



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**MONITOREO DE LA INFECCIÓN DEL VIRUS DE LA
DIARREA EPIDÉMICA PORCINA DURANTE BROTES
ACTIVOS Y REBROTOS EN CERDAS REPRODUCTORAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

LILIANA VARGAS ESPARRAGOZA

ASESOR:

Dr. José Francisco Rivera Benítez

COASESOR:

Dr. Enrique Corona Barrera

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mi mamá que me ha dado todo en la vida, por tu apoyo, amor, paciencia y comprensión a lo largo de este proceso y más allá. Te agradezco las enseñanzas y consejos que me has brindado, la confianza que siempre has depositado en mi me ha impulsado a alcanzar mis metas, te aseguro que todos tus sacrificios valdrán la pena. Te amo.

A ti porerito, sé que desde arriba me acompañas y lo seguirás haciendo hasta mi último respiro. Tu partida sigue doliendo pero algún día volveremos a vernos y mientras tanto espero enorgullecerte día a día por el resto de mi vida.

A Rubí, Mari y Yoyis que juntas recorrimos este camino, les agradezco su amistad sincera e incondicional, su apoyo en los peores momentos, las risas y aventuras vividas a lo largo de estos años.

A Xime que siempre escuchó mis alegrías, enojos y tristezas, gracias por tus consejos.

A Manuel que ocupa un lugar muy especial en mi corazón, te agradezco los años que compartiste conmigo, todas las experiencias vividas, las horas que dedicamos al estudio, a las charlas y a la diversión; gracias por todos esos momentos que quedarán en mi memoria para siempre.

A la Sra. Yolanda y Sr. Vicente por su apoyo a lo largo de la carrera y el desarrollo de este trabajo, no tengo cómo pagarles todo lo que hicieron por mí: los viajes, las comidas, la convivencia, los consejos. Siempre estarán en mi memoria, gracias.

Al MVZ Miguel Raygoza y la MVZ Enedina Silva (Q.E.P.D.) que fueron profesores que dejaron una huella en mi camino, gracias por sus consejos y apoyo profesional y personal. Les agradezco por la formación que me dieron.

A Karla, Chio, Flor, Ross y el doctor Cerriteño por estar conmigo en ese lapso tan difícil, les agradezco por estar al pendiente, por acompañarme en los momentos más gratos y por haber compartido tantas risas.

A mi pequeña ángel Nicole te agradezco por compartir tus 6 años conmigo, estarás siempre en mi corazón y mente. Te prometo formarme como una excelente MVZ para poder ayudar a los animales, te extrañaré toda la vida, te amo pequeñita.

A ti que llegaste a mi vida en la última parte de este proceso, *tú me salvaste*.

ESTE TRABAJO ES PARA USTEDES ¡GRACIAS!

AGRADECIMIENTOS

El principal agradecimiento es para mi mamá, familia y amigos, sin su apoyo no habría sido posible desarrollar este proyecto. Les agradezco por estar presentes en mi vida, por compartir mis alegrías y tristezas. No hay palabras suficientes para expresarles mi sentir.

Al señor Ángel y Ceci por los conocimientos y experiencia compartidos en la granja, por su ayuda en el muestreo de los animales.

A la M. en C. Rocío Lara por su orientación en las técnicas de biología molecular realizadas en este trabajo.

Al pMVZ Amaury Martínez por su apoyo en la realización de RT-PCR para el diagnóstico del virus durante el brote en la granja.

A la MVZ Flor Solís por compartir conmigo su conocimiento en lo que respecta a manejo de cultivo celular y aislamiento viral.

A la M en C. Catalina Tufiño por enseñarme a realizar los análisis estadísticos de la presente tesis.

Al M en C. Marco Antonio Barrera por orientarme en la ejecución de la técnica de ELISA.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Virología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CENID-MA INIFAP)

El financiamiento para el desarrollo de esta tesis fue otorgado por INIFAP No. 13592932977 “Desarrollo y validación de pruebas para la detección de anticuerpos y antígeno del virus de la diarrea epidémica porcina” y CONACYT PDCPN2014-01. No. 249177 “Desarrollo y evaluación de productos de diagnóstico y un biológico para el control y la prevención de la diarrea epidémica porcina”.

La alumna fue becaria del proyecto PDCPN2014-01/249177 con número de becario 25966.

CONTENIDO

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Historia.....	2
1.2 Agente etiológico	3
1.2.1 Clasificación taxonómica	3
1.2.2 Características estructurales	4
1.2.3 Organización del genoma.....	4
1.3 Transmisión.....	5
1.4 Ciclo de replicación	5
1.5 Patogenia	7
1.6 Signos y lesiones	8
1.7 Diagnóstico	8
1.7.1 Análisis virológicos.....	8
1.7.2 Análisis serológicos.....	10
1.7.3 Diagnósticos diferenciales.....	12
1.8 Prevención.....	13
1.9 Situación nacional del vDEP.....	14
1.10 Inmunidad	16
2. JUSTIFICACIÓN	18

3. HIPÓTESIS	19
4. OBJETIVOS	19
4.1 Objetivo general.....	19
4.2 Objetivos particulares	19
5. MATERIAL Y MÉTODOS	20
5.1 Información del brote en granja	20
5.2 Colección de datos de producción, parámetros reproductivos	24
5.4 Extracción de RNA	26
5.5 RT-PCR dúplex en tiempo real.....	26
5.6 RT-PCR en tiempo real.....	26
5.6.1 Iniciadores y sonda.....	27
5.6.2 Condiciones de amplificación	27
5.7 Aislamiento viral.....	27
5.7.1 Células.....	27
5.7.2 Preparación inóculo.....	27
5.7.3 Infección.....	28
5.7.4 Titulación viral	28
5.8 ELISA	29
5.9 Seroneutralización.....	29
5.10 Amplificación parcial y secuenciación del gen S	30
5.10.1 Inóculos	30
5.10.2 Elaboración cDNA	31
5.10.3 PCR Punto Final.....	31
5.10.4 Purificación de productos y secuenciación	31
5.10.5 Análisis filogenético.....	32

5.11 Análisis estadístico.....	32
6. RESULTADOS	33
6.1 Parámetros.....	33
6.2 RT-PCR dúplex en tiempo real.....	36
6.3 Excreción viral.....	36
6.3.1 Etapa 1.....	36
6.3.2 Etapa 2.....	38
6.4 Aislamiento viral.....	40
6.5 ELISA	40
6.5.1 Sueros.....	40
6.5.2 Calostro	43
6.6 Seroneutralización.....	43
6.7 Caracterización parcial del gen S del vDEP	45
7. DISCUSIÓN	51
8. CONCLUSIÓN	58
9. REFERENCIAS.....	60
ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS.....	67

RESUMEN

VARGAS ESPARRAGOZA LILIANA. Monitoreo de la infección del virus de la diarrea epidémica porcina durante brotes activos y rebrotes en cerdas reproductoras (bajo la dirección de: MVZ, Doctor José Francisco Rivera Benítez y MVZ, Doctor Enrique Corona Barrera).

El virus de la diarrea epidémica porcina produce diarrea aguda, vómito y deshidratación severa en cerdos de todas las edades, afectando significativamente a los lactantes causando mortalidad del 90-100 % con grandes pérdidas económicas. Actualmente, es reconocida como una enfermedad emergente y re-emergente, las características clínicas durante los brotes son diversas y la capacidad de producir rebrotes en hembras previamente expuestas, hace necesaria su investigación. El objetivo del presente estudio fue realizar un monitoreo en cerdas reproductoras y sus camadas durante un brote de DEP en granja, al igual en su siguiente parto.

Se registró un brote en una granja porcina con mortalidad de 24 %, empleando qRT-PCR se detectó diferencia en la excreción viral en los muestreos realizados en la primera etapa, mientras que para la segunda no existió distinción. En los parámetros no se determinó diferencia entre el testigo, brote y parto consecutivo. Mediante ELISA se comprobó que el estado inmunológico de las cerdas fue el mismo en todo el monitoreo mientras que en lechones fue distinto. Empleando aislamiento viral y seroneutralización se encontraron anticuerpos neutralizantes en el 100 % (18 sueros) de cerdas, mientras que en lechones solo 40 % de 15 sueros. Las inmunoglobulinas en calostro se mantuvieron en ambos partos. Con la secuenciación parcial del gen S se detectó una delección y dos sustituciones de aminoácidos no encontradas en otras cepas INDEL reportadas anteriormente, esto persistió durante toda la investigación; la secuencia correspondiente al final del monitoreo tuvo dos sustituciones extras en una región distinta.

INTRODUCCIÓN

1.1 Historia

En el año 1971 en Inglaterra, se identificó una enfermedad gastroentérica que afectaba cerdos en crecimiento y engorda (Lin, *et al.*, 2015 A), la cual es caracterizada por provocar una diarrea acuosa, similar al virus de la gastroenteritis transmisible del cerdo (vGET). La enfermedad fue denominada diarrea epidémica viral y con el paso de los años se diseminó por diversos países de Europa (Lee, 2015).

En 1976, la enfermedad se presentó de nuevo, en contraste a los brotes previos, en esta ocasión afectó cerdos de todas las edades, incluyendo a los lactantes. Debido a estas características se clasificó en un grupo diferente para diferenciarlo del mencionado anteriormente (Lee, 2015).

En 1978, en Bélgica se le asignó el nombre de CV777, posteriormente se determinó que estos dos grupos de cepas eran diferentes a los otros coronavirus: vGET y el virus de encefalomiелitis hemaglutinante; así fue como la enfermedad fue denominada diarrea epidémica porcina (DEP) (Lee, 2015; Song y Park, 2012).

Los casos de DEP en Europa fueron esporádicos y con baja seroprevalencia durante los 90's, causando diarrea especialmente en cerdos adultos y signos atenuados en lactantes (Leidenberger, *et al.*, 2017). Fue en 1982 cuando se reportó por primera vez en el continente asiático y desde entonces, la enfermedad ha causado pérdidas económicas en la industria porcícola (Lin, *et al.*, 2016).

Diversas vacunas atenuadas o inactivadas basadas en la cepa CV777 se han desarrollado desde 1994, estas fueron utilizadas con éxito hasta el año 2010 cuando en China se reportó una nueva variante de alta virulencia, la cual afectó de forma considerable al sector, debido a la mortalidad generada en neonatos (50-100 %), esta cepa fue encontrada en granjas donde se utilizaban vacunas inactivadas (Lin, *et al.*, 2016). Al realizar el análisis de las secuencias, se determinó la presencia de dos inserciones en el gen S del virus en la nueva variante.

En abril del 2013, DEP fue reportada en Estados Unidos (Gimenez-Lirola, *et al.*, 2017) (USA/Colorado/2013) diseminándose rápidamente por todo el país, generando 95 % de mortalidad en animales lactantes; el origen exacto y la ruta de ingreso del virus no se conocen, sin embargo al realizar análisis filogenéticos se demostró que la cepa causante de

este brote se encuentra relacionada con los aislamientos chinos antes mencionados (Leidenberger, *et al.*, 2017).

Las cepas emergentes se encontraban diseminadas por México y Canadá en el 2014 (Lin, *et al.*, 2016), en este mismo año se reportaron dos variantes OH851 y CH/HBQX/10 en US y China respectivamente, en ellas se encontraron tres deleciones y una inserción en el gen S en comparación con las secuencias prototipo circulantes en Norte América, pero similares a las cepas clásicas (Lin, *et al.*, 2016). Estas cepas se caracterizan por una disminución en la severidad de los signos y menor mortalidad, genéricamente son denominadas cepas S-INDEL, mismas que posteriormente se han encontrado distribuidas por Europa.

El vDEP presenta alta variabilidad, aunado a esta condición puede existir recombinación entre algunas cepas que puede ser clásica y virulenta, virulenta y S-INDEL (Lin, *et al.*, 2016).

Actualmente, la DEP es considerada una enfermedad emergente y re-emergente por la capacidad que tiene de producir rebrotes, esto indica que el virus puede superar los protocolos de vacunación, sistemas de control y la bioseguridad, además del riesgo potencial de la entrada de múltiples cepas a la producción porcícola (Jung y Saif, 2015).

1.2 Agente etiológico

1.2.1 Clasificación taxonómica

El virus de la diarrea epidémica porcina (vDEP), es un virus envuelto tipo ARN monocatenario en sentido positivo, pertenece a la familia *Coronaviridae*, género *Alphacoronavirus*, orden *Nidovirales* (Gimenez-Lirola, *et al.*, 2017). Este agente se clasifica en el grupo IV de Baltimore, por su origen se determinaron 3 genogrupos diferentes (Lara-Romero, *et al.*, 2017):

- Cepas G1 clásicas: G1a (cepas de campo), G1b (cepas vacunales).
- Cepas G2 pandémicas: G2a (cepas asiáticas a partir de 2010), G2b (cepas americanas).
- Cepas S-INDEL (cepas variantes).

1.2.2 Características estructurales

El virión es esférico y pleomórfico, su diámetro varía de 95-190 nm con proyecciones conformadas por trímeros de la proteína S del virus, cuya longitud es de 18-23 nm. En su estructura se distinguen 4 proteínas: *Spike*, envoltura, matriz y nucleocápside (Lee, 2015).

1.2.3 Organización del genoma

El genoma completo del virus es de 28 Kb, y se encuentra dividido de la siguiente forma: 5'UTR, ORF1a, ORF1b, S, ORF3, E, M, N, 3'UTR (Song y Park, 2012). Dos tercios se encuentran abarcados por ORF1a y ORF1b. Cada gen codifica para una proteína específica que a continuación se mencionan (Lee, 2015).

ORF1a: replicasa 1^a, cuya función es la síntesis de ARN viral.

ORF1b: poliproteína 1a y 1ab, que posteriormente serán escindidas para formar 16 proteínas no estructurales (pns) que conformarán el complejo de replicación y transcripción.

S: *spike* (150-220 kDa), glicoproteína transmembranal tipo 1 cuya función es la unión al receptor celular, la fusión viral y la inducción de anticuerpos neutralizantes. La secuencia de este gen es de especial importancia debido a la gran tasa de modificaciones que posee, estas se encuentran relacionadas con la virulencia y evolución de cada cepa. La proteína se conforma de 1383-1386 aminoácidos (aa) y se divide en dos sitios: S1 (1-789aa) que reconoce el receptor celular y S2 relacionada con la fusión del virión a la célula (790-1383aa) (Chen, *et al.*, 2016 A), el primer sitio contiene un dominio N-terminal (NTD) y un C-terminal (CTD), siendo el NTD dónde se han encontrado variaciones entre cepas clásicas y emergentes incluyendo S-INDEL, se ha sugerido que una mutación de los aminoácidos localizada en esta región puede afectar la afinidad al receptor celular (Deng, *et al.*, 2016).

Este gen posee 4 epítomos neutralizantes: COE (499-638 aa), SS2 (748-755aa), SS6 (764-771), 2C10 (1368-1374) (Lara-Romero, *et al.*, 2017; Song y Park, 2012). El primero es el más variable (Lin, *et al.*, 2016).

ORF3: gen accesorio que codifica para un canal de iones, puede prolongar la fase S del ciclo celular, facilita la formación de vesículas y regula la producción de

viriones (Chen, *et al.*, 2016 A). Este gen puede ser utilizado para diferenciar entre cepas de campo y cepas vacunales atenuadas.

E: envoltura (7 kDa), involucrada en la liberación de la partícula viral, además de inducir estrés al retículo endoplásmico de la célula, de igual forma favorece la producción de IL6 e IL8 (Sun, *et al.*, 2017 A).

M: matriz (20-30 kDa), es la proteína más abundante en la envoltura del virión, capaz de estimular la producción de anticuerpos neutralizantes.

N: nucleocápside (58 kDa), genera estrés celular, protege al genoma, antagoniza la producción de IFN y activa al NF- κ B (Lee, 2015). Es una proteína altamente conservada entre cepas y es la que se expresa de forma más abundante en la célula infectada (Okda, *et al.*, 2015).

1.3 Transmisión

La transmisión del vDEP se da principalmente por vía fecal-oral, pero el alimento contaminado o los ingredientes de la dieta pueden ser el vehículo, aunque también se ha reportado transmisión por aerosol (Lin, *et al.*, 2016; Lin, *et al.*, 2015 B).

El vDEP puede ingresar a las granjas mediante camiones que pueden ir contaminados con heces o vómito de animales afectados. Adicionalmente las personas, aves o fauna nociva pueden diseminar el virus por las instalaciones de granjas de producción porcina (Lee, 2015).

Después de la aparición de un brote, el virus puede permanecer en las instalaciones a causa de una higiene inadecuada o por animales persistentemente infectados, como los cerdos en las etapas de destete a engorda. Existe un posible reservorio que pueden ser cerdos adultos con una infección subclínica (Jung y Saif, 2015).

1.4 Ciclo de replicación

El receptor del vDEP es la aminopeptidasa N porcina (1) (glicoproteína transmembranal de 150 kDa), misma que se encuentra en la superficie del enterocito (Jung y Saif, 2015). La proteína S debe ser activada por una escisión proteolítica que producirá dos subunidades que originarán al péptido señal encontrado en S1 y a la proteína de fusión en S2, así el CTD de la proteína interactúa con la aminopeptidasa (2) (Teeravechyan, *et al.*, 2016).

El virión penetra a la célula liberando su genoma hacia el citoplasma (3), inmediatamente es traducido por los ribosomas para producir las replicasas pp1a y pp1ab (4), estas poliproteínas son escindidas en 16 pns que conforman el complejo de replicación y transcripción (CRT) (5).

El CRT sintetiza una cadena de ARN en sentido negativo, posteriormente se realiza la cadena en el sentido positivo (6).

Las proteínas S, E y M traducidas (7) son insertadas en el retículo endoplásmico y ancladas en el aparato de Golgi (AG) (8). La proteína N interactúa con el nuevo ARN sintetizado para formar el complejo ribonucleocápside de forma helicoidal y así proteger el ácido nucleico.

El virión es ensamblado en el compartimiento intermedio del retículo endoplásmico y AG mediante gemación (9), por medio de una vesícula adquirida de este organelo. La liberación se da mediante exocitosis (10) al fusionar la vesícula con la membrana plasmática (Lee, 2015). El esquema del ciclo de replicación se presenta en la Figura 1.

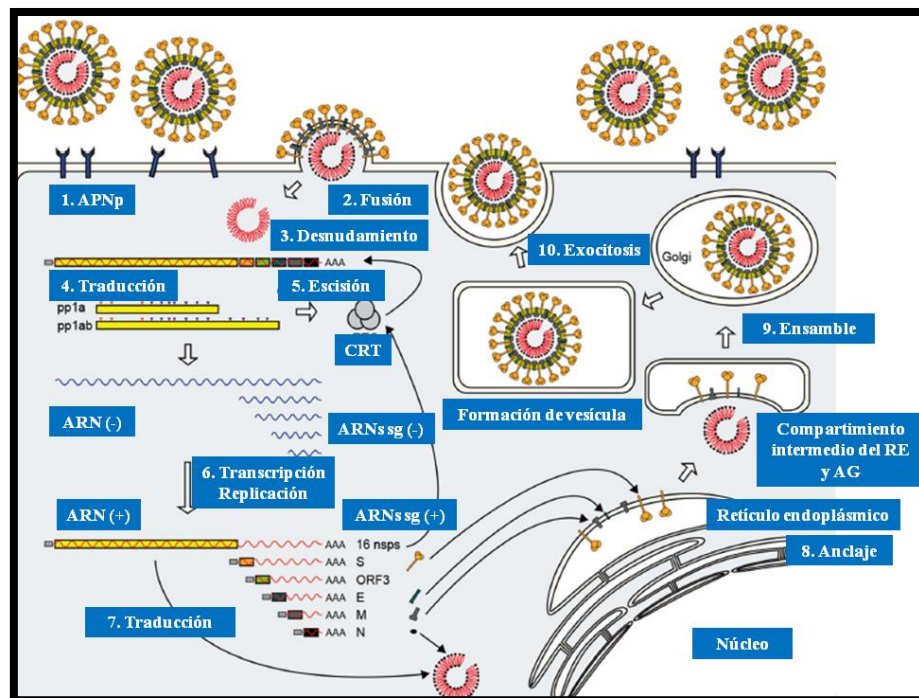


Figura 1. Esquema representativo del ciclo de replicación del vDEP (Modificado de Lee, 2015).

1.5 Patogenia

El tropismo primordial del virus es en intestino delgado, especialmente yeyuno e íleon, secciones que son las más afectadas, incluso el ciego y colon pueden ser susceptibles (Lin, *et al.*, 2016).

El periodo de incubación es de horas a dos días, pero varía por cepa y por grupo de edad afectado (Diel, *et al.*, 2016).

La DEP afecta animales de todas las edades, alcanzado una morbilidad de 100 %. El tiempo que tarda en existir una recuperación de los signos es de tres a cuatro semanas (Lee, 2015).

En animales de destete y engorda, la enfermedad es autolimitante en aproximadamente cinco a diez días (Jung y Saif, 2015), aunque el virus afecta el crecimiento de los cerdos, generando menor ganancia de peso diaria.

Con la replicación se destruye el enterocito generando atrofia, esto se ve reflejado en la reducción de la actividad enzimática del intestino delgado que interrumpe la digestión y absorción de nutrientes y electrolitos causando diarrea por mal absorción, lo que finaliza en la deshidratación fatal en los lechones. Al examinar los enterocitos mediante microscopía electrónica se observa una rápida degeneración de la mitocondria que conlleva a la disminución en el transporte de energía necesaria para la absorción. La diarrea por este virus tiene un pH ácido, esto es consecuencia del descenso de las enzimas digestivas tales como lactasa, sacarasa, maltasa, fosfatasa alcalina que se encuentran en el borde de la membrana de las vellosidades intestinales (Jung y Saif, 2015).

El mecanismo mediante el cual el vDEP produce vómito no se conoce. La enfermedad presenta similitud con la gastroenteritis transmisible, los neonatos padecen hipernatremia, hipercalemia, hipercloremia e hipocalcemia, además de bajos niveles de bicarbonato.

El motivo por el cual, los lechones lactantes son los más afectados reside en la baja capacidad que poseen para reemplazar los enterocitos dañados, a diferencia de animales de mayor edad; por ello la severidad de la enfermedad es inversamente proporcional a la edad de los cerdos (Jung y Saif, 2015). Thomas, *et al.* (2015) describen otros factores que podrían estar contribuyendo en la susceptibilidad de los neonatos frente al vDEP: sistema inmunológico inmaduro (bajos niveles de IFN α y células fagocitarias), mayor vulnerabilidad a la deshidratación y desbalance electrolítico, mayor cantidad de enterocitos

permisivos. Lin, *et al.* (2015 B) adicionalmente mencionan una mayor expresión de aminopeptidasa N porcina en los animales menores de una semana de vida.

1.6 Signos y lesiones

La infección en lechones menores a siete días de vida causa diarrea líquida, vómito por tres a cuatro días, seguido de deshidratación y desbalance electrolítico que finaliza en la muerte de los animales, además de la prolongada excreción del virus en las heces (Poonsuk, *et al.*, 2016 A). Las lesiones se centran en el tracto gastrointestinal, caracterizado por distensión estomacal causada por la acumulación de leche sin digerir, se observa adelgazamiento de las paredes intestinales y en el lumen un fluido amarillento (Lee, 2015). De igual forma los vasos mesentéricos se encuentran congestionados y los linfonodos de esta región se observan edematosos.

Las lesiones microscópicas se detectan con histología, se observa atrofia difusa y severa de las vellosidades intestinales, vacuolización en el enterocito, edema subepitelial en ciego y colon e infiltración de células inflamatorias en la lámina propia del intestino (Jung y Saif, 2015).

En animales de mayor edad se observa diarrea severa, vómito y anorexia.

1.7 Diagnóstico

El vDEP no es el único coronavirus entérico que afecta a los cerdos, adicionalmente existen otros tres que han sido descritos: vGET, Deltacoronavirus porcino (DCoV) y recientemente el Síndrome de Diarrea Aguda Porcina que emergió por una recombinación entre vGET y vDEP. Los dos últimos son considerados más virulentos que el DCoV pero clínicamente e histopatológicamente son indistinguibles (Lin, *et al.*, 2016; Gimenez-Lirola, *et al.*, 2016; Mesonero-Escuredo *et al.*, 2018), por ello el diagnóstico no puede basarse en la historia clínica ni en lesiones observadas.

1.7.1 Análisis virológicos

Los análisis virológicos se basan en la detección del virus, sus ácidos nucleicos o proteínas estructurales.

Aislamiento viral.

La línea celular Vero (riñón de mono verde) es la más utilizada para la propagación del vDEP, el efecto citopático (ECP) causado es la fusión de células resultando en la formación de sincitios (Park, *et al.*, 2011 A), vacuolización y desprendimiento de células, la replicación del virus se ha confirmado por medio de inmunofluorescencia o RT-PCR.

Para el aislamiento se requiere el uso de tripsina o alguna enzima proteolítica, que se adicionan al medio de cultivo, estas enzimas son necesarias para la escisión de la proteína S en sus dos subunidades y para que el virión pueda anclarse con el receptor celular y así fusionarse con la membrana plasmática.

Las muestras de campo obtenidas en algunos estudios han positivas a vDEP por medio de RT-PCR y al realizar el aislamiento, el virus no se replica, con ello se concluye que se requieren cultivos primarios de células epiteliales intestinales o líneas celulares que expresen la aminopeptidasa N en mayor abundancia (Diel, *et al.*, 2016).

Inmunofluorescencia.

La técnica de inmunofluorescencia ha sido empleada para detectar los antígenos del virus en cultivo celular infectado o en cortes de tejido intestinal. El fundamento de este ensayo es mediante inmunodetección de antígenos intracelulares utilizando un anticuerpo conjugado con un fluorocromo, la fluorescencia emitida se visualiza en el citoplasma de las células utilizando un microscopio para este fin. De igual forma, el antígeno es detectado en células intestinales en diferentes etapas de la infección (Diel, *et al.*, 2016).

Inmunohistoquímica.

Las muestras analizadas con inmunohistoquímica son fijadas con formalina y embebidas en parafina, lo que permite la conservación. Se ha utilizado esta prueba para la detección de antígeno en tejido intestinal, es un ensayo enzimático en el cual se utiliza un anticuerpo específico contra el virus que es reconocido por un segundo anticuerpo marcado con una enzima, la reacción es visualizada al adicionar el sustrato (Diel, *et al.*, 2016).

ELISA de captura.

La ELISA de captura se utiliza para la detección de antígeno en las heces de los animales infectados, mediante el empleo de anticuerpos específicos de captura en la fase sólida, la muestra fecal se incuba permitiendo el reconocimiento, la reacción es visualizada al agregar un conjugado seguido de su sustrato. La prueba se puede ver afectada por las condiciones

de almacenamiento de la muestra o errores al momento de su toma, además no se puede detectar durante el periodo de incubación (Diel, *et al.*, 2016).

RT-PCR.

La RT-PCR es una prueba de diagnóstico molecular que detecta el ARN del vDEP. El resultado de la prueba puede obtenerse a las 24 horas de recibir la muestra, esto permite la implementación de medidas de control para reducir el riesgo de diseminación del virus. Las muestras que pueden ser utilizadas son: heces, hisopados rectales o intestino de animales infectados, además de fluidos orales. Es un ensayo que presenta alta sensibilidad y especificidad (Diel, *et al.*, 2016).

Para el diseño de los iniciadores se deben seleccionar regiones del genoma del virus que permitan detectar la mayoría de las cepas circulantes en el mundo (clásicas, pandémicas y S-INDEL), además de diferenciar de otros coronavirus.

La secuenciación del gen S ha sido útil para determinar el genotipo circulante, pero para el diagnóstico no es necesario.

Pruebas de inmunocromatografía (pruebas rápidas de campo).

Las técnicas mencionadas anteriormente se han empleado para el diagnóstico del virus, sin embargo el tiempo para obtener el resultado depende del entrenamiento de los técnicos y de la disponibilidad de equipo específico, además de los factores que influyen en la calidad de la muestra cuando se transporta a un laboratorio desde la granja donde existe el brote. Diversos laboratorios farmacéuticos han desarrollado kits de detección rápida con especificidad y sensibilidad altas para ser utilizados en las producciones porcinas, estos ensayos de inmunocromatografía son cualitativos y el resultado se obtiene en minutos (Kwang-Soo, *et al.*, 2017).

La muestra que se emplea para los kits son heces obtenidas mediante hisopado rectal, y algunos de ellos están diseñados para diferenciar con vGET y rotavirus. El hisopo se introduce en un diluyente incluido en el kit mezclando la materia orgánica por unos segundos, posteriormente con un gotero se obtiene una fase líquida que es colocada en el pozo destinado a la muestra (VDRG® PEDV Ag Rapid Kit).

1.7.2 Análisis serológicos

La importancia del desarrollo de ensayos serológicos radica en la detección de la infección, confirmación de una previa exposición y monitoreo de los niveles de inmunidad (Gimenez-

Lirola, *et al.*, 2017). Basados en la detección de anticuerpos generados ante la infección. Las muestras a utilizar son: suero, calostro, leche, heces y fluidos orales (Diel, *et al.*, 2016).

ELISA.

Se han desarrollado dos tipos de este ensayo para la detección de anticuerpos contra el vDEP.

- Indirecta: basada en virus completo o proteínas recombinantes (S, M y N) expresadas en bacterias, el antígeno es fijado en placas de poliestireno e incubado con un suero problema, la reacción es revelada utilizando un conjugado y un sustrato cromogénico
- Competitiva: se utilizan anticuerpos monoclonales o policlonales, estos compiten con las inmunoglobulinas del suero por el antígeno fijado en el pozo. El revelado se realiza de la misma forma que para la técnica indirecta

Con este tipo de ensayos, se ha detectado IgG contra la proteína N del virus entre el 9-14 dpi (días postinfección) con un pico al día 21, al 43 aún se mantienen. El ELISA indirecto ha permitido utilizar fluidos orales para determinar la presencia de IgG e IgA, especialmente este último anticuerpo parece incrementar aproximadamente a los 100 dpi. En conclusión esta prueba es considerada una herramienta para evaluar la exposición al vDEP (Diel, *et al.*, 2016).

La desventaja de esto es la posible reacción cruzada al utilizar sueros de animales inmunizados con vacunas atenuadas causando baja especificidad; algunos grupos de trabajo han empleado estas proteínas recombinantes purificadas para el diagnóstico serológico pero para realizar la validación de estos ensayos se requiere cumplir con múltiples parámetros (Okda, *et al.*, 2015).

Inmunofluorescencia indirecta.

La técnica de inmunofluorescencia indirecta es utilizada para detectar anticuerpos y evaluar el estado inmunológico de la población en la piara. La línea celular que se emplea es la Vero con la finalidad de obtener antígeno y detectarlo con anticuerpos presentes en un suero problema procedente de animales sospechosos, si la muestra es positiva, las inmunoglobulinas se unen al epítipo en la fase sólida. Estos son visualizados con un microscopio de fluorescencia al utilizar un anti-anticuerpo de cerdo marcado con un fluorocromo, aquí es considerada como una técnica cualitativa.

Para determinar el título de anticuerpos (cuantitativa) se realizan diluciones seriadas del suero y la cantidad es expresada como el recíproco de la dilución más alta del suero en que la señal fluorescente es observada.

Con esta prueba, los anticuerpos anti-vDEP son detectados a los 7-14 dpi y los anticuerpos circulantes se mantienen hasta el día 43, a partir de este momento comienzan a declinar.

Existe discrepancia en su uso, ya que se reporta en un estudio que al emplear un suero hiperinmune contra la cepa de vGET Miller existió reactividad cruzada con cuatro cepas de vDEP al utilizar esta técnica, pero no fue capaz de neutralizar a este último (Diel, *et al.*, 2016).

Seroneutralización viral.

La seroneutralización se define como la reducción en la infectividad viral mediada por anticuerpos neutralizantes, estos bloquean uno o más pasos de la replicación del virus en la célula. La interpretación basándose en el ECP suele ser complicada debido a que la tripsina utilizada puede producir redondeamiento y desprendimiento de las células, en consecuencia, podría ser confundido este efecto, al igual que el efecto citotóxico que podría tener el suero (Lee, 2015). Los anticuerpos neutralizantes son detectados a partir del día 7-14 dpi y un alto título existe aún después de 6 meses ante infecciones naturales (Diel, *et al.*, 2016).

Esta técnica ha sido empleada para evaluar el nivel de inmunoglobulinas presentes en calostro y suero. Adicionalmente, este ensayo es capaz de discriminar entre cepas de vDEP y vGET (Diel, *et al.*, 2016).

Es una prueba altamente específica y útil para la determinación del título de anticuerpos, sin embargo es costosa y requiere de una persona capaz de interpretarla (Lee, 2015).

1.7.3 Diagnósticos diferenciales

La diarrea neonatal es uno de los signos clínicos más frecuentes en los cerdos jóvenes, incrementando significativamente la mortalidad en maternidad. El impacto de las enfermedades entéricas depende del agente causal y del animal *per se*, para implementar las medidas de control apropiadas se requiere un diagnóstico certero.

Los diagnósticos diferenciales de las enfermedades en neonatos (primera semana de vida) pueden ser causadas por bacterias o virus, ya sea por sí solas o en co-infección.

- Agentes virales: la rotavirosis causada por Rotavirus tipo A es la más común, aunque el tipo B y C también se encuentran ligadas, los agentes causales de la GET y la DEP son agentes etiológicos de importancia.
- Agentes bacterianos: *Escherichia coli* es la bacteria más importante como responsable de la enfermedad entérica, siendo el principal serotipo el enterotoxigénico (ETEC). *Clostridium perfringens* es otro patógeno de importancia dentro de las causas de diarrea, se clasifica en cinco grupos (A-E) basado en la producción de toxinas: alpha, beta, epsilon e iota (Mesonero-Escuredo, *et al.*, 2018).
- Agentes parasitarios: la coccidiosis causada por *Cystoisospora suis* produce diarrea en los lechones, se caracteriza por emaciación, diarrea y adelgazamiento de la pared intestinal. A la histopatología se observa atrofia de las vellosidades en yeyuno y también puede percibirse el parásito en el citoplasma del enterocito (Kanamori, *et al.*, 2018).

1.8 Prevención

La bioseguridad es una de las medidas más importantes para la prevención y control durante un brote, al minimizar el ingreso de material o personas que pudieron tener contacto con el virus. La restricción del movimiento de animales o personal de cada área es crucial para el control en la diseminación.

La desinfección de las instalaciones consta del lavado eficiente de la superficie en cuestión, el uso de un producto apropiado que inactive al agente y posteriormente se recomienda dejar secar en su totalidad. Además de realizar el monitoreo de los animales de nuevo ingreso para conocer su estado sanitario (Lee, 2015).

Mediante análisis filogenéticos y de aminoácidos de la proteína S, se ha determinado que las diferencias entre las cepas prototipo americanas y las S-INDEL residen en la región S1 (1-738aa), especialmente en el dominio N-terminal (1-390aa) mientras que el genoma restante es conservado entre las dos. La secuencia de proteínas que corresponde a los epítomos neutralizantes antes mencionados es conservada entre ambos tipos de cepas, lo que sugiere una neutralización cruzada, es decir, los anticuerpos generados contra una cepa virulenta deberían proteger contra una S-INDEL o viceversa (Chen, *et al.*, 2016 B y C; Lin, *et al.*, 2015 A).

Como estrategia alternativa se ha considerado en algunas granjas la exposición intencional de cerdas gestantes frente al virus mediante *Feedback* utilizando diarrea o macerado de intestinos de lechones infectados, con ello se trata de estimular la respuesta inmune lactogénica (Lee, 2015; Goede y Morrison, 2016). Existen diversas desventajas sobre el uso de esto, como es el riesgo de diseminar ciertos patógenos como PRRS o PCV2 o al desconocer el título de virus presente en el inóculo puede no generar anticuerpos suficientes para la protección de la camada (Lee, 2015; Clement, *et al.*, 2016). Al igual que las vacunas atenuadas, el *Feedback* puede no generar los anticuerpos deseados por razones similares: dosis viral baja, inactivación del virus por errores en condiciones de manejo y almacenamiento del inóculo, interferencia de inmunidad al existir previas inmunoglobulinas que bloqueen la replicación viral en el intestino de la cerda o una etapa de gestación inadecuada para la infección (Langel, *et al.*, 2016).

Las vacunas atenuadas o inactivadas de varias cepas se desarrollaron desde 1994, éstas fueron eficientes en Asia hasta la aparición de las nuevas cepas emergentes donde la protección fue parcial o nula (Lin, *et al.*, 2016). En México se encuentra disponible una vacuna inactivada basada en la cepa USA/Colorado/2013 (Lara-Romero, *et al.*, 2017). El uso de proteínas recombinantes como biológicos inmunogénicos ha cobrado importancia recientemente.

1.9 Situación nacional del vDEP

Mediante pruebas moleculares, se identificó que el virus empezó a circular en las zonas de importancia en la producción porcina como La Piedad, Michoacán y Degollado, Jalisco desde julio del 2013 (Herrera, 2014), pero fue hasta mayo del año siguiente cuando el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) reconoció que la enfermedad estaba presente en el país.

Las cepas del vDEP que se encuentran circulando en México han sido secuenciadas, encontrándose modificaciones al igual que las reportadas a nivel mundial, en muestras analizadas de diversos estados se detectaron cambios e inserciones en la región COE en comparación con la cepa de Colorado/2013. De igual forma, se obtuvieron dos cepas S-INDEL circulantes en México: PEDV/MEX/VER/01/2014 y PEDV/MEX/MICH/02/2015.

Con los análisis filogenéticos se determinó que en el país existen cepas pertenecientes a los genogrupos 2a y 2b (Lara-Romero, *et al.*, 2017).

Se han reportado cuatro presentaciones de la enfermedad (Herrera, 2014):

- Brote agudo de corta duración: el curso de la enfermedad dura de 4 a 6 semanas regresando a parámetros normales de la granja
- Brote de larga duración: mortalidad alta de cuatro a seis semanas, posteriormente se establece en 20 % alcanzado hasta 60 %. El brote se prolonga por veinte semanas con picos y declives
- Rebrote agudo con alta mortalidad: después de la recuperación de parámetros normales, se presenta un rebrote con mortalidad que va desde 50 a 70 %
- Rebrotos periódicos de baja mortalidad cada ocho y doce semanas o intermitentes: posterior a un brote de DEP, se presentan variaciones recurrentes en la mortalidad de 5 a 20 % por dos a tres semanas.

La pérdida económica calculada en un estudio con 700,000 cerdas en México en el 2014, fue de aproximadamente 80,152,671 dólares.

Según (Langel, *et al.*, 2016), la situación del vDEP en los hatos se puede clasificar en tres formas:

- Negativos: nunca infectados
- Activo: presencia de enfermedad y positivos mediante RT-PCR en la excreción del virus
- Estable: previo brote reportado, sin signos actual, no excretan virus y algunas o todas las cerdas con inmunidad.

La existencia de los rebrotos no se encuentra claramente explicada, ya que al ingresar el virus a la producción porcina se presume que todas las cerdas fueron infectadas, para asegurar esto se ha empleado el uso del *Feedback* con la finalidad de generar una respuesta inmune humoral capaz de ser transmitida mediante el calostro y leche. Sin embargo, al haber un rebrote es cuestionable, por qué si existe inmunidad, el virus puede afectar de nueva cuenta a los animales generando alto porcentaje de mortalidad y cuadros clínicos, allí la interrogante.

Durante los brotes agudos de DEP, la signología se ve reflejada en cerdos de todas las edades, pero los lechones que no reciben la suficiente inmunidad materna son los que

frecuentemente mueren. Posterior al brote, el virus puede ser eliminado o presentarse como una enfermedad enzoótica en las granjas, de ser así, afectará a los animales neonatos y lactantes, estos transmitirán el virus a las camadas siguientes que tengan baja o nula inmunidad lactogénica, esto sugiere que aquellos animales lactantes que no reciben los niveles suficientes de anticuerpos a través del calostro son más susceptibles a la enfermedad causando una circulación persistente en la granja (Park, *et al.*, 2011 B). Goede, *et al.* (2015) mencionan que poco se conoce acerca de la duración de la inmunidad en los hatos expuestos al vDEP y esto podría estar relacionado con la aparición de los rebrotes en poblaciones porcinas afectadas previamente.

1.10 Inmunidad

Los cerdos recién nacidos son agammaglobulinemicos debido al limitado número de células linfoides, al poco desarrollo de tejido linfoide y ausencia de células de memoria o efectoras. Las secreciones mamarias contienen una cantidad significativa de células del sistema inmune, este número se ve reflejado ante el desarrollo fisiológico e inmunológico que tiene la glándula mamaria de la hembra. Ante la ingesta de calostro los linfocitos transmitidos pasivamente pueden cruzar el epitelio intestinal del neonato para migrar a linfonodos mesentéricos, hígado, bazo, pulmón, lámina propia de duodeno y yeyuno (Poonsuk, *et al.*, 2016 B).

Las inmunoglobulinas transmitidas protegen a los animales desde su nacimiento hasta que su sistema inmune madura, la IgG predomina en calostro, mientras que el isotipo IgA en leche (Clement, *et al.*, 2016). La acumulación de linfocitos en la glándula mamaria difiere entre cerdas primerizas y múltiparas, debido a que las segundas tienen mayor tejido dónde almacenar células plasmáticas (Poonsuk, *et al.*, 2016 B).

Los anticuerpos son esenciales para la protección de los neonatos, particularmente mediante la transmisión de inmunidad a través del calostro ingerido por los animales, estas inmunoglobulinas deben ser capaces de neutralizar al vDEP (Song, *et al.*, 2016; Park, *et al.*, 2011 B).

El uso de vacunas atenuadas ha sido discutido por dos motivos: su eficacia y la evidencia que sugiere la recombinación de cepas vacunales con cepas de campo, un ejemplo de esto es un estudio realizado en China en el que se determinó que la cepa CH/GSJIII/07(campo)

se encuentra estrechamente relacionada con dos cepas vacunales, esto sugiere que este tipo de inmunógenos pueden modificarse en una forma infecciosa en campo (Song y Park, 2012), una situación similar es reportada por Lin, *et al.* (2016) con la cepa CH/HNQX-3/14. La variabilidad que existe en la proteína S afecta la virulencia de la cepa y se piensa que al contener los epítomos neutralizantes puede generar una limitación ante la protección cruzada que pudiera existir (Choudhury, *et al.*, 2016).

Las cerdas en gestación han sido expuestas al *Feedback*, con la finalidad de estimular la inmunidad lactogénica, sin embargo el contenido intestinal no es homogéneo en cuanto a la cantidad de virus, por ello una infección uniforme es inconsistente. En consecuencia, se sugiere evaluar la cantidad de IgA en calostro y leche para determinar si la inmunidad pasiva es adecuada para los lechones recién nacidos (Gerber, *et al.*, 2014).

Si la cerda se infecta a pocos días previos al parto, se determina que no genera la suficiente inmunidad para proteger a la camada vía calostro, en consecuencia los lechones se infectan y la excreción viral incrementa. En los cerdos lactantes se ha reportado la detección de anticuerpos propios hasta la tercera semana de vida y permanece hasta los 60-100 días de vida, incluso hasta los 145 días (Bertasio, *et al.*, 2016).

Ouyang, *et al.* (2015) detectaron presencia de IgA en plasma de cerdas infectadas hasta seis meses posteriores, mediante seroneutralización se determinó que aún transcurrido este tiempo, la inmunidad permaneció alta en esa muestra.

Los neonatos son protegidos por IgG específica hasta el día 4-13 de vida transmitida por calostro y leche de la cerda. Después de la infección intestinal de la cerda, las células que producen IgA migran a glándula mamaria, donde secretan este anticuerpo en el calostro y en la leche y con ello IgA, la cual llega al lumen intestinal. El calostro contiene aproximadamente 60 % de IgG (Poonsuk, *et al.*, 2016 B) y protege de infecciones sistémicas (Langel, *et al.*, 2016), sin embargo el anticuerpo más eficiente para la neutralización del vDEP es la IgA, además de ser más resistente a la degradación proteolítica por el factor inhibidor de tripsina contenido en las secreciones mamarias (Paudel, *et al.*, 2014; Poonsuk, *et al.*, 2016 B), este anticuerpo provee inmunidad local en el tracto gastrointestinal del lechón (Langel, *et al.*, 2016).

Goede, *et al.* (2015) reportan que las cerdas infectadas naturalmente por una cepa S-INDEL, siete meses posteriores fueron inoculadas con una cepa virulenta,

aproximadamente al día 109 de gestación, generaron inmunidad lactogénica y al desafiar a los lechones con esa cepa existió protección parcial. Con ese estudio se demostró que las hembras infectadas naturalmente son capaces de producir inmunidad lactogénica, sin embargo la protección de los lechones puede no ser completa, ya que existen diversas variantes que pueden influir (Langel, *et al.*, 2016).

Se ha observado que la exposición de una cerda ante el virus, reduce el impacto sobre los neonatos debido a los mecanismos de inmunidad materna, por ello se postula que IgA e IgG contenidos en leche y calostro son necesarios para la protección de los lechones. Se determinó que la infección oral de un animal genera mayor cantidad de IgA en el tejido mamario (Poonsuk, *et al.*, 2016 B).

Los anticuerpos maternos de cerdas infectadas con vDEP son indispensables para la supervivencia del lechón, la actividad neutralizante del calostro es mayor a la de la leche y suero (Song, *et al.*, 2016; Diel, *et al.*, 2016). Langel, *et al.* (2016) mencionan que no existe correlación entre el nivel de IgG en el suero de la cerda y la cantidad de este en las secreciones procedentes de la glándula mamaria.

2. JUSTIFICACIÓN

La diarrea epidémica porcina es una enfermedad altamente contagiosa que afecta a cerdos de todas las edades, especialmente a los lechones menores de una semana de vida causando mortalidad del 90-100 % por cepas virulentas y de 0-75 % por cepas S-INDEL. Los signos presentados en los animales son: diarrea, vómito, anorexia y deshidratación severa, siendo esta última la causa de muerte.

Posterior a la presentación de un brote en granja se asume que las cerdas generarán inmunidad, la cual será transferida a la camada mediante el calostro protegiendo a los lechones de la infección, sin embargo existe evidencia de la aparición de rebrotes en las producciones porcícolas.

La existencia de los rebrotes en las granjas no está claramente explicada, las suposiciones se encuentran relacionadas con la inmunidad o directamente con la cepa viral, por ello es importante conocer las razones del porqué, si existe inmunidad ante la primera exposición, el virus vuelve a afectar a los animales.

3. HIPÓTESIS

Las cerdas expuestas por primera vez al vDEP generarán inmunidad y se conservará hasta su siguiente parto, permitiendo la transferencia de anticuerpos a las dos camadas producidas, evitando así, la aparición de un rebrote aun cuando la cepa del virus que circule en ese momento sea diferente a la cepa original. Las cerdas dejarán de excretar virus hacia el segundo parto y por lo tanto sus lechones no serán infectados, adicionalmente los parámetros de eficiencia productiva no se verán afectados.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Realizar el monitoreo en granja de la infección del virus de diarrea epidémica porcina durante un brote activo y un posible rebrote en cerdas reproductoras y sus camadas empleando técnicas serológicas y moleculares.

4.2 Objetivos particulares

1. Realizar el diagnóstico del vDEP durante un brote activo en una granja para confirmar la presencia del agente viral.
2. Recabar información acerca de los parámetros productivos y reproductivos antes, durante y después del brote para determinar si la enfermedad se refleja en estos.
3. Determinar y cuantificar la excreción viral en diferentes momentos de muestreo, de cerdas reproductoras y sus camadas hasta el destete para conocer su comportamiento.
4. Detectar la presencia de anticuerpos en calostro de hembras y suero de cerdas y lechones.
5. Detectar la presencia de anticuerpos neutralizantes en suero de cerdas y lechones.
6. Realizar seguimiento al parto consecutivo para determinar diferencia en inmunidad y excreción del virus empleando la misma metodología usada durante el brote.
7. Amplificar y secuenciar una región parcial del gen S del virus a partir de muestras de las dos etapas de muestreo para detectar variaciones y realizar análisis filogenéticos de las cepas circulantes.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo de campo se realizó en una granja porcina ubicada en el Estado de México, el procesamiento de las muestras en el laboratorio de Virología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

5.1 Información del brote en granja

La información general de la granja se encuentra descrita en el Cuadro 1. El brote de DEP se registró el 1 de agosto del 2017. No se tenía historia de brotes previos de DEP, ni se implementaba ninguna vacuna para este virus. A partir del cuadro clínico, se implementó la vacunación contra vDEP (Zoetis® virus inactivado) en las cerdas gestantes que se encontraban a tres semanas del parto por recomendación del fabricante, esto a partir del día 31 del mismo mes.

El brote inició con un macho celador que presentó diarrea, vómito y apatía. Se administró enrofloxacina, sin embargo, la diarrea se presentó por tres días más y el apetito se recuperó hasta la semana siguiente. A los dos días algunas hembras de primer parto tuvieron los mismos signos, hasta que todas ellas dejaron de comer. Se trataron con enrofloxacina y gentamicina. Seis días después, las cerdas recuperaron el apetito, pero demuestran rechazo al alimento ofrecido (sorgo), al día siguiente, las hembras de segundo parto alojadas frente a las de primer parto inician con anorexia y vómito.

Debido al rechazo por el alimento, se envió una muestra al laboratorio, por humedad se decide cambiar el sorgo por maíz.

A los doce días iniciado el brote, 50 % de las cerdas alojadas frente a las sementaleras presentaron los mismos signos ya descritos anteriormente. Tres días después se detecta la muerte de un lechón de cinco días de vida. Las hembras de reemplazo gestantes padecieron anorexia, una de ellas abortó a los 70-80 días de gestación.

Se mencionó que algunas cerdas presentaron diarrea a los cinco días antes de su parto, el resto de ellas al subir a jaula de maternidad iniciaron con este cuadro clínico, sus camadas fueron las más afectadas; algunas hembras presentaron vómito. En la Figura 2 y 3 se muestran los signos observados durante la visita a la granja, en animales de todas las edades.

Algunos lechones de 23 días de edad tuvieron vómito y diarrea pastosa, animales de 40 días de edad iniciaron con diarrea. La mortandad fue de 24 % en animales de 1-10 días de edad. A los 22 días se realizó el diagnóstico confirmatorio de vDEP. Se implementaron ciertas medidas estrictas de desinfección de las instalaciones, además de uso de cal en pasillos, paredes y piso de casetas, al igual que uso de antibióticos como colistina y bacitracina en alimento para evitar co-infecciones bacterianas (Cuadro 2 y Figura 4).

Cuadro 1. Información general de granja analizada.

Información zootécnica	Granja
Número de vientres	240
Tipo de granja	Multisitios: Sitio 1
Planificación partos	23 hembras/15 días
Barda perimetral	Si
Presencia de otras especies	Si
Distancia a granja más cercana	12 km
Ingreso personas externas	No
Ingreso vehículos	Si
Desinfección vehículos	Si
Vados en cada área	Si
Ducha al ingreso	No
Ducha a la salida	Si
Limpieza y desinfección de botas	Diariamente
Visita a otra granja	No
Medicación alimento	Si
Disposición excretas	Fosa
Disposición mortalidad	Fosa
Colibacilosis	Si
Historia GET	Si
Salmonelosis	Si
PRRS	Vacunación, estable
Fecha brote DEP	01-ago-17
Área inicio	Servicios y gestación
Fecha estabilidad de DEP	dic-17



Figura 2. Signología observada en cerdos destetados y hembras del área de servicios y gestación. **A.** Cerda gestante con diarrea acuosa **B.** Cerda con anorexia **C.** Cerda destetada recostada en heces acuosas color grisáceo **D.** Cerdo destetado con diarrea amarillenta en zona perianal **E.** Piso de destete sucio por diarrea **F.** Cerdos en destete con pérdida de peso se observan animales de diferentes tamaños.



Figura 3. Signología observada en sala de maternidad. **A.** Lechones sucios y con baja condición corporal **B.** Animales lactantes recostados sobre su madre en busca de una fuente de calor **C.** Lechones hipotérmicos y tapete manchado con diarrea **D.** Jaula de maternidad sucia de heces acuosas color grisáceo **E.** Piso sucio **F.** Tapetes antiderrapantes de maternidad con diarrea blanquecina originada por el consumo de leche de neonatos.

Cuadro 2. Medidas implementadas después del brote de DEP.

Medidas implementadas ante DEP	Granja
Tratamientos animales	
Antibióticos en agua	Si
Antibióticos inyectados	Si
Hidratación lechones	No
Administración calostro a neonatos	Si
Cambios en maternidad	
Restricción movimiento del personal	Si
Desinfección con cloro	Si
Uso desinfectante comercial	Si
Ropa exclusiva	Si
Restricción en adopciones y donaciones	No
Encalamiento	Si
Descanso instalaciones	Si
Cambios en otras áreas	
Restricción movimiento del personal	Si
Desinfección	Si
Ropa exclusiva	Si



Figura 4. Medidas de desinfección implementadas en la granja y en sala de maternidad. **A-C** En las imágenes se observa el uso de cal en pisos, paredes y como vado sanitario en la entrada a la caseta de maternidad. **D.** Personal de granja desinfectando la entrada a maternidad.

5.2 Colección de datos de producción, parámetros reproductivos

Se obtuvo la información acerca de algunos parámetros con la finalidad de determinar si estos fueron afectados con el brote de DEP, de la misma forma al siguiente ciclo productivo individual de cada cerda.

Se registró el comportamiento productivo de la camada al nacimiento, camada al destete y post-destete de la hembra, aunque solo los datos resaltados se analizaron.

- Al nacimiento: lechones nacidos totales, lechones nacidos vivos, lechones nacidos muertos
- Al destete: **mortalidad durante la lactancia**, duración de ésta, **lechones destetados**, **peso al destete** y peso ajustado a 21 días
- Post-destete: **días destete a primer servicio**, días destete a concepción, número de servicios dados

Al siguiente parto, se registró solamente el comportamiento de las camadas.

Para comparar estos parámetros, se asignó un grupo testigo conformado por las mismas cerdas del estudio un parto antes del brote.

5.3 Toma y procesamiento de muestras

Las muestras fueron colectadas durante un brote activo en una granja localizada en el Estado de México.

Cerdas: se seleccionaron 8 cerdas en gestación con tres semanas antes del parto (muestreo 1) y se procedió a la toma de muestra de sangre por vía yugular con aguja 20G en tubos vacutainer sin anticoagulante para la obtención de suero. Se centrifugó a 2500 rpm por 15 minutos, se realizaron alícuotas de forma estéril en una cabina de seguridad biológica y se almacenaron a -20 °C. Este procedimiento se repitió al día uno posparto (muestreo 2), a los 14 días (muestreo 3) y al momento de destete (muestreo 4), estos cuatro muestreos realizados durante el brote se agruparon como etapa 1.

Adicionalmente, se tomaron hisopados rectales de las cerdas y fueron colocados en microtubos con 1 mL de PBS estéril, se mantuvieron en congelación hasta la llegada al laboratorio, dónde posteriormente se almacenaron a -70 °C. Esto fue realizado en los cuatro muestreos descritos anteriormente.

Al momento del parto se colectó 10 mL de calostro en tubos Falcon y la muestra fue almacenada a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento (Figura 5). En este momento se añadieron tres cerdas a la población del muestreo.

Lechones: se extrajo sangre de cordón umbilical de todos los lechones nacidos realizando un pool para después obtener el suero. Se seleccionaron cinco lechones por camada para la toma de muestra de hisopado rectal, el cual se realizó al día de nacidos y a los 14 días y, para el destete se consideraron sólo tres animales. Adicionalmente se colectó una muestra sanguínea al momento del destete (Figura 6).

Estos mismos procedimientos se repitieron al siguiente parto (etapa 2). En la Figura 7 se observa la toma de las múltiples muestras.

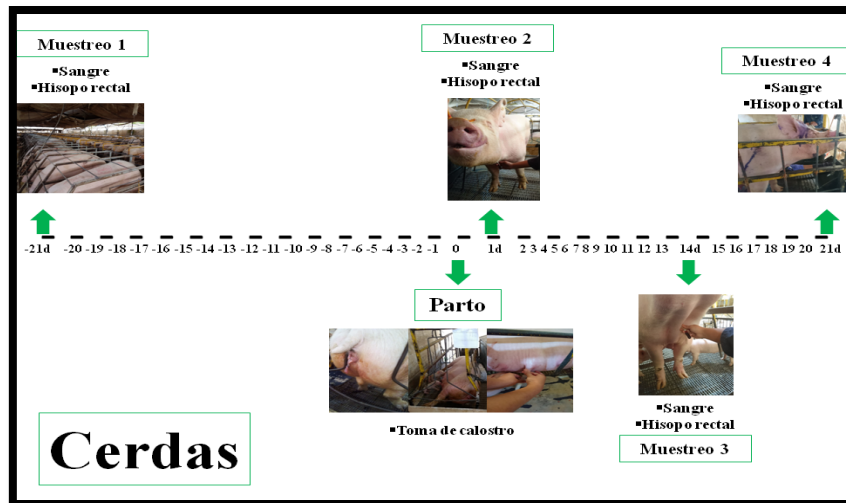


Figura 5. Muestreo en cerdas evaluadas

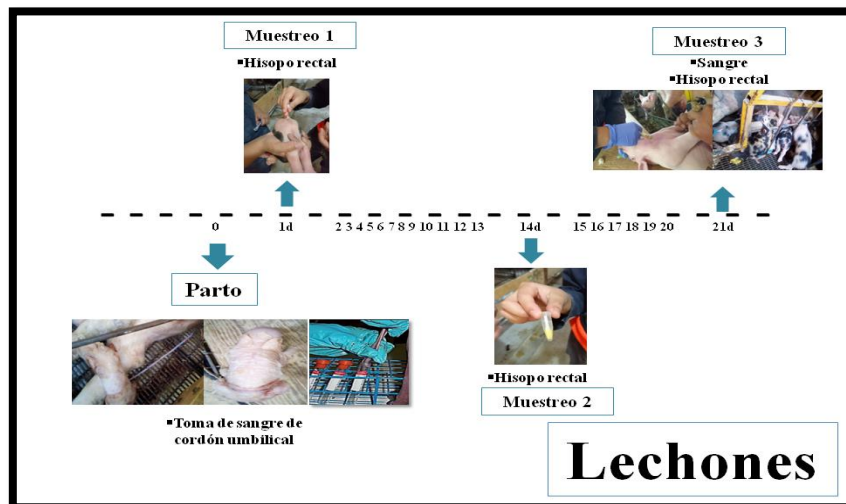


Figura 6. Muestreo en lechones



Figura 7. Toma de muestras en cerdas y lechones. **A-B** Sangrado de lechones al momento del destete **C- D.** Toma de muestra sanguínea de cerdas en lactancia **E.** Colecta de calostro directo del pezón al momento del parto **F.** Toma de hisopo rectal en lechones al día de nacidos

5.4 Extracción de RNA

El paquete comercial de RNeasy Mini Kit® (Qiagen) fue utilizado para la extracción de RNA total en la muestra de hisopado, para ello se siguieron las indicaciones del fabricante. Se implementó el uso de β -mercaptoetanol como lo sugiere el instructivo.

5.5 RT-PCR dúplex en tiempo real

Esta prueba se realizó para las primeras ocho muestras con la finalidad de discriminar entre cepas variantes y virulentas, de acuerdo a lo reportado por (Wang *et al.*, 2014).

5.6 RT-PCR en tiempo real

Para realizar la RT-PCR se utilizó el kit comercial TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix® con un volumen de reacción final de 20 μ L, empleando 2 μ L de ARN. Al finalizar el muestreo se obtuvieron un total de 330 muestras.

5.6.1 Iniciadores y sonda

Los oligonucleótidos empleados fueron los reportados por (Martínez-Puebla, *et al.*, 2017), se diseñaron con base en la posición 2225-2327nt del gen S, la cual es una región altamente conservada entre cepas variantes y virulentas.

5.6.2 Condiciones de amplificación

Se utilizó el termociclador CFX96 Real Time System BioRad® para la realización de la RT-PCR, en el Cuadro 3 se presentan las condiciones del programa de amplificación.

Cuadro 3. Condiciones para la amplificación de una región del gen S.

Temperatura	Tiempo
50 °C	5 minutos
95 °C	20 segundos
95 °C	15 segundos
60 °C	1 minuto

Para determinar el valor de cuantificación (Cq) se utilizó el software Bio-Rad CFX Manager™ versión 3.1 y se empleó una curva patrón para cuantificar la carga viral en cada muestra. Al final se obtuvo el número de equivalentes genómicos por mL de muestra (expresado en Log₁₀).

5.7 Aislamiento viral

Para realizar la prueba de seroneutralización, se requirió aislar el vDEP causante del brote en la granja y obtener un lote viral suficiente para la determinación de anticuerpos neutralizantes en los sueros obtenidos de la granja, además de la titulación del virus para realizar la prueba.

5.7.1 Células

Se emplearon células Vero (riñón de mono verde africano) pase No. 138 para la replicación del virus. Para ello, se mantuvieron los cultivos celulares utilizando DMEM suplementado con el 5 % de suero fetal bovino.

5.7.2 Preparación inóculo

Se realizó el macerado de intestino delgado de un lechón lactante de 10 días de edad con signos clínicos agudos, obtenido durante el brote inicial en la granja. Se colocó 1 g del

órgano en un mortero y se procedió a macerar utilizando 10 mL de DMEM sin suero y se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, el sobrenadante obtenido fue filtrado con membranas estériles de nitrocelulosa con poro de 0.45 μm en el interior de un gabinete de seguridad biológica, se realizaron alícuotas en microtubos estériles y fueron almacenados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

5.7.3 Infección

Un día previo a la infección, se realizaron pases celulares con la finalidad de garantizar que la célula se encuentre en división y la replicación viral sea mayor.

Como medio de infección se empleó DMEM sin suero, adicionando 10 %TPB, gentamicina 1 mL/L y 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de pancreatina de acuerdo al protocolo descrito por (Horie, *et al.*, 2016). Este medio fue utilizado para la dilución del inóculo y para el mantenimiento de las células durante la infección.

Se empleó una botella de 25 cm^2 para la infección utilizando el inóculo diluido 1:10 en un volumen de 500 μL y se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos permitiendo la adsorción del virus, posteriormente se adicionaron 4.5 mL del medio de infección a la botella. A las 72 horas la botella fue congelada-descongelada (2 veces) para la lisis celular y por lo tanto liberación de viriones. Se realizó la extracción de ARN y qRT-PCR para determinar si el virus se replicó exitosamente. El sobrenadante obtenido fue empleado como inóculo para llevar a un segundo pase, el proceso fue el mismo que se describió antes, esto se realizó hasta obtener un cuarto pase, el último colectado a las 48 hpi. En todos los casos se destinó una botella como testigo negativo.

La cosecha del último pase fue reservado para ser utilizado en la seroneutralización.

5.7.4 Titulación viral

La titulación se realizó empleando una placa de 96 pozos para cultivo celular de la línea Vero, se hicieron diluciones decuples seriadas del virus con medio de infección iniciando de 10^1 hasta 10^8 , además de una dilución 1:2 como control testigo, todas las diluciones se analizaron con ocho repeticiones.

Para la inoculación se utilizaron 50 μL de cada dilución por pozo, además de dieciséis testigos en los cuales se adicionó únicamente medio de infección. La placa se incubó por una hora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ para permitir la adsorción, posteriormente se agregó 100 μL de medio sin suero por pozo.

La placa fue fijada a las 48 hpi con 70 μ L de cristal violeta por pozo con la finalidad de observar al microscopio el ECP. El título se obtuvo mediante el método de Reed y Muench (1938).

5.8 ELISA

El ensayo inmunoenzimático indirecto que se realizó fue basado en la metodología descrita por (Barrera, 2018). Se empleó una proteína recombinante de la nucleocápside del virus de DEP como antígeno (100 ng). Se bloqueó con leche semidescremada al 5 % y los lavados fueron realizados con PBS+Tween 0.05 %. Los sueros y calostros obtenidos del muestreo fueron evaluados para la detección de IgG utilizando una dilución 1:100. Como conjugado se utilizó un anti-IgG de cerdo marcado con HRP diluido 1:7500 y como solución reveladora TMB, para finalizar, ácido sulfúrico como solución de paro. La lectura se efectuó con un espectrofotómetro a una densidad óptica de 450 nm. Adicionalmente el procedimiento se ejecutó para la detección de IgA en el calostro, la única modificación fue el anticuerpo secundario.

5.9 Seroneutralización

La seroneutralización se define como la reducción de la infectividad del virus mediada por anticuerpos neutralizantes, estos se unen a los viriones bloqueando una o más etapas del ciclo de replicación (ingreso, unión con receptor celular, desnudamiento) o causando lisis de las partículas virales; con ello se reduce o neutraliza la infectividad (Diel, *et al.*, 2016). Se seleccionaron 33 sueros probados previamente por ELISA con densidades ópticas altas, medias y bajas con la finalidad de comprobar la presencia de anticuerpos neutralizantes. Estos fueron inactivados a 56 °C por 20 minutos.

Se utilizaron 1000 DICC 50 % (Poonsuk, *et al.*, 2016), esto fue ajustado de acuerdo al título viral obtenido y al volumen total a emplearse para la placa de 96 pozos. Se colocaron 50 μ L de DMEM sin suero en cada pozo, excepto para la primer dilución del suero en la cual el volumen final fue de 100 μ L. Se empleó un control positivo y negativo para cada placa, iniciando 1:160 y se realizaron diluciones dobles seriadas hasta 1:10240 transfiriendo 50 μ L entre ellas. Lo mismo se realizó con los sueros problema, 50 μ L de la solución ajustada del virus se colocó en cada pozo. Esta mezcla fue incubada por 30

minutos a temperatura ambiente, posteriormente se transfirieron los 100 μ L a la placa de células Vero, al final se adicionaron 100 μ L de medio de infección. Cada suero fue analizado por duplicado.

Las placas se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂ hasta las 72 hpi cuando la lectura fue realizada previamente y posterior a ser fijadas con cristal violeta.

El título de anticuerpos fue definido como la última dilución capaz de neutralizar el efecto causado por el virus en cultivo celular a las 72 hpi.

Se determinó un punto de corte de 1:160, es decir los sueros que no fueron capaces de neutralizar al virus en esta dilución se consideraron negativos y aquellos con título \geq 1:160 se determinaron como sueros positivos.

5.10 Amplificación parcial y secuenciación del gen S

5.10.1 Inóculos

Se seleccionaron algunas muestras de hisopos rectales con Cq bajo (Cuadro 4) para la preparación de tres inóculos correspondientes al inicio y final de las dos etapas de muestreos en la granja. En la Figura 8 se esquematiza el gen S y su división de acuerdo a los aminoácidos, así como las regiones que amplifican pares de iniciadores.

El primer inóculo se obtuvo de tres cerdas y dos lechones destetados; el segundo a partir de una cerda gestante y dos lechones al día de nacidos; por último el tercero procedente de una cerda y un lechón destetados.

Cuadro 4. Etapa y muestreo seleccionados para preparación de los inóculos.

Inóculo 1	Inóculo 2	Inóculo 3
Etapas 1 y 2: muestreo 4	Etapas 1 y 2: muestreo 1 y 2	Etapas 1 y 2: muestreo 4

Cada inóculo fue utilizado para la infección de células Vero en botellas de 25 cm², la dilución empleada fue 1:2 y el procedimiento fue el antes descrito; se mantuvo hasta las 72 hpi para posteriormente ser congelada-descongelada (2 veces). Se realizaron tres pases ciegos para cada uno de ellos.

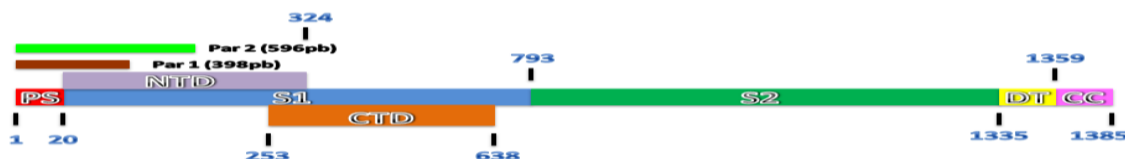


Figura 8. Esquema del gen S del vDEP. Los dígitos indican el inicio y final de cada región en aminoácidos.

5.10.2 Elaboración cDNA

Se realizó la extracción de RNA total de los tres inóculos originales y de su tercer pase, así como de la muestra original de intestino con su pase número tres obtenido del aislamiento. Posteriormente utilizando el kit First Strand cDNA Synthesis #K1612® se generó el cDNA para las ocho muestras siguiendo las instrucciones del fabricante. Lo obtenido se diluyó 1:5 con agua libre de nucleasas.

5.10.3 PCR Punto Final

Se utilizaron dos pares de iniciadores reportados por (Lara-Romero, *et al.*, 2017) (Cuadro 5). La mezcla de reacción se realizó a un volumen final de 50 μ L. En el Cuadro 6 se muestran las cantidades y las constantes de amplificación. Los productos de PCR fueron empleados para el corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1 % a 90 V y 300 A, para la visualización se utilizó bromuro de etidio.

Cuadro 5. Secuencia de nucleótidos de los iniciadores para la amplificación parcial del gen S.

	Iniciador	Secuencia	Tamaño del amplicón	TM
1	Fw	TAAGTTGCTAGTGCGTAATAATGA	398 pb	60 °C
	Rv	GCAATTAGCTGTACAGGGTTCA		
2	Fw	AGGCGGTTCTTTTCAAAATTTAATG	596 pb	54 °C
	Rv	GCAATTAGCTGTACAGGGTTCA		

5.10.4 Purificación de productos y secuenciación

Se realizaron dos metodologías para la purificación de las muestras amplificadas, para ocho de ellas se empleó el QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen ®) y las cuatro restantes con el QIAquick Gel extraction Kit (Qiagen ®).

La secuenciación fue efectuada por la metodología de Sanger en el Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Cuadro 6. Mezcla de reacción de PCR punto final para amplificación parcial del gen S.

Reactivo	Cantidad	Constantes	
Master mix	25 µL	95 °C	2 minutos
Fw	3 µL	95 °C	1 minuto
Rv	3 µL	---	1 minuto
Agua	14 µL	72 °C	1.30 minutos
cDNA	5 µL	72 °C	10 minutos

5.10.5 Análisis filogenético

Posterior a la amplificación parcial del dominio S1 del gen S del vDEP (región NTD) se realizó el análisis filogenético empleando el programa bioinformático Mega 5.05. Se analizaron cinco secuencias generadas en tres momentos de muestreo, brote y aislamiento (par 1: 398 pb) y tres secuencias de dos tiempos de muestreo (par 2: 596pb). Se seleccionó el mejor método de análisis de secuencias de aminoácidos empleando la prueba de máxima verosimilitud.

Se realizó el análisis filogenético empleando el modelo JTT con 1000 réplicas de arranque.

5.11 Análisis estadístico

Se utilizó el programa SPSS Statistics 17.0. Para la determinación de la normalidad se empleó la prueba de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad de varianzas se analizó mediante la prueba de Levene. De cumplir con el supuesto de homocedasticidad se utilizó la prueba de T-Student para comparación de dos medias y se realizó ANOVA de un factor para mayor número de medias, con este último análisis se incluyó la prueba de Tukey. En caso de no cumplir, se procedió al empleo de estadística no paramétrica con la prueba de Kruskal-Wallis.

Un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

6. RESULTADOS

6.1 Parámetros

En la Figura 9 se observan los parámetros obtenidos durante el presente estudio, para el segundo muestreo la C2 y C11 fueron dadas de baja de la granja por decisión del propietario. La misma información fue recabada sobre el grupo testigo (Cuadro 7).

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
Comportamiento camada al nacimiento											
Vacunación	31/08/2017	31/08/2017	31/08/2017	31/08/2017	31/08/2017	31/08/2017	31/08/2017	31/08/2017	31/08/2017	31/08/2017	31/08/2017
Fecha parto	10/09/2017	11/09/2017	10/09/2017	12/09/2017	11/09/2017	11/09/2017	18/09/2017	15/09/2017	11/09/2017	11/09/2017	11/09/2017
Número parto	4	5	4	2	2	3	4	2	5	4	6
LNT	17	11	14	16	17	12	3	13	12	8	14
LNV	14	10	14	16	16	12	3	13	10	8	11
LNM	3	1	0	0	1	0	0	0	2	0	3
Comportamiento camada al destete											
Mortalidad lactancia	14,28%	0	14%	12,50%	25%	0	66,66%	15,38%	20%	25%	18,18%
Duración lactancia	24	23	24	22	23	23	16	19	23	23	23
Número destetados	10	7	11	14	8	12	8	11	6	9	10
Peso destete	73,4	48,7	77,8	88	45	79	39,4	61,3	38,6	76,6	81,5
Peso ajustado 21 días	69,3	46,01	73,4	88	No calculado	76,3	49,9	68,3	42,5	74,7	76,32
Post-destete											
Días destete a primer servicio	5		7	7		7	7	8	4	5	
Días destete a concepción	5		7	7		7	7	8	4	5	
Número servicios	1		1	1		1	1	1	1	1	
Siguiente parto											
Comportamiento camada al nacimiento											
Vacunación	10/01/2018		10/01/2018	10/01/2018	10/01/2018	10/01/2018	10/01/2018	09/02/2018	10/01/2018	10/01/2018	
Fecha parto	30/01/2018		02/02/2018	02/02/2018	30/01/2018	02/02/2018	02/02/2018	05/03/2018	30/01/2018	31/01/2018	
LNT	11		11	8	19	13	14	11	11	13	
LNV	10		9	8	14	13	14	10	11	13	
LNM	1		2	0	5	0	0	1	0	0	
Comportamiento camada al destete											
Mortalidad lactancia	10%		0	12,50%	7,14%	7,69%	14,28%	0	0	15,38%	
Duración lactancia	23		20	20	23	20	20	20	23	22	
Número destetados	9		9	8	12	11	9	11	9	11	
Peso destete	67,1		53,7	61,6	87,1	73	55,5	74	67,2	83,4	

Figura 9. Parámetros registrados durante el brote de DEP y en el siguiente parto. Se resalta en color verde la información sobre los parámetros de producción de interés.

Se calculó el promedio de la mortalidad, peso al destete, número de destetados y días destete a primer servicio de las once cerdas evaluadas antes, durante y después del brote de DEP, se realizó un ANOVA determinando que entre estos valores obtenidos no existió diferencia estadística significativa (Cuadro 8).

Cuadro 7. Parámetros del grupo testigo registrados un parto anterior al brote.

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
Comportamiento camada al nacimiento											
LNT	19	12	3	10	20	15	13	16	13	12	11
LNV	17	10	3	9	15	14	13	15	8	10	10
LNM	2	2	0	1	5	0	0	1	5	2	1
Comportamiento camada al destete											
Mortalidad lactancia %	0	10	40	0	30.7	7.14	0	0	0	30	0
Duración lactancia	24	24	19	25	24	23	24	2	24	24	24
Número destetados	11	9	6	11	9	13	10	13	10	9	10
Peso al destete kg	81.3	62.7	26.5	58.9	44.6	73.6	66.7	No calculado	78.8	76.5	81.5
Peso ajustado a 21 días	76	59.3	29.5	56.3	44.6	73.7	62.3	No calculado	73.6	58.6	78.2
Post-destete											
DDPS	4	5	4	7	5	5	10	1	5	5	4
Días destete a concepción	4	5	4	7	5	5	10	1	5	5	4
Número servicios	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Cuadro 8. Promedio de cuatro parámetros evaluados, durante y un parto posterior a antes del brote de DEP y su valor de significancia.

Parámetro	Testigo	Brote	Siguiente parto	Valor p
Mortalidad lactancia (%)	10.72 %	19.18 %	7.44 %	0.147
Número destetados	10.09	9.64	9.89	0.854
Peso destete (kg)	65.11	64.48	69.18	0.746
Días destete a primer servicio	5	6.25	No obtenido	0.146

En la Figura 10 se observa el día después del parto de las hembras evaluadas, algunos lechones presentaron diarrea desde ese momento, diferencia de condición corporal y peso en los neonatos de la misma camada. Para el siguiente parto, las nuevas camadas no fueron

afectadas por la enfermedad, determinando que no existió un rebrote a lo largo del estudio realizado (Figura 11).



Figura 10. Signología observada en lechones de un día de nacidos en primera etapa de muestreo. A. Diferencia de tamaño en lechones de dos camadas diferentes y dentro de la misma B. Neonato con diarrea amarilla y ácida C. Tapete de maternidad sucio por diarrea.



Figura 11. Camadas nacidas en el parto de la segunda etapa de muestreo. A-D. Camadas con homogeneidad en el peso de los lechones, los animales se encontraron limpios y secos, sin rastros de diarrea.

6.2 RT-PCR dúplex en tiempo real

La cepa circulante fue detectada como S-INDEL, esto coincide con los signos presentados en los animales, el porcentaje de mortalidad es el mayor indicativo.

6.3 Excreción viral

Se utilizó RT-PCR en tiempo real y una curva patrón para cuantificar la carga viral en muestras de hisopados rectales en diferentes momentos, desde la gestación hasta el destete. Mediante gráficas de líneas se evaluó la excreción viral de las cerdas en sus cuatro momentos de muestreo y sus camadas en tres momentos de muestreo (1 día posparto, a los 14 días de vida, destete) con el objetivo de comparar el comportamiento entre ambos grupos de animales. Esto se realizó en ambos partos.

6.3.1 Etapa 1

Cerdas

Se realizó una prueba de homocedasticidad de varianzas para confirmar la posibilidad de elaborar estadística paramétrica, el valor de significancia fue $p=0.496$; con ello se procedió a efectuar un ANOVA con la finalidad de determinar la existencia de diferencia en la excreción viral en las cerdas en los cuatro momentos de muestreo.

Los resultados en la Figura 12 demuestran que existe diferencia estadística significativa en la cantidad de virus excretado entre gestación-1dpp, gestación-destete, 1dpp-14 días, 14 días-destete.

Muestreo	Muestreo comparativo	Significancia
Gestación	1 dpp	<u>0.003</u>
	14 días	0.704
	Destete	<u>0.001</u>
1 dpp	Gestación	<u>0.003</u>
	14 días	<u>0.000</u>
	Destete	0.986
14 días	Gestación	0.704
	1 dpp	<u>0.000</u>
	Destete	<u>0.000</u>
Destete	Gestación	<u>0.001</u>
	1 dpp	0.986
	14 días	<u>0.000</u>

Figura 12. Valor de significancia en el análisis de comparación de los cuatro momentos de muestreo en la primera etapa.

La prueba de Kruskal-Wallis se realizó adicionalmente y se obtuvo un valor de $p=0.000$, lo cual secunda al resultado del ANOVA. Se puede interpretar que se registró mayor cantidad de virus excretado en la gestación y a los 14 días posparto en los cuales no hay diferencia significativa (Figura 13).

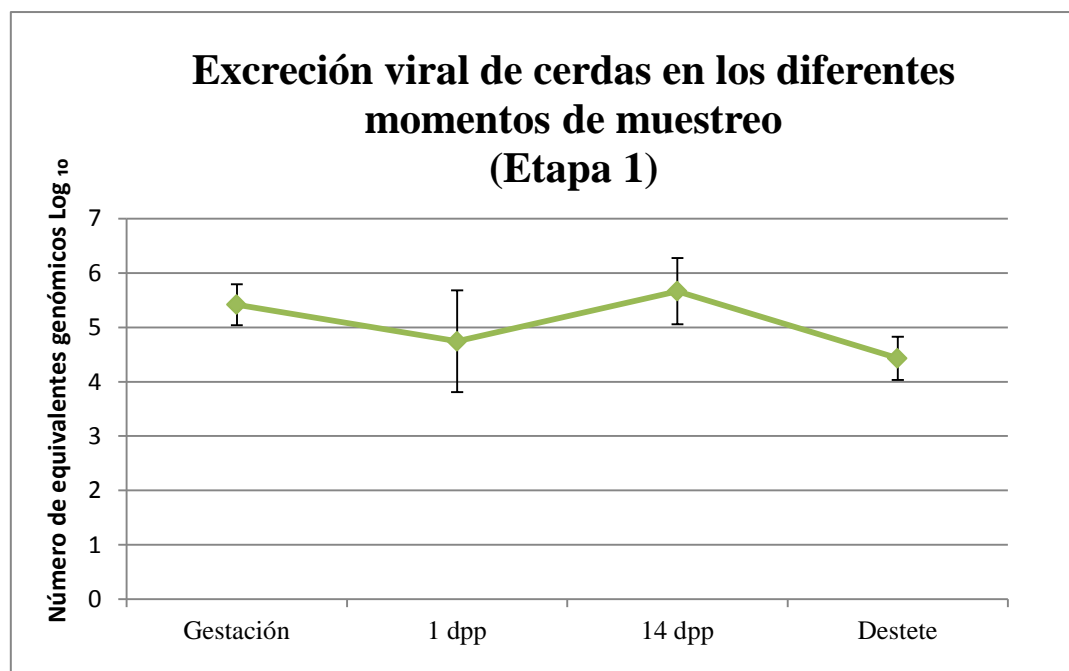


Figura 13. Promedio de excreción viral en hisopados rectales de cerdas en gestación, un día posparto, catorce días y al destete.

Camadas

El valor de significancia para la prueba de homocedasticidad fue de $p=0.000$, por lo cual al realizar la prueba de Kruskal-Wallis se obtuvo una p con el mismo valor, que indica la existencia de diferencia significativa entre los muestreos pero al ser no paramétrico, no se conoce entre cuáles grupos radica la distinción. Se puede observar que 54.54 % de las camadas presentaron un pico de excreción viral a los 14 días de vida, mientras que el 45.45 % restante tuvieron mayor número de equivalentes genómicos al día de nacidos (Figura 14).

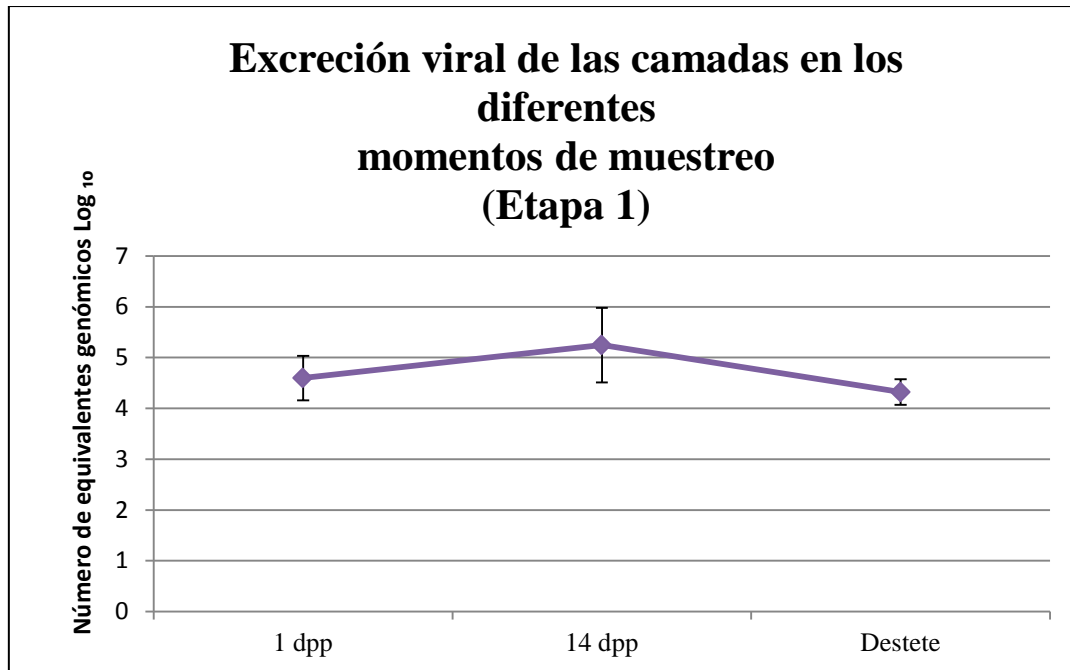


Figura 14. Promedio de excreción viral en hisopados rectales de camadas al día de nacimiento, catorce días de vida y al destete.

6.3.2 Etapa 2

Cerdas

En el siguiente parto se dieron de baja dos cerdas (C2 y C11), se realizaron los mismos análisis. En la prueba de homocedasticidad de varianzas se obtuvo un valor de significancia de $p=0.041$, por ello se procedió a realizar un análisis de Kruskal-Wallis con un valor de $p=0.135$. Como resultado se obtuvo la no existencia de diferencia significativa en la excreción viral entre las cerdas a lo largo de los cuatro muestreos realizados en ellas. En la Figura 15 se observa gráficamente el comportamiento en la eliminación del virus.

Camadas

En la Figura 16 se muestra la excreción viral de las camadas, para este parto se obtuvo más variación en los resultados a comparación de la primera etapa. En la prueba de homocedasticidad de varianzas se obtuvo un valor de significancia de $p=0.000$, por ello se procedió a realizar un análisis de Kruskal-Wallis con un valor de $p=0.339$. Como resultado se determinó que no existe diferencia significativa en la excreción viral entre las camadas a lo largo de los muestreos realizados.

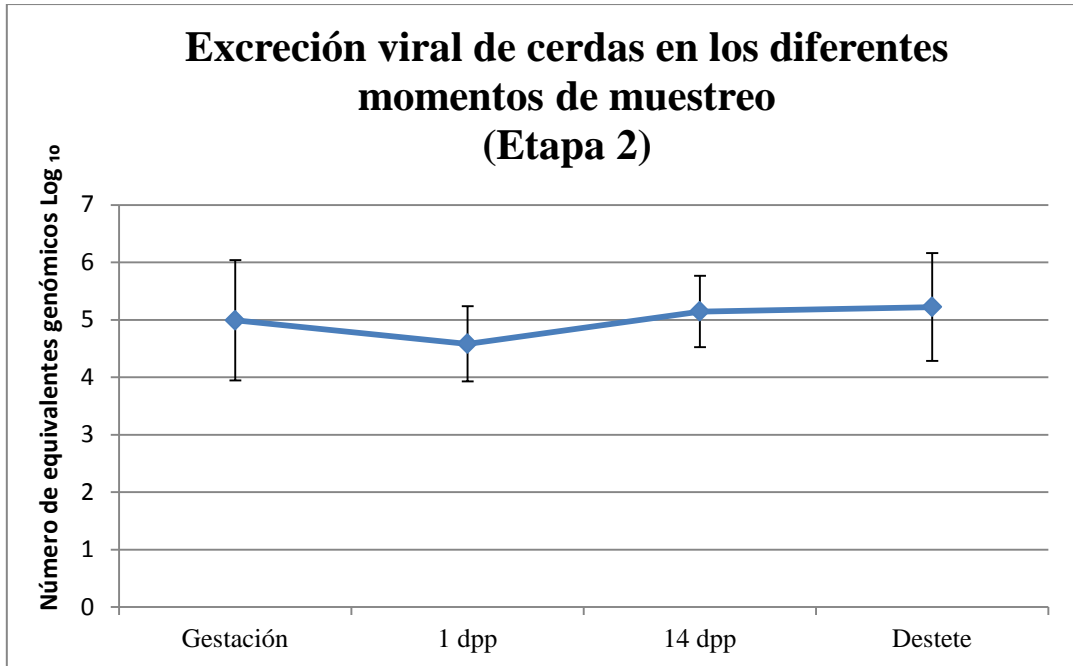


Figura 15. Excreción viral en hisopados rectales de cerdas en gestación, un día posparto, catorce días y al destete, en el parto consecutivo al brote.

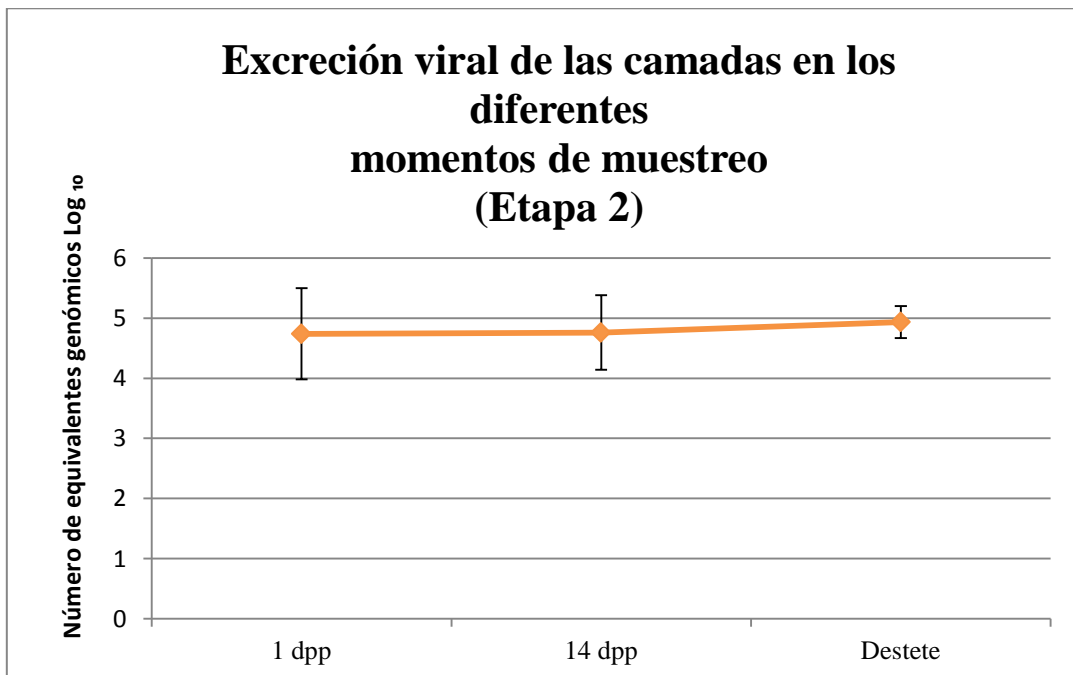


Figura 16. Promedio de excreción viral en hisopados rectales de camadas al día de nacidos, catorce días de vida y al destete.

6.4 Aislamiento viral

La revisión del cultivo celular inoculado fue realizada a las 24,48 y 72 hpi hasta el 4° pase buscando sincitios, vacuolización o desprendimiento de las células. En las Figuras 17 y 18 se observa el efecto encontrado.

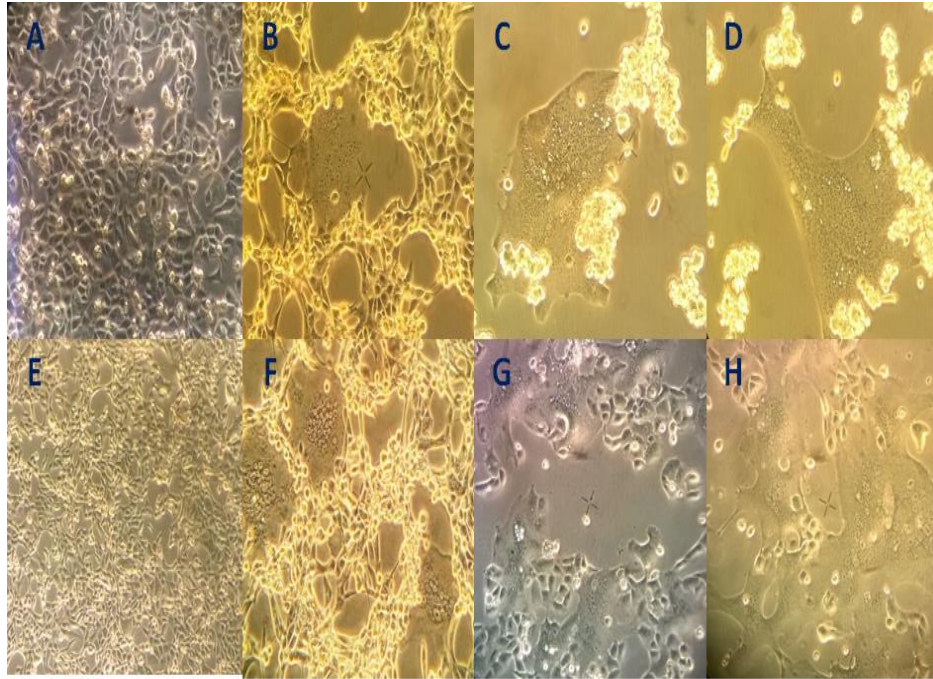


Figura 17. Efecto observado durante el aislamiento del vDEP en células Vero durante primer y segundo pase. **A.** Testigo primer pase **B.** Sincitios a las 24 hpi **C.** 48 hpi **D.** 72 hpi **E.** Testigo segundo pase **F.** Efecto a las 24 hpi **G.** 48 hpi **H.** 72 hpi.

6.5 ELISA

6.5.1 Sueros

Cerdas

Se realizó un análisis de homocedasticidad de varianzas previo al ANOVA, en el primero se obtuvo un valor de $p=0.917$, y para el segundo se determinó que no existió diferencia estadística significativa $p=0.392$ entre los cuatro muestreos de la primera etapa. Adicionalmente se calculó el valor de p mediante la prueba de Kruskal-Wallis obteniendo resultado de 0.389. En la Figura 19 se observa el comportamiento de la inmunidad humoral de las hembras.

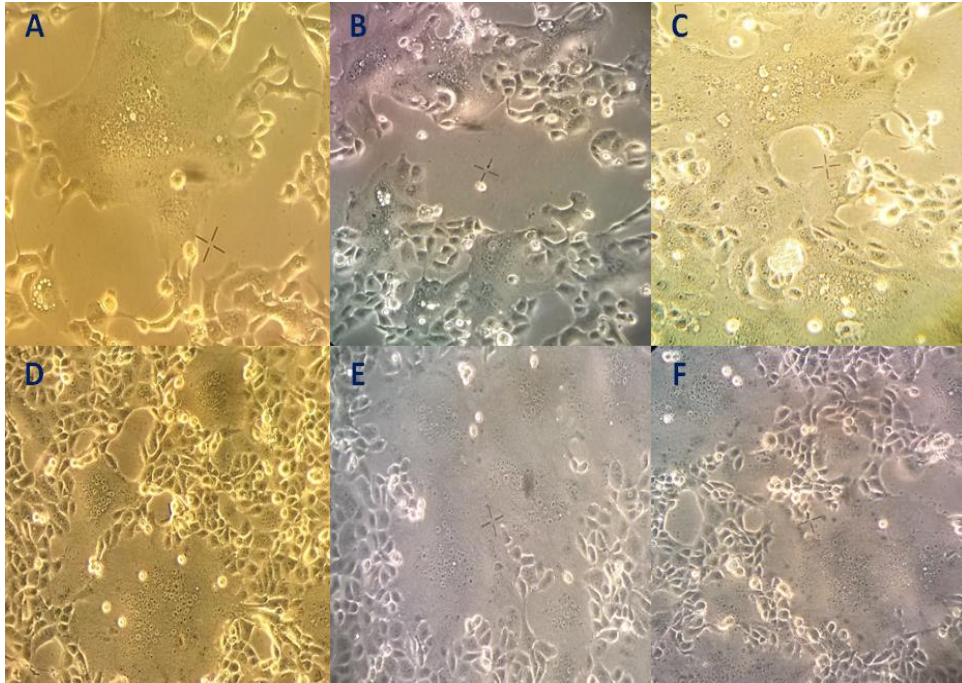


Figura 18. Aislamiento del vDEP en células Vero durante tercer y cuarto pase. **A.** Sincitio observado en células al tercer pase a las 24 hpi **B.** 48 hpi **C.** 72 hpi **D.** Cuarto pase a las 24 hpi. **E-F.** Efecto a las 48 hpi.

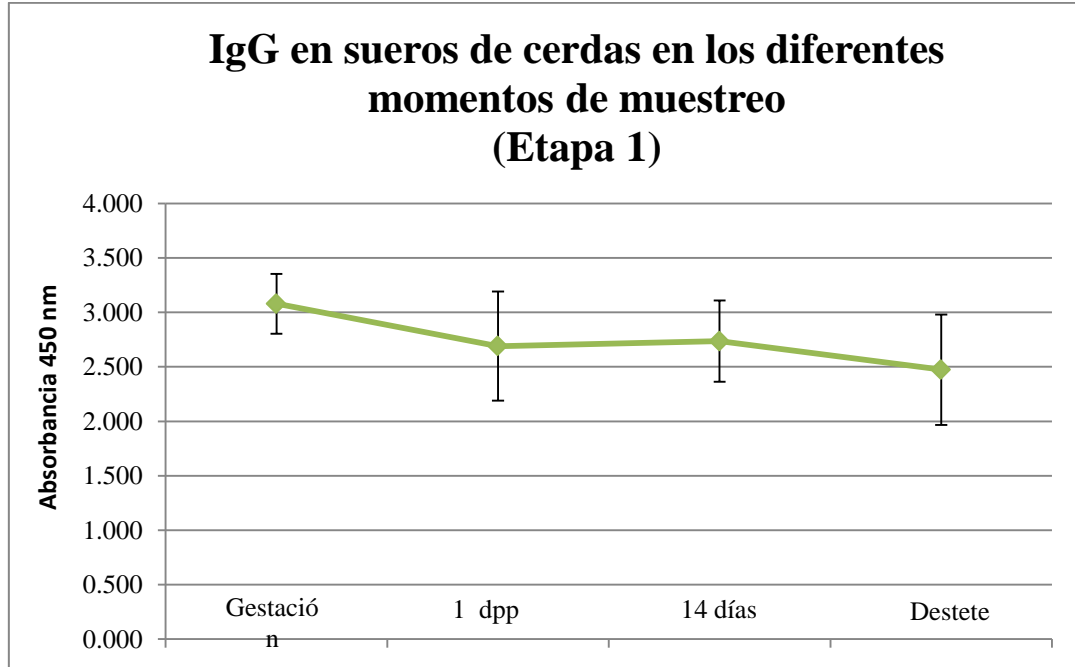


Figura 19. Niveles de IgG en suero de cerdas en gestación, un día posparto, a los catorce días y al destete.

Para los sueros del segundo parto se realizaron los mismos análisis estadísticos, para la homocedasticidad se obtuvo un valor de $p=0.266$ y en el ANOVA $p=0.865$, mediante la prueba de Kruskal-Wallis $p=0.754$. Se concluyó que tampoco hubo diferencia entre los muestreos que involucraron a las cerdas para el segundo parto (Figura 20).

Se realizó una comparación de medias mediante la prueba de T-Student para muestras independientes entre los cuatro diferentes momentos de muestreo (gestación, un día posparto, 14 días y destete) y las dos etapas (brote y parto siguiente), el valor de p fue de 0.728, 0.577, 0.518, 0.981 respectivamente, por lo que no se encontró evidencia estadística para concluir que existe diferencia en los niveles de IgG en suero en las cerdas.

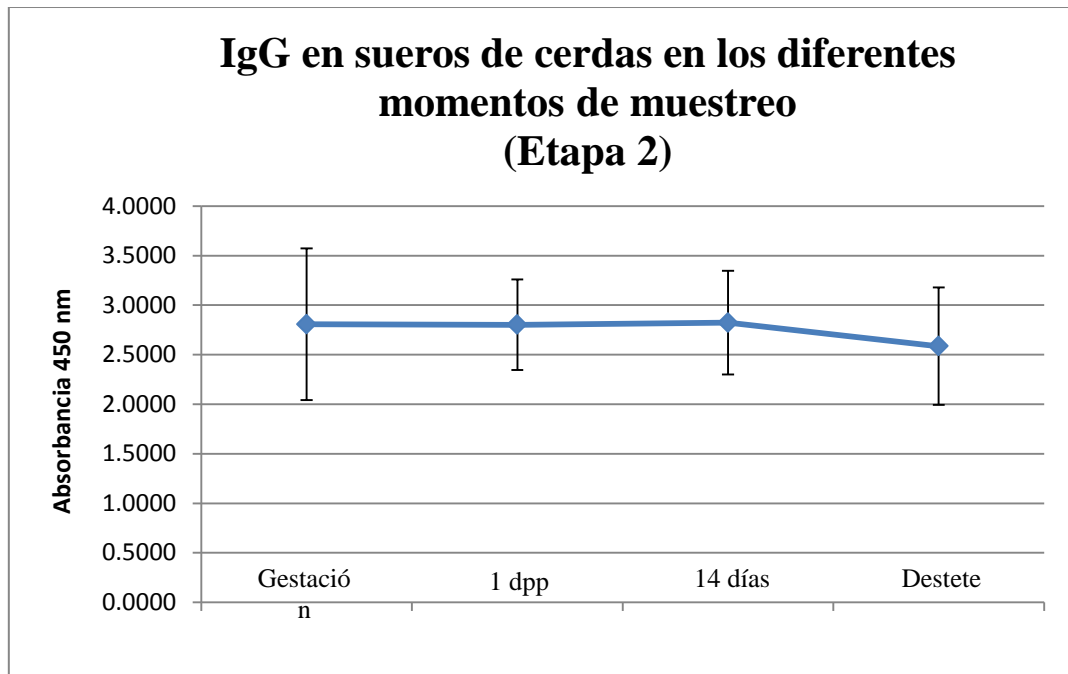


Figura 20. Niveles de IgG en suero de cerdas en gestación, un día posparto, a los catorce días y al destete en segunda etapa de muestreo.

Camadas

Se empleó la prueba de Kruskal-Wallis obteniendo un valor de $p=0.001$, por lo que se concluyó la existencia de evidencia estadística para determinar que el nivel de IgG en suero de estos animales fue diferente en los dos muestreos (brote y parto consecutivo), siendo mayor en la segunda etapa.

6.5.2 Calostro

- IgG: con las absorbancias se realizó la comparación de las medias de los dos momentos de muestreo, para el supuesto de homocedasticidad se obtuvo un valor de $p=0.443$ y en la prueba T-Student se determinó que no existió diferencia significativa ($p=0.731$) en los niveles de esta inmunoglobulina en el calostro producido por las cerdas.
- IgA: no se cumplió con la homocedasticidad, por lo que se analizaron estos resultados mediante la prueba de Kruskal-Wallis con un valor p de 0.284. Se interpretó que no existió diferencia significativa entre las dos etapas.

Se realizó la comparación de IgG con IgA en calostro para las dos etapas de muestreo, mostrando en la primera una significancia de 0.018 y 0.009 para la segunda. Es decir, existió diferencia significativa entre las etapas, siendo mayor la cantidad de IgG en calostro.

6.6 Seroneutralización

El ECP del suero negativo fue observado hasta la dilución 1:160, se definió como punto de corte. En cada placa se destinaron seis testigos de virus y seis de células sin infectar, esto se observa en la Figura 21. Se empleó como control negativo un suero obtenido de sangre de cordón umbilical, este mostró formación de sincitios a partir de la primer dilución (Figura 22), el control positivo un suero hiperinmune obtenido de un cerdo de engorda con un título de 1:320 (Figura 23).

En el Cuadro 9 se observan los títulos detectados en suero de cerdas a lo largo de las dos etapas de muestreo, al igual que de los lechones al destete.

En las cerdas se encontró un título de 1:320 en 60 % de los animales durante el monitoreo realizado a lo largo de dos partos, siendo el máximo 1:640. En las dos etapas se detectaron lechones negativos a anticuerpos neutralizantes de acuerdo al punto de corte establecido en el estudio, para la primera el 50 % de los animales tuvo un título de 1:160 mientras que para la segunda los cerdos sin anticuerpos detectables fueron un 42.86 %.

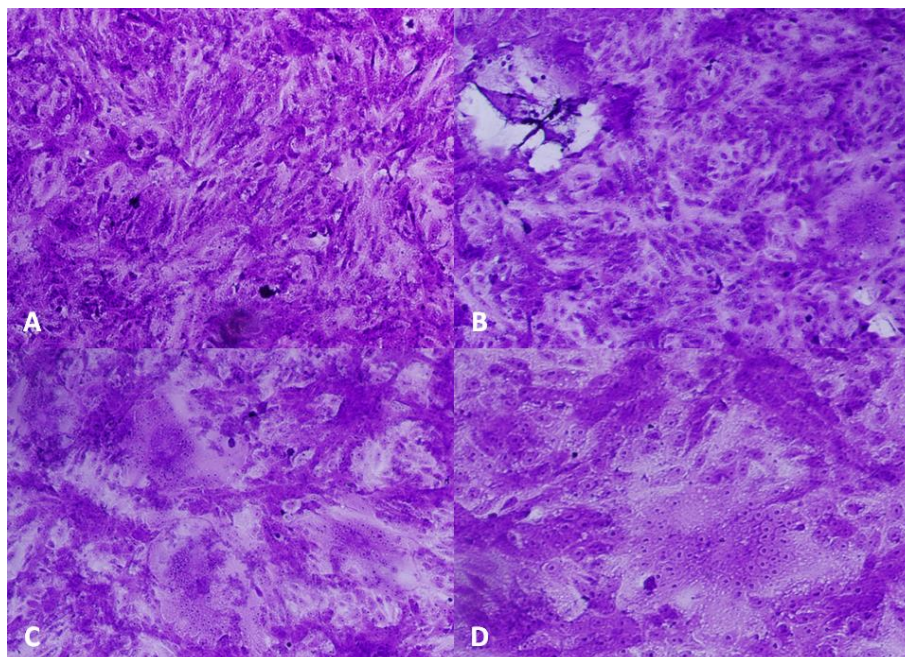


Figura 21. Testigo negativo y positivo de prueba de seroneutralización contra vDEP. Fotografía 20X **A.** Testigo negativo de células sin infectar **B al D.** Testigos de virus.

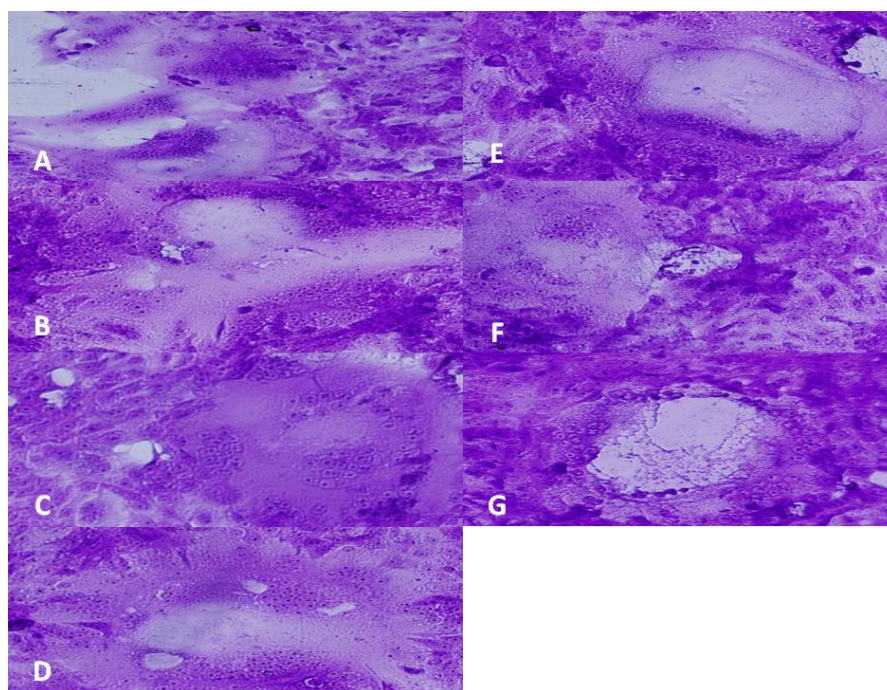


Figura 22. Efecto citopático observado en seroneutralización empleando un suero negativo Fotografía 20X **A.** Primer dilución (1:160) **B al G.** Diluciones dobles seriadas del suero hasta 1:10240.

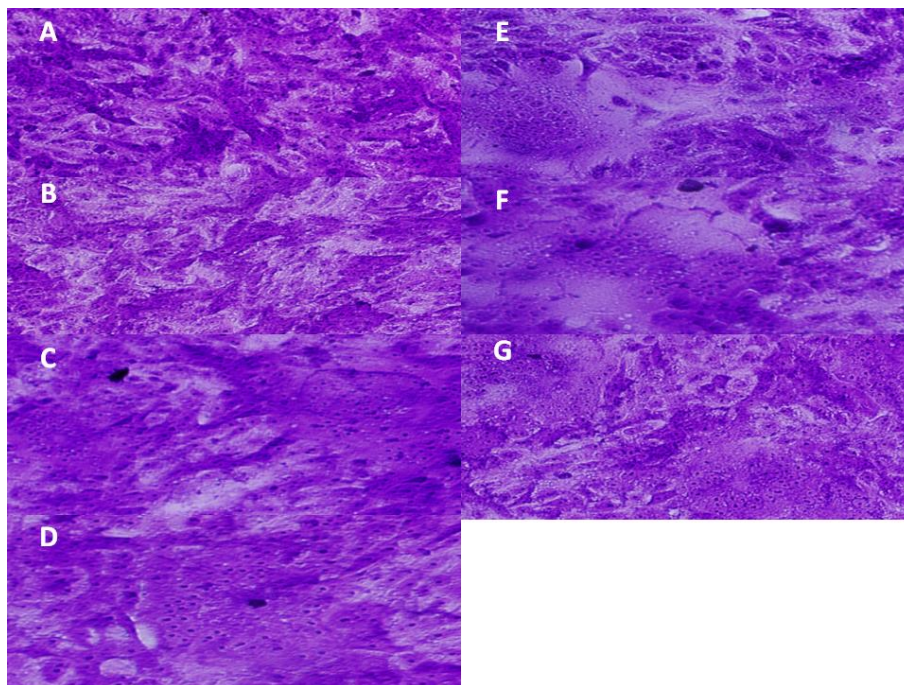


Figura 23. Efecto citopático observado en seroneutralización empleando un suero positivo Imagen 20X **A.** Primer dilución (1:160) **B.** Dilución 1:320 sin efecto observado **C al G.** Diluciones dobles seriadas del suero hasta 1:10240 con sincitios.

Cuadro 9. Título de anticuerpos neutralizantes de cerdas y lechones en las dos etapas de muestreo.

Etapa	Título cerdas	Título lechones
1	60 % 1:320	50 % 1:160
	20 % 1:160	37.5 % negativo
	20 % 1:640	12.5 % 1:320
2	50 % 1:320	42.86 % negativo
	37.5 % 1:160	28.57 % 1:160
	12.5 % 1:640	28.57 % 1:320
	18 sueros	15 sueros

6.7 Caracterización parcial del gen S del vDEP

Mediante la elaboración de PCR en Punto final se amplificaron dos fragmentos del gen S del vDEP correspondientes a la región NTD a partir de tres inóculos y sobrenadantes resultantes de la infección en cultivo celular, intestino y un aislamiento a partir de este (3°

pase). En la Figura 24 se presenta el gel de agarosa en donde se visualizan las bandas correspondientes al tamaño del amplicón, el marcador utilizado fue el 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®).

En el Cuadro 10 se observan las muestras secuenciadas, así como el par de iniciador correspondiente.

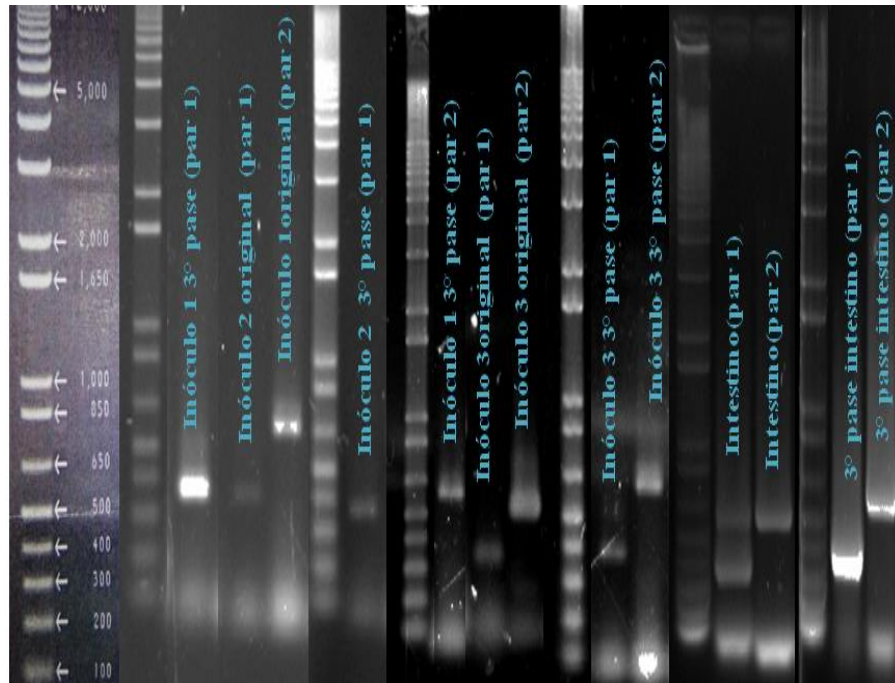


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa con muestras amplificadas

Cuadro 10. Inóculos empleados para amplificación parcial del gen S.

Iniciador	Muestra		
1	Inóculo 1 3° pase	Inóculo 3 original	3° pase intestino
	Inóculo 2 original	Inóculo 3 3° pase	
	Inóculo 2 3° pase	Intestino	
2	Inóculo 1 original	Inóculo 3 original	Intestino
	Inóculo 1 3° pase	Inóculo 3 3° pase	3° pase intestino

Empleando el programa bioinformático Mega 5.05 se obtuvieron dos regiones del gen S, una conformada por 103 aminoácidos y otra por 192. El análisis filogenético se realizó empleando el modelo JTT con 1000 réplicas de arranque utilizando 58 secuencias del vDEP obtenidas del GenBank incluyendo cepas mexicanas.

En la Figura 25 se observa el árbol filogenético construido a partir de los primeros 103 aminoácidos del gen. Las muestras del presente estudio dieron origen a un nuevo subclado dentro del genogrupo S-INDEL conformado por 22 secuencias en este análisis, esto se demuestra en la Figura 27 encontrando una sustitución en todas las muestras evaluadas Q42K, adicionalmente en la secuencia del inóculo tres en su tercer pase se determinó la sustitución R33G.

En la Figura 26 se observa el árbol filogenético construido a partir de 192 aminoácidos del gen. De igual forma se demuestra el nuevo subclado dentro del genogrupo S-INDEL, se encontraron dos sustituciones en la secuencia del inóculo 3 original: N83S y S90G (Figura 28). Adicionalmente se determinó una sustitución en todas las muestras de interés D112A y la delección de un aminoácido N143del.

Los cambios en las posiciones 42, 112 y 143 fueron las mismas en todas las muestras del presente estudio determinando que fueron estas modificaciones las que originaron un clado diferente con base en 58 secuencias del vDEP de la posición 1 a 192. Estas modificaciones persistieron a lo largo de los muestreos (brote a segunda camada destetada).

El inóculo original procedente del segundo destete (final del monitoreo) tuvo dos sustituciones únicas, de igual forma, en su tercer pase se encontró un cambio de aminoácido.

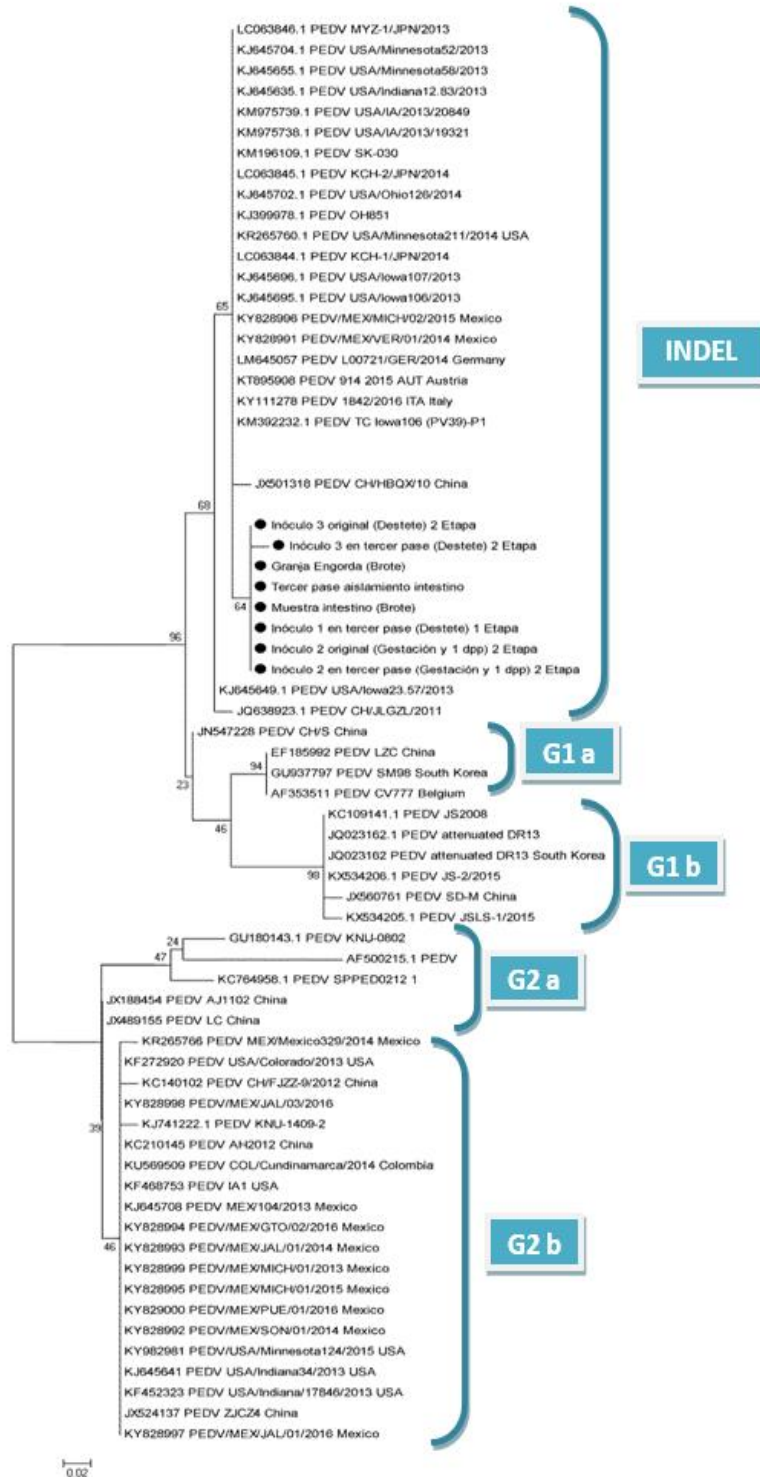


Figura 25. Análisis filogenético molecular por el método de máxima verosimilitud de secuencias amplificadas con primer par de iniciadores. La historia evolutiva se infirió utilizando el método de máxima verosimilitud basada en el modelo JTT. Se muestra el árbol con la probabilidad de registro más alta (-555.3996). El porcentaje de árboles en los que se agrupan los taxones asociados se muestra junto a las ramas. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente de la siguiente manera: cuando el número de sitios comunes era <100 o menos de una cuarta parte del número total de sitios, se utilizó el método de parsimisión máxima; de lo contrario se utilizó el método BIONJ con matriz de distancia MCL. El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama medidas en el número de sustituciones por sitio. El análisis involucró 66 secuencias de aminoácidos. Se

eliminaron todas las posiciones que contienen huecos y datos faltantes. Existió un total de 79 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA5. Las secuencias de interés se encuentran marcadas con un círculo negro.

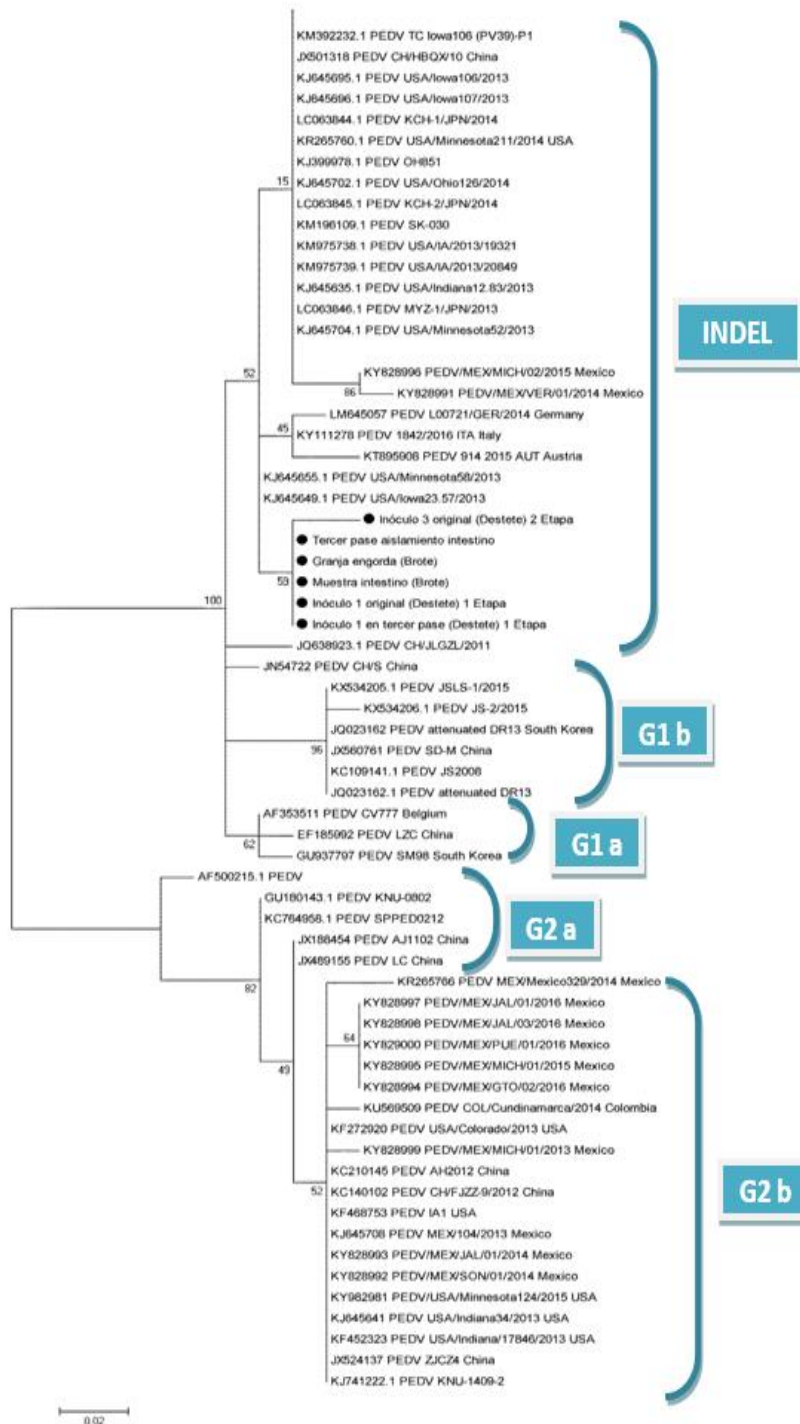


Figura 26. Análisis filogenético molecular por el método de máxima verosimilitud de secuencias amplificadas con segundo par de iniciadores. La historia evolutiva se infirió utilizando el método de máxima verosimilitud basada en el modelo JTT. Se muestra el árbol con la probabilidad de registro más alta (-606.8953). El porcentaje de árboles en los que se agrupan los taxones asociados se muestra junto a las ramas. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente de la siguiente manera: cuando el número de sitios comunes era <100 o menos de una cuarta parte del número total de sitios, se utilizó el método de parsimisión máxima; de lo contrario se utilizó el método BIONJ con matriz de distancia MCL. El árbol se dibuja a escala, con longitudes

de rama medidas en el número de sustituciones por sitio. El análisis involucró 64 secuencias de aminoácidos. Se eliminaron todas las posiciones que contienen huecos y datos faltantes. Existió un total de 103 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA5. Las secuencias de interés se encuentran marcadas con un círculo negro.

	MEX/Mexico329/2014 Mexico (KR265766)	31	M	F	R	R	F	F	S	K	F	N	V	G	A	P	44
G2 b	USA/Colorado/2013 USA (KF212320)	31															44
	CHP/JZ2-3/2012 China (KC140102)	31															44
	PEDV/ME/JAL/03/2016 Mexico(KY620393)	31															44
	PEDV/KNU-1403-2 (KJ141222.1)	31															44
	AH2012 China (KC210145)	31															44
	COL/Cundinamarca/2014 Colombia (KU563509)	31															44
	IA1 USA (KF468753)	31															44
	MEX/104/2013 Mexico (KJ645706)	31															44
	PEDV/ME/JAL/01/2016 Mexico(KY620394)	31															44
	PEDV/ME/JAL/01/2016 Mexico(KY620393)	31															44
	PEDV/ME/KMICH/01/2015 Mexico(KY620395)	31															44
	G2 a	PEDV/ME/PUE/01/2016 Mexico(KY623000)	31														
PEDV/USA/Minnesota24/2015 USA (KY362981)		31															44
USA/Indiana34/2013 USA (KJ645641)		31															44
USA/Indiana/IT846/2013 USA (KF452323)		31															44
ZJC24 China (JX524137)		31															44
PEDV/ME/JAL/01/2016 Mexico(KY620397)		31															44
PEDV/KNU-0802 (GU180143.1)		31															44
PEDV (AF50025.1)		31															44
PEDV SPRED0012 (KC764356.1)		31															44
AJ1102 China (JX186454)		31															44
LC China (JX483955)		31															44
INDEL		PEDV MY2-1/JPN/2013 (LC063846.1)	31														
	PEDV USA/Minnesota52/2013 (KJ645704.1)	31															44
	PEDV USA/Minnesota2.63/2013 (KJ645635.1)	31															44
	PEDV USA/IA/2013/20843 (KM375739.1)	31															44
	PEDV USA/IA/2013/19321 (KM375738.1)	31															44
	PEDV SK-030 (KM136103.1)	31															44
	PEDV KCH-2/JPN/2014 (LC063845.1)	31															44
	PEDV OH851 (KJ393376.1)	31															44
	PEDV USA/Minnesota21/2014 (KR265760.1)	31															44
	PEDV KCH-1/JPN/2014 (LC063844.1)	31															44
	PEDV USA/Iowa106/2013 (KJ645636.1)	31															44
	G1 b	PEDV USA/Iowa106/2013 (KJ645635.1)	31														
PEDV/ME/KMICH/02/2015 Mexico(KY620396)		31															44
PEDV/ME/X/VER/01/2014 Mexico(KY620391)		31															44
100721GER/2014 Germany (LM645057)		31															44
314 2015 AUT Austria (KT035308)		31															44
1642/2016 ITA Italy (KY111278)		31															44
PEDV USA/China126/2014 (KJ645702.1)		31															44
PEDV TC Iowa106 (PV331)-P1 (KM392232.1)		31															44
CHHBGX/10 China (JX501318)		31															44
PEDV USA/Iowa23.57/2013 (KJ645643.1)		31															44
PEDV CHN/GZ1 (2011) (JQ638923.1)		31															44
G1 a		CHNS China (JN547220)	31														
	PEDV JS-2/2015 (KX534206.1)	31															44
	attenuated DR13 South Korea (JQ023162)	31															44
	PEDV JS-2/2015 (KX534206.1)	31															44
	SD-M China (JX560761)	31															44
	PEDV JS1-2/2015 (KX534205.1)	31															44
	CV777 Belgium (AF353511)	31															44
	LZC China (EF185392)	31															44
	SM98 South Korea (GU937737)	31															44
	CV777 Belgium (AF353511)	31															44

Figura 27. Análisis de regiones variables de las secuencias obtenidas del primer par de iniciadores, se muestran las dos sustituciones encontradas del aminoácido 31 a 44.

	MEX/Mexico329/2014 Mexico (KR265766)	01	F	V	S	H	I	R	G	G	H	G	F	E	32	111	K	A	T	113	141	T	A	N	H	D	145
G2 b	PEDV/ME/JAL/01/2016 Mexico(KY620397)	01													32	111				113	141						145
	PEDV/ME/JAL/01/2016 Mexico(KY620398)	01													32	111				113	141						145
	PEDV/ME/PUE/01/2016 Mexico(KY623000)	01													32	111				113	141						145
	PEDV/ME/KMICH/01/2015 Mexico(KY620395)	01													32	111				113	141						145
	PEDV/ME/KMICH/02/2015 Mexico(KY620394)	01													32	111				113	141						145
	COL/Cundinamarca/2014 Colombia (KU563509)	01													32	111				113	141						145
	USA/Colorado/2013 USA (KF212320)	01													32	111				113	141						145
	PEDV/ME/KMICH/01/2015 Mexico(KY620393)	01													32	111				113	141						145
	AH2012 China (KC210145)	01													32	111				113	141						145
	CHP/JZ2-3/2012 China (KC140102)	01													32	111				113	141						145
	IA1 USA (KF468753)	01													32	111				113	141						145
	G2 a	MEX/104/2013 Mexico (KJ645706)	01													32	111				113	141					
PEDV/ME/JAL/01/2014 Mexico(KY620393)		01													32	111				113	141						145
PEDV/ME/JSON/01/2014 Mexico(KY620392)		01													32	111				113	141						145
PEDV/USA/Minnesota24/2015 USA (KY362981)		01													32	111				113	141						145
USA/Indiana34/2013 USA (KJ645641)		01													32	111				113	141						145
USA/Indiana/IT846/2013 USA (KF452323)		01													32	111				113	141						145
ZJC24 China (JX524137)		01													32	111				113	141						145
PEDV KNU-1403-2 (KJ141222.1)		01													32	111				113	141						145
PEDV (AF50025.1)		01	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	32	111				113	141						145
PEDV KNU-0802 (GU180143.1)		01	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	32	111				113	141						145
PEDV SPRED0012 (KC764356.1)		01	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	32	111				113	141						145
AJ1102 China (JX186454)		01	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	32	111				113	141						145
LC China (JX483955)	01	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	32	111				113	141						145	
INDEL	PEDV TC Iowa106 (PV331)-P1 (KM392232.1)	01	L	-	Y	D	A	D	-	-	-	-	-	32	111				113	141		V	-	-	-	145	
	CHHBGX/10 China (JX501318)	01	L	-	Y	D	A	D	-	-	-	-	-	32	111				113	141		V	-	-	-	145	
	PEDV USA/Iowa106/2013 (KJ645635.1)	01	L	-	Y	D	A	D	-	-	-	-	-	32	111				113	141		V	-	-	-	145	
	PEDV USA/Iowa106/2013 (KJ645636.1)	01	L	-	Y	D	A	D	-	-	-	-	-	32	111				113	141		V	-	-	-	145	
	PEDV KCH-1/JPN/2014 (LC063844.1)	01	L	-	Y																						

7. DISCUSIÓN

El vDEP causa mortalidad de 0-100 %, esto se relaciona con el tipo de cepa que se encuentra afectando a los animales

Las cepas S-INDEL producen nulo a bajo porcentaje de mortandad en los lechones menores de una semana de vida. En el presente estudio se calculó una mortalidad de 24 %, similar a lo reportado por (Bertasio, *et al.*, 2016) que encontró mortalidades de 18, 25, 30 y 35 % en granjas infectadas con el mismo grupo de vDEP. El tiempo transcurrido para retornar a la línea base de producción en la granja analizada fue de 16 semanas, en contraste con las 52 semanas reportadas por (Goede y Morrison, 2016) esto podría relacionarse con los protocolos de desinfección e inmunidad del hato.

Ante un brote de DEP, los parámetros productivos y reproductivos pueden ser afectados, el área de maternidad es la más perjudicada por la mortalidad que causa el virus en los lechones que se encuentran en lactancia, Furutani, *et al.* (2018) determinaron una mayor mortandad y menor número de lechones destetados de un grupo de cerdas que fue infectado durante un brote encontrándose entre 60-90 días de gestación, comparado con un grupo testigo. En el presente estudio no se encontró diferencia significativa entre estos parámetros, al igual que lo reportado por (Furutani, *et al.*, 2017) al establecer este mismo resultado en cerdas Berkshire gestantes en un brote. El ingreso del virus a las producciones porcinas se asocia con la disminución en el número de lechones destetados y el aumento de la mortalidad en lactancia, pero no con el comportamiento de la camada en el parto siguiente como lo observado en la granja analizada.

El control y la prevención de la DEP es uno de los mayores desafíos para la industria porcícola (Ouyang, *et al.*, 2015), Furutani, *et al.* (2018) mencionan la posibilidad de que el virus continúe presente por la sala de maternidad al tiempo en que las siguientes cerdas paren, debido a que las granjas tienen un sistema de producción intensivo que dificulta la limpieza y desinfección completas entre parto-parto.

La excreción del virus en las heces de cerdas a los 28 días de haber iniciado el brote en la granja analizada fue de $5.42 \log_{10}$ EG/mL, mientras que Bertasio, *et al.* (2016) presentó la cantidad de $6.5 \log_{10}$ EG/mL en una producción porcina con el mismo tiempo de inicio de la signología y con una cepa perteneciente al mismo grupo que la de este estudio.

En este estudio se encontró la mayor excreción de las cerdas al momento del primer muestreo (gestación) y otro pico a los 14 días posteriores al parto, entre estos dos no se encontró diferencia estadística significativa. De acuerdo a lo reportado por Lin, *et al.* (2015 A), las cerdas se encuentran expuestas de forma continua a gran cantidad de virus excretado por los lechones, infectándose al estar en contacto con ellos, estos investigadores detectaron antes de los 14 dpi un título de $>8\log_{10}$ EG/mL; es posible que la hembra que se encuentra lactando sea más susceptible a la infección debido a los cambios fisiológicos asociados con la gestación y lactación. Cabe resaltar que lo reportado por Bertasio, *et al.* (2016) es un análisis realizado en infecciones naturales en granja, al igual que el presente estudio.

En el caso de los cerdos lactantes, en la investigación ya mencionada se registró mayor excreción de los tres a seis días de vida ($5.6-6\log_{10}$ EG/mL), a los 14-18 días disminuyó y al día 30 fue nula, en contraste con lo analizado en el presente estudio se detectó que la mitad de los lechones tuvieron la mayor excreción del virus a los 14 días con $5.17\log_{10}$ EG/mL y el restante, al primer día de vida con la cantidad de $4.88\log_{10}$ EG/mL. En comparación con lo que (Diel, *et al.*, 2016) reportan ante una infección experimental, la excreción del virus se detectó entre el primer día y tercer día postinfección y hasta los 24-30 días, similar a lo encontrado en los lechones del presente estudio. Contrastando con Chen, *et al.* (2016 B) que realizaron la comparación con cepas S-INDEL y virulentas, ambos grupos comenzaron la excreción a los días uno a tres posteriores a la inoculación, en la cepa prototipo se detectó gran cantidad de virus hasta el día siete y gradualmente fue disminuyendo mientras que para S-INDEL fue incrementando progresivamente, alcanzando un pico al quinto día y declinó hasta el séptimo día. Por otra parte Lin, *et al.* (2015 A) detectaron que camadas infectadas (tres días de vida) con cepa S-INDEL tuvieron el pico de excreción viral al día posterior a la inoculación. El título fue disminuyendo pero incrementaba cada tres a seis días, la excreción continuó más allá de los 21 dpi en la mayoría de los cerdos, siendo esta última parte, igual a lo encontrado en este estudio. Leidenberger, *et al.* (2017) también reportó eliminación de virus en heces posterior a los 20 dpi.

Para la segunda etapa de muestreos no se encontraron estudios realizados que brinden seguimiento al parto consecutivo, por lo cual no fue posible la comparación de información. Al igual que lo reportado por Park, *et al.* (2011 B), aunque no exista

signología en los lechones, se ha detectado RNA mediante RT-PCR de muestras fecales de estos animales, indicando la persistencia del virus en el hato, similar a lo encontrado. Contrario a Stadler, *et al.* (2015) que realizaron una evaluación durante un brote en una granja de ciclo completo, encontrando muestras negativas a las cuatro, seis y ocho semanas posteriores al inicio de la signología; aunque a las nueve semanas, el grupo afectado inicialmente presentó diarrea de nuevo.

La constante circulación del virus favorece la infección y por lo tanto, la inmunidad es más duradera (Bertasio, *et al.*, 2016), en este estudio no se encontró diferencia significativa en los niveles de IgG en el suero de las cerdas a lo largo de los ocho muestreos realizados en ellas, incluso posterior a la vacunación. En contraste a Bertasio, *et al.* (2016) que mencionan que en una granja analizada sólo en un 70 % de las cerdas se detectaron anticuerpos en suero a los 28 días posteriores al brote, mientras que en el presente estudio el 100 % de los animales presentaron IgG en suero en este mismo tiempo. Los resultados concuerdan con (Ouyang, *et al.*, 2015), que reportan que los niveles de IgG e IgA en suero pueden permanecer con alto título más allá de los 6 meses posteriores a una infección de campo, de igual forma (Leidenberger, *et al.*, 2017) mencionan un estudio en el cual algunas cerdas fueron inoculadas con cepas de campo cuatro semanas antes del parto, presentaron IgG e IgA en suero y calostro, al igual que lo reportado por (Goede, *et al.*, 2015).

Leidenberger, *et al.* (2017) sugieren que debe existir una re-vacunación/re-infección de las hembras para asegurar la protección de los lechones a través del calostro. En contraste a la granja analizada donde se implementó la vacunación contra vDEP en el calendario de medicina preventiva, como ya se mencionó no existió aumento significativo de anticuerpos posterior a la aplicación del profiláctico.

Schwartz, *et al.* (2016) reportaron la evaluación de una vacuna con virus atenuado en un grupo de cerdas gestantes con exposición previa al vDEP (EP) y otro con hembras sin exposición previa (SEP) dejando dos grupos testigos (T) correspondientes a la variable de exposición (TEP y ESEP), se demostró que la exposición previa induce altos niveles de IgG en suero, evidenciado alto título en TEP a comparación del ESEP. La vacunación no incrementó de forma significativa los niveles de IgA en calostro del grupo EP y muy poco en el grupo SEP, existió poca diferencia entre EP y TEP. La IgG en calostro fue similar en EP y SEP y mayor en EP que en TEP. Esto concuerda con la investigación realizada, ya

que las IgA e IgG no tuvieron diferencia en el calostro de los dos partos evaluados demostrando que los anticuerpos detectados en el suero de las cerdas de la granja y en el calostro son producidos ante la exposición con el virus, siendo este último el componente más importante para la protección de las camadas. Por otra parte Rapp-Gabrielson, *et al.* (2014) probaron una vacuna con virus atenuado en hembras gestantes con previa exposición en granja, la vacunación disminuyó la mortalidad en lechones en lactancia (6.3 % del grupo testigo vs 0.6 % del grupo vacunado).

En este estudio se encontró diferencia significativa entre los niveles de IgG e IgA en calostro de acuerdo a lo mencionado por (Poonsuk, *et al.*, 2016 B), siendo mayor la cantidad del primer anticuerpo mencionado.

El nivel de IgG en el suero de los lechones a los 21 días de edad tuvo diferencia significativa en los dos muestreos siendo mayor en la segunda camada. Bertasio, *et al.* (2016) reportan que la mayoría de los lechones infectados con cepa S-INDEL desarrollan inmunidad desde las tres semanas hasta los 60-100 días de vida. En contraste con lo mencionado por (Leidenberger, *et al.*, 2017) que mencionan que los anticuerpos declinan a la edad del destete. Stadler, *et al.* (2018) por otra parte detectaron anticuerpos a partir de los seis a nueve dpi hasta los 43 días en animales infectados a las cuatro semanas de vida, 63 dpi en animales de engorda y 105 dpi en cerdos lactantes, resultando en la detección de IgG por al menos 63 días después del brote inicial. Diel, *et al.* (2016) indicaron que las inmunoglobulinas G contra la proteína N del vDEP se detectan desde los siete días alcanzando un pico a los 21 dpi y comienza a declinar, aunque persisten posterior a los 43 dpi. En el estudio realizado no se determinó la inmunidad en suero después del destete, pero hasta los 21 días de vida coincide con lo reportado por los autores.

Los anticuerpos neutralizantes se detectan entre el séptimo y 14 días posteriores a la infección, alzando un pico al día 21 y persisten por lo menos seis meses al igual que en el grupo de cerdas analizadas y sus camadas (Diel, *et al.*, 2016). El título encontrado por seroneutralización en las cerdas en ambas etapas fue de 1:160-1:640, mientras que (Okda, *et al.*, 2015) detectaron título de 1:40 a 1:1280 en hatos previamente expuestos al virus con un punto de corte de 1:20 empleando 100 UFP. Por otra parte (Poonsuk, *et al.*, 2016 B) mencionan que cerdas previamente expuestas al virus tuvieron en promedio un título de 1:8 y a los 12 dpi de desafiarlas con una cepa se incrementó a 1:26 determinando sueros <1:8

como negativos con 1000 DICCC 50 %. Ouyang, *et al.* (2015) determinaron un título de 1:512 en cuatro grupos de cerdas infectadas considerando título menor a 1:16 como sueros negativos con 50 DICCC 50 %. En animales vacunados también se han evaluado estos anticuerpos, Taimur, *et al.* (2016) reportaron sueros con título de hasta 1:160 (<1:10 como negativos con 100 DICCC 50 %.), mientras que Sunhee, *et al.* (2017) mencionan títulos de 1:64 a 1:128 en animales inmunizados con virus atenuado en cultivo celular. Los resultados del presente estudio son similares a lo determinado por estas dos últimas investigaciones.

En una investigación realizada por Clement, *et al.* (2016) se estudió la duración de los anticuerpos neutralizantes en cerdas gestantes previamente expuestas al vDEP en dos granjas, encontrando títulos menores a 1:20 (negativo), posteriormente brindaron *Feedback* a las hembras obteniendo valores de 1:160-1:640 al momento del parto y a las seis semanas título de 1:20-1:640. Adicionalmente determinaron que a los seis meses posteriores a la exposición tuvieron inmunidad. Al igual que en el presente estudio donde se determinó presencia de anticuerpos neutralizantes en el segundo parto (aproximadamente siete meses después del brote).

En lechones se detectaron animales negativos y otros con de 1:160-1:320. Clement, *et al.* (2016) reportaron en lechones de 18 días de vida un título máximo de 1:40 en una granja donde el 90 % de los cerdos tuvieron anticuerpos y de 1:20-1:80 en una segunda granja en animales de 12 días de edad de los cuales solo en el 52 % de ellos pudo detectarse neutralización (1:20 como negativo). El título determinado en este estudio se contrasta con lo obtenido por otros autores, mientras que la presencia de cerdos negativos a anticuerpos es similar a lo descrito por (Clement, *et al.*, 2016).

El aislamiento en cultivo celular es el primer paso para establecer ensayos virológicos y serológicos. En el presente estudio se empleó como inóculo una muestra de intestino visualizando vacuolización, desprendimiento de células y sincitios desde las 24 hpi, esto se incrementó hasta las 72 hpi. Los reportes previos para una propagación exitosa de diversas cepas del vDEP mencionan el uso de tripsina en el medio de infección. Oka, *et al.* (2014) utilizaron 11 cepas incluyendo S-INDEL (Iowa 106) para inocular células Vero empleando 10 µg/mL de la enzima en el medio, determinaron que el tiempo transcurrido para visualizar el ECP es significativamente diferente (uno a cinco días postinfección) entre tipo de inóculo y cepa utilizada, siendo el contenido intestinal la mejor fuente para el

aislamiento. Por otro lado Liu, *et al.* (2015) reportaron la formación de sincitios en cultivo celular a partir de las 24 hpi. Yamamoto, *et al.* (2015) obtuvieron el aislamiento a partir de muestras fecales e intestinales, en el cual observaron ECP a los siete dpi en los tres pases realizados, mientras que en otras muestras no se observó ECP en cinco pases ciegos. En el presente estudio se empleó pancreatina como enzima proteolítica (Horie, *et al.*, 2016), al igual Solís-Galicia, *et al.* (2017) mencionan que para el aislamiento de las diferentes cepas circulantes en México, la pancreatina es más eficiente en comparación con la tripsina reportada por otros autores.

La severidad de los signos y la mortalidad que se presenta en los brotes varía de acuerdo a la virulencia de las cepas y a las modificaciones en el gen S del vDEP. En la primera región de este gen se encuentran las mayores variaciones, un cambio de un solo aminoácido podría modificar la virulencia de los coronavirus (Deng, *et al.*, 2016). En este se obtuvieron 4 muestras correspondientes al inicio (gestación) y final (destete) de las dos etapas analizadas (gestación durante brote y gestación consecutiva) y se emplearon como inóculos para su aislamiento en cultivo celular con la finalidad de que se replicara y obtener mayor material genético para la secuenciación. Empleando dos pares de iniciadores se obtuvo la secuencia parcial de la región NTD del gen S del virus de la granja, realizando el análisis filogenético se originó un nuevo subclado en un grupo de 22 cepas S-INDEL reportadas previamente al encontrar dos sustituciones: Q42K, D112A y la delección de un aminoácido N143del. Estas modificaciones persistieron a lo largo del monitoreo. Para el final del estudio (segundo destete) se encontraron dos sustituciones en la secuencia del inóculo original: N83S y S90G y en su tercer pase en cultivo celular la sustitución R33G. En México existe poca información acerca de las cepas circulantes, Lara-Romero, *et al.* (2017) reportaron la primer cepa INDEL en el país, su nombre es PEDV/MEX/ VER/01/2014 la cual tiene 99.8 % de identidad con la cepa OH851 y la segunda encontrada fue la PED/MEX/MICH/02/2015. La cepa del presente estudio sugiere ser la tercer INDEL encontrada.

Mediante análisis filogenéticos de diversas cepas se ha encontrado que difieren especialmente en el NTD, determinando más de 100 mutaciones en los aminoácidos. En las posiciones 1-324 de la proteína S se ha demostrado afinidad de unión a co-receptores de azúcar (Deng, *et al.*, 2016). Lin, *et al.* (2016) mencionan que el índice de mutación es de

6.2×10^{-4} sustituciones/sitio/año, adicionalmente estos autores reportaron que una inserción y una deleción dieron origen al clado de cepas emergente y al de cepas clásicas.

En el presente análisis se encontraron las múltiples deleciones (1-nt, 11-nt, y 3-nt) e inserciones (6 nt) en el NTD de la S1, típico de las cepas S-INDEL como lo reportan (Van Diep, *et al.*, 2018). Bertasio, *et al.* (2016) reportaron un seguimiento en granja durante un brote de INDEL donde se detectó un segundo pico de excreción viral en cerdos de 60 días de edad después del brote inicial, mediante secuenciación se determinó una variante genética diferente comparada con la del inicio de la signología clínica, por lo tanto concluyeron que existió una segunda introducción del vDEP, sugieren que la rápida diseminación del virus en una granja se debe a la deficiente bioseguridad o el manejo incorrecto durante la desinfección. Al final de este monitoreo se determinó que existieron dos sustituciones extras en el NTD pero no se registró un rebrote en la granja analizada, se demostró la existencia de anticuerpos capaces de neutralizar al virus circulante hasta el final del estudio aún con las modificaciones en la secuencia analizada, lo que sugiere una reacción cruzada como lo mencionan (Chen, *et al.*, 2016 B y C; Lin, *et al.*, 2015 A).

Lin, *et al.* (2016); Sun, *et al.* (2018) señalan que empleando bioinformática se predice que los cambios en la proteína S de las cepas podrían alterar su estructura primaria o secundaria, sitios de N-glicosilación, potenciales sitios de fosforilación y sitios de palmitolaciones; todas estas modificaciones afectarían la antigenicidad y patogenicidad. La deleción encontrada en la secuencia del virus estudiado podría explicar la presentación clínica observada en esta investigación.

Sun, *et al.* (2018) indican que la proteína S es la principal estructura para el desarrollo de vacunas contra este virus, así como para entender la relación genética entre las diversas cepas y poder así determinar la epidemiología de la enfermedad en el campo.

8. CONCLUSIONES

- En el presente estudio se realizó un monitoreo serológico y molecular de cerdas reproductoras y sus camadas durante un brote de DEP presentado en una granja, al igual en su siguiente parto.
- Se confirmó la presencia del virus en la granja mediante RT-PCR, la cepa causante del brote presentó características de S-INDEL y la presentación clínica observada concuerda con ello.
- Los parámetros productivos y reproductivos recabados antes, durante y posterior al brote no tuvieron diferencia significativa entre ellos.
- En la primera etapa la excreción viral en heces de las cerdas mostró un primer pico en las muestras obtenidas durante la gestación correspondiente al brote, el segundo pico se registró a los 14 días posteriores al parto indicando una re-infección. La excreción por parte de los lechones de la primera camada tuvo diferencia significativa en los tres muestreos realizados en ellos.
- Se detectó RNA viral en las heces de hembras y sus camadas de la segunda etapa, no se determinó diferencia en los cuatro muestreos de las cerdas. Con lo anterior se demostró la prolongada excreción viral en heces de las cerdas reproductoras indicando la persistencia del agente en la instalación porcina y la continua re-infección de los animales.
- La inmunidad humoral (IgG) generada por las cerdas se mantuvo hasta el final de la investigación indicando una duración de aproximadamente seis meses, al igual que los anticuerpos (IgG e IgA) presentes en el calostro. Es decir en ambas etapas se detectaron anticuerpos en suero y calostro de las cerdas.
- Se logró aislar el virus causante del brote y se llevó a un cuarto pase para la seroneutralización.
- Se determinó la existencia de anticuerpos neutralizantes contra el virus en 100 % de los sueros analizados pertenecientes a cerdas y solo en 40% de los sueros de lechones destetados.
- Con la secuenciación se determinó que la región parcial analizada del gen S (NTD) mostró una delección no encontrada en otras cepas INDEL además de dos sustituciones, estas mismas modificaciones persistieron a lo largo del estudio. La

secuencia obtenida al final del estudio reveló dos sustituciones extras en una región distinta.

- Al detectar la excreción viral por tiempo prolongado, se concluye que las inmunoglobulinas generadas son capaces de neutralizar de tal forma que no existió la re-emergencia de DEP en la granja analizada aunque la cepa encontrada al final de la investigación fuera distinta a la del brote inicial.

Los resultados obtenidos durante la presente investigación permiten concluir que la prevención de esta enfermedad radica en la generación de anticuerpos neutralizantes contra el vDEP ante una previa exposición por parte de la cerda reproductora, que serán transmitidos mediante el calostro a los lechones, siendo estos los animales principalmente afectados.

Las prácticas deficientes de bioseguridad, movimiento de animales, alimento, personal, equipo y otros fomites han sido identificados como factores de riesgo para la transmisión del virus entre granjas, por ello el mayor reto ante la re-emergencia del vDEP se encuentra asociado con las prácticas en la producción porcícola, así como la nula/baja producción de calostro/leche por parte de la cerda que puede dejar sin protección a los neonatos generando un rebrote.

Los datos adquiridos en estudios realizados en campo son importantes ya que se consideran factores que no podrían ser reproducidos en condiciones experimentales.

9. REFERENCIAS

1. Barrera-Aldana MA, Rivera-Benítez JF (tutor). Construcción de un sistema de expresión para la proteína N del virus de la diarrea epidémica porcina (vDEP) en *E. coli* y caracterización antigénica en ensayos inmunoabsorbentes. [Tesis en Internet]. [Ciudad de México]: Universidad Nacional Autónoma de México, 2018 [citado 22 de octubre 2018].
2. Bertasio C, Giacomini E, Lazzaro M, Perulli S, Papetti A, Lavazza A, Lelli D, Alborali G and Boniotti MB. Porcine Epidemic Diarrhea Virus Shedding and Antibody Response in Swine Farms: A Longitudinal Study. *Front. Microbiol.* 2016; 7:2009. doi: 10.3389/fmicb.2016.02009.
3. Clement T, Singrey A, Lawson S, Okda F, Nelson J, Diel D, Nelson EA, Christopher-Hennings J. Measurement of neutralizing antibodies against porcine epidemic diarrhea virus in sow serum, colostrum, and milk samples and piglet serum samples after feedback. *J. Swine Heal. Prod.* 2016; 24: 1–10.
4. Chen F, Ku X, Li Z, Memon A, Ye S, Zhu Y, Zhou C, Yao L, Meng X, He Q. Genetic characteristics of porcine epidemic diarrhea virus in Chinese mainland, revealing genetic. *Gene.* 2016; 588: 95–102 (A).
5. Chen Q, Gauger P, Stafne M, Thomas J, Madson D, Huang H, Zheng Y, Li G, Zhang J. Pathogenesis comparison between the United States porcine epidemic diarrhoea virus prototype and S-INDEL-variant strains in conventional neonatal piglets. *J. of General Virology.* 2016; 97: 1107–1121(B).
6. Chen Q, Thomas J, Giménez-Lirola L, Hardham J, Gao Q, Gerber P. Evaluation of serological cross-reactivity and cross-neutralization between the United States porcine epidemic diarrhea virus prototype and S-INDEL-variant strains. *BMC Vet. Res.* 2016; 12:70 (C).
7. Choudhury B, Dastjerdi A, Doyle N, Frossard JP, Steinbach F. From the field to the lab-An European view on the global spread of PEDV. *Virus Res.* 2016; 226: 40–49
8. Deng F, Ye G, Liu Q, Navid M, Zhong X, Li Y, Wan C, Xiao S, He Q, Fu Z, Peng G. Identification and Comparison of Receptor Binding Characteristics of the Spike Protein of Two Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strains. *Viruses.* 2016; 8: 55.

9. Diel D, Lawson S, Okda F, Singrey A, Clement T, Fernandes M, Christopher-Hennings J, Nelson E. Porcine epidemic diarrhea virus: An overview of current virological and serological diagnostic methods. *Virus Res.* 2016; 226: 60–70.
10. Furutani A, Kawabata T, Sueyoshi M, Sasaki Y. Impact of porcine epidemic diarrhea on herd and individual Berkshire sow productivity. *Anim. Reprod. Sci.* 2017; 183:1-8.
11. Furutani A, Kawabata T, Sueyoshi M, Sasaki Y. Assessment of reproductive performance in F1 sows exposed to the porcine epidemic diarrhea virus at different periods of production stage on farms with different hygienic environments. *Anim. Reprod. Sci.* 2018; 192: 233-241.
12. Gerber PF, Gong Q, Huang YW, Wang C, Holtkamp D, Opriessnig T. Detection of antibodies against porcine epidemic diarrhea virus in serum and colostrum by indirect ELISA. *Vet. J.* 2014; 202(1): 33–36.
13. Gerber PF, Xiao C, Lager K, Crawford K, Kulshreshtha V, Cao D. Increased frequency of porcine epidemic diarrhea virus shedding and lesions in suckling pigs compared to nursery pigs and protective immunity in nursery pigs after homologous re-challenge. *Vet. Res.* 2016; 47:118
14. Gimenez-Lirola LG, Zhang J, Carrillo-Avila JA, Chen Q, Magtoto R, Poonsuk K, Baum DH, Piñeyro P, Zimmerman J. Reactivity of porcine epidemic diarrhea virus structural proteins to antibodies against porcine enteric coronaviruses: diagnostic implications. *J. Clin. Microbiol.* 2017; 55:1426–1436.
15. Goede D, Morrison B. Production impact & time to stability in sow herds infected with porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). *Prevent Vet. Medicine.* 2016; 123: 202–207.
16. Goede D, Murtaugh M, Nerem J, Yeske P, Rossow K, Morrison R. Previous infection of sows with a “mild” strain of porcine epidemic diarrhea virus confers protection against infection with a “severe” strain. *Vet. Microbiol.* 2015; 176:161–164.
17. Herrera A. Diarrea Epidémica Porcina (DEP) Experiencias en México e impacto económico. En: 2° Simposio sobre diarrea epidémica porcina; Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; 2014 Agosto 28; Ciudad de México, México.
18. Horie M, Kabemura M, Masatani T, Matsuu A, Ozawa M. Isolation and molecular characterization of porcine epidemic diarrhea viruses collected in Japan in 2014. *Arch. Virol.* 2016; 161:2189–2195.

19. Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences*. 1992; 8: 275-282
20. Jung K, Saif LJ. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *Vet. J.* 2015; 204 (2): 134-43.
21. Kanamori K, Manchanayake T, Matsubayashi M, Imai N, Kobayashi Y, Sasai K, Shibahara T. Genetic and Histopathological Identification of *Cystoisospora suis* in a Post-weaned Piglet with Watery Diarrhea. *JARQ*. 2018; 52(1): 55-61.
22. Kwang-Soo L, Yeom M, Jungho K, Donghyuk K, Gunwoo H, Woonsung N, Van Phan L, Daesub S. Development of rapid immunochromatographic strip test for the detection of porcine epidemic diarrhea virus. *Vet. Rec.* 2017; 181(22): 596.
23. Langel S, Paim F, Lager K, Vlasova A, Saif L. Lactogenic immunity and vaccines for porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): Historical and current concepts. *Virus Res.* 2016; 226: 93–107.
24. Lara-Romero R, Gomez-Nunez L, Cerriteno-Sanchez JL, Marquez-Valdelamar L, Mendoza-Elvira S, Ramirez-Mendoza H, Rivera-Benitez JF. Molecular characterization of the spike gene of the porcine epidemic diarrhea virus in Mexico, 2013–2016. *Virus Genes*. 2017.
25. Lee C. Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virol. J.* 2015; 12:193.
26. Leidenberger S, Schröder Ch, Zani L, Auste A, Pinette M, Ambagala A, Nikolin V, Smit H de, Beer M, Blome S. Virulence of current German PEDV strains in suckling pigs and investigation of protective effects of maternally derived antibodies. Recuperado de: www.nature.com/scientificreports. 2017.
27. Lin C-H, Saif L, Marthaler D, Wang Q. Evolution, antigenicity and pathogenicity of global porcine epidemic diarrhea virus strains. *Virus Res.* 2016; 226: 20-39.
28. Lin C-M, Annamalai T, Liu X, Gao X, Lu Z, El-Tholoth M, Hu H, Saif L, Wang Q. Experimental infection of a US spike insertion deletion porcine epidemic diarrhea virus in conventional nursing piglets and cross-protection to the original US PEDV infection. *Vet. Res.* 2015; 46:134 (A).

29. Lin C-M, Gao X, Oka T, Vlasova AN, Esseili MA, Wang Q, Saif LJ. Antigenic relationships among porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus strains. *J. Virol.* 2015; 89:3332–3342 (B).
30. Liu C, Tang J, Ma Y, Liang X, Yang Y, Peng G, Qi Q, Jiang S, Li J, Du L, Li F. Receptor usage and cell entry of porcine epidemic diarrhea coronavirus. *J. Virol.* 2015; 89: 6121–6125.
31. Martínez-Puebla AR, Gómez-Núñez L, De la Luz-Armendáriz J, Cerriteño-Sánchez JL, Lara-Romero R, Rivera-Benítez JF. Evaluación de pruebas de RT-PCR para la detección de la excreción del virus de Diarrea Epidémica Porcina en lechones En: *Memorias AMVEC. Congreso Nacional LI. 2017 Julio. Querétaro, México.* p. 289-290.
32. Mesonero-Escuredo S, Strutzberg-Minder K, Casanovas C, Segalés J. Viral and bacterial investigations on the etiology of recurrent pig neonatal diarrhoea cases in Spain. *Porcine Health Management.* 2018; 4:5.
33. Oka T, Saif LJ, Marthaler D, Esseili M, Meulia T, Lin C-H, Vlasov A, Jung K, Zhang Y, Wang Q. Cell culture isolation and sequence analysis of genetically diverse US porcine epidemic diarrhea virus strains including a novel strain with a large deletion in the spike gene. *Vet. Microbiol.* 2014; 173:258–269.
34. Okda F, Liu X, Singrey A, Clement T, Nelson J, Christopher-Hennings J, Nelson E, Lawson S. Development of an indirect ELISA, blocking ELISA, fluorescent microsphere immunoassay and fluorescent focus neutralization assay for serologic evaluation of exposure to North American strains of Porcine Epidemic Diarrhea Virus. *BMC Vet. Res.* 2015; 11:180.
35. Ouyang K, Shyu DL, Dhakal S, Hiremath J, Binjawadagi B, Lakshmanappa. Evaluation of humoral immune status in porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) infected sows under field conditions. *Vet. Res.* 2015; 46:140.
36. Park J-E, Cruz DJ, Shin H-J. Receptor-bound porcine epidemic diarrhea virus spike protein cleaved by trypsin induces membrane fusion. *Arch. Virol.* 2011; 156:1749–1756 (A).
37. Park C, Lee K, Lee C. PED Past, Present and Future. En: *Proceedings of the 5th Asian Pig Veterinary Society Congress. 2011 Marzo. Pattaya, Thailand.* S19-S20 (B).

38. Paudel S, Park J, Jang H, Hyun B, Yang D, Shin H. Evaluation of antibody response of killed and live vaccines against porcine epidemic diarrhea virus in a field study. *Veterinary Quarterly*. 2014; 34(4): 194-200.
39. Perri A, Poljak Z, Dewey C, Harding J, O'Sullivan T. An epidemiological investigation of the early phase of the porcine epidemic diarrhea (PED) outbreak in Canadian swine herds in 2014: A case-control study. *Prevent Vet. Medicine*. 2018; 150: 100-109.
40. Poonsuk K, Giménez-Lirola L, Zhang J, Arruda P, Chen Q, Carrion L, Magtoto R, Pineyro P, Sarmiento L, Wang C, Sun Y, Madson D, Johnson J, Yoon K, Zimmerman J, Main R. Does Circulating Antibody Play a Role in the Protection of Piglets against Porcine Epidemic Diarrhea Virus?. *PLoS ONE*. 2016;11 (4) (A).
41. Poonsuk K, Zhang J, Chen Q, Gonzalez W, Correa da Silva Carrion L, Sun Y. Quantifying the effect of lactogenic antibody on porcine epidemic diarrhea virus infection in neonatal piglets. *Vet. Microbiol*. 2016; 197: 83–92 (B).
42. Rapp-Gabrielson, Frederickson DF, Bandrick M, Taylor LP, Marx J, Ricker T, Coleman D, Pfeiffer A, Thompson JR, Zhang J, Zager S, Huether M, Hardham JM, Sornsen S. Field efficacy of an experimental Porcine Epidemic Diarrhea (PED) vaccine administered to pregnant sows. En: *North American PRRS Symposium*. 2014 p 80.
43. Reed MJ y Muench H. A simple method for estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg*. 1938; 27: 493-497.
44. Schwartz TJ, Rademacher CJ, Gimenez-Lirola LG, Sun Y, Zimmerman JJ. Evaluation of the effects of PEDV vaccine on PEDV naïve and previously PEDV exposed sows in a challenge model comparing immune response and preweaning mortality. En: *Annual Meeting: Standing on the shoulders of giants: Collaboration and teamwork*. American Association of Swine Veterinarians. 2016. EEUU p. 363-366.
45. Solís-Galicia DF, Gómez-Núñez L, De la Luz-Armendáriz J, Rivera-Benítez JF. Implementación de dos métodos para el aislamiento del virus de diarrea epidémica porcina en cultivos celulares. En: *Memorias AMVEC. Congreso Nacional LI*. 2017 Julio. Querétaro, México. p. 345-346.
46. Song D, Park B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes*. 2012; 44:167–175.

47. Song Q, Stone S, Drebes D, Greiner L, Dvoraka C, Murtaugh M. Characterization of anti-porcine epidemic diarrhea virus neutralizing activity in mammary secretions. *Virus Res.* 2016; 226: 85–92.
48. Stadler J, Moser L, Numberger J, Rieger A, Strutzberg-Minder K, Stellberger T, Ladinig A, Ritzmann M, Fux R. Investigation of three outbreaks of Porcine Epidemic Diarrhea in Germany in 2016 demonstrates age dependent differences in the development of humoral immune response. *Prevent Vet. Medicine.* 2018; 150:93–100.
49. Stadler J, Zoels S, Fux R, Hanke D, Pohlmann A, Blome S, Weissenbock H, Weissenbacher-Lang C, Ritzmann M, Ladinig A. Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in southern Germany. *BMC Vet. Res.* 2015; 11: 142.
50. Sun M, Ma J, Yu Z, Pan Z, Lu C, Yao H. Identification of two mutation sites in spike and envelope proteins mediating optimal cellular infection of porcine epidemic diarrhea virus from different pathways. *Vet. Res.* 2017; 48:44 (A).
51. Sun J, Li Q, Shao C, Ma Y, He H, Jiang S, Zhou Y, Wu Y, Ba S, Shi L, Fang W, Wang X, Song H. Isolation and characterization of Chinese porcine epidemic diarrhea virus with novel mutations and deletions in the S gene. *Vet. Microbiol.* 2017; 207: 248–258 (B).
52. Sunhee L, Kyu-Yeol S, Yun-Hee N, Seung-Chul L, Hwan-Won C, In-Joong Y, Changhee L. Genetic characteristics, pathogenicity, and immunogenicity associated with cell adaptation of a virulent genotype 2b porcine epidemic diarrhea virus. *Vet. Microbiol.* 2017; 207: 248–258.
53. Taimur Islam Md, Kubota T, Ujike M, Yahara Y, Taguchi F. Phylogenetic and antigenic characterization of newly isolated porcine epidemic diarrhea viruses in Japan. *Virus Res.* 2016; 222: 113–119.
54. Teeravechyan S, Frantz PN, Wongthida P, Chailangkarn T, Jaru-Ampornpan P, Koonpaew S, Jongkaewwattana A. Dechipering the biology of porcine epidemic diarrhea in the era of reverse genetics. *Virus Res.* 2016; 226: 152-171
55. Thomas J, Chen Q, Gauger P, Giménez-Lirola L, Sinha A, Harmon K, Madson D, Burrough E, Magstadt D, Salzbrener H, Welch M, Yoon K, Zimmerman J, Zhang J. Effect of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Infectious Doses on Infection Outcomes in Naïve Conventional Neonatal and Weaned Pigs. *PLoS ONE.* 2015; 10(10).

56. Van Diep N, Sueyoshi M, Norimine J, Hirai T, Myint O, Ping Ping The A, Zahli Izzati U, Fuke N, Yamaguchi R. Molecular characterization of US-like and Asian non-S INDEL strains of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) that circulated in Japan during 2013–2016 and PEDVs collected from recurrent outbreaks. *BMC Vet. Res.* 2018; 14:96.
57. Wang L, Zhang Y, Byrum B. Development and evaluation of a duplex real-time RT-PCR for detection and differentiation of virulent and variant strains of porcine epidemic diarrhea viruses from the United States. *J. Virol. Methods.* 2014; 207:154-157.
58. Yamamoto R, Soma J, Nakanishi M, Yamaguchi R, Niinuma S. Isolation and experimental inoculation of an S INDEL strain of porcine epidemic diarrhea virus in Japan. *Res. Vet. Sci.* 2015; 103: 103-106.

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Figura 1. Esquema representativo del ciclo de replicación del vDEP	6
Figura 2. Signología observada en cerdos destetados y hembras del área de servicios y gestación	22
Figura 3. Signología observada en sala de maternidad.....	22
Figura 4. Medidas de desinfección implementadas en la granja y en sala de maternidad...23	
Figura 5. Cronograma de muestreo en las cerdas evaluadas	25
Figura 6. Cronograma de muestreo en lechones.....	25
Figura 7. Toma de muestras en cerdas y lechones.....	26
Figura 8. Esquema del gen S del vDEP	31
Figura 9. Parámetros registrados durante el brote de DEP y en el siguiente parto.....	40
Figura 10. Signología observada en lechones de un día de nacidos en primera etapa de muestreo.....	35
Figura 11. Camadas nacidas en el parto de la segunda etapa de muestreo.....	35
Figura 12. Valor de significancia en el análisis de comparación de los cuatro momentos de muestreo en la primera etapa	36
Figura 13. Promedio de excreción viral en hisopados rectales de cerdas en gestación, un día posparto, catorce días y al destete.....	37
Figura 14. Promedio de excreción viral en hisopados rectales de camadas al día de nacimiento, catorce días de vida y al destete.	37
Figura 15. Excreción viral en hisopados rectales de cerdas en gestación, un día posparto, catorce días y al destete, en el parto consecutivo al brote	39
Figura 16. Promedio de excreción viral en hisopados rectales de camadas al día de nacidos, catorce días de vida y al destete.....	39

Figura 17. Efecto observado durante el aislamiento del vDEP en células Vero durante primer y segundo pase.	40
Figura 18. Aislamiento del vDEP en células Vero durante tercer y cuarto pase.	40
Figura 19. Niveles de IgG en suero de cerdas en gestación, un día posparto, a los catorce días y al destete	41
Figura 20. Niveles de IgG en suero de cerdas en gestación, un día posparto, a los catorce días y al destete en segunda etapa de muestreo	42
Figura 21. Testigo negativo y positivo de prueba de seroneutralización contra vDEP.	44
Figura 22. Efecto citopático observado en seroneutralización empleando un suero	44
Figura 23. Efecto citopático observado en seroneutralización empleando un suero positivo	45
Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa con muestras amplificadas.....	46
Figura 25. Análisis filogenético molecular por el método de máxima verosimilitud de secuencias amplificadas con primer par de iniciadores.	47
Figura 26. Análisis filogenético molecular por el método de máxima verosimilitud de secuencias amplificadas con segundo par de iniciadores.	49
Figura 27. Análisis de regiones variables de las secuencias obtenidas del primer par de iniciadores	50
Figura 28. Análisis de regiones variables de las secuencias obtenidas del segundo par de iniciadores.	50
Cuadro 1. Información general de granja analizada.	21
Cuadro 2. Medidas implementadas después del brote de DEP.	23
Cuadro 3. Condiciones para la amplificación de una región del gen S	27
Cuadro 4. Etapa y muestreo seleccionados para preparación de los inóculos.....	30
Cuadro 5. Secuencia de nucleótidos de los iniciadores para la amplificación parcial del gen	31

Cuadro 6. Mezcla de reacción de PCR punto final para amplificación parcial del gen S...	31
Cuadro 7. Parámetros del grupo testigo registrados un parto anterior al brote.	34
Cuadro 8. Promedio de cuatro parámetros evaluados, durante y un parto posterior a antes del brote de DEP y su valor de significancia.	34
Cuadro 9. Título de anticuerpos neutralizantes de cerdas y lechones en las dos etapas de muestreo.....	45
Cuadro 10. Inóculos empleados para amplificación parcial del gen S.....	46