



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**EVALUACIÓN DE UN BIOLÓGICO
RECOMBINANTE DEL VIRUS DE LA
DIARREA EPIDÉMICA PORCINA EN
CERDOS EN ENGORDA**

T E S I S

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

PRESENTA:

MANUEL ZAPATA MORENO

ASESOR:

Dr. José Francisco Rivera Benítez

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 2020



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.

Dedicatorias

A mi madre, Yolanda Moreno, de quien toda la vida he recibido comprensión y cariño, mismo que estoy eternamente agradecido. A mi padre, J. Vicente Zapata, cuyo ejemplo de vida y desempeño profesional han guiado siempre mi camino, gracias por tus oportunas palabras y a ambos, por darme todos los elementos para ser quién soy ahora.

A mi hermano, Oscar V. Zapata, mi segundo ejemplo a seguir, y a mi cuñada, Norma Anguiano, ambos han inspirado en mí, el carácter para enfrentar un problema y salir adelante. A mis sobrinos, Ale y Fer, por siempre recordarme al niño interior con sus juegos y ocurrencias. A ustedes, *la familia que siempre estará conmigo.*

Al equipo de trabajo de Virología, del CENID Sanidad Animal e Inocuidad, aquellos exploradores siempre de la verdad. *Confía en aquellos que buscan la verdad, duda de quiénes la encuentran.*

A ti, *mi vendaval.*

A los animales involucrados en cada proyecto de investigación, ya que con su beneficio enriquecen al arte más noble y a la ciencia de curar a otros animales, la medicina veterinaria.

Finalmente, al resto de mi familia y amigos, cada reunión sirvió para alentarme a seguir dando lo mejor de mí, a quienes me han acompañado a lo largo de *este viaje*; a aquellos que ya no están y los que sé que seguirán conmigo.

Nada tenemos en propiedad, sino a nosotros mismos; lo único que nos es permitido entregar es el don de nuestro trabajo, nuestro espíritu y nuestro ingenio. Y esta ofrenda de nosotros a todos los hombres, enriquece tanto al donador como a la comunidad.

A. France

Agradecimientos

A mi maestro y asesor, Dr. José Francisco Rivera Benítez, darme la oportunidad de trabajar en el área de virología desde que fue mi profesor, por su confianza y dirección antes, durante y después de mi estancia en el laboratorio y sus conocimientos en lo teórico y práctico, agradecerle todo el aprendizaje durante la realización de mi tesis, que sirvieron para mi formación, tanto personal como académica.

Al Dr. Luis Gómez Núñez, de quien siempre tuve la seguridad y el respaldo, para resolver alguna situación de índole laboral o propia, gracias por la comprensión y el aprecio hacia mi persona, las horas de trabajo dedicadas y las charlas amenas en el laboratorio.

A la Dra. Jazmín de la Luz y al Ing. Ricardo Barba su aportación en el procesamiento de las muestras, análisis de resultados y la realización de las pruebas de PCR. A la Dra. Catalina Tufiño, su apoyo para llevar a cabo el análisis estadístico y discusión. Además de su colaboración y confianza, han estado siempre al pendiente de mí y de mi trabajo, siendo siempre un ejemplo del trabajo en equipo y apoyo invaluable.

A mis compañeros del laboratorio, es difícil dejar a alguien fuera ya que todos, sin excepción, me ayudaron de manera importante en el trabajo de laboratorio y el manejo de los animales, aportando cada uno su conocimiento y experiencia, así como sus diferentes puntos de vista, los cuales enriquecieron mi trabajo; especial agradecimiento a la MVZ Liliana Vargas, tu comprensión y consejo que me llevó siempre a desempeñar de mejor manera mi trabajo, al Dr. José Luis Cerriteño y a la Ing. L. Itzel Álvarez la introducción al mundo de las proteínas recombinantes, al MVZ Marco Barrera su apoyo en la realización de este proyecto. Sin duda, me llevo momentos muy gratos del laboratorio de Virología.

A los integrantes del honorable jurado por evaluar el presente trabajo y proporcionar sus acertadas observaciones y correcciones pertinentes:

Presidente: MVZ Francisco Javier Basurto Alcántara

Vocal: MVZ Rosalba Carreón Nápoles

Secretario: MVZ José Iván Sánchez Betancourt

Suplente: MVZ José Francisco Rivera Benítez

Suplente: MVZ Pablo Hernández Peralta

Agradecimientos institucionales

El presente trabajo fue realizado en las instalaciones del Laboratorio de Virología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria, Sanidad Animal e Inocuidad (CENID-SAI), perteneciente al Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). El financiamiento para el desarrollo de este proyecto fue otorgado por Proyecto FONSEC-SAGARPA-CONACYT 2017-06-292826 “Desarrollo, producción y validación de biológicos y sistemas diagnósticos de nueva generación basados en la Biotecnología para contribuir en la prevención y control de las enfermedades que afectan la producción pecuaria en México”, RF INIFAP, 13592932977 y CONACYT PDCPN2014-01/249177. No. 249177 “Desarrollo y validación de productos de diagnóstico y un biológico para el control y la prevención de la diarrea epidémica porcina”. El alumno fue becario del proyecto PDCPN2014-01/249177 con número 25965.

Contenido

Resumen.....	1
1. Introducción	2
1.1 Generalidades	2
1.2 Agente etiológico	3
1.2.1 Clasificación	3
1.2.2 Características del virión	4
1.2.3 Organización genómica	4
1.2.4 Proteínas estructurales.....	5
1.2.5 Ciclo de replicación viral	6
1.3 Patogenia	8
1.3.1 Transmisión	8
1.3.2 Signos clínicos.....	9
1.3.3 Lesiones	10
1.4 Inmunidad frente al vDEP	10
1.5 Epidemiología del vDEP	12
1.6 Situación en México	14
1.7 Diagnóstico	16
1.7.1 Pruebas virológicas	16
1.7.2 Pruebas serológicas	17
1.8 Prevención y control	18
1.8.1 Manejo zootécnico	18
1.8.2 Feedback	19
1.8.3 Vacunación	20
1.9 Ingeniería genética.....	21
2. Justificación	23
3. Hipótesis	23
4. Objetivo general	24
4.1 Objetivos específicos.....	24

5. Material y métodos	25
5.1 Biológico recombinante	25
5.1.1 Cepas	25
5.1.2 Cinética de expresión de las cepas de <i>E. coli</i> BL21/S1 1135, <i>E. coli</i> BL21/ S1 834, <i>E. coli</i> BL21/M y <i>E. coli</i> BL21/N	25
5.1.3 Extracción de los cuerpos de inclusión	26
5.1.4 Cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC)	27
5.1.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	27
5.1.6 Diálisis.....	28
5.1.7 Cuantificación	28
5.1.8 Liofilización	28
5.1.9 Formulación del biológico recombinante INI- <i>rv</i> DEP	29
5.2 Animales de experimentación	29
5.2.1 Toma de muestras	30
5.2.2 Inmunización e infección experimental	31
5.2.3 Monitoreo clínico	32
5.3 Ensayo inmunoenzimático ELISA	33
5.4 RT-PCR en tiempo real	33
5.5 Análisis estadístico	33
6. Resultados	35
6.1 Biológico recombinante	35
6.1.1 Inducción de las cepas de <i>E. coli</i> BL21/S1 1135 y <i>E. coli</i> BL21/ S1 834	35
6.1.2 Cinética de expresión de las cepas de <i>E. coli</i> BL21/M y <i>E. coli</i> BL21/N	35
6.1.3 Extracción de los cuerpos de inclusión	37
6.1.4 Cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC)	38
6.1.5 Diálisis	41
6.1.6 Cuantificación	43
6.2 Animales de experimentación	43
6.2.1 Seguridad del biológico recombinante INI- <i>rv</i> DEP	43
6.2.2 Infección experimental	43

6.2.3 Monitoreo clínico de temperatura	44
6.2.4 Signos clínicos	45
6.3 Respuesta inmune humoral.....	50
6.3.1 IgG específica hacia la subunidad rS 834	50
6.3.2 IgG específica hacia la proteína rN.....	51
6.3.3 IgG específica hacia la subunidad rS 1135	53
6.3.4 IgG específica hacia la proteína rM.....	54
6.4 Evaluación de diferentes concentraciones de antígeno de la subunidad rS 834 para la detección de IgA	55
6.5 Determinación de la dilución óptima para muestras de fluido oral	56
6.6 Respuesta inmune mucosal	57
6.6.1 Niveles de IgA en fluidos orales	57
6.6.2 Niveles de IgG en fluidos orales	58
6.7 Excreción viral	59
7. Discusión	61
8. Conclusiones	68
9. Referencias	69
Lista de figuras y cuadros	78
Anexos	80

RESUMEN

ZAPATA MORENO MANUEL. Evaluación de un biológico recombinante del virus de diarrea epidémica porcina en cerdos en engorda (bajo la dirección de: Dr. José Francisco Rivera Benítez).

La diarrea epidémica porcina (DEP) es una enfermedad emergente y reemergente, causada por el virus de diarrea epidémica porcina (vDEP). La infección por el vDEP produce un cuadro agudo de diarrea, vómito, inapetencia y letargia provocando una morbilidad del 100%, afectando a cerdos de todas las edades, y mortalidad del 50 al 100%. En México, la emergencia de la enfermedad generó pérdidas económicas estimadas del 8.7% de la producción de ganado porcino en 2014 y actualmente se considera una enfermedad endémica, a pesar de los programas de bioseguridad en granjas y el uso reciente de una vacuna inactivada, por lo que se requieren métodos de control más eficientes. En este estudio se produjeron lotes de las proteínas recombinantes N, M y dos subunidades de la S (S834 y S1135) del vDEP, con concentraciones y pureza adecuadas. Se formuló un biológico recombinante utilizando una dosis de 300µg de proteína purificada en combinación con dos adyuvantes comerciales. Se conformaron cuatro grupos experimentales de 5 cerdos de 24 semanas de edad, cada uno: G1. Cerdos vacunados e infectados experimentalmente: VacR/INF, G2. Cerdos vacunados y no infectados: VacR/No-INF, G3. Cerdos no vacunados e infectados experimentalmente: No-VacR/INF y G4. Cerdos no vacunados y no infectados: No-VacR/No-INF. Los dos grupos VacR se inmunizaron vía intramuscular e intranasal, sin efectos adversos. Se evidenció una respuesta inmune específica de IgG hacia las cuatro proteínas utilizadas, en suero y de IgG e IgA en fluido oral hacia la S834, mediante ELISA indirecto. Los dos grupos INF fueron infectados experimentalmente y los animales vacunados manifestaron una menor duración de los signos clínicos y un menor tiempo de excreción viral, así como una carga viral menor, evaluados mediante RT-PCR, en muestras de hisopo rectal. Se comprobó la eficacia del biológico recombinante a través de la respuesta inmune humoral y mucosal inducida, así como la protección conferida ante el desafío con una cepa virulenta, mediante la valoración de signos clínicos y excreción viral, siendo candidato como vacuna subunitaria contra la DEP.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

La diarrea epidémica porcina (DEP) es reconocida actualmente a nivel mundial como una enfermedad emergente y re-emergente, distribuida en los continentes de Europa, Asia y América; afecta gravemente la producción porcícola, en forma clínica y económica (Jung y Saif, 2015). Únicamente la especie porcina es susceptible a la enfermedad y no representa un riesgo para la salud pública. La DEP no se encuentra dentro de la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (OIE, 2014), por lo cual no existen medidas de restricción para la movilización de animales, limitando la contención de la enfermedad dentro de un área geográfica. En México, es una enfermedad que se considera endémica en las granjas porcinas desde su primer reporte, en 2013 (OIE-WAHID, 2014).

La DEP fue descrita por primera vez en 1971 en el Reino Unido, identificando una infección entérica, altamente contagiosa y que afecta a cerdos de cualquier edad (Jung y Saif, 2015; Carvajal *et al.*, 2015). Esta enfermedad es caracterizada por un cuadro agudo de diarrea líquida profusa, vómito y letargia, el cual es indistinguible al que se produce por la infección con otros agentes virales, tales como el virus de Gastroenteritis Transmisible (vGET) o el Deltacoronavirus porcino (DCoVP), otros dos coronavirus entéricos, así como por el Rotavirus porcino (RovP) (Jung y Saif, 2015; Opriessnig, 2015), los cuales, en conjunto con infecciones bacterianas pueden establecer el complejo entérico porcino. A pesar de que los agentes involucrados comparten ciertas características biológicas y moleculares, la epidemiología y curso de la enfermedad, así como los métodos de control y prevención, difieren en el caso particular del virus de la DEP (vDEP) (Wang *et al.*, 2019).

Un método de control eficiente debe incluir de manera integral programas de bioseguridad, manejo zootécnico, así como el uso de vacunas seguras y eficientes. A pesar de que tiene poca accesibilidad comercial en nuestro país, se cuenta con una vacuna inactivada, cuya eficacia se encuentra a la expectativa en condiciones de campo. (Sánchez-Sosa *et al.*, 2018). Los avances en biotecnología han permitido diseñar vacunas de nueva generación como vacunas de ADN, de partículas replicantes de ARN, vacunas vectorizadas, vacunas activas modificadas y vacunas subunitarias (Gerdtts y Zakhartchouk, 2017; Zúñiga *et al.*, 2016).

Una vacuna subunitaria, es aquella en la que se utilizan antígenos virales específicos y purificados, por lo que tienen un mejor perfil de seguridad (Rajasekaran *et al.*, 2018). A la fecha, se han identificado los genes que codifican las proteínas antigénicas del vDEP, permitiendo su producción recombinante utilizando diversos sistemas de expresión, abriendo la posibilidad de su uso como inmunógeno en vacunas subunitarias experimentales y como reactivo en pruebas diagnósticas (Hou *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2015). La dosis, vía de administración, estabilidad de las proteínas recombinantes y uso de adyuvantes, influyen en la presentación del antígeno al huésped, sin embargo, existe poca información de la eficacia para favorecer inmunidad a nivel de las mucosas después de la administración vía oral o parenteral (Gerdtz y Zakhartchouk, 2017). En este estudio las proteínas recombinantes N, M y dos subunidades de la proteína S (denominadas S834 y S1135) purificadas del vDEP, se emplearon para formular un biológico recombinante, cuya antigenicidad fue evaluada mediante la aplicación en cerdos de engorda, la cual se realizó por vía intramuscular e intranasal con un intervalo entre aplicaciones de 14 días, y la protección conferida se analizó frente al desafío experimental de los animales.

1.2 Agente etiológico

La identificación y aislamiento del agente etiológico fue realizado en 1978, en Bélgica, clasificándose como un coronavirus, designando a la cepa originaria CV777 del vDEP. El agente causal era diferente a los coronavirus ya conocidos en esa época, el vGET y el virus neurotrópico de la Encefalomiелitis Hemoaglutinante Porcina (vEHP) (Pensaert y de Bouck, 1978; Carvajal *et al.*, 2015).

1.2.1 Clasificación

El vDEP se clasifica taxonómicamente dentro del orden *Nidovirales*, suborden *Cornidovirineae*, miembro de la familia *Coronaviridae*, subfamilia *Orthocoronavirinae*, género *Alphacoronavirus*, subgénero *Pedacovirus*, especie virus de diarrea epidémica porcina (ICTV, 2018). Actualmente existen otros miembros de la familia *Coronaviridae*, que afectan a los cerdos: el vGET y el coronavirus respiratorio porcino (CRP), originado por mutación del vGET debido a una delección natural en la proteína S, pertenecientes al género *Alphacoronavirus*; el vEHP, que pertenece al género *Betacoronavirus*; el DCovP,

del género *Deltacoronavirus*; y el coronavirus entérico porcino (SECoV, por sus siglas en inglés) descubierto recientemente, resultado de la recombinación del gen S del vDEP CV777 y el vGET (Jung y Saif, 2015, Chen *et al.*, 2015, Boniotti *et al.*, 2016).

1.2.2 Características del virión

Se identifica un virus envuelto, con un núcleo icosaédrico y nucleocápside helicoidal (Fig. 1). El virión posee un tamaño de 95-190 nm de diámetro, con proyecciones proteicas de 18 nm de longitud, denominados peplómeros, dando la apariencia de corona solar, lo que otorga el nombre a la familia *Coronaviridae* (Lee, 2015)

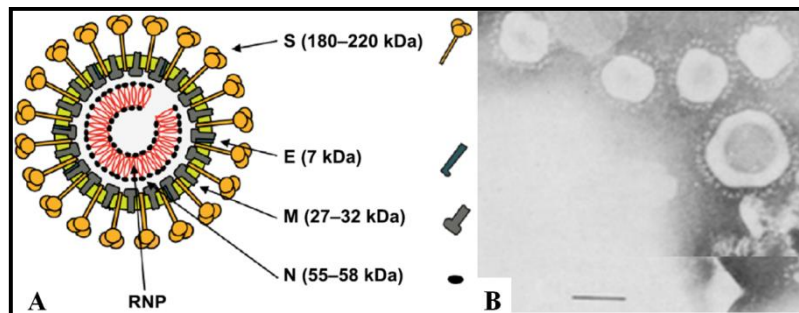


Figura 1. Estructura del vDEP. A) Esquema del virión y las proteínas estructurales con su peso molecular aproximado. B) Micrografía electrónica de una partícula del vDEP. La barra representa 100 nm. S, proteína spike, E, proteína de envoltura, M, proteína de membrana, N, nucleoproteína, RNP, complejo ribonucleoproteína. Modificado de Lee, 2015; Pensaert y de Bouck, 1978.

Generalmente los virus envueltos son susceptibles a cambios en el medio. El vDEP es inactivado fácilmente por solventes como el éter o cloroformo, agentes oxidantes, como el Virkon S y otros desinfectantes como el NaOH 2%, formaldehído o glutaraldehído, detergentes iónicos y no iónicos. El virus pierde su infectividad en valores fuera del rango de pH de 4 a 9. Sin embargo, permanece estable en temperaturas desde 4° a 50 ° C y en presencia de materia orgánica (Jung y Saif, 2015).

1.2.3 Organización genómica

Su material genético consiste en una molécula lineal de ARN en sentido positivo de una sola cadena, de 28 Kb. de longitud aproximadamente, siendo el ARN viral no segmentado más largo conocido, tiene un extremo 3' poliadenilado y un cap-5', similar al ARNm celular. El genoma del vDEP posee siete marcos de lectura abiertos (ORF, por sus siglas en inglés) (Lee, 2015).

El ORF 1a y ORF 1ab, abarcan dos tercios del genoma 5' constituyendo las poliproteínas 1a y 1ab (pp1a y pp1ab) las cuales son escindidas originando 16 proteínas no estructurales (nsp), involucradas en el proceso de replicación y transcripción, seguidos de los ORF's que codifican las proteínas estructurales: proteína "spike" (S), proteína de membrana (M), de envoltura (E), y la nucleocápside (N); finalmente un gene accesorio el cual codifica una proteína denominada ORF 3 (Jung y Saif, 2015; Song y Park, 2012). Los genes están organizados en el genoma del vDEP de la siguiente forma: 5'-UTR-ORF1a-ORF1ab-S-ORF3-E-N-M-UTR-3' (Fig. 2).

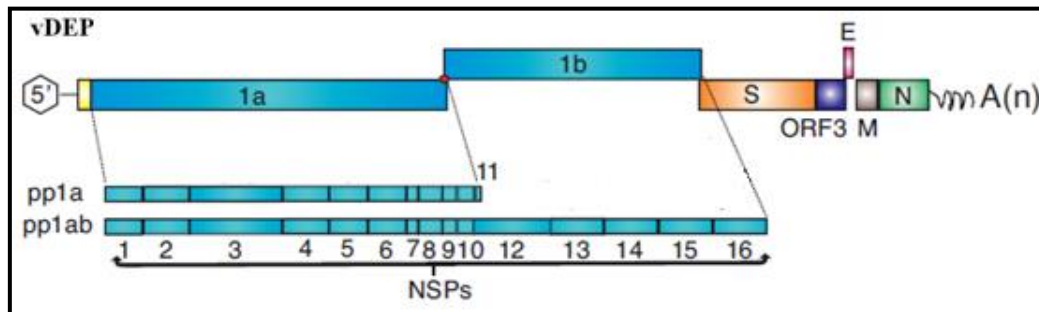


Figura 2. Organización genómica del vDEP. Las poliproteínas 1a y 1ab (pp1a y pp1ab) son traducidas en 16 proteínas no estructurales (NSPs), seguido por las proteínas S, proteína spike, ORF 3, E, proteína de envoltura, M, proteína de membrana, N, nucleoproteína, y un extremo poliadenilado A(n). Modificado de Wang *et al.*, 2019.

1.2.4 Proteínas estructurales

La proteína S es una glicoproteína transmembranal responsable de la adherencia viral, mediante la unión al receptor celular y de la fusión de la envoltura con la membrana celular y la entrada del virus. La interacción directa con la célula hospedadora ha generado que esta proteína sea muy diversa entre las cepas del vDEP. Tiene un peso aproximado de 150-220 kDa y está compuesta de 1383 aminoácidos. Basado en la homología con la proteína S de otros coronavirus, ésta se encuentra constituida por cinco dominios: un péptido señal, dos subunidades denominadas S1 y S2, un dominio transmembranal y una porción terminal (Sun *et al.*, 2008) (Fig. 3).

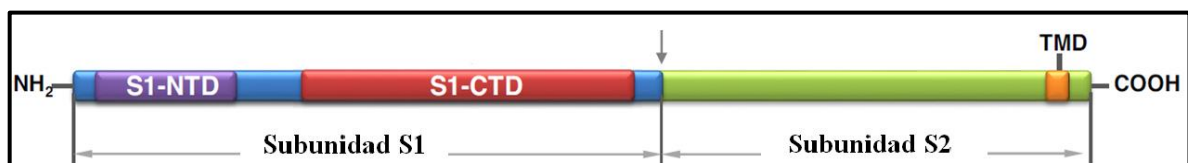


Figura 3. Representación esquemática de la proteína S. S1-NTD, dominio amino terminal de la subunidad S1, S1-CTD, dominio carboxilo terminal de la subunidad S1, TMD, dominio transmembranal. Modificado de Wang *et al.*, 2019.

La subunidad S1 de la proteína S es importante en la unión del virus al receptor celular. Contiene un dominio amino terminal (S1-NTD), el cual tiene actividad de unión a ácido siálico y un dominio carboxilo terminal (S1-CTD), que interactúa con el receptor celular, aminopeptidasa porcina N (APN). La subunidad S2 facilita la fusión de la envoltura viral, con la membrana plasmática. Presenta un péptido de fusión (FP), dos regiones repetidas “heptad”, denominados HR1 y HR2 y un dominio transmembranal (Okda *et al.*, 2017). Además de la adhesión y fusión viral, la proteína S se destaca por la identificación de varios epítopes que, al ser reconocidos, generan anticuerpos neutralizantes contra el virus, en diferentes residuos de aminoácidos (aa), denominados: NTD/S0 (aa 1-219), péptido M (aa 201-212), COE (aa 499-638), SS2 (aa 744-759), SS6 (aa 756-771) y uno en el dominio carboxilo terminal (aa 1371-1377) (Cao *et al.*, 2015, Okda *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017).

La proteína M es una glicoproteína de un peso aproximado de 20-30 kDa, posee un dominio externo amino terminal corto y un dominio carboxi-terminal interno. Es necesaria para el proceso de ensamblaje en conjunto con la proteína E, siendo el componente más abundante de la envoltura viral y además genera anticuerpos neutralizantes contra el vDEP. La proteína N tiene un peso aproximado de 58 kDa y su función es conformar la nucleocápside helicoidal, al interactuar con el ARN genómico viral durante el ensamblaje del virión. La proteína N también altera las respuestas antivirales antagonizando la producción de interferón, como parte de la estrategia de evasión inmune, y activa NF- κ B (Lee, 2015). Debido a la interacción con el hospedador y a sus características antigénicas, las proteínas S, M y N pueden ser el objetivo principal para el desarrollo de vacunas efectivas contra el vDEP.

1.2.5 Ciclo de replicación viral

Se ha identificado que la aminopeptidasa N porcina (APN), expresada en la superficie de los enterocitos, funciona como receptor específico del vDEP, y el ácido siálico como co-receptor uniéndose a los distintos dominios de la proteína S. La escisión de la proteína S, en S1 y S2 es originada por proteasas de la célula hospedadora, o por tripsina cuando se trata de cultivo celular. La replicación y transcripción viral tiene lugar en el citoplasma de los enterocitos, por lo que la internalización se realiza mediante fusión directa de la membrana plasmática y de la envoltura, liberando el genoma viral (Li *et al.*, 2017; Okda *et al.*, 2017) (Fig. 4).

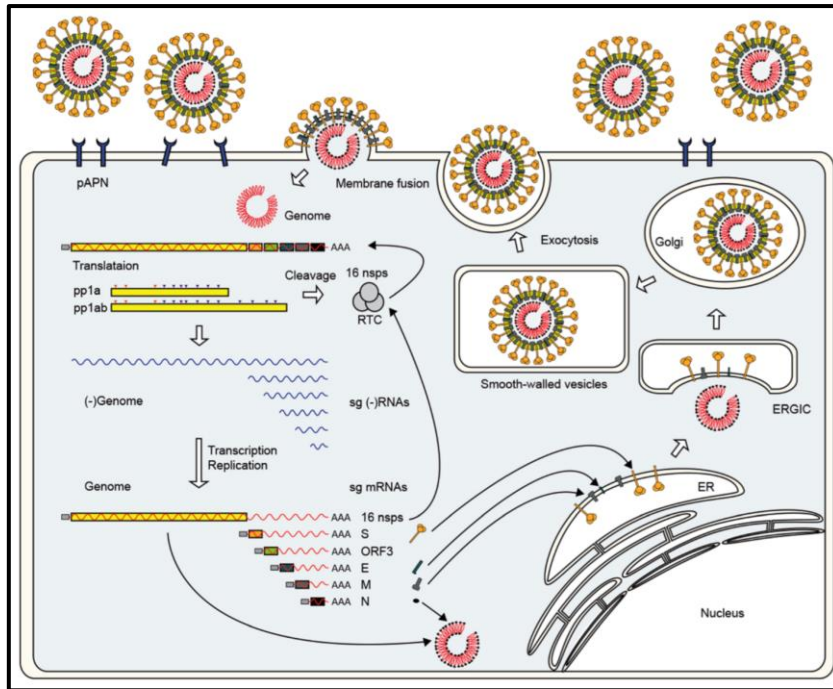


Figura 4. Esquema del ciclo de replicación del vDEP (Tomado de Lee, 2015). Los coronavirus utilizan una transcripción anidada, en la cual la expresión de los genes estructurales está mediada por un conjunto de ARNm subgenómicos anidados, de ahí el nombre del orden *Nidovirales* (MacLachlan y Dubovi, 2017).

El ARN funciona como ARNm para la traducción inmediata del ORF 1a y ORF 1b, sintetizando las replicasas pp1a y pp1b, respectivamente, para luego segmentarse en 16 proteínas no estructurales (nsp), por proteasas codificadas por el virus. Estas proteínas no estructurales son ensambladas formando el complejo de replicasa transcriptasa activa, que comprende la ARN polimerasa dependiente de ARN (nsp12) y proteínas accesorias, incluida una exonucleasa 3'-5' cuya función es la de "proof reading", manteniendo la integridad del genoma, evitando la acumulación de mutaciones asociadas con la baja fidelidad de la ARN polimerasa (Lee, 2015; MacLachlan y Dubovi, 2017).

La polimerasa viral dependiente de ARN transcribe completamente, a partir del ARN (+) del vDEP, produciendo ARN complementario y otras cadenas de ARN subgenómico (en sentido negativo). Este genoma en antisentido se copia nuevamente en ARN genómico de sentido positivo de longitud completa, así como el conjunto anidado de ARN templados de sentido negativo, generando ARNm subgenómicos ahora en sentido positivo. Cada ARNm subgenómico (+) es traducido para producir sólo la proteína codificada por el ORF correspondiente (Lee, 2015).

Las proteínas S, E y M son insertadas en el retículo endoplásmico (RE) y ancladas en el aparato de Golgi. Mientras tanto, la proteína N interactúa con el ARN genómico recién sintetizado para formar la ribonucleoproteína (RNP). La unión de la RNP al compartimiento intermedio del RE y el aparato de Golgi (ERGIC), origina el ensamblaje de los viriones, los cuales son transportados en vesículas hacia la membrana plasmática, donde son liberados por exocitosis.

1.3 Patogenia

La patogenia del vDEP está relacionada con la edad de los cerdos al momento de la infección, así como la virulencia de la cepa viral y la inmunidad previa de las hembras progenitoras. Comparando con las cepas emergentes no INDEL (genogrupo 2), las cepas INDEL producen una menor mortalidad y lesiones histológicas menos severas (Saif *et al.*, 2019). Asimismo, los animales afectados presentan una resistencia dependiente de la edad, ya que es letal en lechones recién nacidos, mientras que en animales destetados y adultos la mortalidad es baja. Los cerdos lactantes mueren debido a la incapacidad de montar una respuesta inmune y a una baja tasa de regeneración del epitelio intestinal, además tienen secreciones gástricas poco ácidas al momento de nacer, y la presencia de calostro y leche amortigua la acidez estomacal. Esto favorece la protección del virus en su paso a través del estómago (Wang *et al.*, 2019).

1.3.1 Transmisión

La principal ruta de transmisión del vDEP es vía fecal-oral, a través del contacto directo con animales infectados debido a la movilización entre granjas o, de forma indirecta, por contacto con objetos inanimados (fómites), tales como vehículos de transporte, indumentaria o instrumentos contaminados, así como condiciones medioambientales favorables a la diseminación del virus entre granjas vecinas, constituyen otra fuente del virus (Jung y Saif, 2015; Machado *et al.*, 2018).

La infectividad del vDEP en heces frescas (4°C a -20°C) se mantiene por 28 días por 7 días a temperatura entre 40 y 60°C, con una humedad relativa (HR) de 30 a 70%; en alimentos secos contaminados con material fecal se logra mantener durante 7 días a 25°C y hasta 14 días a 25°C en forraje húmedo. En una mezcla de alimentos húmedos a 25°C, logra mantener la infectividad por 28 días (Carvajal *et al.*, 2015).

Los cerdos infectados pueden excretar el virus desde el primer día postinfección y continuar durante 7 a 10 días, aunque en diferentes condiciones puede ser detectado hasta por 36 semanas. Se considera a los cerdos de mayor edad como posibles reservorios del vDEP, cuando éstos presentan de forma subclínica la enfermedad (Carvajal *et al.*, 2015).

La elevada cantidad del vDEP en heces y el amplio periodo de excreción, en conjunto con la mínima dosis infecciosa, hace posible la rápida diseminación del virus altamente contagioso, reportando un índice de morbilidad de 100%, diseminándose en todas las etapas productivas del cerdo y una tasa de mortalidad que va del 50% al 100% (Lee, 2015). Tradicionalmente, una tasa mayor al 10% de pérdidas en lechones nacidos vivos representaba un parámetro crítico (Trujillo *et al.*, 2002). En Estados Unidos (EE.UU.), este parámetro ha ido aumentando, en relación al tamaño de la camada, excediendo el 10%. En el periodo de 2012 a 2014 en que la DEP fue reportada, la mortalidad previa al destete aumentó de 15.5% a 20.5%, disminuyendo y estabilizándose de 2015 a 2017 con 17.5%. La mortalidad durante la maternidad produce pérdidas subsecuentes en la línea de producción, debido al menor número de lechones destetados. En el periodo de 2012 a 2014 este parámetro disminuyó de 10.3 a 9.7 lechones destetados por hembra, lo que representa una disminución en el número de animales para el abasto (Stalder, 2018).

1.3.2 Signos clínicos

Una vez que el vDEP ingresa al organismo, alcanza el tracto gastrointestinal e infecta selectivamente los enterocitos que se encuentran revistiendo la mucosa, y que conforman las microvellosidades intestinales. Posterior a la replicación viral, el vDEP provoca necrosis aguda de los enterocitos, generando lisis celular, con la consecuente pérdida de área de absorción. Esto genera un síndrome de mala absorción y mala digestión. El periodo de incubación es de 1 a 4 días y los signos clínicos característicos que aparecen son pérdida de condición corporal, anorexia, depresión, deshidratación y diarrea profusa líquida amarillenta. En lechones neonatos, (Fig. 5) el vDEP produce una pérdida de peso, deshidratación e hipotermia graves debido a la baja reserva energética provocando una alta tasa de mortalidad (Jung y Saif, 2015).



Figura 5. Lechones afectados con el vDEP.

El cuadro clínico en el destete y engorda tiene una duración de una semana, generalmente es autolimitante, con una mortalidad menor al 3% (Carvajal *et al.*, 2015). Aun así, los cerdos que resisten la infección con el vDEP exhiben un retraso en el crecimiento, aumentando costos de producción debido al insumo adicional por concepto de alimento. Las hembras reproductoras permanecen con infección subclínica, sin embargo la morbilidad es alta y pueden presentar anorexia, depresión y letargia, disminuyendo su inmunidad, aumentando el riesgo de co-infección con otras enfermedades, así como ciclos reproductivos anormales y falla lactacional (Lee, 2015).

1.3.3 Lesiones

El virus tiene tropismo hacia las secciones de yeyuno e íleon del intestino delgado, sin embargo, se observa una dilatación gastrointestinal generalizada por la presencia de gas y contenido acuoso amarillento, las paredes intestinales lucen translúcidas, debido a la pérdida de la relación 7:1 entre las criptas y las vellosidades intestinales, hasta <4:1. El estómago se encuentra dilatado y repleto de leche sin digerir, la cual tiene apariencia grumosa, a causa de la mala digestión. Las lesiones microscópicas son consecuencia de la replicación viral y la respuesta del organismo, incluyendo degeneración y necrosis de células epiteliales, atrofia y acortamiento severo de vellosidades, infiltrado linfocítico, congestión moderada e hiperplasia de nódulos linfáticos mesentéricos (Saif *et al.*, 2019).

1.4 Inmunidad frente al vDEP

Debido al tipo de placentación en las cerdas (epitelio-corial) los lechones recién nacidos no cuentan con inmunoglobulinas, por lo que su protección se basa en el consumo de calostro. Su principal función es la transmisión de inmunoglobulinas. El intestino del lechón neonato presenta una permeabilidad durante las primeras 24 horas, lo que permite la absorción de

inmunoglobulinas, IgG, IgM e IgA las cuales son proteínas de alto peso molecular derivadas de la sangre materna (Trujillo *et al.*, 2002).

Después de la sensibilización antigénica, consecuencia de una infección natural o inmunización, en el intestino de las cerdas los linfocitos B, diferenciados en células plasmáticas productoras de Inmunoglobulina A secretora (IgAs) migran a glándula mamaria donde se localizan y secretan IgAs hacia el calostro y la leche materna, por lo cual su contenido en secreciones mamarias es más elevado (Langel *et al.*, 2016).

La inmunidad lactogénica es transferida en forma pasiva a través de la lactación, la cual protege a los lechones recién nacidos contra una gran diversidad de agentes entéricos, incluido el vDEP, por la acción neutralizante de la inmunoglobulina IgA secretora y otros componentes de la respuesta innata como lactoferrinas y lactoperoxidasas (Carvajal *et al.*, 2015). La principal inmunoglobulina en el calostro es el tipo IgG, no obstante, ésta disminuye 31% a las 3 horas postparto. Posteriormente, se da una transición al tipo IgA, siendo la inmunoglobulina predominante en leche. Sin embargo, la inmunidad no es muy duradera, en cuanto los lechones pierden su protección materna, se vuelven susceptibles al virus (Langel *et al.*, 2016). La importancia del eje intestino-glándula mamaria-IgAs radica en el diseño de vacunas, ya que éstas deben inducir primero una inmunidad en mucosas de la hembra gestante para luego inducir niveles altos de IgAs y su transmisión a los lechones recién nacidos a través del calostro y leche (Paudel *et al.*, 2014).

La inmunidad adaptativa requiere un estímulo, es decir, el desafío de una partícula extraña para su desarrollo y, contrario a la respuesta innata, puede ser transferible, es específica y establece una memoria para responder al estímulo, por lo que se considera inmediata cuando ocurrió un contacto previo con el antígeno en cuestión. Las hembras previamente infectadas con el vDEP pueden generar inmunidad y altos niveles de IgA a nivel de las mucosas. Las vacunas activas administradas por vía oral actúan por la ruta natural de la infección estimulando la respuesta inmune mucosal de IgA y provoca una respuesta inmune humoral sistémica efectivamente (Wang *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2015).

1.5 Epidemiología del vDEP

Desde su primera descripción, en 1971 (Wood, 1977), la DEP se ha diseminado a través del continente europeo, causando brotes ocasionales durante los últimos 30 años. En las granjas europeas, la diarrea asociada al virus era observada en cerdos de crecimiento y hembras reproductoras sin presentar mortalidad o impacto económico significativos, por lo que no se impulsó el desarrollo de vacunas (Choudhury, *et al.*, 2016). En contraste, en el continente asiático los brotes se observaban de manera recurrente, generando altos índices de mortalidad en cerdos lactantes y pérdidas económicas, manteniéndose como una enfermedad endémica desde la década de 1980. Históricamente, el control de DEP en los países asiáticos consistía en la generación y uso constante de vacunas atenuadas e inactivadas desde los años 90; por ejemplo, en China, se ha aplicado una vacuna inactivada bivalente contra el vGET y el vDEP, desde 1999, además se controló su propagación con el uso de vacunas basadas en la cepa prototipo CV777, hasta el año 2010 (Wang *et al.*, 2016). En octubre de ese año, surgió una cepa variante altamente patógena del vDEP, relacionada con los brotes a gran escala, dañando gravemente la industria porcina del país asiático (Huang *et al.*, 2013).

El vDEP había sido exótico en EE.UU. hasta que en mayo de 2013, se confirmó el primer diagnóstico de DEP en Iowa. Las muestras fueron remitidas de cuatro granjas con una mortalidad del 90-95% en lechones (Stevenson *et al.*, 2013). Las primeras cepas aisladas en EE.UU. se encontraron relacionadas genéticamente con la cepa de origen chino reportadas en 2012 (AH2012), sugiriendo un posible origen del país asiático, siendo esta cepa el ancestro más cercano de las cepas norteamericanas (Huang *et al.*, 2013; Lee, 2015). Posteriormente, surgieron cepas variantes con inserciones y deleciones en el gen S, denominadas cepas S-INDEL, las cuales se asocian con una menor virulencia y no tienen protección cruzada con las cepas No-INDEL (Vlasova *et al.*, 2014). El surgimiento de las cepas S-INDEL resultó de eventos de recombinación múltiples entre las cepas clásicas debido al extenso uso de vacunas activas atenuadas en Asia (Saif *et al.*, 2019).

Los análisis de las cepas del vDEP, basadas en las secuencias genéticas de la proteína S, han permitido clasificarlas en genogrupos, G1a, G1b, G2a y G2b. El grupo G1a incluye la cepa prototipo CV777 y las demás cepas variantes atenuadas distribuidas históricamente en Europa y Asia, mientras que el G1b incluye las cepas S-INDEL, localizadas en Europa,

Asia y Norteamérica. Las cepas del genogrupo G2a son exclusivas del continente asiático y en el G2b se encuentra la cepa prototipo de EE.UU. del año 2013 (Opriessnig *et al.*, 2017) (Fig. 6).

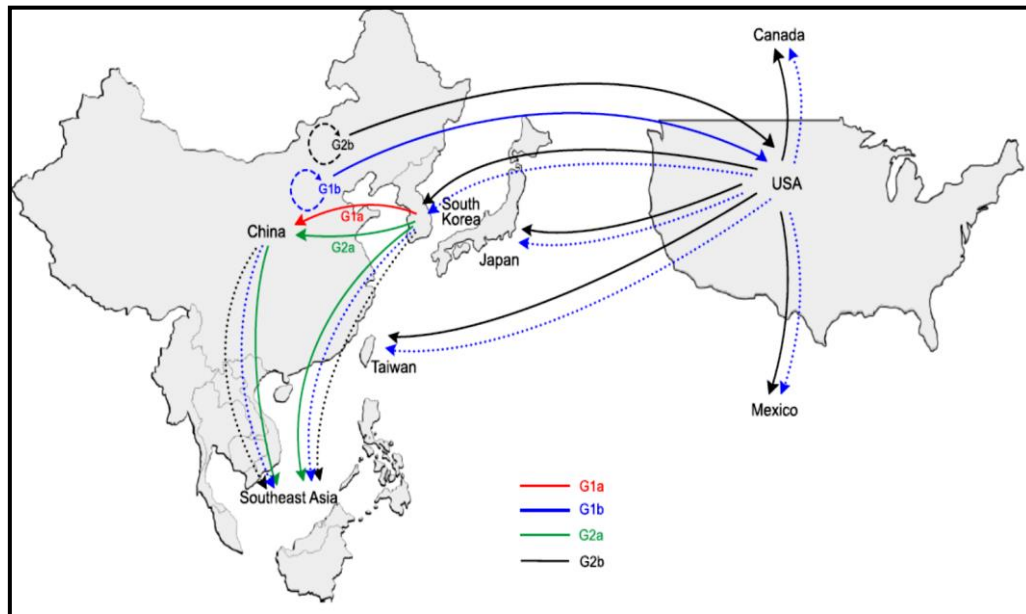


Figura 6. Potenciales rutas de transmisión del vDEP. Se indican los genogrupos en diferentes colores y su diseminación en diferentes países (Tomado de Lee, 2015)

Las vacunas activas atenuadas comercializadas en el continente asiático, son realizadas a partir de cepas pertenecientes al genogrupo G1a, como la CV777 y DR13. Como ocurre con otros coronavirus, el vDEP muta rápidamente surgiendo cepas variantes (Sun *et al.*, 2008). Esto explica porque las vacunas tradicionales no proporcionan protección contra las cepas circulantes del genogrupo G2, ya que son genética y antigénicamente distintas, disminuyendo su eficacia (Opriessnig *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2018).

Las enfermedades emergentes y re-emergentes constituyen un desafío continuo en la salud animal, poniendo en riesgo la producción pecuaria y la seguridad alimentaria. El aumento en la población humana y la demanda creciente de proteína animal, obliga a contar con sistemas de producción cada vez más intensivos, con poblaciones animales más numerosas (Roth, 2011). Esto genera una alta tasa de comercialización de cerdos e insumos para consumo animal a través de granjas y entre distintos países, lo que limita la contención del virus dentro de un área geográfica específica, propiciando brotes reemergentes en países asiáticos y brotes epidémicos emergentes en EE.UU., extendiéndose por toda América, (Opriessnig, 2015).

En Canadá, se reportó el primer caso de DEP en enero de 2014, afectando lechones de una granja de 500 hembras localizada en la provincia de Ontario. Se observaron lesiones histopatológicas de atrofia y fusión de vellosidades intestinales en muestras de lechones con cuadro de diarrea aguda. El diagnóstico fue confirmado por RT-PCR en tiempo real, descartando vGET, DCovP y RovP, así como *Escherichia coli* o *Salmonella spp* (Ojkic *et al.*, 2015). Un ensayo biológico fue conducido para evaluar como factor de riesgo, el alimento contaminado con plasma porcino atomizado-desechado (spray-dried porcine plasma o SDPP), en el cual cerdos inoculados con el ingrediente SDPP excretaron altos niveles de vDEP, por lo cual el alimento no se puede descartar como fuente de infección (Pasick *et al.*, 2014).

1.6 Situación en México

Los primeros brotes de la enfermedad acontecieron en la región centro-occidente del país, en Degollado, Jalisco y La Piedad, Michoacán en julio de 2013 (Quintero, 2014). El brote de La Piedad, Michoacán ocurrió en Julio y Agosto de 2013, en una granja de 200 animales. Se observó diarrea verdosa, vómito y anorexia en cerdas gestantes y cerdos de crecimiento. Los lechones mostraron signos de vómito, abundante diarrea amarillenta y muerte a las 24 h, debido a la deshidratación severa e hipotermia, con un índice de mortalidad de 100% en lechones, en un lapso de dos semanas. En otro brote ocurrido en el Estado de México durante septiembre del 2013, se observaron signos característicos de dos a tres días, con una morbilidad del 67% y mortalidad de 27.5% (Fajardo *et al.*, 2014).

En 2013, se analizaron muestras de cerdos procedentes de México en el Laboratorio Veterinario de Diagnóstico, de la Universidad de Minnesota, las cuales resultaron positivas al vDEP (Vlasova *et al.*, 2014). Para el mes de febrero de 2014 la enfermedad se extendió por los estados de Jalisco, Michoacán, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, México, Aguascalientes, Puebla, Veracruz, Nuevo León, Tamaulipas, Sinaloa y Sonora, provocando severas pérdidas económicas (Quintero, 2014).

Posterior a la información de los casos, los servicios veterinarios oficiales comenzaron un diagnóstico situacional, realizando un muestreo epidemiológico en granjas de destete-finalización, granjas reproductoras, producciones de traspatio y rastros con evidencia clínica sugerente de DEP. Un total de 2309 muestras de 19 estados, fueron examinadas por

RT-PCR en tiempo real entre agosto 2013 y mayo 2014. Se obtuvo sólo un 30% de muestras positivas al vDEP, sugiriendo un evento multicausal involucrando otros agentes patógenos. Las características clínicas y epidemiológicas de los brotes ocurridos entre julio de 2013 y principios de 2014, asociado al diagnóstico confirmatorio por pruebas moleculares del vDEP, evidenciaron la emergencia de la enfermedad en nuestro país. Durante el mes de mayo de 2014, el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Alimentaria (SENASICA), reconoció la presencia de la enfermedad de manera oficial en 17 estados, las muestras de los estados de Yucatán y Oaxaca resultaron negativas a la prueba (OIE, 2014b).

El laboratorio Investigación Aplicada S.A. de C.V. realizó el primer diagnóstico de la enfermedad a través de un ensayo inmunocromatográfico, en 2014; en ese año se procesaron 992 muestras resultando un 23% positivas, en 2015 recibió 2,618 muestras de las cuales el 13% resultaron positivas y en 2016, se obtuvo un 16% de positividad en 2,099 muestras remitidas (Sánchez-Sosa *et al.*, 2018).

En relación con el impacto económico generado, se reportó una disminución del inventario porcino de 16.2 millones en el 2013 a 16.1 millones de cabezas al año 2014. Por otro lado, la producción de carne de cerdo había tenido una tasa promedio de crecimiento anual de 1.9% entre 2005 y 2013, sin embargo, en 2014 sólo fue de 0.5% registrando una desaceleración del crecimiento de la producción primaria. Finalmente, en el año 2014 se sacrificaron 10.94 millones de ganado porcino para carne, un 8.7% menos que en 2013 (FIRA, 2015; PORCIMEX, 2016).

En el año 2016, se da a conocer el primer reporte de la enfermedad, incluyendo el aislamiento viral en células VERO y la detección molecular del *Alfacoronavirus* en México, a partir de muestras provenientes de un brote del año 2014, el cual tuvo índices de mortalidad de 100% en lechones (Trujillo *et al.*, 2016). De acuerdo al último reporte enviado a la OIE el 11 de febrero de 2016, los casos de DEP no se han resuelto y es poco probable que sea controlado, no obstante, la situación se considera suficientemente estable para considerarla como una enfermedad endémica en México (OIE, 2016).

1.7 Diagnóstico

El diagnóstico, no sólo del vDEP, sino de cualquier agente etiológico requiere de la participación integral del Médico Veterinario clínico y el Médico Veterinario del Laboratorio de Diagnóstico. El diagnóstico clínico de la enfermedad se basa en los signos clínicos característicos y las lesiones a la necropsia conforman el diagnóstico anatomopatológico; sin embargo, el diagnóstico definitivo requiere de técnicas de laboratorio, debido a la similitud con otros agentes involucrados (Cuadro 1) en el complejo entérico porcino (Song y Park, 2012).

Cuadro 1. Diagnóstico diferencial asociado a cuadros entéricos (Modificado de Saif *et al.*, 2019)

Agente etiológico	Edad
Virales:	
Coronavirus (vDEP, vGET, DCovP)	Todas las edades susceptibles
RovP	2 a 3 semanas de edad (más frecuente)
Circovirus porcino Tipo 2 (PCV-2)	6 a 12 semanas, en ocasiones en adultos
Bacterianas:	
<i>Escherichia coli</i> (ETEC, EPEC)	1 a 4 días de edad (neonatal) 2 a 3 semanas postdestete
<i>Clostridium perfringens</i> (Tipo C, Tipo A)	1 a 14 días (tipo C) 3 a 28 días (Tipo A)
<i>Lawsonia intracellularis</i>	5 semanas de edad en adelante
<i>Brachyspira</i> spp.	5 semanas de edad en adelante
<i>Salmonella</i> spp.	Todas las edades, frecuente en el postdestete
Parasitarias:	
<i>Isospora suis</i>	5 a 21 días de edad
<i>Cryptosporidium</i> spp.	3 días de edad hasta el destete
<i>Trichuris suis</i>	A partir del destete hasta adultos

1.7.1 Pruebas virológicas

Los métodos virológicos tienen como objetivo la detección de partículas virales, el ácido nucleico o las proteínas virales, por medio de diversas técnicas como: aislamiento viral, inmunofluorescencia directa, inmunohistoquímica y pruebas de RT-PCR (Diel *et al.*, 2016). El aislamiento viral constituye una herramienta sólida de diagnóstico, en la cual se recupera el virus a partir de una muestra de tejidos y se propaga *in vitro* en líneas celulares. Las células VERO (células de riñón de mono verde africano) permiten la replicación del vDEP, no obstante, dependen de una enzima exógena en el medio de cultivo, la tripsina, la cual es una proteasa que escinde la proteína S, incrementando la infectividad viral. Las

células MARC-145, otra línea de riñón de mono verde africano, reporta pasajes celulares consecuentes del vDEP. Sin embargo, se considera un método laborioso, costoso y demorado de realizar (Jung y Saif, 2015).

La inmunofluorescencia directa detecta los antígenos virales en cultivo celular fijado o en porciones de intestino delgado ultracrioseccionadas, mediante anticuerpos conjugados con un fluoróforo específicos hacia el vDEP. Los antígenos intracelulares se observan bajo un microscopio de fluorescencia, dentro de los enterocitos infectados con el vDEP. La inmunohistoquímica se basa en la detección de antígenos del vDEP en muestras de tejido fijado con formalina y procesados con parafina. Se utiliza un anticuerpo específico primario hacia el antígeno y posteriormente un anticuerpo secundario conjugado con una enzima, la cual al agregar el sustrato químico revela la distribución del virus en el tejido infectado (Diel *et al.*, 2016).

Las pruebas de RT-PCR se han desarrollado a partir de técnicas de biología molecular, como una prueba rápida, sensible, específica y de elección para el diagnóstico del vDEP (Diel *et al.*, 2016). Además, se han utilizado para varios tipos de muestras; heces, hisopos rectales, porciones de intestino, fluido oral, incluso alimento. Esta técnica se basa en la detección de ARN viral, por lo que es posible un resultado positivo, sin la presencia de virus activo en la muestra. El diseño de las pruebas de RT-PCR, se basan en las proteínas estructurales del vDEP, por lo que se pueden emplear para diferenciar entre cepas clásicas, emergentes o S-INDEL, mediante la amplificación de algunas regiones de la proteína S, las cuales, tienen una mayor variabilidad que otras, mientras que la proteína N se considera una proteína conservada entre las diferentes cepas circulantes (Diel *et al.*, 2016).

1.7.2 Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas se basan en la detección de anticuerpos en muestras de cerdos convalecientes, vacunados o lechones inmunizados pasivamente. Se han desarrollado varios ELISA's de tipo indirecto con las proteínas recombinantes (S, N y M) del vDEP, que permiten la detección de anticuerpos de tipo IgG e IgA, en muestras de suero, calostro, leche, heces (Gerber *et al.*, 2014a; Hou *et al.*, 2007; Fan *et al.*, 2015) o en fluido oral utilizando un ELISA basado en el virus completo (Bjstrom-Kraft *et al.*, 2016a).

La técnica se basa en recubrir o sensibilizar una microplaca de poliestireno con el antígeno viral e incubar con la muestra problema, con la finalidad de formar una reacción antígeno-

anticuerpo. Esta reacción es evidenciada agregando un anticuerpo secundario conjugado con una enzima, la cual responde a la adición de sustrato colorimétrico (Diel *et al.*, 2016).

La técnica de inmunofluorescencia indirecta también está diseñada para detectar anticuerpos en suero, la diferencia radica en la utilización de la línea celular VERO, infectada con el vDEP, como antígeno. Si la muestra es positiva, los anticuerpos se unen a los antígenos inmovilizados en la fase sólida. Para su detección, se añade un anticuerpo secundario etiquetado con un fluoróforo, dirigido hacia los anticuerpos presentes en la muestra, los cuales son visualizados en un microscopio de fluorescencia (Diel *et al.*, 2016).

Los ensayos de seroneutralización viral han sido desarrollados para detectar anticuerpos específicos, los cuales tienen la propiedad de neutralizar la infección por el vDEP *in vitro*. El resultado se reporta como una reducción del efecto citopático en cultivo celular, debido a la interferencia en el ciclo de replicación del virus y a la inactivación de partículas virales. Es posible evaluar el nivel de anticuerpos neutralizantes en muestras de suero, calostro y leche (Lee, 2015; Diel *et al.*, 2016).

1.8 Prevención y control

Prevenir el ingreso del vDEP a una granja se basa en un estricto control de bioseguridad, implementando las siguientes medidas: delimitación del área con otras granjas (bardas perimetrales), control de accesos (embarcaderos, puerta principal) y entrada de personas, material y equipo, contar con arcos, vados y tapetes sanitarios (entradas, salidas y por áreas de la granja), así como un periodo de cuarentena en los animales con estado sanitario desconocido (SENASICA, 2014; OIE, 2014).

En caso de que la unidad se encuentre con un brote de DEP, se debe realizar el diagnóstico de laboratorio confirmatorio y se deben extremar medidas de bioseguridad: realizar limpieza y desinfección, encalado de instalaciones en todas las áreas de la granja, mantener un flujo unidireccional de personal y un programa todo dentro, todo fuera, utilizar indumentaria exclusiva por áreas. Debe haber una disposición adecuada de cadáveres y de ser posible suspender el ingreso de animales (SENASICA, 2014; Carvajal *et al.*, 2015).

1.8.1 Manejo zootécnico

La única opción de tratamiento es ofrecer electrolitos en solución oral, a través del agua de bebida, la medicación del alimento, sólo para prevenir infecciones bacterianas secundarias.

A las cerdas se debe ofrecer dietas concentradas. En el área de maternidad, procurar un mayor confort a la hembra y en lechones, mediante el control de temperatura y humedad relativa para propiciar un ambiente limpio y seco, retiro de excretas frecuente. Es de gran relevancia la ingesta de calostro y la atención de lechones nacidos de bajo peso. Para la prevención de diarreas en lechones se han utilizado diversos probióticos y acidificantes (Saif *et al.*, 2019).

1.8.2 Feedback

Durante los primeros brotes, el único método de control de la enfermedad fue a través de la estrategia del *feedback*, exponiendo el vDEP activo a las cerdas reproductoras, previo al parto. En este proceso, se realiza un macerado de órganos intestinales (o su contenido) de lechones infectados y/o muertos durante el brote, ofreciendo este material en el alimento de las hembras. Este manejo tiene como objetivo generar una infección intencional, para estimular la inmunidad en las cerdas gestantes, la cual es transferida a los lechones a través del calostro (Song *et al.*, 2015).

A pesar de que la exposición oral del virus, aumenta los niveles de anticuerpos, la principal desventaja es que la carga viral administrada generalmente es desconocida, lo que provoca la circulación del virus entre las hembras o los lechones y la diseminación de otros patógenos, como el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS, por sus siglas en inglés), el circovirus porcino tipo 2 (PCV-2), DCovP y *Salmonella* spp. en las diferentes etapas de producción (Lee, 2015; Song *et al.*, 2015).

El inóculo sólo debe contener fragmentos congelados de yeyuno e íleon, provenientes de lechones y debe analizarse para garantizar que se encuentre libre de PRRS, PCV-2 y DCovP, así como cuantificar las partículas virales para que sea una exposición controlada. Posteriormente, evaluar en la hembra excreción viral y título de anticuerpos (Sánchez-Sosa *et al.*, 2018).

El *feedback* ha sido ampliamente utilizado en las producciones porcícolas como método de control, con la constante persistencia del virus, además del riesgo sanitario que implica. Debido a esto, los especialistas dedicados a la medicina porcina han propuesto estrategias de control más seguras para la prevención de brotes y rebrotes en las granjas (Carvajal *et al.*, 2015; Sánchez-Sosa *et al.*, 2018).

1.8.3 Vacunación

Las vacunas implementadas en la medicina veterinaria son de gran importancia para mantener la salud y bienestar animal, así como para mejorar la producción pecuaria y la salud pública. Constituyen un método de prevención, control y/o erradicación tanto en animales de compañía, como en animales de producción (Meeusen, 2007). Las vacunas deben ser evaluadas en términos de seguridad y eficacia, y en cuanto al costo-beneficio de su aplicación sobre el impacto en la economía de los productores y propietarios de animales (Roth, 2011).

Existen dos tipos de vacunas convencionales para la inmunización contra el vDEP, las de tipo virus inactivado y las de virus activo atenuado, las cuales, a su vez, tienen dos vías de administración conocidas, inmunización parenteral y oral. Las vacunas parenterales no inducen inmunidad a nivel de la mucosa, que es la localización primordial de los agentes infecciosos entéricos. Las vacunas mucosales, sin embargo, inducen respuestas tanto humoral como local, por lo que tienen el potencial de controlar patógenos en el punto de infección y a nivel sistémico (Lee *et al.*, 2018).

Las vacunas de virus activo atenuado sólo se encuentran disponibles en Asia, la respuesta inmune conferida resulta más duradera, sin embargo, no previene la excreción viral. Esto puede representar un problema de bioseguridad, ya que la cepa vacunal persiste en el ambiente a largo plazo y puede revertir su virulencia, debido a la patogenicidad residual. Además, tiene el inconveniente de que se genere una posible recombinación entre cepas circulantes (Jarvis *et al.*, 2016; Zúñiga, *et al.*, 2016).

Las vacunas convencionales inactivadas, usualmente son de aplicación parenteral e inducen una fuerte respuesta humoral, sin embargo, no todos los animales desarrollan una sólida respuesta inmune mucosal, por lo que son parcialmente efectivas. Actualmente, en México se tiene la licencia para el uso de la vacuna inactivada, basada en la cepa USA/Colorado/2013 (KF272920) (Lara-Romero *et al.*, 2018), cuya eficacia y protección está todavía en debate y en observación bajo condiciones de campo.

La inmunización contra el vDEP resulta beneficiosa en las pjaras previamente expuestas y falla en pjaras sin exposición (Opriessnig *et al.*, 2017). El uso de la vacuna inactivada puede ser adecuado para generar un estímulo aumentado en la inmunidad desarrollada por

animales previamente expuestos al virus o a una vacuna activa (Zúñiga, *et al*, 2016, Baek, *et al*, 2016).

El enfoque en la producción de vacunas ha cambiado conforme han avanzado las diversas técnicas de biología molecular y la ampliación en el conocimiento de los mecanismos de inmunidad en los animales (Cuadro 2).

Cuadro 2. Estrategias vacunales contra los coronavirus entéricos (Modificado de Gerds y Zakhartchouk, 2017)

Tipo de vacuna	Desarrollo	Antígeno
Virus inactivado	Viriones inactivados con químicos	Virus completo
Virus activo atenuado	Genoma viral con mutaciones, derivado de pasajes múltiples en células VERO	Virus completo
Virus vectorizado	Genoma viral no relacionado (Poxvirus, Adenovirus) diseñado para expresar el gen de interés	Proteína S
Subunitaria	El antígeno es expresado en células de mamífero, baculovirus, levaduras o vegetales	Proteína S
Vacuna de ADN	Genes que codifican para el antígeno son clonados en un vector de expresión plasmídico	Proteína S, M o N
Partículas virales replicantes	El replicón de ARN contiene el gen de interés incluido en los viriones del Alfavirus	Proteína S

1.9 Ingeniería genética

La ingeniería genética es el conjunto de técnicas para la manipulación *in vitro* del material genético. Con esta metodología es factible aislar los genes o diversas secuencias de codificación para su clonación molecular en un sistema de expresión bacteriano, de levaduras, células de insecto, de mamíferos o de plantas. El sistema de expresión, con la secuencia clonada, tiene la posibilidad de producir una proteína, a la cual se le denomina heteróloga, ya que tiene un origen diferente al sistema hospedador. Bajo este esquema de tecnología de ADN recombinante, se producen proteínas derivadas de agentes infecciosos, como los virus y otros agentes infecciosos (Bolívar, 2007).

Otro avance a su vez, es la producción de etiquetas de afinidad (Baneyx, 1999) con el propósito de identificar y aislar las proteínas de interés, obteniendo proteínas purificadas

que pueden ser empleadas como reactivo diagnóstico o inmunógenos, los cuales tienen la característica de ser seguros, lo cual es un fundamento para la producción de vacunas subunitarias. La administración de proteínas recombinantes, sin la necesidad de utilizar un vector vivo recombinante, ofrece un excelente perfil de seguridad, la posibilidad de producción a gran escala y la capacidad de inducir una respuesta inmune celular y humoral, dependiendo del sistema de expresión y el uso de adyuvantes (Dellagostin *et al.*, 2017; Rajasekaran *et al.*, 2018).

Es relevante para el desarrollo de una vacuna subunitaria, identificar los epítopes importantes de las proteínas virales, capaces de inducir anticuerpos neutralizantes y la diversidad antigénica natural de las proteínas entre las cepas virales (Jorge y Dellagostin, 2017).

La existencia de diversos epítopes en el dominio S1 de la proteína S y en la proteína M, permite el desarrollo de vacunas subunitarias contra el vDEP. Ante la falta de pruebas diagnósticas y vacunas efectivas para contrarrestar al virus de la diarrea epidémica porcina (vDEP), en el laboratorio de Virología del CENID, Salud Animal e Inocuidad, del INIFAP se realizó la producción recombinante de las proteínas N y M de longitud completa (Barrera, 2018), así como las regiones inmunogénicas S(834) y S(1135) correspondientes a los aminoácidos del 55-430 y del 678-953, respectivamente, que son parte del dominio S1 de la proteína S (Sanabria, 2016, Álvarez, 2017). El sistema de expresión empleado fue *Escherichia coli* cepa BL-21 (DE3), obteniendo resultados exitosos de expresión de las proteínas recombinantes con un peso estimado de 70 kDa para la proteína N, de 38 kDa para la proteína M, de 48 kDa para la subunidad S(834) y de 60 kDa para la subunidad S(1135). En dos estudios piloto se evaluó la transferencia pasiva de IgG de una cerda gestante a su camada, a través del calostro, al utilizar las subunidades S(834) y S(1135) (Álvarez, 2018, Zapata *et al.*, 2018), con un doble esquema de vacunación intramuscular e intranasal, observando resultados comparables con el estudio de Makadiya y colaboradores en 2016 (Makadiya *et al.*, 2016).

2. JUSTIFICACIÓN

A la fecha, existe la necesidad de desarrollar vacunas seguras y efectivas para contrarrestar la enfermedad ocasionada por el virus de diarrea epidémica porcina. Las proteínas recombinantes del vDEP, como la proteína Spike (S), matriz (M) y nucleocápside (N), se han utilizado como reactivo en pruebas diagnósticas. En el modelo murino y porcino, se ha evidenciado su potencial antigénico, siendo candidatos para su uso como vacunas subunitarias, sin embargo, su eficacia como inmunógeno debe ser evaluada por la respuesta inmune humoral y mucosal inducida en animales adultos y la protección ante el desafío, simulando condiciones de campo con una cepa virulenta, disminuyendo el cuadro clínico y el tiempo de excreción viral.

3. HIPÓTESIS

La inmunización de cerdos en engorda utilizando un biológico recombinante, inducirá una respuesta inmune humoral y mucosal, y a su vez, generará protección ante la infección experimental de los animales con una cepa virulenta del vDEP, manifestando una disminución de los signos asociados a la enfermedad y el tiempo de excreción viral, indicando su eficacia como vacuna subunitaria.

4. OBJETIVO GENERAL

Formular un biológico recombinante del vDEP y evaluar su antigenicidad en cerdos de engorda, a través de la respuesta inmune humoral y mucosal inducida, así como la protección conferida ante el desafío con una cepa virulenta, mediante la valoración de signos clínicos y excreción viral, para comprobar su eficacia como vacuna subunitaria efectiva contra la DEP.

4.1 Objetivos específicos

- Producir lotes de las proteínas recombinantes N, M y dos subunidades de la proteína S (S834 y S1135) del vDEP.
- Establecer las condiciones de purificación utilizando cromatografía de afinidad por iones metálicos (IMAC).
- Realizar la formulación del biológico recombinante, utilizando las proteínas purificadas y un adyuvante comercial para aplicación por vía parenteral y mucosal.
- Aplicar el biológico recombinante en los modelos animales, en los tiempos señalados del estudio.
- Realizar la infección experimental de los animales utilizando una cepa virulenta del vDEP y registrar los signos asociados a la enfermedad, previo al desafío y postdesafío.
- Evaluar la presencia de anticuerpos IgG en el suero, e IgA en las muestras de fluidos orales, mediante la técnica de ELISA.
- Cuantificar la carga viral, en muestras de hisopado rectal, evaluando tiempo de excreción del vDEP a lo largo del ensayo.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Biológico recombinante

5.1.1. Cepas

Para la producción de las proteínas recombinantes, se utilizaron las cepas transformadas de *Escherichia coli* BL-21 (DE3) con el vector de expresión pET-SUMO Champion TA (Invitrogen) con los fragmentos para cada proteína recombinante, procedentes del laboratorio de Virología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria, Sanidad Animal e Inocuidad, del INIFAP. Las cepas se denominaron *E. coli* BL21/S1 1135, *E. coli* BL21/ S1 834, *E. coli* BL21/M y *E. coli* BL21/N y se mantuvieron viables en placas de agar LB adicionado con kanamicina, renovando cada mes el cultivo.

5.1.2 Cinética de expresión de las cepas de *E. coli* BL21/S1 1135, *E. coli* BL21/ S1 834, *E. coli* BL21/M y *E. coli* BL21/N

Con el asa bacteriológica se inocularon 20 ml de medio LB líquido con las cepas seleccionadas previamente por separado, así como la cepa de *Escherichia coli* BL-21 transformada con el gen de la cloranficol acetil-transferasa (CAT) y la cepa BL-21 sin vector de expresión. Se incubaron durante 12 h a 37° C, en una incubadora-agitadora de piso Max Q500, con agitación a 250 rpm, para obtener un precultivo y se verificó crecimiento bacteriano al cabo de ese tiempo. Se utilizó el espectrofotómetro D30 Biophotometer (Eppendorf) para las lecturas de absorbancia y se ajustó a 0.1 unidades de absorbancia (UA) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Datos para ajustar a 0.1 UA el cultivo a inducir

Proteína rN: Absorbancia del precultivo	0.189 _{A600}	*Factor de dilución (10)	1.89
0.1 * 300	30	30/ <u>1.89</u>	
<i>Volumen a inocular = 15.87 ml.</i>			
Proteína rM: Absorbancia del precultivo	0.185 _{A600} UA	*Factor de dilución (10)	1.85
0.1 * 300	30	30/ <u>1.85</u>	
<i>Volumen a inocular = 16.21 ml.</i>			

El volumen resultante correspondió al volumen a inocular del precultivo, en el cultivo a expresar, el cual se incubó a 37° C, con agitación a 250 rpm el tiempo necesario para alcanzar una absorbancia de 0.5 UA. Una vez que alcanzó 0.5 UA (Cuadro 4) se agregaron 450 µl del inductor IPTG (Isopropil-tiogalactosido) 1 M, para lograr una concentración de 1.5 mM.

Cuadro 4. Lecturas de los cultivos listas para la inducción con IPTG

Absorbancia de <i>E. coli</i> BL21/N	567 _{A600} UA
Absorbancia de <i>E. coli</i> BL21/M	515 _{A600} UA

Se realizó el ensayo de expresión en 300 ml de medio LB, contenido en matraces estériles de 1 L, incubándose a 37°C, durante 6 horas, en agitación continua a 250 rpm (Fig. 7).



Figura 7. Crecimiento de las cepas de *Escherichia coli* en medio LB. Medio LB sin inocular (izquierda) y medio LB ajustado a 0.5 UA (derecha).

Se obtuvieron muestras a partir de la inducción a los 30 y 60 minutos y a las 2, 3, 4 y 6 horas para estimar el mejor tiempo de expresión. Las muestras obtenidas se ajustaron a 0.6 unidades de absorbancia para obtener el mismo número de células y hacer el corrimiento electroforético mediante SDS-PAGE. El resto de la muestra se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos y se almacenó a -20 °C, hasta su uso.

5.1.3 Extracción de los cuerpos de inclusión

Se realizó la extracción de los cuerpos de inclusión, a partir de las muestras de cultivo expresado con IPTG, utilizando el protocolo de Álvarez, 2018, con algunas modificaciones (Anexo B). El botón celular se resuspendió en Tris HCl 5 mM pH 8 como medio de conducción para la sonicación. Se utilizó el equipo Virsonic 475 (Virtis) con las constantes de sonicación de 1 minuto con pulsos al 100% de potencia durante 10 segundos y descansos a 40% por 10 segundos, repitiendo 3 a 5 ciclos, para la lisis bacteriana. Posteriormente, se utilizó el detergente Tritón al 1% y agua desionizada Milli Q para las

fases de lavado de los remanentes bacterianos. La solución de urea 8 Molar se utilizó como agente desnaturizante para los cuerpos de inclusión y, finalmente, Sarcocyl al 10% para la solubilización proteica, incubando por 12 horas a 37° C. Las muestras de los cuerpos de inclusión fueron procesadas y evaluadas como se describe en el apartado de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

5.1.4 Cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC)

Para la purificación de las muestras solubilizadas de las proteínas recombinantes, se utilizó cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC por sus siglas en inglés). Se utilizó el equipo ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare) y una columna HiTrap™ IMAC HP de 5ml (GE Healthcare), bajo las siguientes condiciones: 0,5 MPa de presión máxima, 40 mg de proteína purificada por cada ml de muestra, flujo máximo de 4ml/m y con los volúmenes de columna sugeridos por el manual de usuario. Se estableció un protocolo para el procedimiento de purificación con las mejores condiciones (Anexo C), realizando dos rondas continuas por cada muestra de proteína. Se colectaron muestras de la fase de flujo de carga de la muestra, la fase de lavado, así como las muestras de la elución purificada de las proteínas, en un volumen de 1 ml en tubos de ensaye, para evaluarlas mediante un corrimiento electroforético y seleccionar aquellas donde se encuentren bandas proteicas de interés. Se obtuvieron los parámetros de absorbancia durante el proceso y se compararon con los resultados del corrimiento electroforético. Aquellas muestras en las que se observaron las proteínas de interés se resguardaron en refrigeración a 4°C, hasta la diálisis.

5.1.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Todas las muestras a evaluar mediante SDS-PAGE se mezclaron en proporción 3:1 con el buffer de tratamiento reductor SDS 4X y se calentaron en ebullición a 95 °C por 10 minutos, para favorecer la desnaturización proteica. Se cargaron en geles de poliacrilamida al 12.5%, y se realizó el corrimiento electroforético (Anexo A) en una cámara vertical Criterion™ Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad) a 70 V durante 30 minutos, para el gel concentrador y posteriormente a 100 V durante dos horas, para el gel separador. Se utilizó la tinción con azul de Coomassie para la visualización de los geles.

5.1.6 Diálisis

Las muestras a dializar se colocaron dentro de una membrana tubular de nitrocelulosa Spectra-por (Spectrum Lab. Inc.), con poro molecular de 12-14 kDa. Se dejaron a 4° C inmersas en 1 L de solución PBS (amortiguador de fosfatos) de acuerdo al protocolo descrito en el Anexo D, con el fin de eliminar las soluciones utilizadas durante la purificación como el imidazol y evitar una reacción colorimétrica en la cuantificación.

Una vez dializadas las fracciones proteicas, se utilizó una jeringa de 5 ml con aguja calibre 21G x 1.5", para colectar las muestras de la membrana y se transfirió un volumen de 1 ml de cada proteína a microtubos de 1.5 ml filtrándose a través de 0.45 µm, para su esterilización. Se almacenaron a -20° C, dejando una muestra de 100 µl para la cuantificación por lote producido.

5.1.7 Cuantificación

La cuantificación de las proteínas, se realizó por el método de Bradford, la cual dependió de una curva de calibración, para lo cual se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) a diferentes concentraciones, desde 0 a 10 µg en 1 ml del reactivo de Bradford (Bio-Rad). El ensayo se realizó de acuerdo al protocolo del Anexo E, colocando por triplicado las muestras, haciendo la lectura de la absorbancia a 595 nm y mediante interpolación de los datos, se obtuvo la concentración por cada ml de los lotes producidos para cada proteína. Utilizando los datos de absorbancia, se realizó la gráfica de dispersión de la albúmina sérica bovina y se obtuvo la ecuación de la recta ($y = mx + b$), con la cual se hizo la corrección lineal de las lecturas. Las curvas de calibración de la albúmina sérica bovina se encuentran en el anexo E.

5.1.8 Liofilización

Las muestras de las proteínas recombinantes fueron liofilizadas para su conservación utilizando el equipo Freeze-Dry Sistem FreeZone™ 2.5 (Labconco) a -53°C y 0.220 mBar de vacío, durante 8 horas, justo al observar una completa deshidratación del material proteico, procurando tapar los contenedores para evitar la rehidratación de las muestras. Los lotes de proteínas se almacenaron en refrigeración hasta alcanzar la concentración suficiente para la formulación de las dosis del biológico recombinante.

5.1.9 Formulación del biológico recombinante INI-*rv*DEP

Para la formulación del biológico recombinante se utilizaron 4 proteínas recombinantes del *v*DEP, obtenidas a partir de la producción de los lotes, purificadas por cromatografía de afinidad a iones metálicos (Álvarez, 2018) y liofilizadas para su conservación a 4° C, hasta su uso. Se dispuso de las muestras proteicas hasta reunir la dosis de 300 µg de cada proteína recombinante y se resuspendieron en H₂O desionizada para la formulación del biológico INI-*rv*DEP. Las proteínas rehidratadas, se homogenizaron en un volumen de 1.5 ml para la inyección intramuscular y un volumen de 2 ml para la fórmula intranasal. Posteriormente, cada formulación se mezcló en volúmenes iguales con el adyuvante Montanide ISA 206 VG (SEPPIC) para la aplicación parenteral y con el adyuvante de nanopartículas, Montanide IMS 1313 VG NPR (SEPPIC) para la administración intranasal, de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El volumen final para la formulación parenteral fue de 3 ml y para la intranasal fue de 4 ml. Se homogenizaron con agitación en vórtex hasta la formación de una sola fase, se almacenaron en refrigeración a 4° C, hasta su uso.

5.2 Animales de experimentación

El protocolo de experimentación en animales fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales (CICUA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM (Anexo F). Se dispuso de 20 cerdos Yorkshire-Landrace de 24 semanas de edad, obtenidos de una granja comercial, los cuales conformaron cuatro grupos experimentales, con 5 animales cada uno divididos aleatoriamente. Los grupos se organizaron de la siguiente manera:

- G1. Cerdos vacunados e infectados experimentalmente: VacR/INF
- G2. Cerdos vacunados y no infectados: VacR/No-INF
- G3. Cerdos no vacunados e infectados experimentalmente: No-VacR/INF
- G4. Cerdos no vacunados y no infectados: No-VacR/No-INF

Las muestras de suero (S), fluido oral (FO) e hisopado rectal (HR) se obtuvieron a la llegada de los animales a las instalaciones. Se proporcionó a los animales una semana de aclimatación, previo el ensayo experimental y se verificó la ausencia de anticuerpos contra el *v*DEP en suero, mediante la prueba de ELISA estandarizada en el laboratorio

previamente (Barrera, 2018) y de ARN viral por RT-PCR en tiempo real (Martínez, 2018), en muestras de hisopado rectal.

Los grupos experimentales se mantuvieron en la unidad de aislamiento (Fig. 8), con medidas de bioseguridad, tales como ducha al ingreso y a la salida del personal y uso de indumentaria exclusiva de la unidad, tapetes sanitarios, drenaje directo a una fosa de fermentación de desechos con separación de materia sólida y excedentes líquidos. Los cerdos contaron con agua a libre acceso mediante bebederos automáticos. Se realizó el mantenimiento y limpieza diariamente, ofreciéndoles al día la cantidad de alimento comercial concentrado, de acuerdo a la etapa de finalización por animal, dividida en dos raciones, matutina a las 10:00 h. y vespertina a las 17:00 h.



Figura 8. Animales de experimentación

5.2.1 Toma de muestras

La fase experimental consistió de dos periodos, un periodo postvacunación y un periodo postinfección experimental, cada uno de 5 semanas de seguimiento. El primer periodo comenzó al momento de la inmunización de los grupos 1 y 2 (VacR) al día 0, hasta el día 28 postvacunación (28 dpv). El segundo periodo comenzó al día 77 postvacunación, una semana previa a la infección experimental en el día 84 postvacunación (84 dpv).

Se colectaron las muestras de S, FO e HR en todos los grupos, con un intervalo de una semana durante ambos periodos, hasta los 112 dpv y 28 dpi.

La colecta de sangre se llevó a cabo de forma individual, por punción percutánea de la vena yugular, con sistema vacutainer y tubos sin anticoagulante. La muestra de sangre se mantuvo a temperatura ambiente una hora, con los tubos en posición inclinada para la formación del coágulo. Para la separación del suero, se centrifugaron a 2,000 rpm durante 10 minutos.

La obtención de FO fue de una muestra por cada grupo experimental, tendiendo una cuerda de algodón trenzada de 30 cm. el tiempo suficiente para extraer 3-5 ml presionando el extremo húmedo de la cuerda (Prickett *et al.*, 2008).

La muestra de HR se colectó introduciendo un hisopo de algodón, realizando un roce de la mucosa rectal en forma circular. Los hisopos se mantuvieron en 1 ml de PBS, utilizando microtubos de 1.5 ml cortando el extremo libre. Al momento de su colecta, las muestras de hisopado rectal y fluido oral se conservaron a 4°C hasta su transporte al laboratorio. La muestra de FO se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos para su clarificación y se colectó el sobrenadante.

Los sueros obtenidos y las muestras de fluido oral fueron alicuotados en un volumen de 1 ml y fueron almacenados a -20°C, hasta el ensayo de ELISA, mientras que los hisopados rectales se resguardaron a -70°C, hasta la extracción de ARN y su posterior análisis.

5.2.2 Inmunización e infección experimental

Para el manejo se recurrió a la contención física y el apoyo de personal capacitado procurando producir el menor estrés posible a los animales. Los cerdos de los grupos VacR/INF y VacR/No-INF, fueron inmunizados dos veces vía intramuscular y vía intranasal con dos semanas de intervalo entre inmunizaciones. Los cerdos de los grupos No-VacR/INF y No-VacR/No-INF no recibieron ningún tratamiento experimental, siendo considerados como grupos testigo libre de inmunización (Cuadro 5).

Cuadro 5. Esquema de inmunización e infección experimental

Grupos experimentales	Periodo postvacunación		Periodo postinfección	
	INI-rvDEP Intramuscular	INI-rvDEP Intranasal	Infección experimental	Fin
VacR/INF	0 dpv	14 dpv	0 dpi (84 dpv)	28 dpi (112 dpv)
VacR/No-INF	0 dpv	14 dpv	-	112 dpv
No-VacR/INF	-	-	0 dpi	28 dpi
No-VacR/No-INF	-	-	-	112 d

Para la vía intramuscular, se administró un volumen de 3 ml de la fórmula en el área de la tabla del cuello utilizando una aguja calibre 21G x 1.5”, se delimitó la zona (Fig. 9A.) y se realizó asepsia local previo a la inyección. Para la aplicación intranasal, se instiló un

volumen de 2 ml de la formulación por cada fosa nasal, procurando que el animal no tuviera estornudo, obstruyendo la fosa nasal momentáneamente (Fig. 9B.).

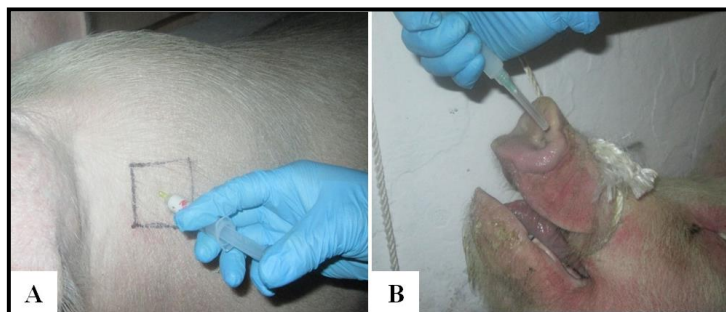


Figura 9. Inmunización. A) Aplicación intramuscular. B) Administración intranasal

Por otra parte, los animales de los grupos INF fueron infectados experimentalmente al día 84 postvacunación con la cepa PEDV/MX/MICH/01/2013 (Número de acceso GenBank: KJ906603). El inóculo se compuso de la suspensión viral en medio DMEM para cultivo celular administrado por vía oral en un volumen de 1 ml por cada cerdo (n=10). Los grupos No-INF no recibieron el inóculo y fungieron como grupos testigo de la infección (Fig. 10).

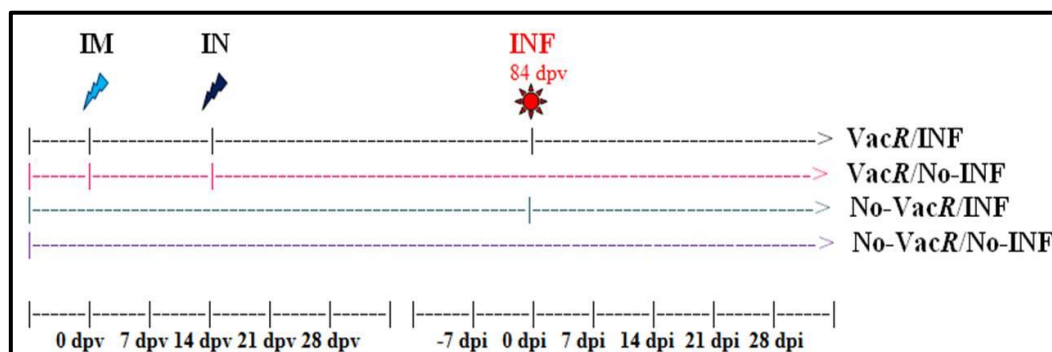


Figura 10. Línea de tiempo del ensayo experimental. VacR/INF, Vacunados e infectados, VacR/No-INF, vacunados, no infectados, No-VacR/INF, no vacunados, infectados, No-VacR/No-INF, no vacunados, no infectados, IM, vacuna intramuscular, IN, vacuna intranasal, INF, infección experimental, dpv, días postvacunación, dpi, días postinfección.

5.2.3 Monitoreo clínico

Se llevó a cabo el registro de temperatura y el monitoreo de signos clínicos para todos los grupos experimentales, durante los días de muestreo. El seguimiento se realizó diariamente durante 15 días después de la infección experimental en los grupos INF, con la valoración del cuadro clínico utilizando un puntaje del 0 a 3, otorgando valores de 0, a los animales sin signos clínicos, de 1 para los cerdos con heces pastosas, reducción ligera de consumo

voluntario y/o actividad disminuida, 2, presentación de diarrea moderada, hiporexia y/o letargia, y 3, vómito, diarrea profusa, depresión marcada, y/o anorexia.

5.3 Ensayo inmunoenzimático ELISA

Para la detección de anticuerpos, se realizó un ensayo de ELISA de tipo indirecto, evaluando los niveles de IgG e IgA, de acuerdo al protocolo previamente estandarizado en el laboratorio (Barrera, 2018), descrito en el Anexo G. Se utilizaron como antígeno lotes concentrados y purificados de las subunidades *rS834* *rS1135* y de las proteínas recombinantes N y M (*rN* y *rM*) del vDEP. Se incluyeron testigos positivos y negativos para validar la prueba. Se reveló con la adición de un sustrato que, al interactuar con el conjugado específico anti-anticuerpo, generó un color cuantificable por el espectrofotómetro, expresando el resultado en densidad óptica. La respuesta inmune humoral y mucosal atribuida a la inmunización con el biológico recombinante se representó mediante el cálculo del radio muestra a positivo (S/p, por sus siglas en inglés) para los diferentes días de muestreo, con la fórmula de Bjustrom-Kraft *et al.*, 2016:

$$\text{Radio Muestra/Positivo (S/P)} = \frac{(\text{DO de la muestra} - \text{DO promedio del testigo negativo})}{(\text{DO promedio del testigo positivo} - \text{DO promedio del testigo negativo})}$$

5.4 RT-PCR en tiempo real

Para la extracción de ARN se utilizó un kit comercial QIAMP Viral RNA Mini Kit (Qiagen), de acuerdo al protocolo del fabricante (Anexo H). El ARN se obtuvo en un volumen de 80 μl y se almacenó a -70°C , hasta su análisis. Se realizó una prueba cuantitativa de RT-PCR en tiempo real (Anexo I) para cuantificar la excreción viral, a partir de las muestras clínicas de hisopos rectales y fluidos orales.

5.5 Análisis estadístico

El radio S/p para muestras de suero y la temperatura se representaron con promedio y desviación estándar. Los resultados del ensayo de ELISA para muestras de fluido oral se representaron utilizando una gráfica de dispersión, con los datos individuales del valor S/p. Para el puntaje de los signos clínicos se utilizó el promedio y la excreción viral se

representó con los resultados individuales de la prueba de RT-PCR, expresados en No. de copias/ml en escala Log_{10} . Se utilizó el programa SPSS Statistics 17.0 (IBM) para el análisis estadístico. Se determinó la normalidad de los datos, utilizando la prueba de Shapiro-Wilk. De no cumplir con el supuesto de distribución normal, se utilizó estadística no paramétrica para comparar los cuatro grupos con la prueba de Krustal-Wallis y la prueba de U de Mann-Whitney para comparar dos grupos. Los signos clínicos y la detección de ARN, se analizaron a través de la prueba de Chi cuadrada, mediante presencia o ausencia. Se estableció un valor de $p \leq 0.05$, considerado estadísticamente significativo para definir diferencias entre los grupos analizados.

6. RESULTADOS

6.1 Biológico recombinante

6.1.1 Inducción de las cepas de *E. coli* BL21/S1 1135 y *E. coli* BL21/S1 834

En la prueba de expresión de las cepas *E. coli* BL21/S1135, *E. coli* BL21/S834 y *E. coli* BL-21 transformada con el gen cloranfenicol acetil-transferasa (CAT), se utilizó una concentración de IPTG 2 mM y 12 horas como tiempo fijo de incubación a 37° C, en agitación continua a 250 rpm. Las muestras obtenidas al finalizar el tiempo de expresión se analizaron mediante geles de poliacrilamida SDS-PAGE (Fig. 11).

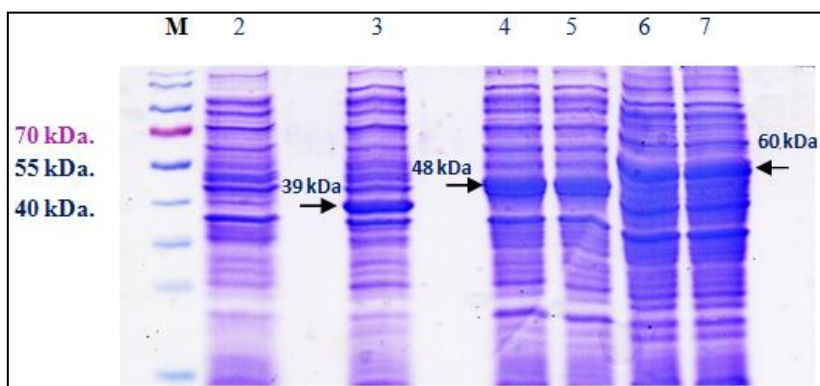


Figura 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS teñido con Coomassie para inducción. Carril 1 M, marcador de peso molecular Bench Mark™ Pre-stained Protein Ladder. Carril 2, Cepa de *E. coli* BL-21 no transformada. Carril 3, Cepa de *E. coli* BL-21 transformada con el gen cloranfenicol acetil-transferasa (CAT). Carriles 4 y 5, Cepa de *E. coli* BL-21/S 834. Carriles 6 y 7, Cepa de *E. coli* BL-21/S 1135. Las flechas señalan el peso molecular esperado de las proteínas.

En el testigo negativo no se observó banda de sobreexpresión, mientras que en el testigo positivo se observó una banda de sobreexpresión de 39 kDa, correspondiente a la proteína CAT. Se evidenciaron bandas de sobreexpresión de las subunidades *rS* 834 y *rS* 1135, de 48 kDa y 60 kDa, respectivamente.

6.1.2 Cinética de expresión de las cepas de *E. coli* BL21/M y *E. coli* BL21/N

La cinética de expresión de las cepas de *Escherichia coli* BL21/M y *Escherichia coli* BL21/N, inducidas con IPTG, se evaluó mediante una electroforesis en geles de

poliacrilamida SDS-PAGE (Fig. 12 y Fig. 13), visualizando las bandas sugerentes de 38 kDa y de 70 kDa de las proteínas *rM* y *rN*, respectivamente.

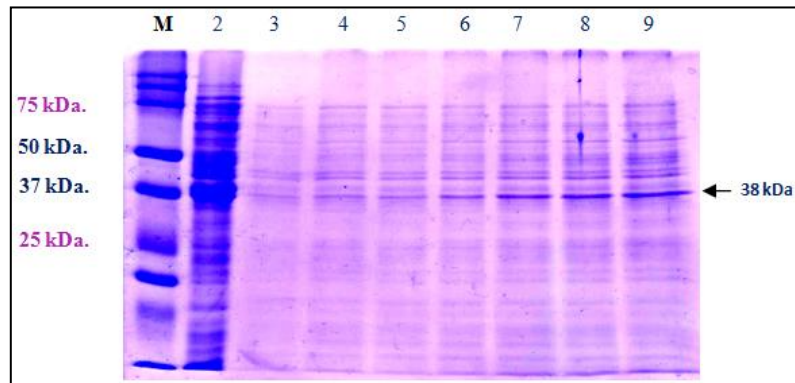


Figura 12. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS teñido con Coomassie de proteína *rM*. Carril 1 M, Marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards. Carril 2, Cepa de *E. coli* BL-21/CAT. Carril 3, *rM* 0 h. Carril 4, *rM* 0.5 h. Carril 5, *rM* 1h. Carril 6, *rM* 2h. Carril 7, *rM* 3h. Carril 8, *rM* 4h. Carril 9, *rM* 6h Las flechas señalan el peso molecular esperado de las proteínas.

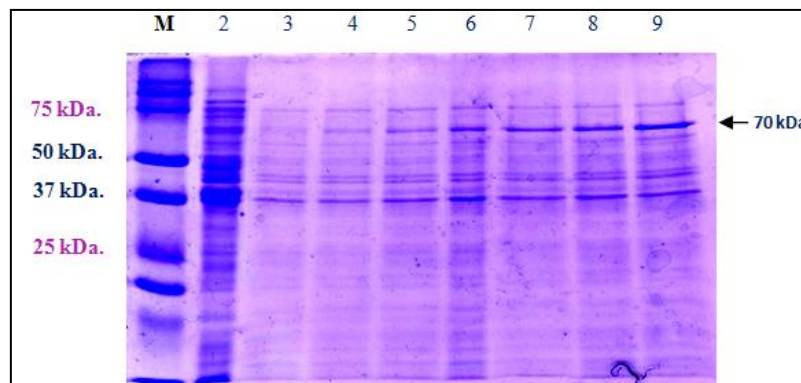


Figura 13. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS teñido con Coomassie de la proteína *rN*. Carril 1 M, Marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards. Carril 2, Cepa de *E. coli* BL-21/CAT. Carril 3, *rN* 0 h. Carril 4, *rN* 0.5 h. Carril 5, *rN* 1h. Carril 6, *rN* 2h. Carril 7, *rN* 3h. Carril 8, *rN* 4h. Carril 9, *rN* 6h. Las flechas señalan el peso molecular esperado de las proteínas.

La mayor banda de sobreexpresión se obtuvo en la muestra colectada a las 6 horas, para ambas proteínas recombinantes. Para el caso del testigo positivo se observó una banda diferencial de 37 kDa correspondiente a CAT, en los carriles con dicha muestra.

Se procedió a producir lotes de las proteínas recombinantes utilizando 12 horas para la expresión de las subunidades *rS* 834 y *rS* 1135 y 6 horas para las proteínas *rM* y *rN*. El cultivo inducido con IPTG se transfirió a tubos cónicos de 50 ml y se centrifugó a 6,000

rpm durante 10 minutos, para coleccionar las pastillas bacterianas. En cada tubo cónico de 50 ml se concentraron 200 ml de medio expresado, para cada proteína. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta la extracción de los cuerpos de inclusión.

6.1.3 Extracción de los cuerpos de inclusión

Siguiendo la metodología descrita (Anexo B), se encontraron fracciones proteicas en la parte insoluble del cultivo expresado. Se logró la lisis del concentrado bacteriano por el método físico de sonicación y se realizaron lavados de la muestra con Tritón al 1%; para la desnaturalización de los agregados de proteína se utilizó una solución de Urea 8 M, la cual, además disminuyó la cantidad de contaminantes en la muestra (Fig. 14).

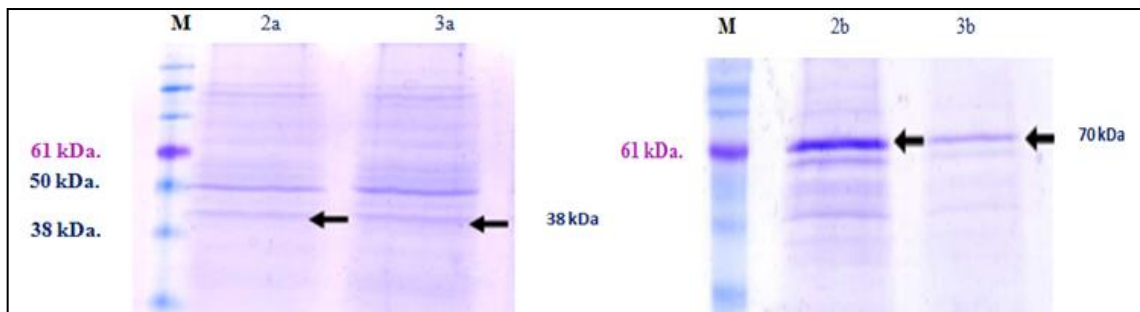


Figura 14. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS teñido con Coomassie de los cuerpos de inclusión. Carril 1 M, marcador de peso molecular Bench Mark™ Pre-stained Protein Ladder. Carril 2a, Cuerpo de inclusión con Urea 8 M. Carril 3a, Cuerpo de inclusión sin Urea 8 M. Carril 2b, Cuerpo de inclusión sin urea 8 M. Carril 3b, Cuerpo de inclusión con Urea 8 M. Las flechas señalan el peso molecular esperado de las proteínas *rM* (38 kDa) y *rN* (70 kDa).

La solubilización de la proteína se realizó mediante la incubación 12 horas con la solución de Sarcocyl al 10%. Las muestras de las proteínas solubilizadas se filtraron a través de una membrana de 0.45 µm para eliminar los restos del proceso de extracción de los cuerpos de inclusión y se visualizaron en geles de poliacrilamida SDS-PAGE (Fig. 15), previo a la purificación por cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC).

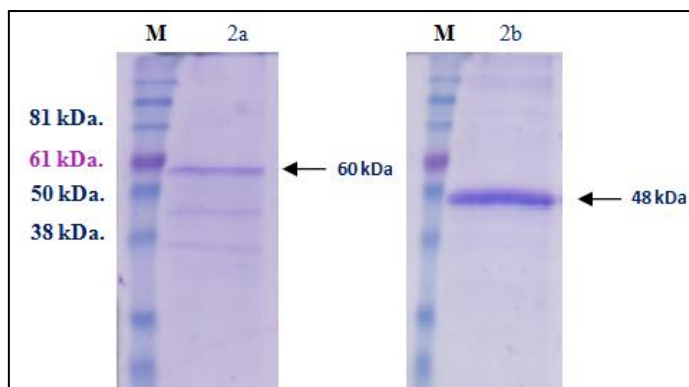


Figura 15. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS teñido con Coomassie de las proteínas purificadas. Carril 1 M, marcador de peso molecular Bench Mark™ Pre-stained Protein Ladder. Carril 2a, Cuerpo de inclusión de la subunidad *rS* 1135. Carril 2b, Cuerpo de inclusión de la subunidad *rS* 834. Las flechas señalan el peso molecular esperado de 60 kDa (*rS* 1135) y de 48 kDa (*rS* 834).

6.1.4 Cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC)

Mediante la utilización del equipo Äkta Prime Plus se realizó automáticamente el proceso de purificación y detección de los niveles de absorbancia, demostrando la cantidad de proteína presente en la muestra. Después de la optimización del proceso, se establecieron las condiciones de purificación de dos rondas, con volúmenes de muestra de cuerpo de inclusión de 15 a 20 ml a un flujo de trabajo de 1.5 ml/min, con 0.5 MPa de presión máxima, de acuerdo al protocolo descrito en el Anexo C.

La purificación constó de 3 fases: la primera durante el flujo de carga de la proteína, a través de la columna, una fase de lavado, para retirar la proteína no unida a la columna, y por último la fase de elución. En las figuras 16 a 19 se muestran las condiciones de absorbancia durante las fases del fraccionamiento proteico: flujo de muestra (F), lavado (L) y elución (E), dadas para cada proteína recombinante, junto con el análisis por SDS-PAGE de las eluciones de cada fase; en el carril 1, se incluyó el marcador de peso molecular Bench Mark™ Pre-stained Protein Ladder, en el carril 2 se incluyó la muestra del flujo de carga, carriles 3 y 4, la fase de lavado inicial y terminal, y por último, en los carriles 5-10, las eluciones de la proteína purificada.

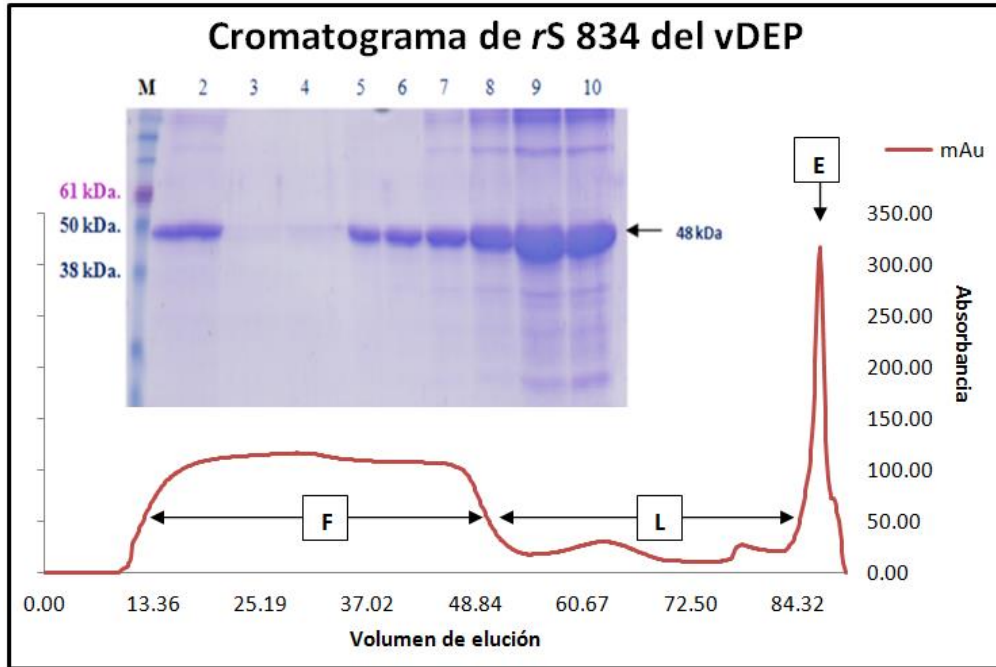


Figura 16. Condiciones óptimas de purificación para *rS* 834. Eluciones analizadas por SDS-PAGE, correspondientes a la gráfica de absorbancia obtenida durante el proceso: F, flujo de carga, L, lavado, E, elución.

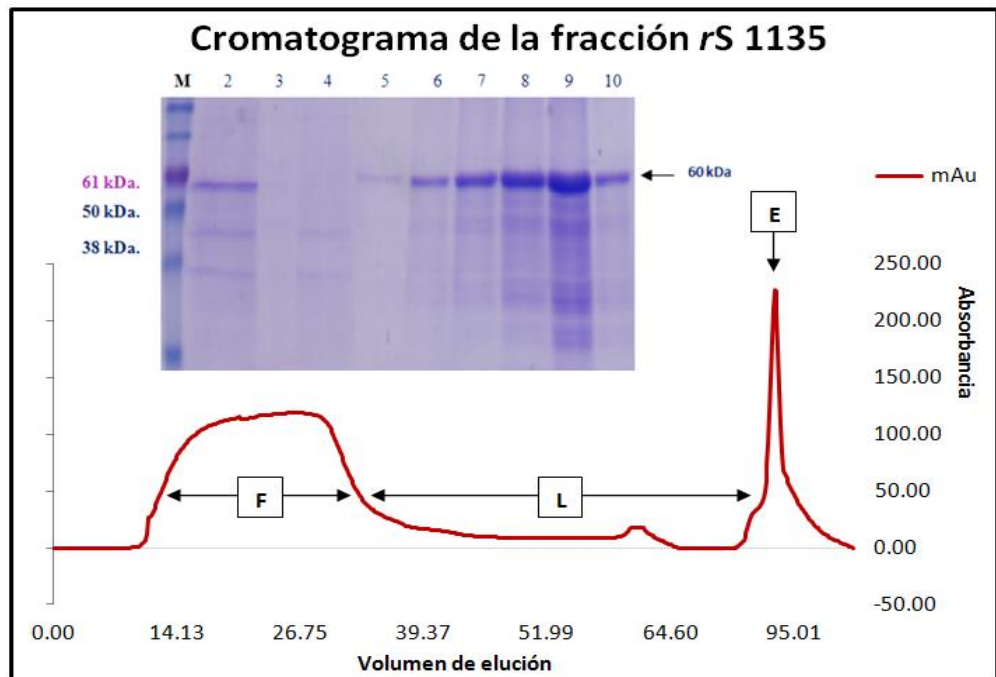


Figura 17. Condiciones óptimas de purificación para *rS* 1135. Eluciones analizadas por SDS-PAGE, correspondientes a la gráfica de absorbancia obtenida durante el proceso: F, flujo de carga, L, lavado, E, elución.

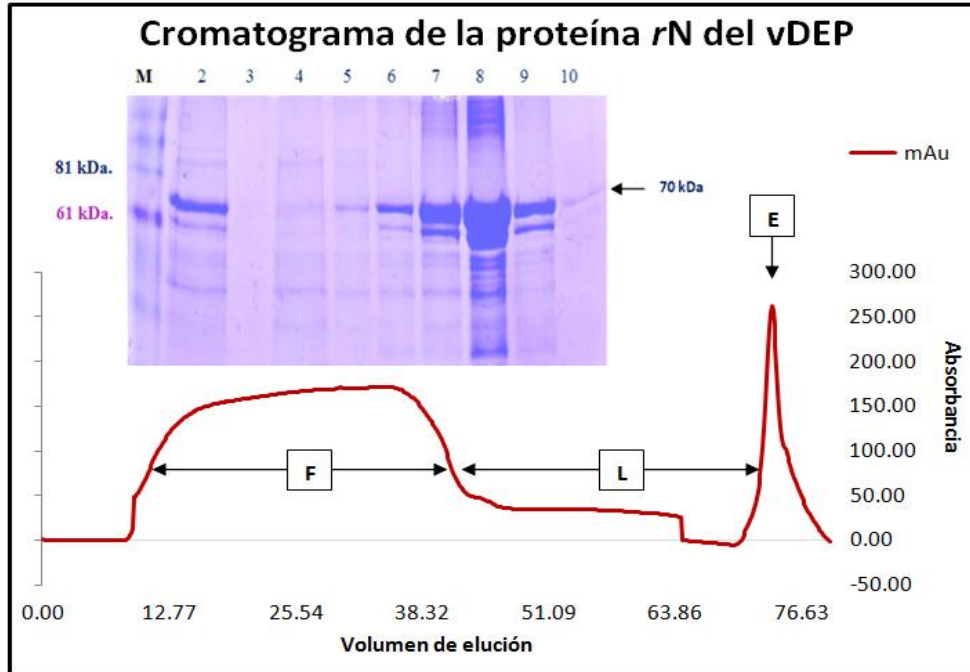


Figura 18. Condiciones óptimas de purificación para rN. Eluciones analizadas por SDS-PAGE, correspondientes a la gráfica de absorbancia obtenida durante el proceso: F, flujo de carga, L, lavado, E, elución.

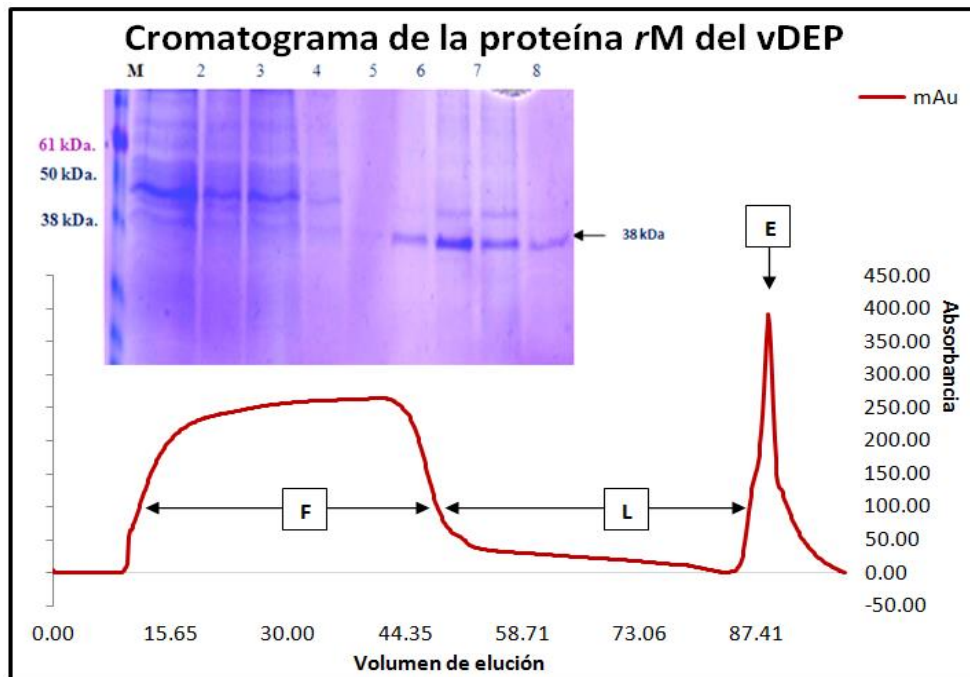


Figura 19. Condiciones óptimas de purificación para rM. Eluciones analizadas por SDS-PAGE, correspondientes a la gráfica de absorbancia obtenida durante las fases del proceso: F, flujo de carga, L, lavado, E, elución.

El aumento en el valor inicial de absorbancia, durante el flujo de carga indica que existe una concentración proteica alta de las muestras solubilizadas. El volumen de la fase de lavado depende de la carga proteica de cada cuerpo de inclusión y aumenta conforme exista mayor cantidad de proteína no unida a la columna. En esta fase, los niveles de absorbancia disminuyeron, lo cual indica la eliminación de proteína no específica. Finalmente, en la fase de elución, se dio un cambio de afinidad de la columna hacia la proteína de interés por la del imidazol, favoreciendo la recuperación de la proteína purificada. Se observó un pico máximo de absorbancia, rango de 200 hasta 400 miliunidades de absorbancia (mAu) siendo, en todos los casos, mayor al de la fase de carga de la muestra, lo cual indica la acumulación de proteína purificada en el eluido final. En el análisis mediante SDS-PAGE, se muestran las eluciones obtenidas de la purificación por cromatografía de afinidad (IMAC), confirmándose la presencia de las proteínas *rN*, de 70 kDa y *rM*, de 38 kDa, así como las subunidades *rS834*, de 48 kDa y *rS1135*, de 60 kDa.

6.1.5 Diálisis

Para la diálisis, se concentraron las eluciones en aquellas en las que se evidenciaron bandas proteicas de interés por la técnica de SDS-PAGE (Figuras 20-23), siguiendo la metodología descrita en el Anexo D.

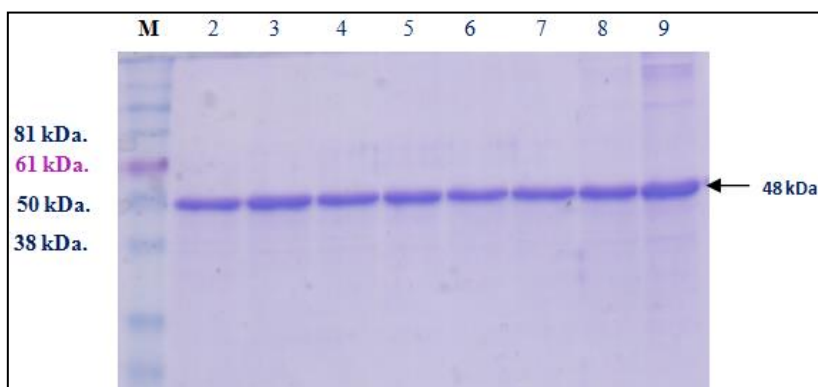


Figura 20. SDS-PAGE teñido con Coomassie de la diálisis de *rS 834*. Carril 1 M, marcador de peso molecular Bench Mark™ Pre-stained Protein Ladder. Carriles 2-9, eluciones de *rS 834*. Se indica el peso molecular: 48 kDa (flecha).

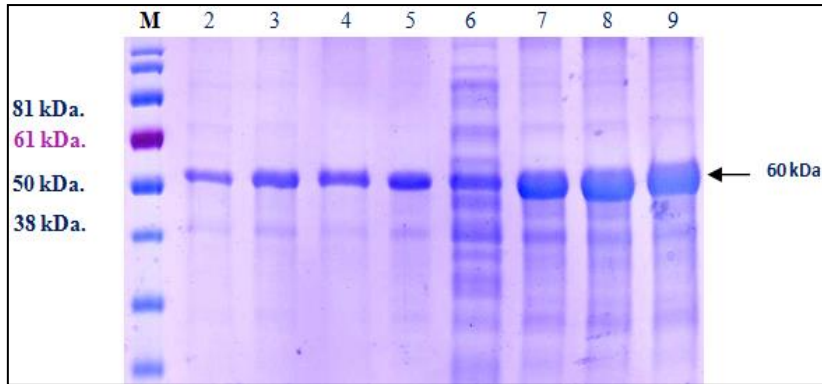


Figura 21. SDS-PAGE teñido con Coomassie de la diálisis de *rS* 1135. Carril 1 M, marcador de peso molecular Bench Mark™ Pre-stained Protein Ladder. Carriles 2-9, eluciones de *rS* 1135. Se indica el peso molecular: 60 kDa (flecha).

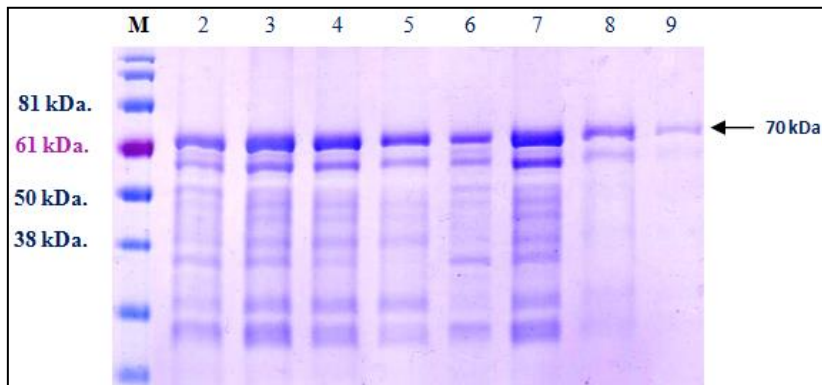


Figura 22. SDS-PAGE teñido con Coomassie de la diálisis de *rN*. Carril 1 M, marcador de peso molecular Bench Mark™ Pre-stained Protein Ladder. Carriles 2-9, eluciones de *rN*. Se indica el peso molecular: 70 kDa (flecha).

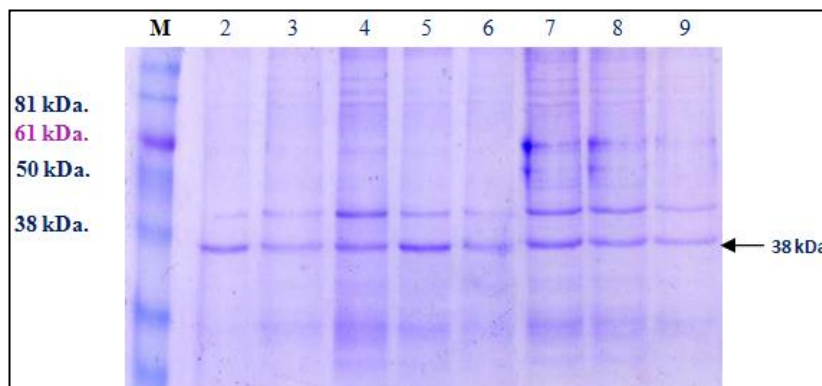


Figura 23. SDS-PAGE teñido con Coomassie de la diálisis de *rM*. Carril 1 M, marcador de peso molecular Bench Mark™ Pre-stained Protein Ladder. Carriles 2-9, eluciones de *rM*. Se indica el peso molecular: 38 kDa (flecha).

6.1.6 Cuantificación

Utilizando los datos de absorbancia obtenidos por el método de Bradford, se realizó la gráfica de dispersión de la albúmina sérica bovina y se obtuvo la ecuación de la recta ($y = mx + b$), con la cual se hizo la corrección lineal de las lecturas. Las curvas de calibración de la albúmina sérica bovina se encuentran en el anexo E. Al resolver la ecuación: $x = (\text{absorbancia} - b) / m$ para los datos de las muestras a cuantificar (Cuadro 6) se obtuvieron los siguientes resultados:

Cuadro 3. Cuantificación de lotes con mayor concentración proteica

<i>rN</i>	<i>rM</i>	<i>rS 834</i>	<i>rS 1135</i>
N 132 $\mu\text{g/ml}$	M 80 $\mu\text{g/ml}$	S 834 255 $\mu\text{g/ml}$	S 1135 472 $\mu\text{g/ml}$
N 182 $\mu\text{g/ml}$	M 202 $\mu\text{g/ml}$	S 834 270 $\mu\text{g/ml}$	S 1135 80 $\mu\text{g/ml}$
N 287 $\mu\text{g/ml}$	M 370 $\mu\text{g/ml}$	S 834 32 $\mu\text{g/ml}$	S 1135 423 $\mu\text{g/ml}$
		S 834 110 $\mu\text{g/ml}$	

6.2 Animales de experimentación

Todos los animales fueron serológicamente negativos previo al ensayo experimental y sin excreción viral del vDEP mediante RT-PCR tiempo real, además no se observó cuadro clínico asociado a DEP. Los cerdos se confirmaron como animales no expuestos.

6.2.1 Seguridad del biológico recombinante INI-*rv*DEP

Posterior a la aplicación del biológico recombinante, se ratificó la ausencia de reacciones adversas en la zona relacionadas con la formulación administrada, tales como inflamación o depresión, anorexia e hipertermia corporal, realizando el seguimiento por tres días postvacunación.

6.2.2 Infección experimental

Se realizó una prueba de RT-PCR en tiempo real para confirmar el número de copias o equivalentes genómicos del inóculo. La infección experimental se llevó a cabo con los cerdos de los grupos VacR/INF y No-VacR/INF, los cuales recibieron individualmente vía oral (Fig. 24), un volumen de 1 ml de la suspensión viral del vDEP con 9.3 \log_{10} de número de copias/ml del vDEP. Los animales de los grupos VacR/No-INF y No-VacR/No-INF, no fueron inoculados y se trataron como grupos testigos libres de la infección.



Figura 24. Infección experimental.

6.2.3 Monitoreo clínico de temperatura

Se registraron valores variables de temperatura, evidenciados por el aumento en la desviación estándar. Se determinó un rango de temperatura corporal normal de 38.5° C a 39.2° C, el cual se observó en los cuatro grupos experimentales durante el ensayo, excepto a los 21 dpv, 0 dpi (84dpv), 14 dpi y 21 dpi, en los diferentes grupos. En el grupo *VacR/No-INF* se registró un promedio por arriba del rango normal al día 21 postvacunación. En cambio, los grupos *VacR/INF* y *No-VacR/No-INF* presentaron un promedio de temperatura por debajo del rango normal a los 0 dpi. Ambos recuperaron el rango normal de temperatura a la semana siguiente y los animales del grupo *No-VacR/No-INF* se mantuvieron así, hasta el final del ensayo clínico. A los 14 dpi, el grupo *VacR/INF* registró otra disminución. Finalmente, los animales del grupo *No-VacR/INF*, registraron una disminución al 0 dpi, sin caer fuera del rango normal de temperatura; en este grupo los valores de temperatura por debajo del rango normal, se registraron hasta los 21 dpi y hacia el final del experimento los animales registraron un valor normal de temperatura para cerdos adultos (Fig. 25).

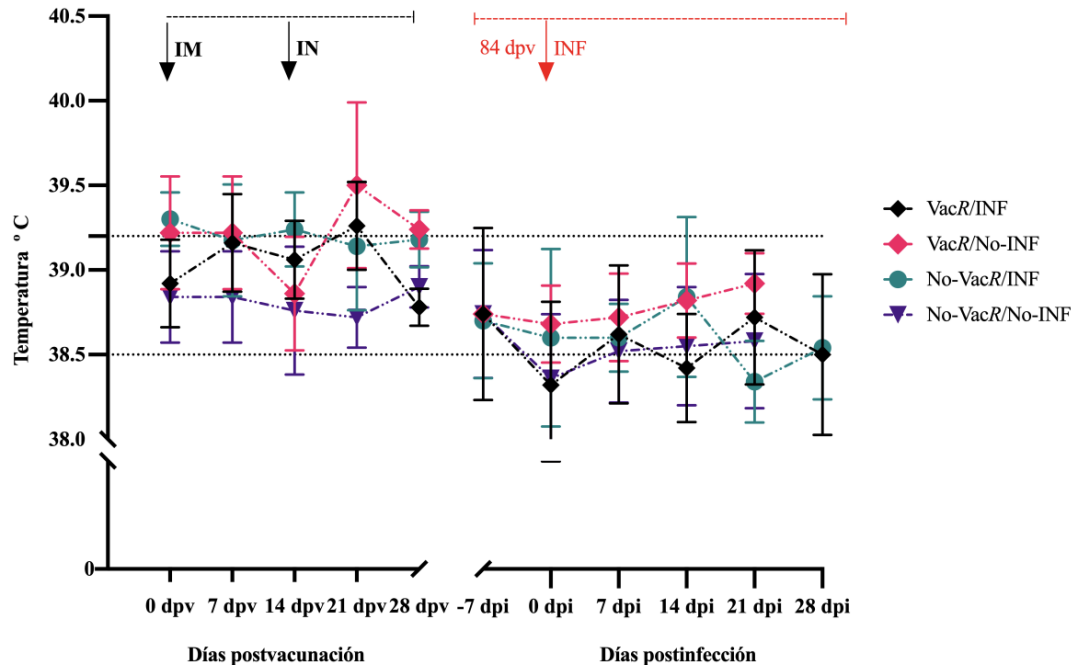


Figura 25. Monitoreo de temperatura. Se muestra el promedio y la desviación estándar. Las líneas punteadas delimitan el rango normal de temperatura. VacR/INF, Vacunados e infectados, VacR/No-INF, vacunados, no infectados, No-VacR/INF, no vacunados, infectados, No-VacR/No-INF, no vacunados, no infectados, IM, vacuna intramuscular, IN, vacuna intranasal, INF, infección experimental.

6.2.4 Signos clínicos

Los animales de los grupos testigos No-INF se mantuvieron clínicamente sanos, sin registro de diarrea, anorexia o depresión durante todo el periodo de observación clínica. Se evidenció una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre los grupos infectados (INF) y los grupos controles (No-INF). Los animales de los grupos INF, no tuvieron presencia de diarrea, anorexia o letargia, previo al desafío con el vDEP virulento (84 dpv). Estos grupos experimentales exhibieron signos la enfermedad a las 24 horas postinfección (Fig. 26).



Figura 26. Signos clínicos en los grupos experimentales INF.

La evaluación del puntaje de diarrea arrojó valores de mayor severidad (promedio de 2.4) en el grupo VacR/INF, comparado con el grupo No-VacR/INF (promedio de 1.2) durante 5 días postinfección (dpi), con una tendencia a disminuir, hacia los 6 y 7 dpi, en los cuales los dos grupos se comportaron de manera similar (promedio <1) (Fig. 27).

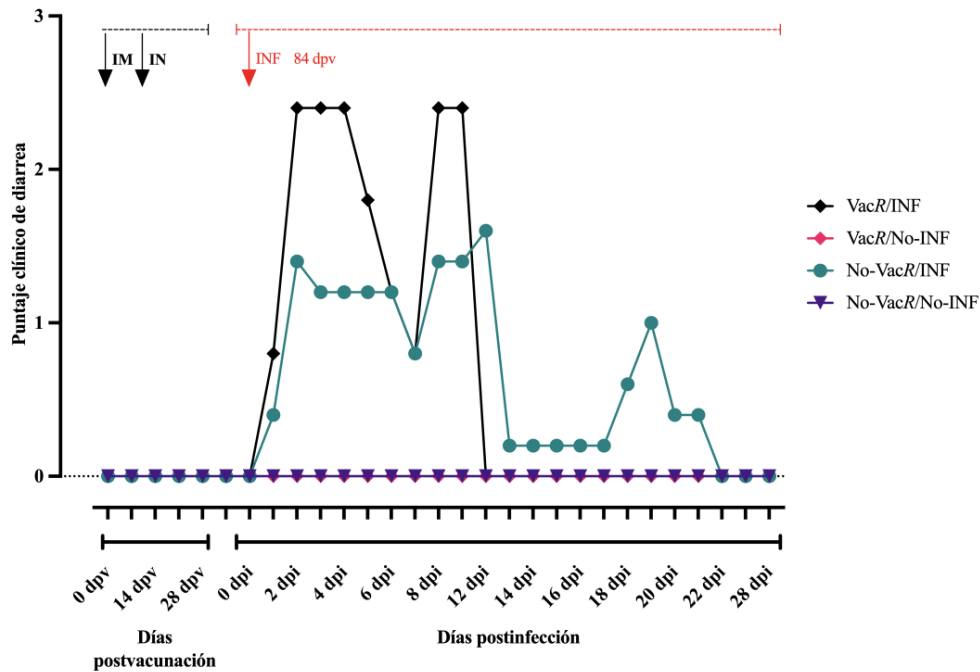


Figura 27. Puntaje clínico de diarrea. Se muestra el promedio de los grupos experimentales durante el ensayo. VacR/INF, vacunados e infectados, VacR/No-INF, vacunados, no infectados, No-VacR/INF, no vacunados, infectados, No-VacR/No-INF, no vacunados, no infectados, IM, vacuna intramuscular, IN, vacuna intranasal, INF, infección experimental.

A pesar de que se presentó un nuevo aumento en el puntaje clínico de diarrea a los 8 y 9 dpi (promedio 2.4), todos los animales del grupo VacR/INF dejaron de presentar diarrea a los 12 dpi, manteniendo esta condición hasta el final del experimento. Los animales del grupo No-VacR/INF continuaron con un promedio de puntaje clínico disminuido para la diarrea (0.2), a partir del día 13 y hasta los 17 dpi, pero tuvieron un nuevo aumento de diarrea por cuatro días consecutivos (18 a 21 dpi), regresando a valores bajos hasta los 22 dpi (0.4) y cesando la presentación clínica un día después y hasta el final del ensayo, a los 112 dpv. No hubo diferencia estadística significativa entre ambos grupos infectados, durante el periodo postinfección, excepto en un punto del muestreo, a los 10 días postinfección ($P = 0.038$).

La anorexia en los grupos infectados (INF) se evidenció cuando los animales dejaron de consumir su ración matutina diaria, o cuando se observó alimento sobrante por la tarde. En este caso, se observó una tendencia en el aumento de este signo clínico en los animales del grupo No-VacR/INF, comparado con los del grupo VacR/INF. El análisis estadístico exhibió diferencia estadística significativa a los 7, 12, 13, 14 y 15 dpi. Posteriormente, el grupo VacR/INF presentó un consumo normal de alimento a los 14 dpi y se mantuvo así hasta el final del desafío experimental (28 dpi). Los animales del grupo No-VacR/INF continuaron presentando anorexia hasta el final del ensayo experimental, sin embargo, no hubo diferencia estadística en los días posteriores al día 15 posterior a la infección (Fig. 28).

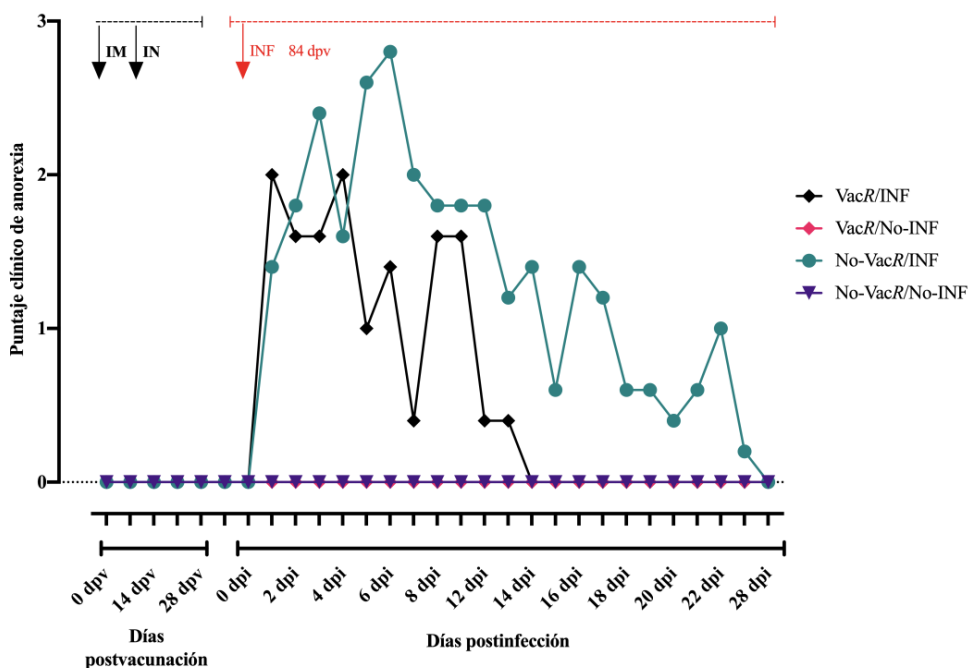


Figura 28. Puntaje clínico de anorexia. Se muestra el promedio de los grupos experimentales durante el ensayo. VacR/INF, vacunados e infectados, VacR/No-INF, vacunados, no infectados, No-VacR/INF, no vacunados, infectados, No-VacR/No-INF, no vacunados, no infectados, IM, vacuna intramuscular, IN, vacuna intranasal, INF, infección experimental.

Al igual que con la diarrea y la disminución en el consumo de alimento, los animales de ambos grupos infectados (INF), presentaron signos de depresión, tales como estar postrados, una menor curiosidad y apetito, así como poca o nula respuesta al estímulo del encargado de los animales, a las 24 horas después del desafío experimental (1 dpi) (Fig. 29).

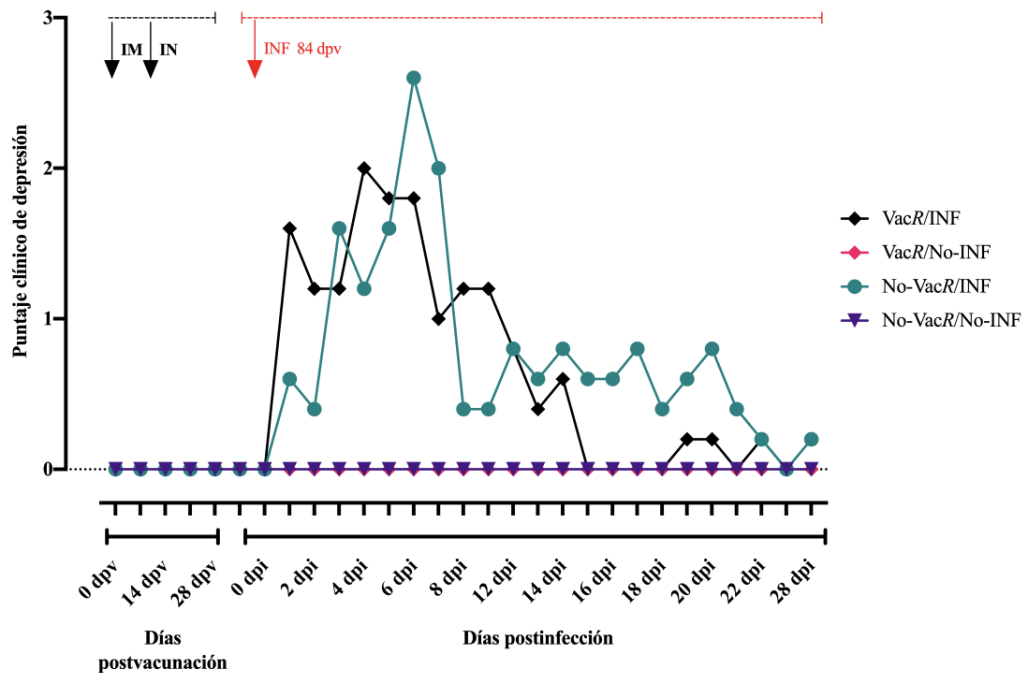


Figura 29. Puntaje clínico de depresión. Se muestra el promedio de los grupos experimentales durante el ensayo. VacR/INF, vacunados e infectados, VacR/No-INF, vacunados, no infectados, No-VacR/INF, no vacunados, infectados, No-VacR/No-INF, no vacunados, no infectados, IM, vacuna intramuscular, IN, vacuna intranasal, INF, infección experimental.

Hubo un aumento en el promedio del puntaje en los animales del grupo VacR/INF (valor de 2), al dpi 1, comparado con los del grupo 3, sin embargo, el grupo No-VacR/INF registró el valor máximo a los 13 dpi (promedio de 2.8). El grupo VacR/INF presentó un comportamiento normal a los 15 dpi y sólo en los 12 y 13 dpi volvieron a presentar depresión, con un promedio de 0.2. Los animales del No-VacR/INF continuaron presentando depresión, fluctuando en valores promedio de 0.4 y 0.8, regresando a la normalidad en cuanto a su actividad a los 21 dpi. No hubo diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) entre ambos grupos INF, durante el periodo postinfección, salvo en

los 15 dpi ($P = 0.01$). El número de animales que presentaron signos clínicos se representa como frecuencia en los grupos INF (Fig. 30).

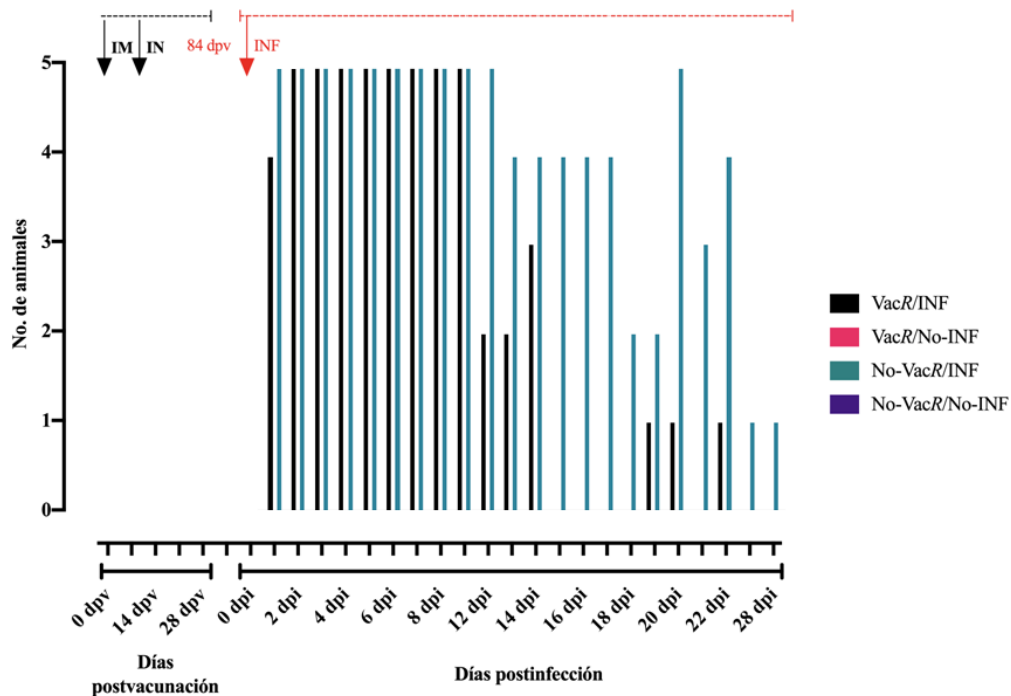


Figura 30. Frecuencia de animales con signos clínicos de DEP. VacR/INF, vacunados e infectados, VacR/No-INF, vacunados, no infectados, No-VacR/INF, no vacunados, infectados, No-VacR/No-INF, no vacunados, no infectados, IM, vacuna intramuscular, IN, vacuna intranasal, INF, infección experimental.

Durante todo el periodo postinfección, se registró al menos un animal con signos clínicos en el grupo No-VacR/INF. De acuerdo a la gráfica, los animales de los grupos infectados (VacR/INF y No-VacR/INF) tuvieron un comportamiento igual en cuanto a la frecuencia de signos clínicos (5/5), desde el 1er dpi, hasta los 12 dpi. Después de este punto, la frecuencia disminuyó a 2/5 en el grupo VacR/INF, por 3 días. En el grupo No-VacR/INF, fue observada una frecuencia de 4/5, a partir de los 13 dpi y hasta los 18 dpi, mientras que en el grupo VacR/INF a los 15 dpi no se registraron animales con signos clínicos, sino hasta los 19 y 20 dpi, registrando una frecuencia de 1/5. A los 20 dpi, se aumentó la frecuencia de animales a 5/5 en el grupo No-VacR/INF.

6.3 Respuesta inmune humoral

6.3.1 IgG específica hacia la subunidad rS 834

Los valores de la relación S/p obtenida en la prueba de ELISA para los sueros de los grupos experimentales (grupo Vac/INF, grupo Vac/No-INF, No-Vac/INF y No-Vac/No-INF) resultaron iguales estadísticamente al día 0 ($P = 0.094$). Mientras que en los 7, 14, 21, 28 dpv y a los -7, 0, 7, 14, 21, 28 dpi, los valores de la relación S/p de los cuatro grupos experimentales mostraron diferencia estadística significativa ($P < 0.05$). Al hacer la prueba U de Mann-Whitney, se comparó entre un par de grupos, a partir del segundo muestreo. Los grupos vacunados (VacR) mostraron un aumento en los valores S/p de IgG sérica específica hacia la subunidad rS 834, desde los 7 dpv resultando iguales estadísticamente entre ellos y diferentes con respecto a los grupos control (No-VacR). Se registró un ligero aumento a los 21 dpv, 7 días después del refuerzo intranasal. Los niveles de IgG se mantuvieron elevados hasta el día 77 postvacunación, en el que se registró una disminución para el grupo VacR/INF (Fig. 31).

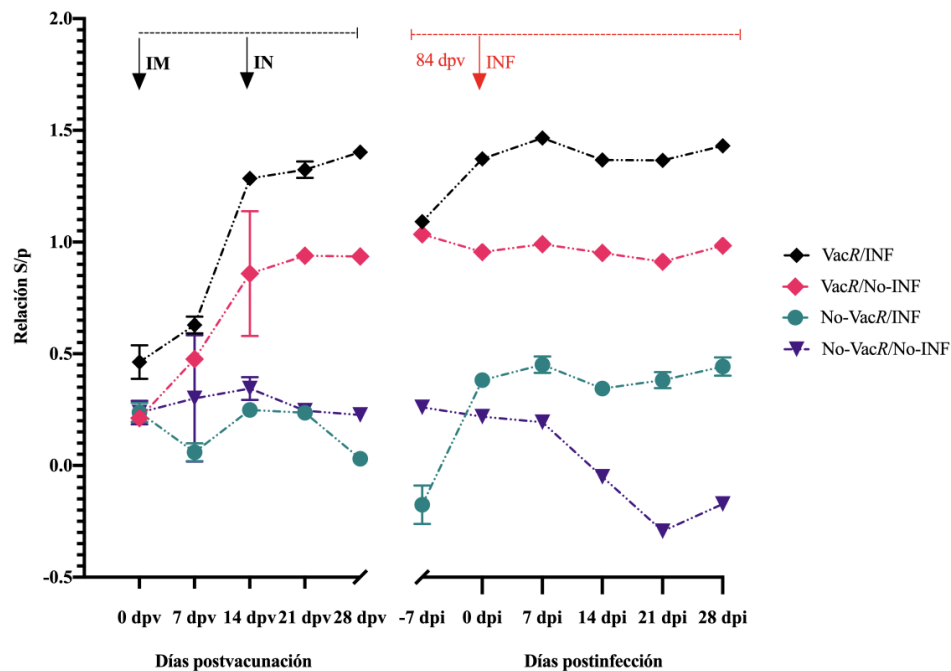


Figura 31. Radio S/p de IgG específica hacia la subunidad rS 834. Se observa el promedio y la desviación estándar de los grupos experimentales entre cada muestreo. VacR/INF, vacunados e infectados, VacR/No-INF, vacunados, no infectados, No-VacR/INF, no vacunados, infectados, No-VacR/No-INF, no vacunados, no infectados, IM, vacuna intramuscular, IN, vacuna intranasal, INF, infección experimental.

A partir del día 84 (0 dpi) se registró un aumento de los valores S/p, que se mantuvo hasta el final del experimento (28 dpi). En el grupo vacunado VacR/No-INF, los valores S/p se mantuvieron constantes desde los 21 dpv, hasta el término del ensayo. Al comparar entre los grupos vacunados (VacR/INF y VacR/No-INF), se encontró diferencia estadística ($P < 0.05$), en los valores S/p, a partir de los 14 dpv y hasta el final del estudio (28 dpi), evidenciando una respuesta más elevada en el grupo VacR/INF, debido al protocolo de inmunización.

Por otro lado, los niveles de IgG de los grupos infectados (INF) se mantuvieron iguales estadísticamente ($P > 0.05$), al día de la infección experimental a los 84 dpv (0 dpi). En el grupo No-VacR/INF, los valores S/p se mantuvieron basales hasta el día 21 dpv, posteriormente, disminuyeron registrando valores negativos al día -7 dpi. Después se registró un aumento hasta rondar el 0.4 de radio S/p detectado a los 84 dpv (0 dpi), hasta los 28 dpi. Se evidenció una diferencia estadística significativa entre el grupo No-VacR/INF y el grupo No-VacR/No-INF, lo que significa que el protocolo de infección tuvo influencia en el aumento del valor S/p desde los 7 dpi y hasta el final del ensayo, con respecto al grupo blanco (No-VacR/No-INF). Finalmente, los animales de los grupos No-VacR/No-INF se mantuvieron alrededor de 0.2 de valor S/p, hasta el día 91, con valores negativos en los días 21 y 28 dpi.

6.3.2 IgG específica hacia la proteína rN

Los niveles basales de IgG en los cuatro grupos experimentales (grupo VacR/INF, grupo VacR/No-INF, No-VacR/INF y No-VacR/No-INF), obtenidos mediante la prueba de ELISA indirecto con la proteína rN, fueron iguales estadísticamente ($P = 0.214$) al inicio del estudio (día 0), y resultaron diferentes estadísticamente ($P < 0.009$) a los 7, 14, 21, 28 dpv y a los -7, 0, 7, 14, 21, 28 dpi. Al comparar entre los grupos vacunados (VacR/INF y VacR/No-INF), no se encontró diferencia estadística ($P > 0.05$), en los valores S/p, a partir del día 7 postvacunación, evidenciando una respuesta similar al protocolo de inmunización, en ambos grupos. Se registró el mayor aumento al día 21 postvacunación y los niveles de IgG se mantuvieron constantes hasta el final del estudio (28 dpi). Asimismo, se evidenció una diferencia estadística ($P < 0.01$) de los valores S/p en los grupos vacunados, con respecto a los grupos controles no vacunados (No-VacR/INF y No-VacR/No-INF), a lo largo del experimento (0 dpv a 28 dpi) (Fig. 32).

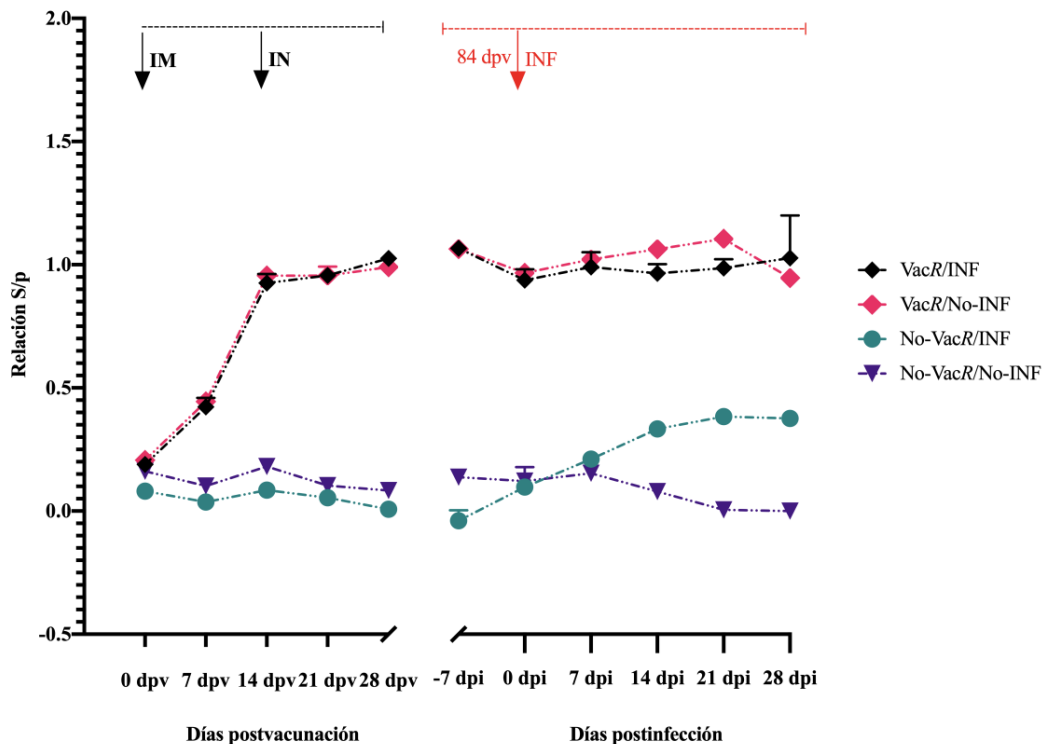


Figura 32. Relación S/p de IgG específica hacia la proteína rN. Se observa el promedio y la desviación estándar de los grupos experimentales entre cada muestreo. VacR/INF, vacunados e infectados, VacR/No-INF, vacunados, no infectados, No-VacR/INF, no vacunados, infectados, No-VacR/No-INF, no vacunados, no infectados, IM, vacuna intramuscular, IN, vacuna intranasal, INF, infección experimental.

Por otro lado, no se registró un aumento en los valores del radio S/p en los animales No-VacR/INF, evaluados con la proteína rN, permaneciendo iguales estadísticamente ($P > 0.05$), desde el día 0 hasta los 21 dpi. A partir de este día, los valores S/p fueron en aumento hasta rondar el 0.4 de radio S/p, en los días 21 y 28 dpi, evidenciando una diferencia estadística entre el grupo No-VacR/INF y el grupo No-VacR/No-INF, lo que significa que el protocolo de infección tuvo influencia en el aumento del valor S/p hasta los 21 dpi, con respecto al grupo blanco (No-VacR/No-INF). Finalmente, los animales de los grupos No-VacR/No-INF se mantuvieron alrededor de 0 a 0.2 en valores de radio S/p durante el experimento.

6.3.3 IgG específica hacia la subunidad rS 1135

Los valores de la relación S/p obtenida en la prueba de ELISA para los sueros de los grupos experimentales (grupo Vac/INF, grupo Vac/No-INF, No-Vac/INF y No-Vac/No-INF) fueron iguales estadísticamente ($P = 0.320$) al día 0 del ensayo y resultaron diferentes estadísticamente a los 7, 14, 21, 28 dpv y a los -7, 0, 7, 14, 21, 28 dpi ($P < 0.021$), por la prueba de Kruskal-Wallis. Lo anterior indica que al día 0 los grupos experimentales tenían niveles similares de IgG específica, evaluados mediante ELISA indirecto con la proteína rS1135. Al comparar entre los grupos vacunados (VacR/INF y VacR/No-INF), no se encontró diferencia estadística ($P > 0.05$), en los valores S/p, en los días 0, 7, 14, 77 y 84 postvacunación, evidenciando una respuesta similar al protocolo de inmunización, en ambos grupos (Fig. 33).

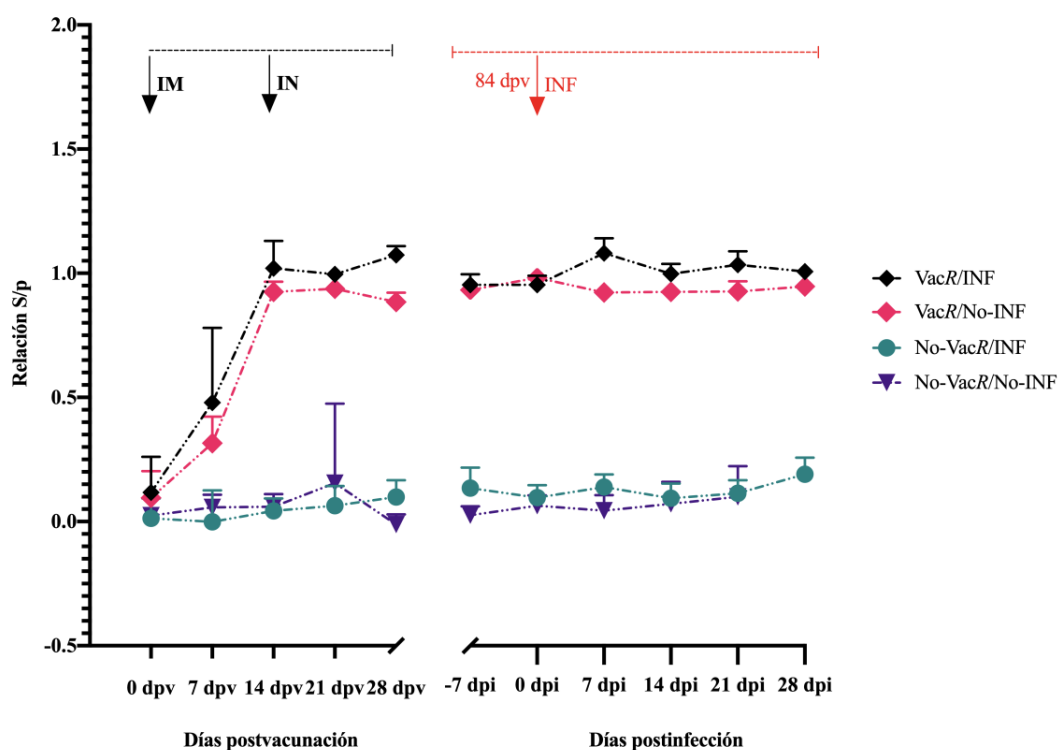


Figura 33. Relación S/p de IgG específica hacia la subunidad rS 1135. Se observa el promedio y la desviación estándar de los grupos experimentales entre cada muestreo. VacR/INF, vacunados e infectados, VacR/No-INF, vacunados, no infectados, No-VacR/INF, no vacunados, infectados, No-VacR/No-INF, no vacunados, no infectados, IM, vacuna intramuscular, IN, vacuna intranasal, INF, infección experimental.

Sin embargo, a los 21 días postvacunación y 21 días postinfección, hubo diferencia entre ambos grupos, aunado al protocolo de infección. Al igual, se evidenció una diferencia estadística ($P < 0.01$) de los valores S/p en los grupos vacunados, con respecto a los grupos controles no vacunados (No-VacR/INF y No-VacR/No-INF), a partir del día 14 postvacunación. Por otro lado, no se registró un aumento en los valores del radio S/p en los animales No-VacR/INF, evaluados con la subunidad rS1135, permaneciendo iguales estadísticamente ($P > 0.05$), desde el día 0 hasta el día 91 postvacunación (7 días postinfección). A partir de este día, los valores S/p fueron en aumento hasta rondar el 0.2 de radio S/p, al día 91, evidenciando una diferencia estadística entre el grupo No-VacR/INF y el grupo No-VacR/No-INF, lo que indica una respuesta al protocolo de infección, sin embargo fueron iguales estadísticamente en días posteriores, lo que significa que el protocolo de infección no tuvo influencia en el aumento del valor S/p y que fue un incremento inespecífico. Finalmente, los animales de los grupos No-VacR/No-INF se mantuvieron alrededor de 0 a 0.1 en valores de radio S/p durante el experimento.

6.3.4 IgG específica hacia la proteína rM

Los niveles basales de IgG en los cuatro grupos experimentales (grupo Vac/INF, grupo Vac/No-INF, No-Vac/INF y No-Vac/No-INF), obtenidos mediante la prueba de ELISA indirecto con la proteína rM, resultaron diferentes estadísticamente ($P < 0.037$) a los 0, 7, 14, 21, 28 dpv y a los -7, 0, 7, 14, 21, 28 dpi. Lo anterior indica que al día 0 los grupos experimentales no tenían niveles similares de IgG específica, evaluados mediante ELISA indirecto con la proteína rM. Al comparar entre los grupos vacunados (VacR/INF y VacR/No-INF), no se encontró diferencia estadística ($P > 0.05$), en los valores S/p, en los días 0, 7, 14, 21, 77, 105 y 112 postvacunación, evidenciando una respuesta similar al protocolo de inmunización, en ambos grupos. Asimismo, se evidenció una diferencia estadística ($P < 0.01$) de los valores S/p en los grupos vacunados, con respecto a los grupos controles no vacunados (No-VacR/INF y No-VacR/No-INF), a partir del día 14 postvacunación. Finalmente, los niveles de IgG de los grupos no vacunados se mantuvieron iguales estadísticamente ($P > 0.05$), desde el día 0 hasta el día 98 postvacunación. En el día 98, 105 y 112 (14, 21 y 28 días postinfección), se evidenció una diferencia estadística entre los grupos no vacunados (No-VacR/INF y No-VacR/No-INF), lo que significa que el protocolo de infección tuvo influencia en el aumento del valor S/p hasta los 21 días

postinfección, con respecto al grupo testigo (No-VacR/No-INF). Finalmente, los animales de los grupos No-VacR/No-INF se mantuvieron en valores negativos de radio S/p durante el experimento (Fig. 34).

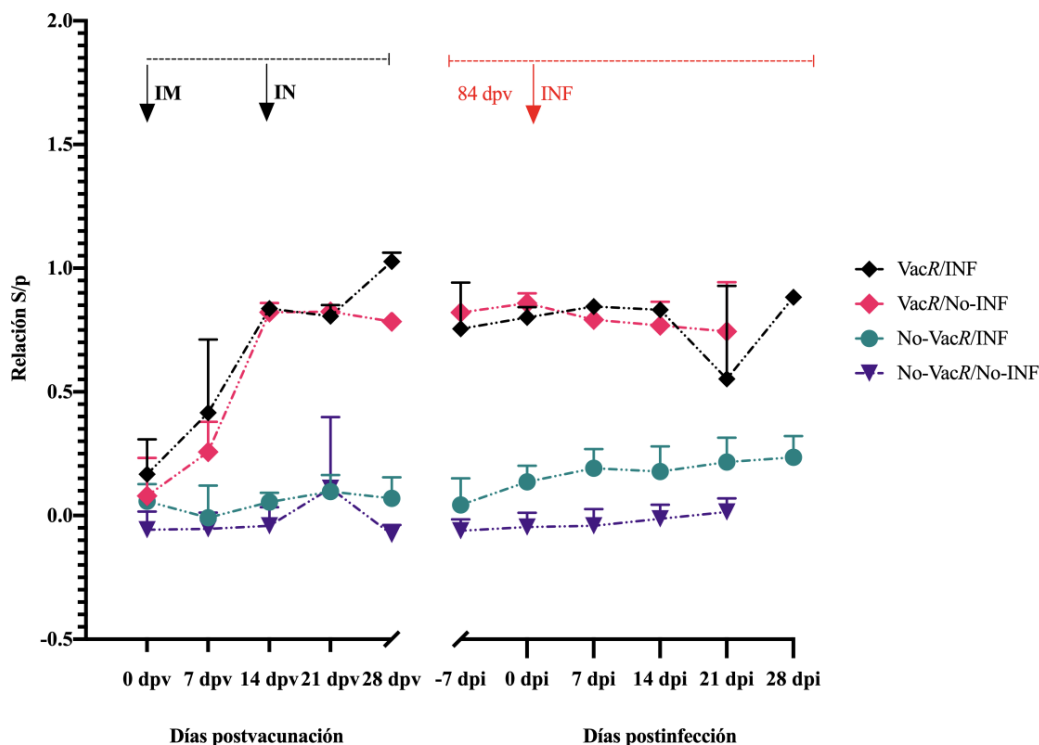


Figura 34. Relación S/p de IgG específica hacia la proteína *rM*. Se observa el promedio y la desviación estándar de los grupos experimentales entre cada muestreo. VacR/INF, vacunados e infectados, VacR/No-INF, vacunados, no infectados, No-VacR/INF, no vacunados, infectados, No-VacR/No-INF, no vacunados, no infectados, IM, vacuna intramuscular, IN, vacuna intranasal, INF, infección experimental.

6.4 Evaluación de diferentes concentraciones de antígeno de la subunidad *rS 834* para la detección de IgA

Se determinó la concentración óptima de la subunidad *rS834* que presentara una mayor diferencia al evaluar las muestras positivas y negativas de suero, con el anticuerpo anti-IgA. Se llevó a cabo una prueba de ELISA, colocando por triplicado sueros positivos y negativos hacia el vDEP, así como un control blanco, sin muestra de suero. Se siguió la metodología descrita en el anexo F, evaluando las siguientes concentraciones de la subunidad *rS 834*: 50, 100, 250 y 500 ng de proteína y se valoró aquella concentración de antígeno en la que se observó mayor discriminación entre la muestra positiva y negativa.

La concentración de 250 ng y la de 50 ng de proteína, diferenció por 4.4 veces más el suero positivo del negativo, mientras que la concentración de 100, la diferencia sólo fue de 2.5 veces para las mismas muestras y de 1.5 en la concentración de 50 ng (Fig. 35).

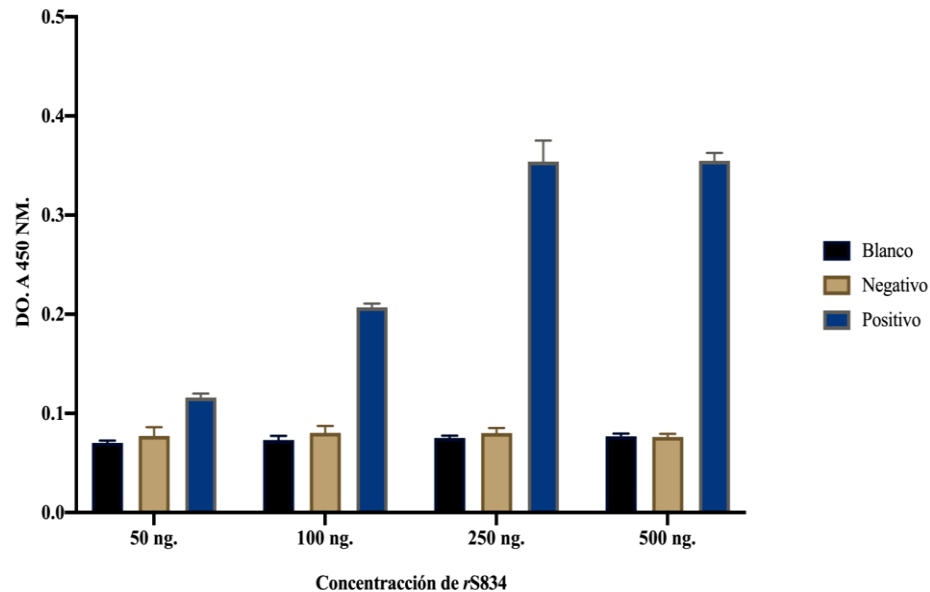


Figura 35. Comparación de las concentraciones para la discriminación entre muestras positivas y negativas. DO, densidad óptica a 450 nm.

La concentración de 250 ng y la de 50 ng de antígeno, diferenció por 4.4 veces más el suero positivo del negativo, mientras que la concentración de 100, la diferencia sólo fue de 2.5 veces para las mismas muestras y de 1.5 veces en la concentración de 50 ng.

6.5 Determinación de la dilución óptima para muestras de fluido oral

Se realizó un ensayo de ELISA para evaluar la dilución óptima en la que se observara una diferencia entre las muestras de fluido oral, en los diferentes tiempos del experimento (0, 7, 14, 21, 35, 42), previo a estimar los valores de IgA en un ensayo concluyente con la subunidad rS 834. Se evaluaron las siguientes diluciones: 1:50, 1:25 y 1:10, así como muestra sin diluir (Fig. 36).

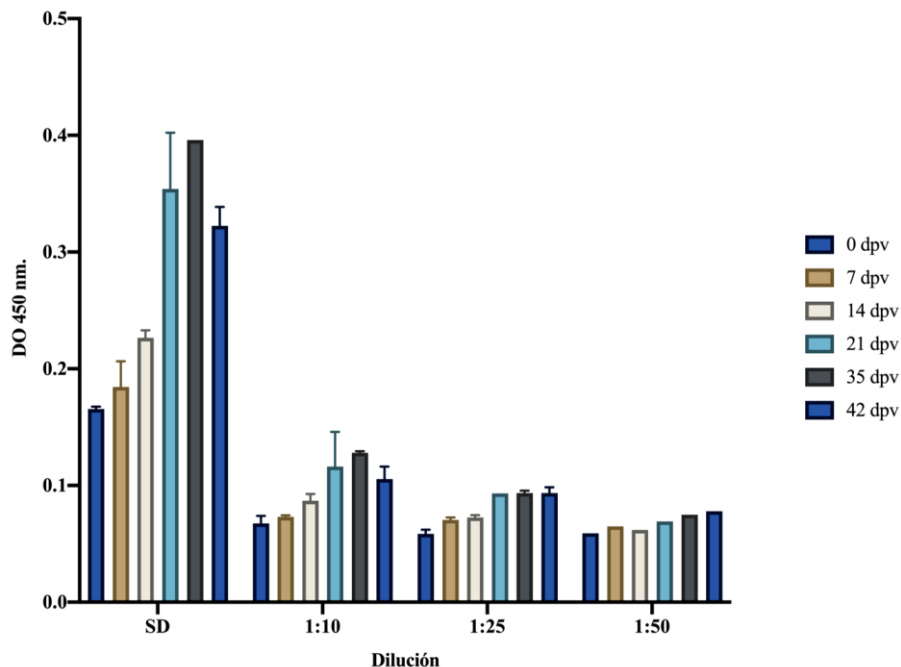


Figura 36. Comparación entre diferentes diluciones en la prueba de ELISA empleando fluido oral. Se muestra el promedio y la desviación estándar. DO, densidad óptica a 450 nm., dpv, días postvacunación

Se observó que para las muestras sin diluir (SD) y la dilución 1:10 existe una diferencia, entre los tiempos del muestreo, mientras que para las diluciones 1:25 y 1:50, esta diferencia es mínima. Se optó por utilizar una dilución 1:5 para evidenciar un aumento o disminución entre cada tiempo de muestreo.

6.6 Respuesta inmune mucosal

6.6.1 Niveles de IgA en fluidos orales

Se analizaron las muestras de fluido oral, de acuerdo al protocolo del Anexo F, con algunas modificaciones con base en los resultados anteriores. La respuesta de IgA, fue evaluada en las muestras de los animales control (No-VacR, No-INF), muestras de animales vacunados (VacR) y en muestras de animales infectados (INF) (Fig. 37).

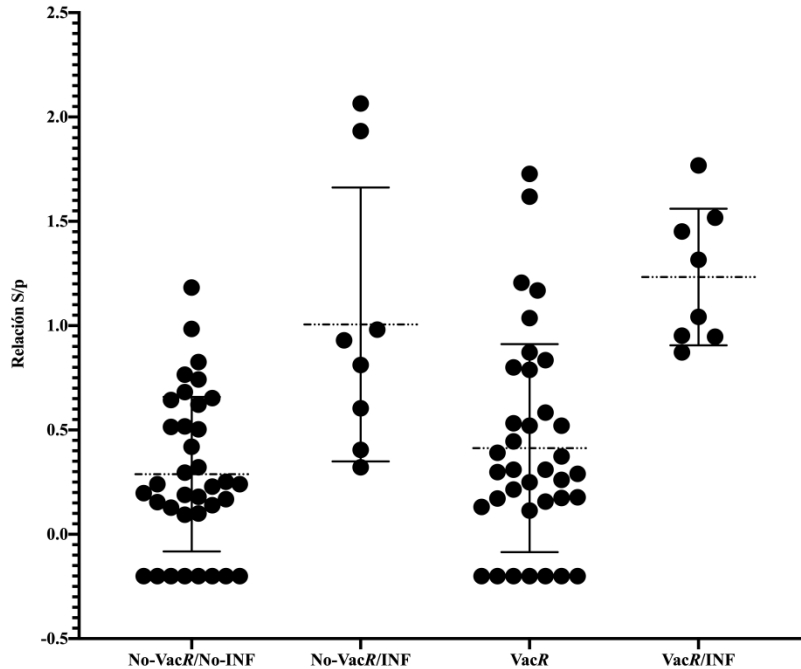


Figura 37. Comparación entre grupos experimentales de la secreción de IgA en fluido oral. No-VacR/No-INF, no vacunados, no infectados, No-VacR/INF, no vacunados, infectados, VacR, vacunados, VacR/INF, vacunados, infectados.

Al comparar el grupo control con el grupo vacunado no se observó una diferencia estadística significativa ($P = 0.303$), lo que indica que los valores de IgA en ambos grupos fue igual y que el protocolo de vacunación no indujo una respuesta mucosal de IgA. Por otra parte, la comparación del grupo infectado tanto con el grupo vacunado, como con el control, evidenció una diferencia estadística ($P < 0.05$), atribuible al protocolo de infección.

6.6.2 Niveles de IgG en fluidos orales

La respuesta de IgG, fue evaluada en las muestras de los animales control (No-VacR, No-INF), muestras de animales vacunados (VacR) y en muestras de animales infectados (INF). Al comparar el grupo control con el grupo vacunado se observó una diferencia estadística significativa ($P = 0.002$), lo que indica que los valores de IgA en ambos grupos fue diferente y que el protocolo de vacunación indujo una respuesta mucosal de IgG. Por otra parte, la comparación del grupo infectado tanto con el grupo vacunado, como con el control, evidenció una diferencia estadística ($P < 0.05$), atribuible al protocolo de infección (Fig. 38).

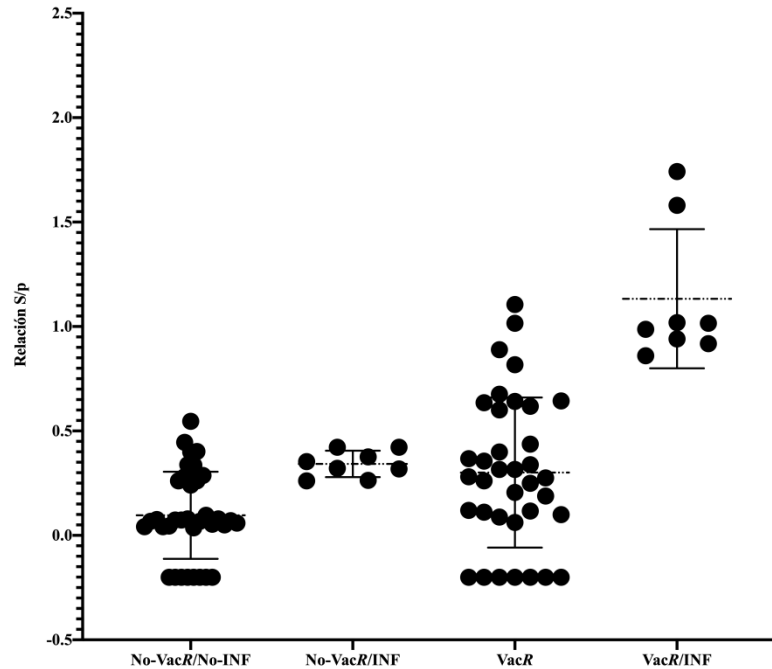


Figura 38. Comparación entre grupos experimentales de la secreción de IgG en fluido oral. No-VacR/No-INF, no vacunados, no infectados, No-VacR/INF, no vacunados, infectados, VacR, vacunados, VacR/INF, vacunados, infectados.

6.7 Excreción viral

Se utilizó RT-PCR en tiempo real para la detección de ARN del vDEP y las muestras positivas se utilizaron para hacer la comparación entre los grupos experimentales. Los grupos control No-INF resultaron negativos para todos los muestreos del estudio, así como los grupos INF, hasta el día que se realizó la infección experimental. Se detectaron 2 animales de cada grupo como positivos a las 48 horas postinfección, posteriormente 3 animales del grupo VacR, fueron positivos, en contraste con 2 animales del grupo No-VacR. Después, a los 7 y 11 días postinfección sólo 1 animal de cada grupo resultó positivo a la prueba. El día 14 postinfección sólo se detectó un animal positivo en el grupo No-VacR. Al hacer la comparación de ambos grupos no se observó diferencia estadística significativa entre ambos grupos, por lo que ambos tuvieron el mismo patrón de excreción viral (Fig. 39).

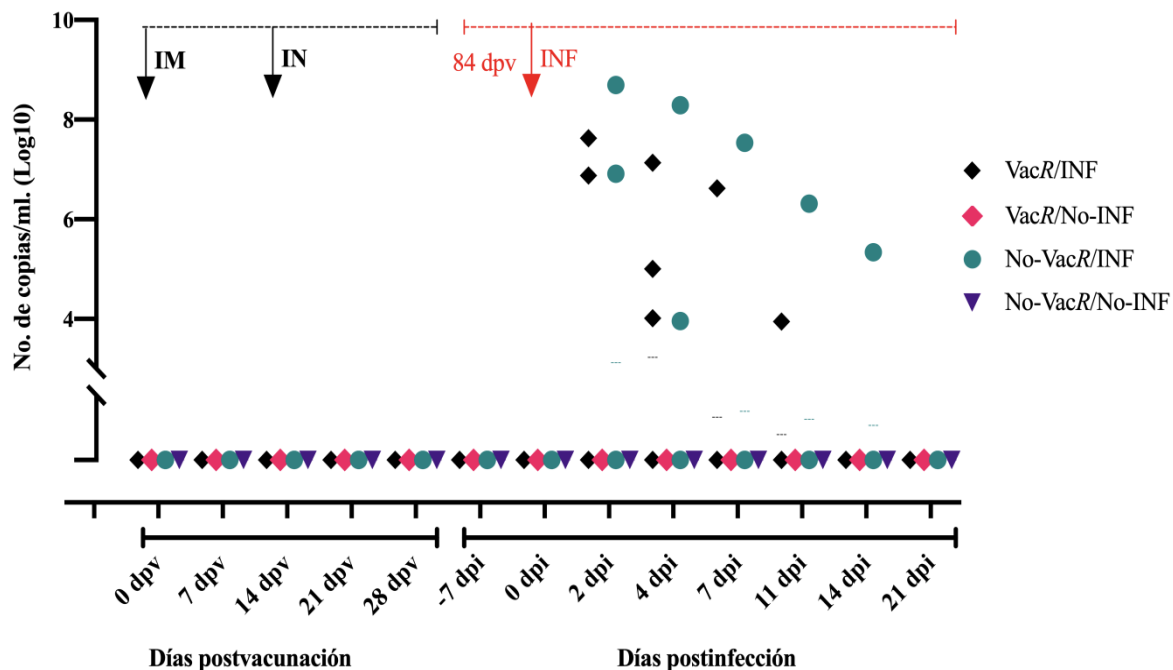


Figura 39. Cuantificación de la excreción viral por RT-PCR. Se observan los valores individuales de los grupos experimentales entre cada muestreo. VacR/INF, vacunados e infectados, VacR/No-INF, vacunados, no infectados, No-VacR/INF, no vacunados, infectados, No-VacR/No-INF, no vacunados, no infectados, IM, vacuna intramuscular, IN, vacuna intranasal, INF, infección experimental.

7. DISCUSIÓN

En México, la DEP tiene relevancia debido al alto impacto económico que provoca y a que se considera una enfermedad endémica, surgiendo la necesidad de estrategias de control (OIE, 2016). La vacunación como método de control es costoso en nuestro país, y a pesar de contar recientemente con una vacuna inactivada, su eficacia aún se encuentra a la expectativa en condiciones de campo.

Como primer paso, para obtener una vacuna subunitaria, se evaluó la antigenicidad de un biológico recombinante basado en las proteínas N, M y dos subunidades de la proteína S del vDEP. En el presente trabajo se produjeron lotes de las proteínas recombinantes de longitud completa N y M, así como dos subunidades de la proteína S del vDEP, que fueron expresadas con éxito en cepas de *Escherichia coli* BL-21 (DE3), las cuales fueron transformadas previamente con el vector de expresión pET-SUMO para cada una de las proteínas, en medio LB (Sanabria, 2016, Álvarez, 2017, Barrera, 2018).

Kim *et al.*, 2018, utilizaron la proteína de fusión SUMO, la cual promueve el plegamiento correcto, estabilidad estructural y aumenta la solubilidad de proteínas parcialmente insolubles al añadirse al extremo N-terminal de la proteína expresada (Young *et al.*, 2012, Invitrogen, 2010). Además, dichas proteínas han sido expresadas con éxito en el sistema *E. coli*, cepa BL-21 (DE3), bajo diferentes condiciones (Hou *et al.*, 2007; Fan *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015; Piao *et al.*, 2016).

Para controlar la expresión de genes heterólogos se requiere incorporar un promotor regulable, en este caso el vector se activa bajo la acción del promotor T7lac, y el inductor isopropil β -D-1 tiogalactopiranosido (IPTG), un análogo no hidrolizable de la lactosa (Rosano y Ceccarelli, 2014; Invitrogen, 2010). A la par del diseño de técnicas de biología molecular para la expresión proteica, se han producido etiquetas de afinidad con el propósito de identificar, producir y aislar las proteínas de interés del sistema hospedador (Zhao *et al.*, 2013), produciendo proteínas puras con el fin de ser utilizadas como inmunógenos seguros y eficaces para proteger a los animales vacunados. El diseño de las proteínas recombinantes utilizadas en este estudio incluyó una etiqueta de poli-histidinas (His-Tag), ya que se requiere para la posterior purificación proteica mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos.

La expresión de las proteínas recombinantes con la etiqueta His-tag y la proteína de fusión SUMO, aumenta el peso molecular 13 kDa, aproximadamente (Invitrogen, 2010). Mediante electroforesis SDS-PAGE se observaron las bandas correspondientes, confirmando así, la identidad de las proteínas N de 70 kDa (nativa 58 kDa), M de 38 kDa (nativa 20-30 kDa) y las subunidades S834 de 48 kDa y S1135 de 60 kDa. La sobreexpresión proteica originó la formación de cuerpos de inclusión (C.I), tal como lo reporta Rosano y Ceccarelli 2014. El primer paso para la extracción de los cuerpos de inclusión consistió en la lisis de las células bacterianas. Esto se puede realizar por métodos físicos y químicos, la sonicación fue el método empleado en el presente trabajo, al igual que en el estudio de Piao *et al.*, 2016, obteniendo resultados favorables. Existen tres consideraciones en cuanto a la recuperación de proteínas activas a partir de cuerpos de inclusión: solubilización, purificación y plegamiento (Tsumoto *et al.*, 2003; Piao *et al.*, 2016). Para la solubilización se eligieron detergentes y sustancias caotrópicas como el tritón y la urea, así como el N-laurylsarcocine (sarcocyl), estas sustancias permiten la eliminación de impurezas asociadas a la expresión proteica, previo a la purificación.

La purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad de acuerdo a protocolos previamente descritos (Hou *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2018), se utilizaron soluciones de lavado y elución en concentraciones definidas de imidazol. Se obtuvo el mayor rendimiento al cargar 4 volúmenes de columna (VC) de C.I., 5 VC de lavado, a un flujo de trabajo de 1.5ml/min, a 0.5 MPa de presión y dos rondas de carga continuas. La transferencia de las eluciones purificadas de una solución desnaturizante concentrada a una solución amortiguada acuosa conduce al plegamiento, manteniendo la solubilidad (Tsumoto *et al.*, 2003). La eliminación de las sustancias desnaturizantes, se realizó mediante diálisis de las eluciones purificadas en un solo paso con PBS (Tsumoto *et al.*, 2003; Piao *et al.*, 2016), obteniendo proteínas con un alto grado de pureza, al usar cromatografía por afinidad (Hou *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2018). La purificación de las proteínas recombinantes conduce a una menor incidencia de efectos adversos postvacunales. A pesar de que se han desarrollado diversos sistemas de expresión para proteínas recombinantes, el sistema procariota ofrece ventajas en términos de costo, adaptabilidad y escalamiento (Piao *et al.*, 2016); esto resulta ventajoso ya que, para la inmunización de cerdos se requieren altas concentraciones de antígeno por animal. A su

vez, las proteínas N (Hou *et al.*, 2007), M (Fan *et al.*, 2015) y el dominio S1 (Li *et al.*, 2015, Piao *et al.*, 2016), han sido expresadas con éxito en el sistema *E. coli*, cepa BL-21 (DE3), bajo diferentes condiciones y su antigenicidad se ha demostrado al funcionar como antígeno en pruebas de ELISA indirecto. La cuantificación de las proteínas expresadas se realizó de acuerdo al método descrito por Bradford en 1976 y Sedmak y Grossberg en 1977, con algunas modificaciones. Se obtuvieron los lotes suficientes para sensibilizar las placas y realizar las pruebas de ELISA, así como la formulación del biológico recombinante, incluyendo 300 µg de cada proteína por dosis. Al ser una vacuna subunitaria, la respuesta inmune conferida se basa en la dosis del antígeno y la frecuencia de la inmunización con el biológico recombinante, así como la determinación del adyuvante óptimo. La dosis empleada para inmunizar cerdos con proteínas recombinantes de diferentes agentes patógenos, se ha descrito en los intervalos de 200 µg hasta 600 µg (Gauci *et al.*, 2012; Cao *et al.*, 2017; Prieto *et al.*, 2010).

El programa recomendado de inmunización incluye vacunación en cerdas gestantes a las 4 y 2 semanas previas al parto, transfiriendo la inmunidad pasiva a los lechones, a través del calostro. Schwartz, y colaboradores, en 2016 reportan IgG en el suero de hembras vacunadas utilizando la vacuna inactivada comercial. Sin embargo, esta vacuna no indujo un aumento en los niveles de IgA, a pesar de estar expuestas previamente al vDEP, por lo que este protocolo de inmunización no eliminó la mortalidad predestete ante el desafío con una cepa del genogrupo G2b del vDEP. Bjstrom-Kraft y colaboradores, 2018, también utilizaron cerdas gestantes previamente expuestas al vDEP, para comprobar la respuesta inmune administrando dos vacunas diferentes, de partículas de ARN replicantes y de virus inactivado. Los resultados de ese estudio indicaron que las cerdas en los grupos experimentales, poseían anticuerpos contra el vDEP y presentaron una respuesta favorable al protocolo de vacunación. No se identificaron diferencias en los niveles de anticuerpos entre la aplicación de las vacunas y tampoco en cuanto al protocolo con 1 o dos dosis. No se evaluó la protección de los lechones nacidos de dichas hembras. La antigenicidad de la proteína S recombinante se ha comprobado en conejos y cerdos y su evaluación como vacuna subunitaria se ha realizado en hembras gestantes en cuanto a la protección con un desafío experimental del vDEP en las camadas (Makadiya *et al.*, 2016; Oh *et al.*, 2014). En ambos estudios se utilizó la ruta de inmunización intramuscular de la proteína S con un

adyuvante. Estos estudios demuestran la presencia de anticuerpos neutralizantes en suero y calostro. Sin embargo, estos estudios son limitados en el número de animales empleados. La evaluación de la eficacia de una vacuna resulta costosa en hembras gestantes, debido al tamaño de camada, producción y consumo de calostro por lechón, instalaciones de maternidad y aspectos reproductivos. Es por ello que el modelo de cerdos en crecimiento ha sido utilizado para la evaluación de vacunas inactivadas (Lee *et al.*, 2018; Collin *et al.*, 2015).

Los animales utilizados durante la fase experimental de este trabajo fueron cerdos adultos de 24 semanas de edad, teniendo en cuenta que los cerdos de todas las edades son susceptibles a la infección con vDEP (Jung y Saif, 2016), y teniendo en cuenta que la vacuna se podría aplicar en hembras gestantes en estudios futuros, así como la facilidad de manejo y manutención. En el estudio de Brown *et al.*, 2019 se utilizaron hembras primerizas para evaluar la eficacia de una vacuna inactivada disponible comercialmente en cuanto a la disminución de la excreción del vDEP.

En el presente estudio, se obtuvo evidencia de la antigenicidad del biológico recombinante en el periodo postvacunación, de acuerdo a los resultados de la prueba de ELISA. Se observó una seroconversión de IgG específica en suero hacia las proteínas rS834, rS1135, N y M a los 14 días posterior a la aplicación del biológico INI-rvDEP en los grupos vacunados, lo cual contrasta con lo observado en los grupos controles no vacunados (No-VacR/INF y No-VacR/No-INF).

Los resultados del presente trabajo demuestran que la seroconversión aumentó gradualmente, hasta alcanzar el pico en el día 35 dpv, en los grupos vacunados, y presentó un ligero descenso, lo cual concuerda con Diel *et al.*, 2016 que evaluaron la respuesta inmune de IgG ante la exposición al vDEP activo. Sin embargo, los niveles se mantuvieron elevados hasta el día 112 postvacunación, en los grupos experimentales de este ensayo, similar al estudio de Bjustrom-Kraft *et al.*, 2016 que detectaron IgG hacia el día 111 postexposición al vDEP.

Opriessnig y colaboradores, 2017, compararon una vacuna inactivada administrada intramuscularmente, en cerdos de tres semanas de edad, la cual indujo la respuesta humoral de IgG a los 21 y 28 dpv. Lee *et al.*, 2018 observaron un aumento gradual de IgG en el suero de cerdos durante la fase de crecimiento a las 6 semanas de edad y una protección

conferida ante el desafío homólogo del vDEP, al disminuir la progresión de la enfermedad y la excreción viral. Los autores atribuyen la fuerte respuesta humoral al adyuvante ISA 206, en la formulación inactivada experimental de una cepa perteneciente al genogrupo G2b del vDEP, dicho adyuvante fue utilizado en la formulación del biológico recombinante en la dosis parenteral administrada a los animales experimentales del presente trabajo. Opriessnig y colaboradores, 2017 también atribuyen la respuesta al adyuvante utilizado en la formulación de la vacuna inactivada y a la dosis de refuerzo administrada 14 días después de la primera aplicación.

Por otra parte, en este estudio se evaluó la respuesta mucosal de los grupos vacunados e infectados. En el ensayo experimental, se detectaron anticuerpos de tipo IgG e IgA en muestras de fluidos orales, sin embargo, al comparar dichas respuestas con la exposición natural al vDEP observadas por Bjustrom-Kraft *et al.*, 2016, fue menor. En dicho estudio, la respuesta de IgG en fluidos orales tuvo un pico a las 2 semanas postexposición y con una tendencia a declinar. La respuesta de IgA tuvo un aumento gradual más lento, detectando niveles elevados hasta las 16 semanas postexposición. En nuestro estudio, la respuesta de IgA en fluidos orales, atribuida a la vacunación no tuvo diferencia con el control no vacunado/no infectado, y tampoco influyó en la respuesta hacia la infección. La respuesta de IgA, bajo condiciones de exposición natural o infección experimental aumenta, a pesar de contar o no con la administración del biológico recombinante. Opriessnig y colaboradores, 2017, determinaron que la vacuna comercial de virus inactivado indujo la presencia de anticuerpos IgA en suero detectada a los 21 dpv, disminuyendo rápidamente a los 28 dpv, contrastando con el grupo expuesto a virus activo, vía oral, los cuales tuvieron mayores niveles de IgA en suero. También se demostró la presencia de IgA en heces en 1 de los 4 cerdos en el grupo vacunado. A pesar de ello, el grupo vacunado vía intramuscular confirió la protección en cerdos ante el desafío homólogo con el vDEP, al disminuir la cantidad de ARN del vDEP en heces y la duración de la excreción viral.

En cuanto a los niveles de IgG en fluidos orales, se presentó diferencia atribuida al protocolo de inmunización con el biológico recombinante, comparada con el grupo no vacunado e infectado. Park y Shin, 2018 demostraron que la producción de anticuerpos IgG en suero aumentó conforme el número de dosis administradas de una vacuna inactivada PED-CUP-B2014 strain, IMMUNISPED-M®, Woogene B&G Co., Ltd.). Los autores

sugieren que un protocolo con seis inmunizaciones puede proveer una fuerte respuesta inmune y protección. De la misma manera, evaluaron IgG e IgA en calostro y observaron que los niveles aumentaban conforme se presentaban más número de partos en las cerdas y el número de dosis administradas, sin embargo, no hubo diferencia entre los grupos de cerdas multíparas y primíparas.

Park y Shin, 2018, evaluaron una vacuna inactivada en dos grupos experimentales de cerdas gestantes, el primero a las 2 y 4 semanas previas al nacimiento y el segundo grupo a las 17 y 19 semanas preparto. No se observó diferencia entre ambos grupos, por lo que los niveles de anticuerpos inducidos por una vacunación temprana y tardía, resultaron similares. Los autores señalan que una vacunación tardía, produciría estrés en los animales gestantes, por lo que se recomienda un protocolo de vacunación con mayor anticipación a la fecha de parto. Además, sólo se administró una dosis de refuerzo, por lo que en estudios posteriores se puede recurrir a aumentar el número de aplicaciones del biológico recombinante. Se ha demostrado que las vacunas subunitarias e inactivadas promueven una fuerte respuesta humoral, pero que son parcialmente efectivas en inducir inmunidad mucosal, ya sea IgG e IgA. La exposición natural o infección intencional con el virus activo induce una respuesta de tipo mucosal, por lo que un protocolo de inmunización heteróloga podría ser utilizado para dar un impulso inmune en cerdas gestantes previamente expuestas al vDEP.

En este ensayo, los animales fueron infectados utilizando una cepa virulenta del vDEP, para demostrar la eficacia de la vacuna, evaluando la excreción viral y el monitoreo de signos asociados a la enfermedad. El inóculo utilizado para la infección experimental tuvo una concentración de $9.3 \log_{10}$ de número copias/ml con una Ct de 16.2. En el estudio de Brown *et al.*, 2019 se evaluó la vacuna inactivada en primerizas expuestas al vDEP y primerizas vacunadas antes y después de la infección experimental con el vDEP, cuyo inóculo poseía un Ct de 19.6. Se encontró que la vacunación no acortó el periodo de excreción viral, sin embargo, el grupo previamente expuesto si tuvo un periodo de excreción más corto del vDEP. Para la detección de ARN del vDEP, las muestras de hisopado rectal en este trabajo fueron evaluadas por RT-PCR en tiempo real. No se observó diferencia significativa entre los grupos infectados experimentalmente, sin embargo, se comportaron de forma diferente en cuanto a tiempo de excreción viral y cantidad de ARN detectado, a lo largo del ensayo.

En el presente estudio el promedio en el número de copias de ARN del vDEP fue de $6.2 \log_{10}$ en el grupo vacunado, durante los primeros siete días y de $7 \log_{10}$ en el mismo periodo para el grupo no vacunado. A los 11 dpi se detectó una concentración de $3.9 \log_{10}$ en un animal del grupo vacunado y $6.3 \log_{10}$ en un animal del grupo no vacunado. La detección de ARN del vDEP se detuvo a los 11 dpi, mientras que a los 14 dpi se encontró un animal positivo en el grupo no vacunado con $5.3 \log_{10}$ de número de copias/ml. De acuerdo a Opriessnig y colaboradores, 2017 se detectó una concentración menor de $3 \log_{10}$ en el grupo vacunado (virus inactivado) hasta los 11 dpi, en una cantidad considerablemente menor a la del grupo control positivo.

En el estudio de Makadiya *et al.*, 2016 no hubo diferencias en cuanto a la excreción viral entre los grupos de lechones de hembras vacunadas (proteína S recombinante) y controles. Bjustrom-Kraft *et al.*, 2016 indicó que el medio ambiente no fue propicio para la persistencia del virus y por lo tanto se interrumpió la detección de ARN en muestras de heces. Sin embargo, los signos clínicos fueron evidentes en ambos grupos experimentales desafiados. El cuadro fue más grave y con mayor duración en el grupo testigo sin vacuna, en comparación con los cerdos inmunizados con el biológico recombinante, sin embargo, durante el análisis estadístico no se observó diferencia, esto concuerda con el estudio de Opriessnig y colaboradores, 2017, en el cual no hubo efecto entre los grupos desafiados experimentalmente.

8. CONCLUSIONES

- Se generaron lotes de las proteínas recombinantes N, M y dos subunidades de la proteína S (S834 y S1135) del vDEP, caracterizando su cinética de expresión y la solubilización para su recuperación.
- Se establecieron las condiciones de purificación de las proteínas solubilizadas utilizando cromatografía de afinidad por iones metálicos (IMAC), obteniendo un alto grado de pureza y concentración proteica.
- Se formuló el biológico recombinante, utilizando 300 µg de cada proteína purificada y un adyuvante comercial manteniendo la estabilidad de las proteínas recombinantes.
- Se aplicó el biológico recombinante, vía parenteral y mucosal, sin reacciones adversas localizadas en el sitio de administración o aumento de temperatura en los modelos animales.
- Se realizó la infección experimental de los animales con una cepa virulenta del vDEP, manifestando una disminución en la duración de los signos asociados a la enfermedad en animales vacunados.
- Se evaluó la presencia de anticuerpos IgG en el suero, e IgA en las muestras de fluidos orales, específicos hacia las proteínas recombinantes mediante la técnica de ELISA, lo que evidencia la antigenicidad del biológico.
- Se detectó ARN viral en muestras de hisopado rectal, de animales vacunados y no vacunados, mostrando un menor tiempo de excreción del vDEP y con una carga viral menor, en el grupo inmunizado con el biológico recombinante.

En el presente estudio se detalla la producción y formulación del biológico recombinante INI-rvDEP, con las proteínas recombinantes N, M y dos subunidades de la S, incorporando un adyuvante comercial, el cual mostró seguridad y eficacia al aplicarlo en cerdos de engorda, a través de la respuesta inmune humoral y mucosal inducida. La disminución de los signos clínicos y menor excreción viral evidencian la protección conferida ante el desafío con una cepa virulenta, siendo una opción viable de vacuna subunitaria contra la DEP, en combinación con otras estrategias de inmunización disponibles.

9. REFERENCIAS

1. Álvarez, LI. Purificación y caracterización de las proteínas recombinantes del virus de la diarrea epidémica porcina. Tesis de licenciatura. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI), Instituto Politécnico Nacional, 2018.
2. Baek, PS, Choi, HW, Lee, S, Yoon, IJ, Lee, YJ, Lee, DS, Lee, S, Lee, C. Efficacy of an inactivated genotype 2b porcine epidemic diarrhea virus vaccine in neonatal piglets. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2016; 174:45-49.
3. Barrera, MA. 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 de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, 2018.
4. Baneyx, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* 1999; 10:411-421.
5. Bjustrom-Kraft, J, Woodard, K, Giménez-Lirola, L, Rotolo, M, Wang, C, Sun, Y, Lasley, P, Zhang, J, Baum, D, Gauger, P, Main, R, Zimmerman, J. Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) detection and antibody response in commercial growing pigs. *BMC Vet. Res.* 2016; 12:99.
6. Bjustrom-Kraft, J, Woodard, K, Giménez-Lirola, L, Setness, B, Ji, J, Lasley, P, Nelson, E, Zhang, J, Baum, D, Gauger, P, Main, R, Zimmerman, J. Serum and mammary secretion antibody responses in porcine epidemic diarrhea-immune gilts following porcine epidemic diarrhea vaccination. *J. Swine Health Prod.* 2018; 26(1):34-40.
7. Bolívar, FG. Ingeniería genética. Las herramientas moleculares y los métodos para aislar, caracterizar y manipular el DNA. En: *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna*. 2ª ed. México (DF). El Colegio Nacional, 2007.
8. Boniotti, MB, Papetti, A, Lavazza, A, Alborali, G, Sozzi, E, Chiapponi, C, Faccini, S, Bonilauri, P, Cordioli, P, Marthaler, D. Porcine epidemic diarrhea virus and discovery of a recombinant swine enteric coronavirus, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22(1):83-87.

9. Bradford, MM, A rapid method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72:248-254.
10. Brown, J, Rademacher, C, Baker, S, Poonsuk, K, Cheng, TY, Skoland, K, Canning, P, Forseth, A, Karriker, L. Efficacy of a commercial porcine epidemic diarrhea virus vaccine at reducing duration of viral shedding in gilts. *J. Swine Health Prod.* 2019;27(5):256-264.
11. Cao, L, Ge, X, Gao, Y, Zarlenga, DS, Wang, K, Li, X, Qin, Z, Yin, X, Liu, Y, Ren, X, Li, G. Putative phage-display epitopes of the porcine epidemic diarrhea virus S1 protein and their anti-viral activity. *Vir. Gen.* 2015; 51:217-224.
12. Cao, Y, Li, D, Fu, Y, Bai, Q, Chen, Y, Bai, X, Jing, Z, Sun, P, Bao, H, Li, P, Zhang, J, Ma, X, Lu, Z, Liu, Z. Rational design and efficacy of a multi-epitope recombinant protein vaccine against foot-and-mouth disease virus serotype A in pigs. *Antiviral Research* 2017; 140:133-141.
13. Carvajal, A, Argüello, H, Martínez-Lobo, FJ, Costillas, S, Miranda, R, de Nova, PJG, Rubio, P, Porcine epidemic diarrhoea: new insights into an old disease. *Porcine Health Management* 2015; 1:12.
14. Chen, Q, Gauger, P, Stafne, M, Thomas, J, Arruda, P, Burrough, E, Madson, D, Brodie, J, Magstadt, D, Derscheid, R, Welch, M, Zhang, J. Pathogenicity and pathogenesis of a United States porcine deltacoronavirus cell culture isolate in 5-day-old neonatal piglets. *Viol.* 2015; 482:51-59.
15. Choudhury B, Dastjerdi A, Doyle N, Frossard J, Steinbach F. From the field to the lab - An European view on the global spread of PEDV. *Virus Res.* 2016; 226:40-49.
16. Collin, EA, Anbalagan, S, Okda, F, Batman, R, Nelson, E, Hause, BM. An inactivated vaccine made from a U.S. field isolate of porcine epidemic disease virus is immunogenic in pigs as demonstrated by a dose-titration. *BMC Vet. Res.* 2015; 11:62.
17. Dellagostin, OA, Feliz, SR, Jorge, S. Recombinant veterinary vaccines. En: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Human and Animal Health Applications.* Netherlands (Amsterdam). Elsevier, 2017.

18. Diel, DG, Lawson, S, Okda, F, Singrey, A, Clement, T, Fernandes, MHV, Christopher-Hennings, J, Nelson, EA. Porcine epidemic diarrhea virus: An overview of current virological and serological diagnostic methods. *Virus Res.* 2016; 226:60-70.
19. Fajardo R, Alpizar A, Martinez A *et al.* Two cases report of PED in different states in México. En: Proceedings of the 23rd International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress; 2014 Jun 8-11; Cancun, Mexico.
20. Fan, JH, Zuo, YZ, Shen, XQ, Gu, WY, Di, JM. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the monitoring and surveillance of antibodies to porcine epidemic diarrhea virus based on a recombinant membrane protein. *Journal of Virological Methods* 2015; 225:90-94.
21. FIRA. Panorama agroalimentario. Carne de porcino 2015. México. 2015. Disponible en URL: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/61951/Panorama_Agroalimentario_Carne_Porcino_2015.pdf
22. Gauci, CG, Jayashi, CM, Gonzalez, AE, Lackenby, J, Lightowers, MW. Protection of pigs against *Taenia solium* cisticercosis by immunization with novel recombinant antigens. *Vaccine* 2012; 30:3824-3828.
23. 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: 33–36.
24. Gerdts, V, Zakhartchouk, A. Vaccines for porcine epidemic diarrhea virus and other swine coronaviruses. *Vet. Microbiol.* 2017; 206:45-51.
25. Hou, X, Yu, L, Liu, J. Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant nucleocapsid protein for detection of porcine epidemic diarrhea (PEDV) antibodies. *Veterinary Microbiology* 2007; 123:86-92.
26. Huang YW, Dickerman AW, Pineyro P, Li L, Fang L, Kiehne R, Opriessnig, T, Meng XJ. Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States. *MBio* 2013; 4 (5):e00737–00713.
27. ICTV Taxonomy history: Porcine epidemic diarrhea virus. 2018. Disponible en URL: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=201851857

28. Invitrogen. Champion™ pET SUMO Protein Expression System. Catalog no. K300-01. Estados Unidos (CA) 2010.
29. Jarvis, MC, Lam, HC, Zhang, Y, Wang, L, Hesse, RA, Hause, BM, Vlasova, A, Wang, Q, Zhang, J, Nelson, MI, Murtaugh, MP, Marthaler, D. Genomic and evolutionary inferences between American and global strains of porcine epidemic diarrhea virus. *Preventive Veterinary Medicine* 2016; 123:175-184.
30. Jorge, S, Dellagostin, OA. The development of veterinary vaccines: a review of traditional methods and modern biotechnology approaches. *Biotechnology Research and Innovation* 2017; 1:6-13.
31. Jung K, Saif LJ. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *Vet. J.* 2015; 204(2):134–143.
32. Kim, SH, Cho, BH, Lee, KY, Jang, YS. N-terminal domain of the spike protein of porcine epidemic diarrhea virus as a new candidate molecule for a mucosal vaccine. *Immune Netw.* 2018; 18(3):e21.
33. Langel SN, Paim FC, Lager KM, Vlasova AN, Saif LJ. Lactogenic immunity and vaccines for porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): Historical and current concepts. *Virus Res.* 2016; 226:93-107.
34. Lara-Romero R, Gómez-Núñez L, Cerriteño-Sánchez JL, Márquez-Valdelamar L, Mendoza-Elvira S, Ramírez-Mendoza H, Rivera-Benítez JF. Molecular characterization of the spike gene of the porcine epidemic diarrhea virus in México, 2013-2016. *Virus Genes* 2018; 54:215-224.
35. Lee C. Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virology Journal.* 2015; 12:193.
36. Lee, SH, Yang, DK, Kim, HH, Cho, IS. Efficacy of inactivated variant porcine epidemic diarrhea virus vaccines in growing pigs. *Clin. Exp. Vaccine Res.* 2018; 7:61-69.
37. Li, C, Li, W, de Esesarte, EL, Guo, H, van den Elzen, P, Aarts, E, van den Born, E, Rottier, PJM, Bosch, BJ. Cell attachment domains of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein are key targets of neutralizing antibodies. *Journal of Virology* 2017; 91(12).

38. Li, Y, Zheng, F, Fan, B, Muhammad, HM, Zou, Y, Jiang, Ping. Development of an indirect ELISA based on a truncated S protein of the porcine epidemic diarrhea virus. *Can. J. Microbiol.* 2015; 61:811-817.
39. Machado, G, Vilalta, C, Recamonde-Mendoza, M, Corzo, C, Torremorell, M, Perez, A, VanderWaal, K. Identifying outbreaks of porcine epidemic diarrhea virus through animal movements and spatial neighborhoods. *Nature* 2019; 9:457.
40. MacLachlan, J, Dubovi, EJ. *Fenner's Veterinary Virology*. 5^a ed. London (UK) Academic Press, 2016.
41. Makadiya, N, Brownlie, R, Hurk, J, Berube, N, Allan, B, Gerds, V, Zakhartchouk, A. S1 domain of porcine epidemic diarrhea virus spike protein as a vaccine antigen. *Virology Journal* 2016; 13:57.
42. Martínez, A. Evaluación de diferentes protocolos de diagnóstico molecular para el virus de la diarrea epidémica porcina en muestras clínicas. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, 2018.
43. Meeusen, ENT, Walker, J, Peters, A, Pastoret, PP, Jungersen, G. Current status of veterinary vaccines. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007; 20 (3):489-510.
44. Oh J, Lee KW, Choi HW, Lee C., Immunogenicity and protective efficacy of recombinant S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein. *Arch Virol.* 2014; 159:29, 77–87.
45. OIE. Infección por el virus de la diarrea epidémica porcina. Ficha Técnica. 2014. Disponible en URL: <https://www.oie.int/doc/ged/D13925.PDF>
46. OIE-WAHID. Immediate notification: 21/05/2014. Porcine epidemic diarrhea virus, México. 2014. Disponible en URL: https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?reportid=15288
47. OIE-WAHID. Follow-up report No.1 Final Report, 11/02/2016. Virus de la diarrea epidémica porcina, México. 2016. Disponible en URL: https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?reportid=19584
48. Ojkic, D, Hazlett, M, Fairles, J, Marom, A, Slavic, D, Maxie, G, Alexandersen, S, Pasick, J, Alsop, J, Burlatschenko, S. The first case of porcine epidemic diarrhea in Canada. *Can. Vet. J.* 2015; 56:149-152.

49. Okda, FA, Lawson, S, Singrey, A, Nelson, J, Hain, KS, Joshi, LR, Christopher-Hennings, J, Nelson, E, Diel, DG. The S2 glycoprotein subunit of porcine epidemic diarrhea virus contains immunodominant neutralizing epitopes. *Virology* 2017; 509: 185-194.
50. Opriessnig T, Gerber P, Shen H, de Castro AM, Zhang J, Chen Q, Halbur P. Evaluation of the efficacy of a commercial inactivated genogroup 2b-based porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) vaccine and experimental live genogroup 1b exposure against 2b challenge. *Vet. Res.* 2017; 48-69.
51. Opriessnig T. Re-emergence of porcine epidemic diarrhea virus in the global pig population. *Vet. J.* 2015; 204(2):131.
52. Park, JE, Shin, HJ. Porcine epidemic diarrhea vaccine efficacy evaluation by vaccination timing and frequencies. *Vaccine* 2018; 36:2760-2763.
53. Pasick, J, Berhane, Y, Ojkic, D, Maxie, G, Embury-Hyatt, C, Swekla, K, Handel, K, Fairles, J, Alexandersen, S. Investigation into the role of potentially contaminated feed as a source of the first-detected outbreaks of porcine epidemic diarrhea in Canada. *Transboundary and Emerging Diseases* 2014; 61:397-410.
54. Paudel S, Park JE, Jang H, Hyun BH, Yang DG, Shin HJ. Evaluation of antibody response of killed and live vaccines against porcine epidemic diarrhea virus in a field study. *Vet Q.* 2014; 34(4):194-200.
55. Pensaert, MB, de Bouck, P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Archives of Virology* 1978; 58:243–247.
56. Piao, DC, Lee, YS, Bok, JD, Hong, ZS, Kang, SK, Choi, YJ. Production of soluble truncated spike protein of porcine epidemic diarrhea virus from inclusion bodies of *Escherichia coli* through refolding. *Protein Expression and Purification* 2016; 126: 77-83.
57. PORCIMEX. Compendio estadístico del sector porcícola 2015. México. 2016. Disponible en URL: <http://www.porcimex.org/Compendio%20Estadistico%202015.pdf>
58. Prickett *et al.*, Oral-fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. *J Swine Health Prod.* 2008;16(2):86-91.

59. Prieto, C, Martínez-Lobo, FG, Díez-Fuertes, F, Aguilar-Calvo, P, Simarro, I, Castro, JM. Immunisation of pigs with a major envelope protein sub-unit vaccine against porcine reproductive and respiratory síndrome virus (PRRSV) results in enhanced clinical disease following experimental challenge. *The Veterinary Journal* 2011; 189:323-329.
60. Quintero RV. Situación Actual de la Diarrea Epidémica Porcina y Estrategias de Control en Granjas Porcinas. *Porcicultura* 05/Marzo/2014. Disponible en URL: <https://www.porcicultura.com/destacado/Escenarios-clínicos-de-la-diarrea-epidémica-porcina-en-México>
61. Rajasekaran, R, Kirubaharan, JJ, Vidhya, M. Recombinant veterinary vaccines. *Indian Farmer* 2018; 5(05): 507-513.
62. Rosano, GL, Ceccarelli, EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology* 2014; 5:1-17.
63. Roth, JA, Veterinary vaccines and their importance to animal health and public health. *Procedia in Vaccinology* 2011; 5:127-136.
64. Saif, LJ, Wang, Q, Vlasova, AN, Jung, K, Xiao, S. Coronaviruses. En: *Diseases of Swine*. 11^a ed. Hoboken (USA) Wiley-Blackwell, 2019.
65. Sanabria, L. Expresión de los determinantes antigénicos SS2 y SS6 de la región amino terminal de la proteína S1 del vDEP en *E. coli* BL-21. Tesina. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI), Instituto Politécnico Nacional, 2016.
66. Sánchez-Sosa, JA, Carrera, V, Munguía, J. Estrategias actuales para el control de la diarrea epidémica porcina en México. En: *Los porcicultores y su entorno*, Año 20, No. 121, 2018; pp 8-16.
67. 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: 2016 AASV Annual Meeting. Louisiana, USA 2016:363-366.
68. Sedmak, JJ, Grossberg SE. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G-250, *Anal. Biochem.* 1977; 79: 544–552.

69. SENASICA. Guía rápida para la vigilancia de investigación epidemiológica de diarrea epidémica porcina (DEP). México. 2014. Disponible en URL: <http://publico.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento=28030&IdUrl=72255&objeto=P%Elgina&IdObjetoBase=4571&down=true>
70. Song, D, Moon, H, Kang, B. Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines. *Clin. Exp. Vaccine Res.* 2015; 4:166-176.
71. Song, D, Park, B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Vir. Gen.* 2012; 44:167-175.
72. Stadler, KJ. 2017 Pork industry Productivity Analysis. Des Moines (IA) National Pork Board, 2018.
73. Stevenson, GW, Hoang H, Schwartz KJ, Burrough ER, Sun D, Madson D, Cooper VL, Pillatzki A, Gauger P, Schmitt BJ, Koster LG, Killian ML, Yoon KJ.. Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *J Vet Diagn Invest.* 2013;25(5):649-54.
74. Sun D, Feng L, Shi H, Chen J, Cui X, Chen H, Liu S, Tong Y, Wang Y, Tong G. Identification of two novel B cell epitopes on porcine epidemic diarrhea virus spike protein. *Vet. Microbiol.* 2008; 131(1-2):73-81.
75. Trujillo-Ortega ME, Beltrán-Figueroa R, García-Hernández ME, Juárez-Ramírez M, Sotomayor-González A, Hernández-Villegas EN, Becerra-Hernández JF, Sarmiento-Silva RE. Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea virus associated with the 2014 disease outbreak in Mexico: case report. *BMC Vet. Res.* 2016; 12:132.
76. Trujillo, OME, Martínez, GR, Herradora, LMA. La piara reproductora. México (DF). Mundi-Prensa, 2002.
77. Tsumoto, K, Ejima, D, Kumagai, I, Arakawa, T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expression and Purification* 2003; 28: 1-8.
78. Vlasova, AN, Marthaler, D, Wang, Q, Culhane, MR, Rossow, KD, Rovira, A, Collins, J, Saif, LJ. Distinct characteristics and complex evolution of PEDV strains, North America, May 2013-February 2014. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20 (10):1620-1628.
79. Wang, D, Fang, L, Xiao, S. Porcine epidemic diarrhea in China. *Virus Res.* 2016; 226:7-13.

80. Wang, Q, Vlasova, AN, Kenney, SP, Saif, LJ. Emerging and re-emerging coronaviruses in pigs. *Current opinion in Virology* 2019; 34:39-49.
81. Wood, EN. An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhoea. *Vet. Rec.* 1977; 100: 243–244.
82. Young, C, Britton, Z, Robinson, A. Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnol. J.* 2012; 7:620-634.
83. Zapata, M, Barrera, M, Lara-Romero, R, Cerriteño-Sánchez, JL, Gómez-Núñez, L, Rivera-Benítez, JF. Producción y evaluación de la antigenicidad de un biológico recombinante del virus de diarrea epidémica porcina. En: *Memorias AMVEC. LII Congreso Nacional AMVEC. Julio, 2018. Mérida, Yucatán. México.*
84. Zhang, Q, Yoo, D. Immune evasion of porcine enteric coronaviruses and viral modulation of antiviral innate signaling. *Virus Res.* 2016; 226: 128-141.
85. Zhao, X, Li, G, Liang, F. Several affinity tags commonly used in chromatographic purification. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 2013; 2013:1-8.
86. Zúñiga, S, Pascual-Iglesias, A, Sánchez, CM, Sola, I, Enjuanes, L. Virulence factors in porcine coronaviruses and vaccine design. *Virus Res.* 2016; 226:142-151.

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

Figuras

Figura 1. Estructura del vDEP	4
Figura 2. Organización genómica del vDEP	5
Figura 3. Representación esquemática de la proteína S	5
Figura 4. Esquema del ciclo de replicación del vDEP	7
Figura 5. Lechones afectados con el vDEP	10
Figura 6. Potenciales rutas de transmisión del vDEP.....	13
Figura 7. Crecimiento de las cepas de <i>Escherichia coli</i> en medio LB.....	26
Figura 8. Animales de experimentación.....	30
Figura 9. Inmunización.....	32
Figura 10. Línea de tiempo del ensayo experimental.....	32
Figura 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS teñido con Coomassie para inducción.....	35
Figura 12. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS teñido con Coomassie de la proteína rM	36
Figura 13. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS teñido con Coomassie de la proteína rN.....	36
Figura 14. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS teñido con Coomassie de los cuerpos de inclusión	37
Figura 15. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS teñido con Coomassie de las proteínas purificadas.....	38
Figura 16. Condiciones óptimas de purificación para rS 834	39
Figura 17. Condiciones óptimas de purificación para rS 1135.....	39
Figura 18. Condiciones óptimas de purificación para rN.....	40
Figura 19. Condiciones óptimas de purificación para rM.....	40
Figura 20. SDS-PAGE teñido con Coomassie de la diálisis de rS 834	41
Figura 21. SDS-PAGE teñido con Coomassie de la diálisis de rS 1135.....	42
Figura 22. SDS-PAGE teñido con Coomassie de la diálisis de rN.....	42
Figura 23. SDS-PAGE teñido con Coomassie de la diálisis de rM.....	42
Figura 24. Infección experimental	44

Figura 25. Monitoreo de temperatura.....	45
Figura 26. Signos clínicos en los grupos experimentales INF.....	45
Figura 27. Puntaje clínico de diarrea.....	46
Figura 28. Puntaje clínico de anorexia	47
Figura 29. Puntaje clínico de depresión	48
Figura 30. Frecuencia de animales con signos clínicos de DEP.....	49
Figura 31. Radio S/p de IgG específica hacia la subunidad rS 834.....	50
Figura 32. Radio S/p de IgG específica hacia la proteína rN	52
Figura 33. Radio S/p de IgG específica hacia la subunidad rS 1135.....	53
Figura 34. Radio S/p de IgG específica hacia la proteína rM	55
Figura 35. Comparación de las concentraciones para la discriminación entre muestras positivas y negativas.....	56
Figura 36. Comparación entre diferentes diluciones en la prueba de ELISA empleando fluido oral.....	57
Figura 37. Comparación entre grupos experimentales de la secreción de IgA en fluido oral	58
Figura 38. Comparación entre grupos experimentales de la secreción de IgG en fluido oral	59
Figura 39. Cuantificación de la excreción viral por RT-PCR	60

Cuadros

Cuadro 1. Diagnóstico diferencial asociado a cuadros entéricos	16
Cuadro 2. Estrategias vacunales contra los coronavirus entéricos	21
Cuadro 3. Datos para ajustar a 0.1 UA el cultivo a inducir.....	25
Cuadro 4. Lecturas de los cultivos listas para la inducción con IPTG	26
Cuadro 5. Esquema de inmunización e infección experimental.....	31
Cuadro 6. Cuantificación de lotes con mayor concentración proteica.....	43

ANEXOS

ANEXO A: ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Equipo:

- Cámara de electroforesis vertical
- Fuente de poder

Materiales y reactivos:

- Soporte de placas
- Placa de vidrio corta
- Placa de vidrio larga
- Abrazadera de placa
- Peine para moldear pocillos
- Solución gel separador 12%
- Solución gel concentrador 4%
- Solución buffer de corrida
- Solución de teñido
- Solución desteñidora

Procedimiento:

Cuadro 1. Soluciones de los geles de poliacrilamida

<i>Gel de corrida 12% (1 gel)</i>		<i>Gel concentrador 4% (hasta el punto 4)</i>	
Agua deionizada	1.022 ml	Agua deionizada	2.21 ml
Tris HCl pH 8.8	1.88 ml	Tris HCl pH 6.8	375 µl
Solución de monómeros	2 ml	Solución de monómeros	350 µl
SDS 10%	50 µl	SDS 10%	30 µl
PSA 10%	50 µl	PSA 10%	30 µl
TEMED	5 µl	TEMED	3 µl

1. Colocar ambas placas en la abrazadera. Verificar que toquen el fondo, apoyando en la mesa para evitar derrame de la solución. Montar en el soporte.
2. Preparar la solución del gel separador y verter la solución del gel separador a través del borde entre las dos placas, hasta la marca señalada.
3. Agregar al instante 1 ml de etanol para nivelar la solución, previo a su polimerización. Cuando la polimerización del gel ha ocurrido, se forma una interfase y se elimina el etanol adicionado.
4. Preparar la solución del gel concentrador y agregarla hasta el margen superior de las placas. insertar el “peine” para formar los pozos del gel, sin formar burbujas, previo a polimerizar.
5. Retirar cuidadosamente el “peine” para no deshacer los pozos. Colocar en solución buffer de corrida hasta el momento de su uso.
6. Quitar la prensa y las placas de vidrio del soporte, para llevarlas a la cámara de electroforesis.
7. Añadir la solución del buffer de corrida, verificando que cubra el electrodo.
8. Cargar las muestras en el pozo correspondiente (para visualizar los pozos agregar la solución buffer de tratamiento reductor 1x)
9. Conectar la fuente de poder a 70 V. y 500 Amp. durante 30 minutos, para el gel concentrador y posteriormente a 100 V. durante dos horas, para el gel de corrida
10. Para recuperar los geles, separar las placas de vidrio y retirar la porción del gel concentrador y desecharla.
11. Cuidadosamente colocar los geles en inmersión con la solución de teñido, durante 1 h.
12. Retirar en su totalidad la solución de teñido y cambiarla por la solución de desteñido. Mantener en inmersión los geles por 15 minutos.
13. Visualizar los geles.

ANEXO B: EXTRACCIÓN DE CUERPOS DE INCLUSIÓN

Equipo:

- Centrífuga
- Incubadora/agitadora de piso Max Q500

Material y reactivos:

- Tubos cónicos de 50 ml
- Vórtex
- Sonicador Sonic Viewer
- Membrana con poro de diámetro 0.45 μm y 0.22 μm
- Sacarosa 20%
- Solución Tris HCl 5 mM
- Tritón 1%
- Urea 8 M
- Sarcocyl 10%

Procedimiento:

1. Transferir el cultivo inducido con IPTG a tubos cónicos de 50 ml y centrifugar a 6000 rpm durante 10 minutos, para obtener la pastilla bacteriana. Concentrar en 3 tubos cónicos de 50 ml, 200 ml de medio expresado.
 2. Realizar un lavado a cada tubo cónico resuspendiendo el cultivo en un volumen de 30 ml de agua deionizada, homogenizar utilizando el vórtex 10 segundos. Centrifugar a 6000 rpm, durante 10 minutos y desechar el sobrenadante.
 3. Agregar un volumen de 15ml de sacarosa al 20% (p/v) por cada tubo, para favorecer el choque osmótico. Mantener en agitación a 250 rpm, durante 10 minutos.
 4. Centrifugar a 6000 rpm, durante 10 minutos. Decantar el sobrenadante y resuspender el botón en un volumen de 40 ml de solución Tris HCl 5mM, por cada tubo, homogenizar con vórtex 10 s.
 5. Lisar la suspensión bacteriana con el Sonicador Sonic Viewer, realizando 3-5 ciclos de 1 minuto con 20 segundos dando pulsos a 100% de potencia por 10 s. y descansos de 10 s. a 40%.
 6. Añadir 15 ml de Tritón 1% (v/v), homogenizar el botón de bacterias lisadas y mantener en agitación a 250 rpm, durante 10 minutos.
 7. Centrifugar a 6000 rpm, durante 10 minutos. Decantar el sobrenadante y resuspender el botón en un volumen de 15 ml de solución de urea a 8 M, centrifugar inmediatamente después de la resuspensión a 6000 rpm, durante 10 minutos.
 8. Decantar el sobrenadante y resuspender el contenido en un volumen de 10 ml de Sarcocyl 10%, para la solubilización de la proteína.
 9. Incubar a 37° C durante 12 h. en agitación a 250 rpm. Al cabo de ese tiempo, centrifugar a 6000 rpm, durante 10 minutos. Colectar el sobrenadante y filtrarlo a través de un diámetro de 0.45 μm y después por 0.22 μm , previo a la purificación.
-

ANEXO C: CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD A IONES METÁLICOS (IMAC)

Equipo:

- ÄKTA Prime Plus
- Computadora con el software ÄKTA Prime Evaluation

Materiales y reactivos:

- Muestra de proteína solubilizada a fraccionar
 - Columna HiTrap™ IMAC HP de 5ml (GE Healthcare)
 - Tubos de ensayo con tapa de goma
 - Gradilla
 - H₂O MiliQ
 - EDTA 0.2 M
 - NaOH 0.5 M
 - NiCl₂ 0.2 M
 - Buffer de equilibrio (Tris HCl 50 mM)
 - Buffer de lavado (Tris HCl 50 mM + Imidazol 30 mM)
 - Buffer de elución (Tris HCl 50 mM + Imidazol 500 mM)
-

Procedimiento:

1. Encender el equipo ÄKTA Prime Plus y la computadora, abrir el programa PRIME.
 2. Operar el equipo, utilizando sólo el conducto con la posición número 8 (VALV POS 8) y realizando la corrida manual (MANUAL RUN)
 3. Ajustar los parámetros de flujo a 10 ml/m (SET FLOW RATE) y pasar hasta 10 ml de H₂O deionizada para retirar burbujas del conducto. Terminar corrida (END RUN).
 4. Observar en el monitor las gráficas de absorbancia y conductividad de cada reactivo que pasa a través del lector del equipo.
 5. Empezar una nueva corrida (MANUAL RUN), ajustando las condiciones de: 0,5 MPa de presión máxima, flujo de 5ml/m (SET FLOW RATE), para la sanitización, activación y equilibrio de la columna HiTrap™ IMAC HP de 5ml. Conectar la columna al equipo, verificando su ajuste sin forzar demasiado la terminal. Para cambiar entre reactivos se debe pausar la corrida (PAUSE), utilizando siempre el mismo conducto 8 (VALV POS 8).
 6. Comenzar la sanitización de la columna con 15 ml de H₂O, pausar y cambiar reactivo.
 7. Continúa con 15 ml de EDTA, pausar y cambiar reactivo. Observar en la gráfica de conductividad una fase de incremento y una fase de meseta.
 8. Después pasar H₂O nuevamente, hasta 40 ml, aproximadamente. Observar una disminución del valor de la conductividad, hasta límite basal. Pausar y cambiar reactivo.
 9. Pasar 20 ml de NaOH, pausar y cambiar reactivo. Observar el aumento en la gráfica de conductividad y una fase de meseta.
 10. Hacer un lavado de la columna, pasando nuevamente H₂O, hasta que los valores en la gráfica de la conductividad disminuyan a 0. Pausar y cambiar reactivo.
 11. Para la activación de la columna pasar 12.5 ml de NiCl₂, observar aumento y meseta en la conductividad. Pausar y pasar 30 ml de H₂O.
 12. La fase de equilibrio requiere pasar por la columna 20-25 ml de la solución buffer de equilibrio, hasta lograr una fase de meseta en la gráfica de la conductividad. Una vez logrado esto, terminar la corrida (END RUN).
 13. Posicionar correctamente los tubos de ensayo en el carrusel del equipo, para coleccionar las eluciones requeridas para su posterior análisis.
 14. Iniciar una nueva corrida (MANUAL RUN), ajustando las condiciones de: 0,5 MPa de presión máxima,
-

flujo de 1.5ml/m (SET FLOW RATE), con un volumen de hasta 20 ml por muestra de proteína a purificar (4 volúmenes de columna). Observar la gráfica de absorbancia durante el proceso. Pasar 20-30 ml (4-6 volúmenes de columna) de la solución buffer de lavado.

15. Cambiar el reactivo a la solución buffer de elución, una vez que la absorbancia se encuentre en niveles basales (AUTOZERO). A partir de que se registre un aumento de la absorbancia, coleccionar todas las fracciones en volúmenes de 1 ml (SET FRACTION SIZE).
 16. Posteriormente la gráfica de absorbancia disminuirá, indicando la finalización de la elución proteica purificada. Un nuevo aumento en la gráfica de la absorbancia y de la conductividad es debido a la salida del imidazol, dejar de coleccionar fracciones eluidas y detener el paso del buffer de elución (PAUSE).
 17. Finalmente, pasar H₂O hasta que ambas gráficas se encuentren en niveles basales; finalizar la corrida (END RUN). Si se requiere realizar una segunda ronda de purificación, después del H₂O, repetir la fase de equilibrio, realizando el proceso desde el punto 13.
 18. Abrir el programa PRIME EVALUATION, dirigirse a ARCHIVOS, abrir MANUAL RUNS, identificar las corridas por la fecha, abrir el archivo correspondiente a las corridas realizadas. Cambiar la escala de tiempo a volumen, haciendo clic en el eje de las "x", y guardar el archivo en una memoria USB: EXPORT > CURVES > seleccionar UV y COND > SELECT > EXPORT > buscar el destino a guardar en EQUIPO > cambiar tipo de archivo a hoja de EXCEL > guardar y retirar USB.
 19. Tapar los tubos de ensaye y conservarlos en refrigeración, hasta su análisis. Desconectar la columna, vaciar el contenido de los desechos y dejar limpio el espacio. Apagar el equipo y la computadora.
-

ANEXO D: DIÁLISIS

Equipo:

- Agitadora

Material y reactivos:

- Membrana tubular de nitrocelulosa Spectra-Por (Spectrum Lab. Inc.)
 - PBS diluido 1:10 con H₂O Mili Q
 - Jeringa 3 ml
 - Jeringa 5 ml
 - Filtro de poro con diámetro de 0.45 µm.
 - Microtubos de 1.5 ml
-

Procedimiento:

1. Analizar las eluciones purificadas, mediante SDS-PAGE, y seleccionar aquellas en las que se visualice una banda correspondiente a las proteínas recombinantes.
 2. Para la activación de la membrana de diálisis, se corta un fragmento de membrana de poro molecular (12,000 – 14,000 Daltons) de nitrocelulosa, y se mantiene en inmersión en H₂O destilada 1 minuto. Si la membrana es de PVDF, se debe mantener inmersa en H₂O deionizada y en ebullición durante 5 minutos.
 3. Realizar un nudo en el extremo de la membrana y depositar las eluciones seleccionadas, evitando la salida del contenido. Al tener la totalidad de las eluciones, se debe anudar el otro extremo de la membrana, con el mínimo espacio de aire dentro de la membrana.
 4. Colocar la membrana cerrada inmersa en solución amortiguadora de fosfatos (PBS), diluída 1:10, con agitación lenta a 30 rpm, utilizando un agitador magnético y en refrigeración (4°C), durante 3 horas realizando 3 cambios de PBS cada hora.
 5. Colectar la muestra dializada, utilizando una jeringa de 3 o 5 ml con aguja calibre 21G.
 6. Previo a la cuantificación, se hizo pasar por medio de un filtro de 0.45 µm, en condiciones de esterilidad, recolectando un volumen de 1 ml en microtubos de 1.5 ml la muestra se dispone para cuantificación y liofilización.
-

ANEXO E: CUANTIFICACIÓN PROTEICA POR MÉTODO COLORIMÉTRICO DE BRADFORD

1. Realizar diferentes diluciones de albúmina sérica bovina (BSA), a partir de albúmina a 0.1 mg/ml en agua deionizada (Milli Q) utilizando microtubos de 1.5 ml, para obtener concentraciones desde 0 µg a 20 µg totales, de acuerdo al cuadro 2:

Cuadro 2. Diluciones de Albúmina Sérica bovina

Tubo	Albúmina (0.1 mg/ml)	H₂O estéril	Reactivo de Bradford
1	10 µl	490 µl	500 µl
2	20 µl	480 µl	500 µl
3	40 µl	460 µl	500 µl
4	60 µl	440 µl	500 µl
5	80 µl	420 µl	500 µl
6	100 µl	400 µl	500 µl
7	140 µl	360 µl	500 µl
8	200 µl	300 µl	500 µl

2. Hacer las diluciones de la proteína a cuantificar, como se muestra en el cuadro 3:

Cuadro 3. Diluciones de la muestra de interés

Tubo	Muestra	H₂O estéril	Reactivo de Bradford
1	20 µl	480 µl	500 µl
2	40 µl	460 µl	500 µl
Testigo	-	500 µl	500 µl

3. Realizar el ensayo en una placa de 96 pozos, colocando 300 µl de cada tubo (1-8) y los tubos 1 y 2 de la muestra a cuantificar, por triplicado.
4. Incubar durante 5 minutos y realizar la lectura en el espectrofotómetro a 595 nm. Obtener el promedio de las tres lecturas y restar el valor promedio de la lectura del blanco (TESTIGO)
5. Realizar la gráfica de dispersión o curva estándar utilizando los puntos de la concentración conocida de BSA, donde el eje de las Y representaba el promedio de las lecturas de absorbancia y el eje de las X la concentración definida. Añadir la tendencia lineal al gráfico y obtener la ecuación de la recta ($y = mx + b$), para la corrección lineal de los datos.
6. Señalar el valor de R², el cual debe ser mayor a 0.90, para verificar que el modelo sea capaz de replicar los resultados.
7. Para obtener la concentración total de la muestra se despeja el valor de x, obteniendo: $x = [(y - b) / m]$, resolver la ecuación utilizando los datos obtenidos de la gráfica de dispersión, sustituyendo en la fórmula el valor de Y por el promedio de la lectura de la muestra.
8. Obtener la concentración proteica por ml, multiplicando por 1000 el resultado anterior y dividiendo por el factor de concentración de la muestra, ya sea 40 o 20 (tubo 1 o tubo 2)
9. Contabilizar el total de tubos y obtener la concentración total por lote.

RESULTADOS DE LA CUANTIFICACIÓN

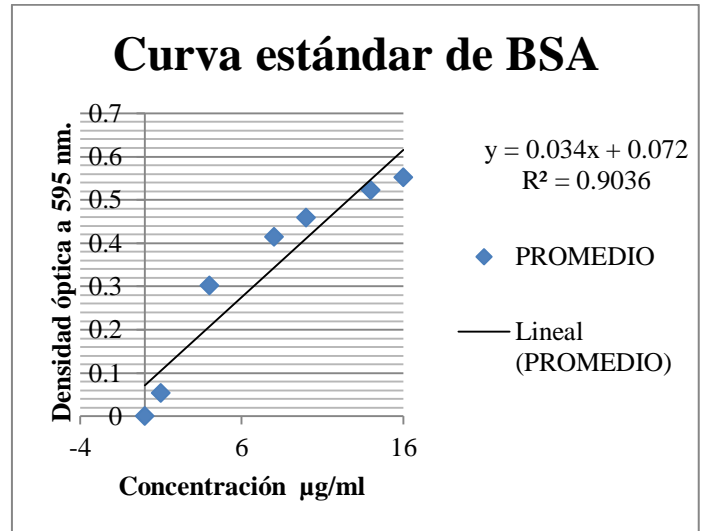
CONCENTRACIÓN

N 182 $\mu\text{g/ml}$

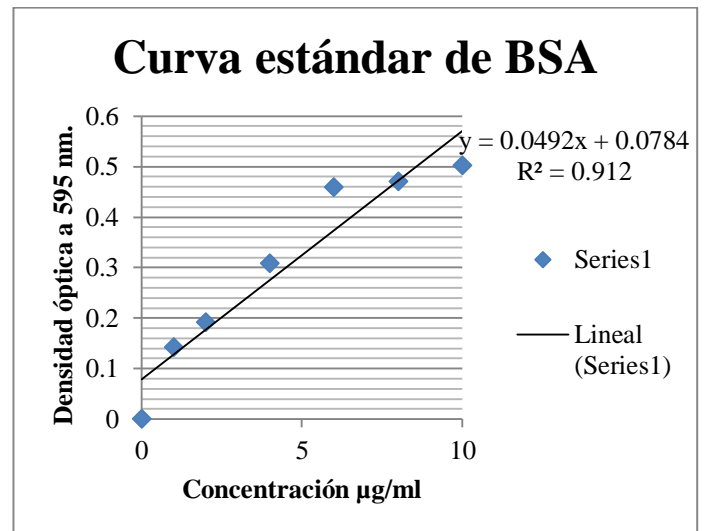
M 202 $\mu\text{g/ml}$

S 1135 80 $\mu\text{g/ml}$

Curva de albúmina sérica bovina

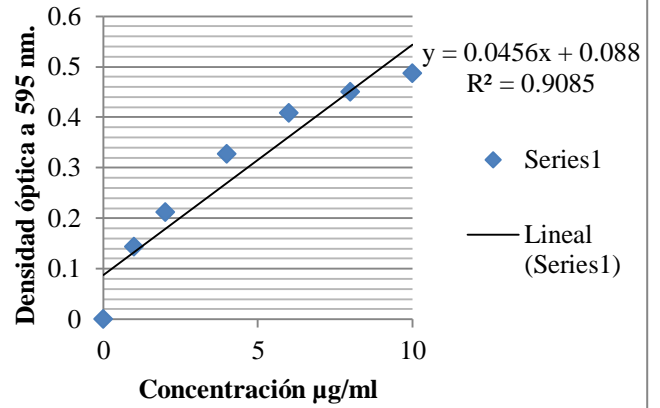


S 1135 472 $\mu\text{g/ml}$



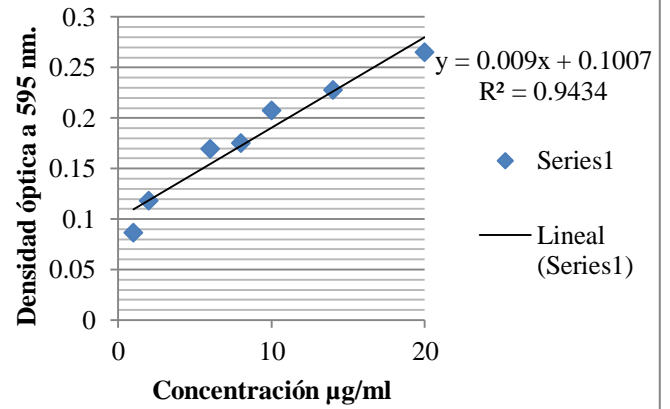
S 834 110 $\mu\text{g/ml}$
M 80 $\mu\text{g/ml}$

Curva estándar de BSA



S 1135 423 $\mu\text{g/ml}$
M 370 $\mu\text{g/ml}$
N 287 $\mu\text{g/ml}$

Curva estándar de BSA



ANEXO F: APROBACIÓN DE EXPERIMENTACIÓN EN ANIMALES



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales



DICTAMEN

PRIMERA REVISIÓN FECHA: 08.10.19 # PROTOCOLO: 639 PROTOCOLO: LICENCIATURA
INTERNO

TÍTULO Evaluación de un biológico recombinante del virus de la diarrea epidémica porcina en cerdos de engorda
RESPONSABLE: José Francisco Rivera Benítez
ADSCRIPCIÓN: Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, INIFAP
DONDE SE REALIZARÁ EL ESTUDIO: Laboratorio Nacional de Recursos Genómicos

Teléfonos de contacto: 5528634739 **Correo electrónico:** zapatamarc92@gmail.com
5538718700 ext 80335 rivera.francisco@inifap.gob.mx

Dudas acerca del protocolo:


NINGUNA


RECOMENDACIONES

NINGUNA

DICTAMEN: APROBADO

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, 08 de octubre de 2019


MVZ Alberto Tejeda Perea
Coordinador del CICUA


MVZ Sara Caballero Chacón
Secretaria del CICUA

U.N.A.M.
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS ESPECIALES
OCT 14 14:19

ANEXO G: ELISA

Equipo:

- Espectrofotómetro iMark™ Microplate Reader (Bio Rad)

Material y reactivos:

- Buffer de carbonatos 0.05 M pH 9.6
- PBS Tween 20 (PBST)
- Solución de bloqueo (leche descremada al 5% o Albúmina Sérica Bovina al 2%)
- Anticuerpo peroxidado HRP (IgG, IgA o IgM)
- KPL TMB Microwell Peroxidase (3,3',5,5' Tetrametilbencidina)
- Solución de Paro (H₂SO₄ 2 M)

Material biológico:

- Proteína recombinante cuantificada.
-

Procedimiento:

1. Sensibilizar la placa de 96 pozos con el antígeno, en este caso se utilizaron 100 ng de las proteínas recombinantes.
 2. Lavar con 250 µl de PBS Tween 20 al 0.05% (PBST), tres veces.
 3. Agregar 100 µl de la solución de bloqueo por pozo. Se deja en incubación a 37° C, 2 horas. Cubrir la placa con adhesivo o proteger con una bolsa de plástico.
 4. Realizar el lavado de la placa (paso 2)
 5. Añadir 100 µl del suero a evaluar con una dilución de 1:100. Incubar 1 hora a 37° C, proteger la placa.
 6. Realizar el lavado de la placa (paso 2)
 7. Realizar la dilución 1:7500 del anticuerpo peroxidado HRP, ya sea IgG, IgM o IgA, en la solución de bloqueo. Añadir 100 µl de la dilución por pozo. Incubar 1 hora a 37° C, proteger la placa.
 8. Realizar el lavado de la placa (paso 2)
 9. Retirar el tercer lavado y agregar 50 µl de la solución de revelado TMB. Colocar en oscuridad total y revisar constantemente hasta observar el cambio de color. Detener la reacción con la solución de paro, agregando 100 µl por pozo. Realizar la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm.
 10. Capturar los datos para su análisis *in silico*.
-

ANEXO H: EXTRACCIÓN DE ÁCIDO RIBONUCLEICO (ARN) EN COLUMNA DE SILICA

Equipo:

- Microcentrifuga Centrifuge 5415D

Material y reactivos:

- QIAamp Viral RNA® Mini Kit
- Etanol absoluto
- B-Mercaptoetanol

Material biológico:

- Muestra de hisopo rectal
-

Procedimiento:

1. Se descongela una alícuota de 560µl del buffer AVL calentando en un ThermoBlock a 80° C, no más de 5 minutos (deben desaparecer los precipitados).
 2. Añadir 140µl de muestra (suero, plasma, fluidos corporales libres de células, sobrenadantes de cultivo celular, sobrenadante de hisopados). Se puede preparar la mezcla de buffer AVL y muestra en microtubos de 1.5 ml nuevos, estériles.
 3. Mezclar con vortex e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
 4. Se añade 560µl de etanol absoluto y se mezcla con vortex por 15 segundos.
 5. Transferir 630µl a la columna con tubo de colecta.
 6. Centrifugar a 8000 x 1 minuto.
 7. Desechar el tubo de colecta y colocar uno nuevo.
 8. Transferir nuevamente 630µl a la columna con tubo de colecta.
 9. Centrifugar a 8000 x 1 minuto.
 10. Desechar el tubo de colecta y colocar uno nuevo.
 11. Añadir 500µl de buffer AW1.
 12. Centrifugar a 8000 x 1 minuto.
 13. Desechar el tubo de colecta y colocar uno nuevo.
 14. Agregar 500µl de buffer AW2.
 15. Centrifugar a máxima velocidad por 3 minutos.
 16. Cambiar la columna a un tubo de 1.5ml
 17. Agregar 40µl de buffer AVE, incubar 1 minuto. Centrifugar a 8000 x 1 minuto
 18. Repetir el paso anterior, para obtener un volumen de 80 µl de ARN eluído.
 19. Almacenar a -70° C
-

ANEXO I: RT-PCR TIEMPO REAL

Equipo.

- Termociclador CFX96™ Real Time PCR Detection System
- Microcentrífuga Centrifuge 5415D

Materiales y reactivos

- Tubos estériles y libres de nucleasas de 1.5 ml
 - Guantes de nitrilo
 - Puntas con filtro, estériles y libres de nucleasas con capacidad de 1000µl
 - Puntas con filtro, estériles y libres de nucleasas con capacidad de 200µl
 - Puntas con filtro, estériles y libres de nucleasas con capacidad de 10µl
-

Procedimiento:

1. Preparar la mezcla de reacción con los volúmenes que se indican en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Mezcla de reacción

Master Mix	Volumen
Master Mix 4x	5 µl
Primer Fw'	0.75 µl
Primer Rv'	0.75 µl
Sonda	0.5 µl
Agua	11 µl
Subtotal	18 µl
Muestra de ARN	2 µl
Total	20 µl

2. Incubar la reacción en el termociclador, con los ciclos de amplificación del Cuadro 5.

Cuadro 5. Ciclos para la amplificación por qRT-PCR

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