidas a 450 nm a partir del software Assay zap versión 3.0

## 6.6 Ganancia de peso

El grupo tratado con EDLh tuvo un peso promedio de 6.58 Kg al día 20 de edad y finalizo con un peso promedio de 12.92 Kg. El grupo tratado con SSF tuvo un peso promedio de 6.68 Kg al día 20 de edad y finalizo con un peso promedio de 12.88 Kg. No hubo diferencia en la ganancia de peso entre los grupos en ninguno de los muestreos. (Ver figura 23)

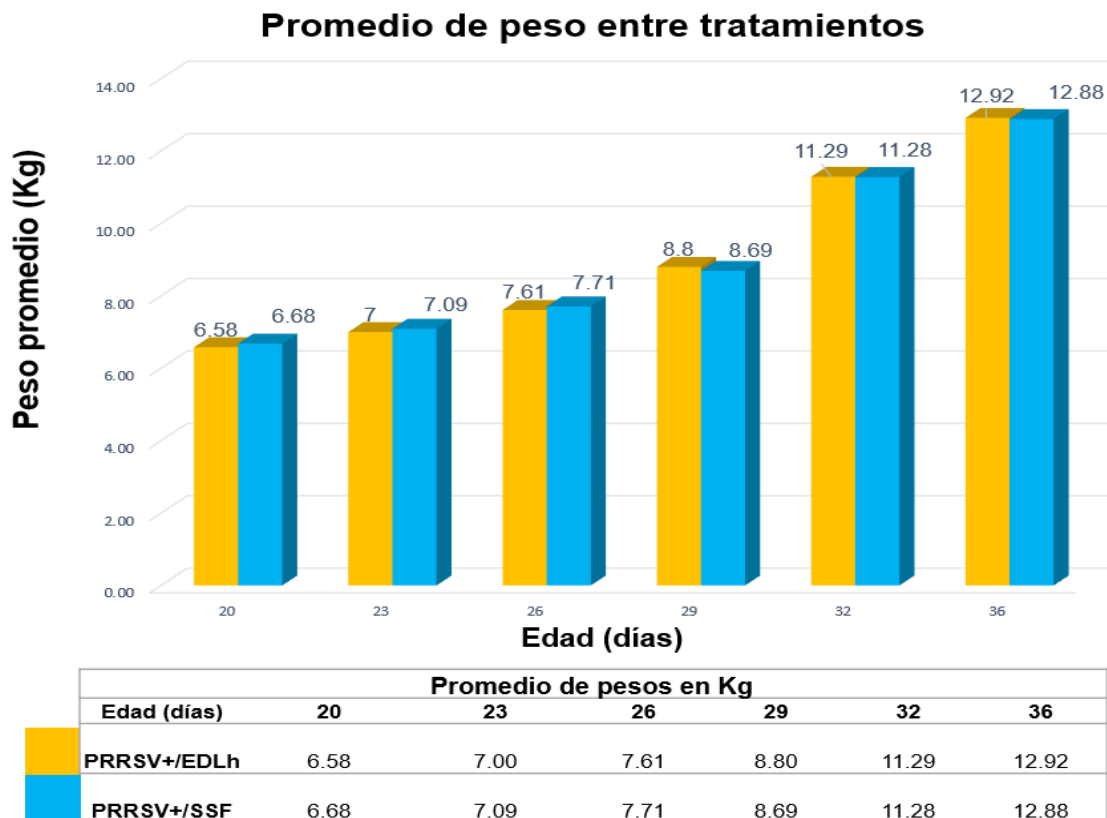
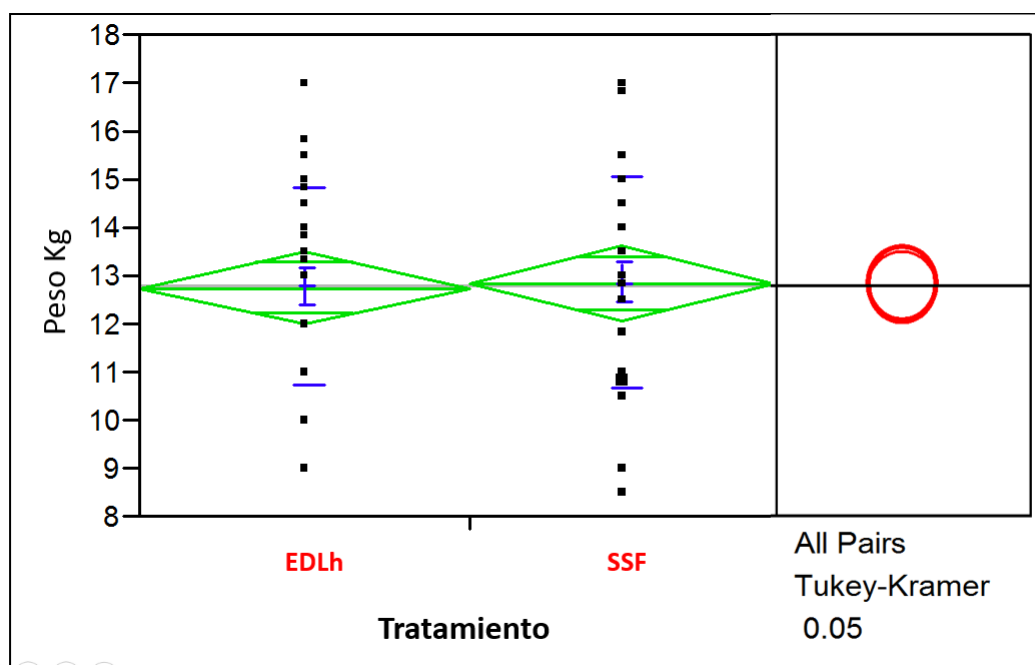


Figura 23. Promedios de peso entre los grupos.

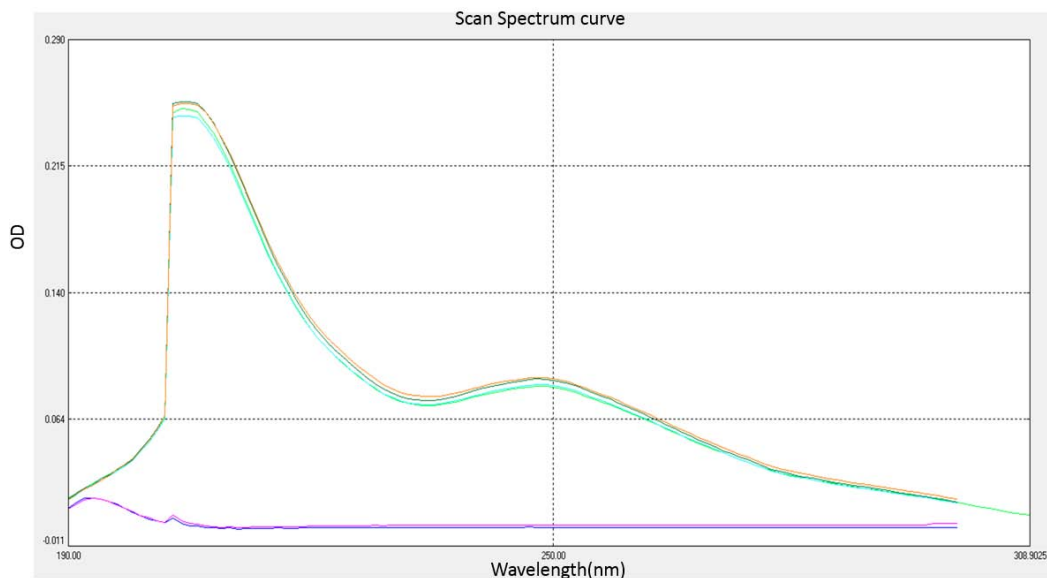
No se encontró diferencia significativa en la ganancia semanal de peso entre el grupo tratado con EDLh y con SSF. (Ver figura 24)



**Figura 24. Prueba de Tukey-Kramer para el peso.** Peso de lechones a los 36 días de edad. Distribución y comparación de los promedios por prueba estadística de Tukey-Kramer.

## 6.7 Extracto dializable leucocitario

Los frascos proporcionados para el estudio doble ciego se evaluaron mediante espectrometría por UV al finalizar el análisis estadístico. Las huellas espectrofotométricas fueron obtenidas mediante el equipo espectro UV-VIS Dual Beam UVS-2700 utilizando el programa UVWin (spectrum) versión 5.05. Las lecturas indican que el EDLh estaba contenido en el frasco marcado como "A", mientras que el tratamiento "B" correspondía a la SSF. Indicando la integridad del extracto. (Ver figura 25)



**Figura 25. Huella espectrofotométrica del EDLh.** Huella espectrofotométrica del extracto dializable leucocitario (Línea continua color verde) y la SSF (Línea continua color rosa). Cada una de ellas con sus respectivas repeticiones.

## 7. DISCUSIÓN

La qRT-PCR basada en Sybr-Green estandarizada en este trabajo logró amplificar de manera específica la secuencia parcial del marco de lectura abierta (ORF7) que codifica para la nucleocapside (N) del virus del PRRS, tal como se ha demostrado en trabajos similares (Kleiboeker et al., 2005; Martínez et al., 2008; Tian et al., 2010). La diferenciación de los productos de PCR y artefactos a través del análisis de la curva de asociación-disociación (MCA) fue hecha por primera vez por Kirk y colaboradores (1997) demostrando su utilidad en ensayos en los que se usan colorantes intercalantes tales como el SYBR Green para evaluar la especificidad (Ririe et al., 1997). En el presente trabajo, el MCA del amplicón de 325 pb en el que se usó como templado RNA de la vacuna elaborada del PRRSV activo cepa VR-

2332 y de muestras de suero positivas obtenidas de animales inoculados experimentalmente con aislados previos, tuvo una  $T_m$  específica de 85 °C y al evaluar templados de ADN o ARN de virus porcinos (circovirus, parvovirus e influenza) y no porcinos (DVB, IBR y moquillo canino) se detectó la presencia de dímeros con una  $T_m$  específica de 76°C, esto indica que la prueba es específica para detectar y cuantificar el ORF7 del PRRSV.

Los resultados de la qRT-PCR basada en Sybr-Green en este estudio muestran que al día 49 de edad, el número de copias calculado de la secuencia parcial del ORF7 para el PRRSV fue menor en el grupo tratado con EDLh en comparación con el grupo que recibió SSF con una  $p < 0.05$ . En otro estudio con el PRRSV realizado por López Huerta en el año 2013 se encontró que el EDL disminuye la presencia viral en órganos diana como pulmón y ganglios linfáticos, así como la frecuencia y duración de cuadros respiratorios (Huerta, 2013). En el presente trabajo no se determinó la carga viral en órganos blanco porque el estudio se realizó en una granja de producción en la que los animales fueron llevados hasta el ciclo final de producción. Sería importante hacer otros experimentos en los que se correlacione la viremia con las lesiones.

Al final del estudio el grupo tratado con EDLh tuvo un menor número de cerdos positivos al PRRSV ( $n=8$ ) que en los animales tratados con la SSF ( $n=13$ ). Existen estudios donde se ha probado que el EDLh aumenta la sobrevivencia de ratones BALB/C inoculados experimentalmente con Herpesvirus simple (Merchand-Reyes et al., 2015). También hay resultados similares en la inoculación de *M. tuberculosis* en ratones (Fabre et al., 2004). Ésto sugiere una actividad profiláctica ante

infecciones bacterianas y virales, además de demostrar que el producto puede funcionar al usarlo en especies diferentes a la que se obtuvo el extracto. En estudios futuros como perspectiva se podría ampliar el periodo de tiempo a evaluar, además del efecto del producto en otras etapas productivas. El número de cerdos que pasaron de negativos a positivos en este estudio fue bajo, esto se puede atribuir a que aun con el virus circulando en sangre no lo excretaban, o a que el número de partículas excretadas no tuviera las dosis infectivas necesarias. Esto podría comprobarse tomando muestras clínicas de exudado nasal, saliva u orina en los cuales se elimina el PRRSV (Wills et al., 1997).

Los lechones del presente estudio mostraron signología respiratoria leve (tos y estornudos) en ambos grupos y ningún lechón murió, por lo que no fue posible hacer una valoración clínica o de mortalidad para comparar los tratamientos. Se sabe que cuando el PRRSV se establece en una granja no se presenta una forma severa de la enfermedad (Stukelj et al., 2013). Para evaluar el impacto clínico del uso del DLE en granjas porcinas sería necesario probarlo en granjas que estén cursando con un brote y por lo tanto la presencia de signos o la mortalidad sea más evidente.

Dentro de los mecanismos involucrados en la respuesta inmune estimulada por el EDL se ha estudiado la inducción de receptores tipo Toll (TLR) y la modulación de citocinas (Ojeda et al., 2005). En un estudio realizado por Hernández se demostró que el EDL porcino aumenta la producción de IFN- $\gamma$  en cerdos sanos (Hernández-Peralta et al., 2014). Por lo anterior en este trabajo se esperaba un incremento en esta citocina. Sin embargo, no fue posible detectar ni IFN- $\gamma$ , ni IL-10 o IL4. Sería

conveniente evaluar el nivel de citocinas con una prueba más sensible que la prueba de ELISA empleada en el presente trabajo como la citometria de flujo.

Por otro lado, se sabe que el PRRSV es capaz de disminuir las concentraciones de TNF- $\alpha$  e IFN- $\alpha$  y aumentar IL-10 (Peng et al., 2009). En el presente trabajo, a pesar de que se sometieron a la prueba sueros positivos a PRSSV en ambos grupos no fue posible demostrar un aumento en la IL-10 en los animales con viremia, con o sin tratamiento.

Finalmente, aún cuando en la hipótesis del estudio se planteó que al final del tratamiento con DLEh los cerdos aumentarían su ganancia de peso debido a un mejor control de la enfermedad, no se encontró diferencia significativa en la ganancia semanal de peso entre los grupos tratados con EDL y SSF tanto en animales positivos como negativos al PRRSV. Esto también pudo deberse a que la enfermedad no se encontraba causando un problema severo en la granja de estudio. Sin embargo, el hecho de que la aplicación del producto no afecte la ganancia de peso coincide con otras investigaciones en donde se evalúa el factor de transferencia en cerdos sanos (Hernández-Peralta et al., 2014) o que cursan con enfermedades bacterianas y virales (Torres, 1994; Rodríguez, 1987). Lo anterior demuestra que el uso del EDLh no tiene efecto negativo en el peso. Sin embargo habría que evaluar si el manejo involucrado en la administración intradérmica de los tratamientos pudiera afectar el peso en comparación con un grupo control sin ningún tipo de manejo.



## **8. CONCLUSIONES**

- I. La administración intradérmica de siete dosis EDLh disminuyó significativamente la cantidad del PRRSV en el suero sanguíneo.
- II. La administración del EDLh no afecta la ganancia de peso en los animales.
- III. No fue posible determinar si la aplicación del EDLh modula IL-10, IL-4 o IFN- $\gamma$ .

## **9. PROSPECTIVA**

- Obtener la secuencia completa de nucleótidos del gen ORF5 y ORF7 del PRRSV para comparar su homología con otras secuencias reportadas y saber a qué genotipo pertenece.
- Probar y comparar el efecto del EDLh y el EDLp ante una inoculación experimental o en una granja con un brote de PRSS no controlado, evaluar la presencia del PRRSV en órganos blanco, la asociación de bacterias relacionadas con el PRRS y prolongar el tiempo de muestreo para determinar su efecto a largo plazo.
- Probar la administración del EDL por vía oral para evaluar si este esquema de administración tiene el mismo efecto, con un menor manejo de los animales.
- Prolongar el calendario de estudio a otras etapas productivas del cerdo y ampliar el número de animales para determinar si el EDL reduce la presentación clínica de la enfermedad y esto genera un beneficio económico en la granja.

## ANEXO 1. Soluciones y medios de cultivo

### Solución stock de ampicilina (50 mg/ml)

Disolver 2.5 g de ampicilina sal de sodio en 50 ml de agua desionizada. Esterilizar por filtración a través de 0,22  $\mu$  y guardar en alícuotas a -20 °C.

### Solución stock de X-Gal (20 mg/ml)

Disolver 200 mg de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido) en 10 ml de N, N- dimetilformamida. Guardar la solución en alícuotas a -20 °C, protegida de la luz

### Solución stock de IPTG (100 mM)

Disolver 1.2 g de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) en 50 ml de agua desionizada. Esterilizar por filtración a través de 0,22  $\mu$ , alucotar y guardar a -20 °C.

### Caldo Luria Bertani (LB)

Peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	5 g

Rehidratar 20 g del medio (#1236-B) en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta completar la disolución. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Conservar en refrigeración de 2° a 8°C.

### Placas LB-ampicilina X-gal/IPTG

Agregar 15 g de agar bacteriológico por cada litro de medio LB. Disolver y esterilizar a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Esperar que la dilución alcance 50°C y añadir 1 ml de la solución stock de ampicilina, 40  $\mu$ l de la solución stock de X-Gal y 40  $\mu$ l de IPTG (100 mM). Mezclar y distribuir en cajas de Petri. Almacenar a 4 °C.

### Solución TBE 10X, pH 8.3

Tris base	108 g
Ac Bórico	55 g
EDTA 0.5 M pH 8	40 ml

Aforar con agua desionizada a 1 litro.

## ANEXO 2. Reproducibilidad del ensayo

El promedio, desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (CV) fueron calculados por separado para cada dilución estándar de DNA basado sobre sus valores de Ct (threshold cycle-ciclo de umbral de detección) usando el software Microsoft Excel

- A) Las variaciones inter-ensayo fueron medidas probando cada dilución en tres corridas separadas.

### Reproducibilidad de la qRT-PCR para el ORF7 del PRRSV

Ensayo	Ciclo umbral de detección (CT) para la curva estandar (copias/reaccion)							
	Variacion inter-ensayo							
	28X10 <sup>7</sup>	28X10 <sup>6</sup>	28X10 <sup>5</sup>	28X10 <sup>4</sup>	28X10 <sup>3</sup>	28X10 <sup>2</sup>	28X10 <sup>1</sup>	28X10 <sup>0</sup>
1	9.02	12.77	16.71	20.78	24.76	28.43	31.59	31.85
2	8.92	12.75	16.71	20.58	24.66	28.43	32.59	33.04
3	8.86	12.78	16.64	20.46	24.76	28.2	32.39	32.83
DS <sup>a</sup>	0.081	0.015	0.040	0.162	0.058	0.133	0.529	0.635
Prom CT	8.933	12.767	16.687	20.607	24.727	28.353	32.190	32.573
CT ± DS <sup>a</sup>	8.93 ± 0.08	12.76 ± 0.01	16.68 ± 0.04	8.93 ± 0.11	24.72 ± 0.05	28.35 ± 0.13	32.19 ± 0.52	32.57 ± 0.63
CV(%) <sup>b</sup>	0.905	0.120	0.242	0.784	0.233	0.468	1.644	1.950

<sup>a</sup> Desviación estándar

<sup>b</sup> Coeficiente de variación

- B) Se analizaron tres diluciones seriadas en una sola corrida para la evaluación de las variaciones intra-ensayo.

### Reproducibilidad de la qRT-PCR para el ORF7 del PRRSV

Ensayo	Ciclo umbral de detección (CT) para la curva estandar (copias/reaccion)							
	Variacion intra-ensayo							
	28X10 <sup>7</sup>	28X10 <sup>6</sup>	28X10 <sup>5</sup>	28X10 <sup>4</sup>	28X10 <sup>3</sup>	28X10 <sup>2</sup>	28X10 <sup>1</sup>	28X10 <sup>0</sup>
1	8.86	12.78	16.64	20.46	24.76	28.5	32.4	32.85
2	8.86	12.78	16.64	20.46	24.76	28.43	32.59	33.05
3	8.87	12.79	16.65	20.47	24.77	28.2	32.39	32.78
DS <sup>a</sup>	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.157	0.113	0.140
Prom CT	8.863	12.783	16.643	20.463	24.763	28.377	32.460	32.893
CT ± DS <sup>a</sup>	8.86 ± 0.00	12.78 ± 0.00	16.64 ± 0.00	20.46 ± 0.00	24.76 ± 0.00	28.37 ± 0.15	32.46 ± 0.11	32.89 ± 0.14
CV(%) <sup>b</sup>	0.065	0.045	0.035	0.028	0.023	0.553	0.347	0.426

<sup>a</sup> Desviación estándar

<sup>b</sup> Coeficiente de variación

## REFERENCIAS

- Albina E, Carrat C, Charley B. Interferon-alpha response to swine arterivirus (PoAV), the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Interferon Cytokine Res.* 1998; 18:485-490.
- Allende R, Laegreid WW, Kutish GF, Galeota JA, Wills RW, Osorio FA. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in individual pigs upon experimental infection. *J Virol.* 2000; 74:10834-10837.
- Arellano Lopez JA. Efecto de la utilización del factor de transferencia como inmunopotenciador celular para el control y la prevención de la rinitis atrófica (Tesis de licenciatura). Cd. México, FMVZ-UNAM, 1988.
- Bautista EM, Goyal SM, Yoon IJ, Joo HS, Collins JE. Comparison of porcine alveolar macrophages and CL 2621 for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and anti-PRRS antibody. *J Vet Diagn Invest.* 1993; 5:163-165.
- Benfield DA, Nelson E, Collins JE, Harris L, Goyal SM, Robison D et al. Characterization of Swine Infertility and Respiratory Syndrome (SIRS) Virus (Isolate ATCC VR-2332). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1992; 4:127-133.
- Benson JE, Yaeger MJ, Christopher-Hennings J, Lager K, Yoon KJ. A comparison of virus isolation, immunohistochemistry, fetal serology, and reverse-transcription polymerase chain reaction assay for the identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus transplacental infection in the fetus. *J Vet Diagn Invest.* 2002; 14:8-14.
- Biron CA. Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN-alpha/beta), in innate and adaptive immune responses to viral infections. *Semin Immunol.* 1998; 10(5):383-90
- Bravo-Blas A, Téllez R, Uribe S, Salmerón F, Valdés L, Estrada-Parra S, et al. El factor de transferencia como inductor de la expresión de RNAm de IFN- $\gamma$  e IL-2 en pollos vacunados contra influenza aviar. *Arch Med Sci.* 2010; 42:67-71.
- Brinton M.A, Snijde EJ. Arteriviruses. *Encyclopedia of Virology.* Third Edition ed, 2008; 176-186.
- Cabezas-Quiroga R, Estrada-Parra S, Padierna OL, Padierna OJ, Fernández OC, López SP. Inmunoterapia con Factor de Transferencia en pacientes con Herpes Zoster. *Infectología* 1985; 11:293-299.
- Calzada-Nova G, Schnitzlein W, Husmann R, Zuckermann FA.. Characterization of the cytokine and maturation responses of pure populations of porcine plasmacytoid

dendritic cells to porcine viruses and toll-like receptor agonists. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010; 135:20-33.

Calzada-Nova G, Schnitzlein WM, Husmann RJ, Zuckermann FA. North American porcine reproductive and respiratory syndrome viruses inhibit type I interferon production by plasmacytoid dendritic cells. *J Virol.* 2011; 85:2703-2713.

Canon N, Audige L, Denac H, Hofmann M, Griot C. Evidence of freedom from porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in Switzerland. *Vet Rec.* 1998; 142:142-143.

Charpin C, Mahé S, Keranflec'h A, Belloc C, Cariolet R, Le Potier MF, et al. Infectiousness of pigs infected by the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSV) is time-dependent. *Veterinary Research* 2012, 43:69; 43.

Chávez Guiltrón LE. Efecto de la utilización del factor de transferencia como inductor de la inmunidad celular en la prevención cólera porcino (Tesis de licenciatura) Cd. México: FMVZ-UNAM, 1988.

Chen Z, Lawson S, Sun Z, Zhou X, Guan X, Christopher-Hennings J, et al. Identification of two auto-cleavage products of nonstructural protein 1 (nsp1) in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infected cells: nsp1 function as interferon antagonist. *Virology.* 2010; 398:87-97.

Christianson WT, Choi CS, Collins JE, Molitor TW, Morrison RB, Joo HS, et al. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses. *Can J Vet Res.* 1993; 57:262-268.

Christopher-Hennings J, Nelson EA, Hines RJ, Nelson JK, Swenson SL, Zimmerman JJ, et al. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. *J Vet Diagn Invest.* 1995; 7:456-464.

Collins JE, Benfield DA, Christianson WT, Harris L, Hennings JC, Shaw DP, et al. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J Vet Diagn Invest* 1992; 4:117-126.

Conzelmann KK, Visser N, Van Woensel P, Thiel HJ. Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group. *Viol.* 1993; 193:329-339.

SAGARPA. Situación actual y perspectiva de la producción de carne de porcino en México. México. 2009.

Delputte PL, Costers S, Nauwynck HJ. Analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles for heparan sulphate and sialoadhesin. *J Gen Virol.* 2005; 86:1441-1445.

Díaz I, Darwich L, Pappaterra G, Pujols J, Mateu E. Different European-type vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus have different immunological properties and confer different protection to pigs. *Virology*. 2006; 351:249-259.

Dunowska M, Biggs PJ, Zheng T, Perrott MR.. Identification of a novel nidovirus associated with a neurological disease of the Australian brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Veterinary Microbiology*. 2012; 156:418-424.

Fabre RA, Pérez TM, Aguilar LD, Rangel MJ, Estrada-García I, Hernández-Pando R, et al. Transfer factors as immunotherapy and supplement of chemotherapy in experimental pulmonary tuberculosis. *Clinical Experimental Immunology*. 2004; 136:215-223.

Fickenscher H, Hor S, Kupers H, Knappe A, Wittmann S, Sticht H. The interleukin-10 family of cytokines. *Trends in Immunology*. 2002; 23:89-96.

Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Zapata-Benavides P, Vera-García ME, Castillo-Tello P, García de la Fuente A, et al. Immunopotent CRP (bovine dialyzable leukocyte extract) adjuvant immunotherapy: a phase I study in non-small cell lung cancer patients. *Cytotherapy* 2008; 10:490-496.

Goyal SM. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1993; 5:656-664.

Halbur PG, Paul PS, Frey ML, Landgraf J, Eernisse K, Meng XJ, et al. Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Veterinary Pathology*. 1995; 32:648-660.

Han M, Yoo D. Engineering the PRRS virus genome: updates and perspectives. *Veterinary Microbiology*. 2014; 174:279-295.

Hernández-Peralta P, Pérez-Tapia S, Limón-Flores A, Vázquez-Leyva S, Estrada Parra S, Sánchez-Betancourt I, et al. El extracto leucocitario dializable aumenta la concentración de interferón gamma sérico en cerdos destetados. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 2014; 46:425-430.

Homberg T, Sáenz V, Galicia-Carreón J, Lara I, Cervantes-Trujano E, Andaluz, et al. The Adverse Event Profile in Patients Treated with Transferon (Dialyzable Leukocyte Extracts): A Preliminary Report. *Pharmacology & Pharmacy*. 2015; 06:65-74.

Huerta CFL. Evaluación del efecto inmunomodulador del extracto dializable de leucocitos (DLE) en lechones infectados con Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV) (Tesis de Maestría) Cd. México-IPN, 2013.

INEGI. Producción, consumo e inversión: Principales características de la estadística de sacrificio de ganado según especie. México. 2016.

Kirkpatrick CH. Transfer factors: identification of conserved sequences in transfer factor molecules. *Mol Med.* 2000; 6:332-341.

Kim O, Sun Y, Lai FW, Song C, Yoo D. Modulation of type I interferon induction by porcine reproductive and respiratory syndrome virus and degradation of CREB-binding protein by non-structural protein 1 in MARC-145 and HeLa cells. *Virology.* 2010; 5;402(2):315-26.

Kleiboeker SB, Schommer SK, Lee S-M, Watkins S, Chittick W, Polson D. Simultaneous detection of North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome virus using real-time quantitative reverse transcriptase-PCR. *J Vet Diagn Invest.* 2005; 170:165-167.

Lager KM, Mengeling WL. Pathogenesis of in utero infection in porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can J Vet. Res* 1995; 59:187-192.

Lager KM, Mengeling WL, Wesley RD. Evidence for local spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Swine Health Prod.* 2002; 10:167-170.

Liu Y, Shi W, Zhou E, Wang S, Hu S, Cai X, et al. Dynamic changes in inflammatory cytokines in pigs infected with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin Vaccine Immunol.* 2010; 17:1439-1445.

Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol.* 2005; 23:275-306.

Loving CL, Brockmeier SL, Vincent AL, Lager KM, Sacco RE. Differences in clinical disease and immune response of pigs challenged with a high-dose versus low-dose inoculum of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Viral Immunol.* 2008; 21:315-325.

López-Fuertes L, Campos E, Doménech N, Ezquerro A, Castro JM, Domínguez J, Alonso F. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus down-modulates TNF-alpha production in infected macrophages. *Virus Res.* 2000; 69(1):41-6.

Mardassi H, Massie B, Dea S. Intracellular synthesis, processing, and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol.* 1996; 221:98-112.

Martinez E, Riera P, Sitja M, Fang Y, Oliveira S, Maldonado J. Simultaneous detection and genotyping of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by real-time RT-PCR and amplicon melting curve analysis using SYBR Green. *Res Vet Sci.* 2008; 85:184-193.

Meng XJ, Paul PS, Halbur PG. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the 3'-terminal genomic RNA of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol.* 1994; 75 (Pt 7):1795-1801.

Mengeling WL, Vorwald AC, Lager KM, Brockmeier SL. Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome using infected alveolar macrophages collected from live pigs. *Vet Microbiol* 1996; 49:105-115.

Merchand-Reyes G, Pavon L, Perez-Sanchez G, Vázquez-Leyva S, Salinas-Jazmín N, Velasco-Velázquez M, et al. Swine Dialyzable Spleen Extract as Antiviral Prophylaxis. *J Med Food.* 2015; 18:1239-1246.

Meulenbergh JJ, de Meijer EJ, Moormann RJ. Subgenomic RNAs of Lelystad virus contain a conserved leader-body junction sequence. *J Gen Virol.* 1993; 74 (Pt 8):1697-1701.

Meulenbergh JJ, Petersen-den Besten A, De Kluyver EP, Moormann RJ, Schaaper WM, Wensvoort G. Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *J Virol.* 1995; 206:155-163.

Mortensen S, Stryhn H, Sogaard R, Boklund A, Stark DC, Christensen, et al. Risk factors for infection of sow herds with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Prev Vet Med.* 2002; 53:83-101.

Murtaugh MP, Elam MR, Kakach LT. Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. *Arch Virol.* 1995; 140:1451-1460.

Nelson EA, Christopher-Hennings J, Drew T, Wensvoort G, Collins JE, Benfield DA. Differentiation of U.S. and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol.* 1993; 31:3184-3189.

Neumann EJ, Kliebenstein JB, Johnson CD, Mabry JW, Bush EJ, Seitzinger AH, et al. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *JAVMA.* 2005; 227.

Oh S.-H., Whitley NC. Pork Production in China, Japan and South Korea. *Asian-Aust J Anim Sci.* 2011; 24:1629-1636.

OIE. PRRS: the disease, its diagnosis, prevention and control. 2008.

Ojeda MO, Veer CV, Ortega CBF, Rosainz Mde J, Buurman WA.. Dialyzable leukocyte extract differentially regulates the production of TNF-alpha, IL-6, and IL-8 in bacterial component-activated leukocytes and endothelial cells. *Inflammation Research.* 2005; 54:74-81.

Otake S, Dee SA, Rossow KD, Moon RD, Pijoan C.. Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by mosquitoes, *Aedes vexans* (Meigen). *Can J Vet Res.* 2002; 66:191-195.



Otake S, Dee SA, Rossow KD, Deen J, et al. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by fomites (boots and coveralls). *J Swine Health Prod.* 2002; 10:59-65.

Otake S, Dee SA, Moon RD, Rossow KD, Trincado C, Pijoan C. Evaluation of mosquitoes, *Aedes vexans*, as biological vectors of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can J Vet Res.* 2003; 67:265–270.

Ostrowski M, Galeota J.A, Jar A.M, Platt K.B, Osorio F.A, Lopez O.J. Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *J Virol* 2002; 76:4241-4250.

Patton JB, Rowland RR, Yoo D, Chang KO. Modulation of CD163 receptor expression and replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine macrophages. *Virus Res.* 2009; 140:161-171.

Peng YT, Chaung HC, Chang HL, Chang HC, Chung WB. Modulations of phenotype and cytokine expression of porcine bone marrow-derived dendritic cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol.* 2009; 136:359-365.

Pineda B, Estrada-Parra S, Pedraza-Medina B, Rodriguez-Ropon A, Pérez R, Arrieta O. Interstitial Transfer Factor as Adjuvant Immunotherapy for Experimental Glioma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2005; 24.

Pol JM, Van Dijk JE, Wensvoort G, Terpstra C.. Pathological, ultrastructural, and immunohistochemical changes caused by Lelystad virus in experimentally induced infections of mystery swine disease (synonym: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS)). *Vet Q.* 1991; 13:137-143.

Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, et al. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol.* 2003; 3:18.

Plagemann P.W.G. GP5 ectodomain epitope of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, strain Lelystad virus. *Virus Res* 2004; 102:225-230.

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* 1997; 245:154-160.

Rodríguez Lazcano DA. El factor de transferencia en la enfermedad de Aujeszky. (Tesis de licenciatura). Cd. México FMVZ-UNAM, 1987.

Rojas Bautista.S. Uso de suero hiperinmune y factor de transferencia para la prevención y tratamiento de la colibacilosis neonatal en lechones (Tesis de licenciatura). Cd. México FMVZ-UNAM, 1987.

Rossow KD, Bautista EM, Goyal SM, Molitor TW, Murtaugh MP, Morrison RB, et al. Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-old pigs. *J Vet Diagn Invest.* 1994; 6:3-12.

Rossow KD, Collins JE, Goyal SM, Nelson EA, Christopher-Hennings, Benfield DA. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. *Vet Pathol.* 1995; 32:361-373.

Rossow KD, Benfield DA, Goyal SM, Nelson EA, Christopher-Hennings J, Collins JE. Chronological immunohistochemical detection and localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in gnotobiotic pigs. *Vet Pathol.* 1996; 33:551-556.

Rozzo SJ, Kirkpatrick CH. Purification of transfer factors. *Mol Immunol.* 1992; 29:167-182.

Samuel CE. Antiviral Actions of Interferons. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14:778-809.

Sanchez-Gonzalez DJ, Sosa-Luna CA, Vasquez-Moctezuma I. Factores de transferencia en la terapeutica medica. *Med Clin (Barc).* 2011; 137:273-277.

Sandoval GF, Vera JG, Solano MO. Factor de transferencia como inmunomodulador específico en el tratamiento de la dermatitis atópica moderada a severa. *Revista Alergia México.* 2005; 52:215-220.

Stadejek T, Oleksiewicz MB, Potapchuk D, Podgórska K. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. *J Gen Virol.* 2006; 87:1835-1841.

Stevenson GW, Van Alstine WG, Kanitz CL, Keffaber KK. Endemic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of nursery pigs in two swine herds without Current Reproductive Failure. *J Vet Diagn Invest.* 1993; 5:432-434.

Stukelj M, Toplak I, ZdravkoValencak. An attempt to eliminate porcine reproductive and respiratory syndrome (prrs) by serum inoculation on small pig farm. *SlovVef Res.* 2013; 50:193-200.

Sun Z, Chen Z, Lawson SR, Fang Y. The cysteine protease domain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 2 possesses deubiquitinating and interferon antagonism functions. *J Virol.* 2010; 84:7832-7846.

Terpstra C, Wensvoort G, Pol JM. Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates fulfilled. *Vet Q.* 1991; 13:131-136.

Tian H, Wu J, Shang Y, Cheng Y, Liu X. The development of a rapid SYBR one step real-time RT-PCR for detection of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Virol J.* 2010; 7:90.

Tornimbene B, Frossard JP, Chhim V, Sorn S, Guitian J, Drew TW. Emergence of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome (HP-PRRS) in medium-scale swine farms in southeastern Cambodia. *Prev Vet Med.* 2014; 118(1):93-103.

Torres M.H. Efecto del factor de transferencia específico en contra de *Actinobacillus pleuroneumoniae* serotipo 5 y *Pasteurella multocida* A, en cerdos (Tesis de licenciatura) Cd. México FMVZ-UNAM, 1994.

Van Gorp H, Van Breedam W, Delputte PL, Nauwynck HJ. Sialoadhesin and CD163 join forces during entry of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol.* 2008; 89:2943-2953.

Van Reeth K, Labarque G, Nauwynck H, Pensaert M. Differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections: correlations with pathogenicity. *Res Vet Sci.* 1999; 67:47-52.

Wang G, Song T, Yu Y, Liu Y, Shi W, Wang S, et al. Immune responses in piglets infected with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011 ;142:170-178.

Wensvoort G, Terpstra C, Pol JM, ter Laak EA, Bloemraad M, de Kluyver EP, et al. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet Q.* 1991; 13:121-130.

Wensvoort G, Kluyver EPd, Pol JMA, Wagenaar F, Moormann RJ, Hulst MM, et al. Lelystad virus, the cause of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome: a review of mystery swine disease research at Lelystad. *Vet Microbiol.* 1992; 33:185-193.

Wills RW, Zimmerman JJ, Yoon KJ, Swenson SL, Hoffman LJ, McGinley MJ, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: routes of excretion. *Vet Microbiol.* 1997; 57:69-81.

Wills RW, Doster AR, Galeota JA, Sur JH, Osorio FA. Duration of Infection and Proportion of Pigs Persistently Infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:58-62.

Wootton S, Yoo D, Rogan D. Full-length sequence of a Canadian porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolate. *Arch Virol.* 2000; 145:2297-2323.

Yang K, Li Y, Duan Z, Guo R, Liu Z, Zhou D. A one-step RT-PCR assay to detect and discriminate porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in clinical specimens. *Gen.* 2013; 531:199-204.

Yoon KJ, Wu LL, Zimmerman JJ, Platt KB. Field isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vary in their susceptibility to antibody dependent enhancement (ADE) of infection. *Vet Microbiol.* 1997; 55:277-287.

Zhou L, Yang H. Porcine reproductive and respiratory syndrome in China. *Virus Res.* 2010; 154:31-37.