



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL
ANÁLISIS DE LA EFICACIA INMUNOESTIMULANTE DEL EXTRACTO
DIALIZABLE LEUCOCITARIO Y LAS PORINAS OMP C Y OMP F DE
SALMONELLA TYPHI EN LA INMUNIZACIÓN PARA EL CONTROL DE LA
DIARREA EPIDÉMICA PORCINA**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
PRESENTA**

LOURDES MARION GALINDO CASTAÑEDA

TUTOR: ROMMEL CHACÓN SALINAS
(ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, IPN)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

LAURA COBOS MARÍN
(FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM)

JOSÉ IVÁN SÁNCHEZ BENTANCOURT
(FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM)

CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO 2021.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mi mamá, eres mi guía, mi ejemplo, mi apoyo y mi todo.

A mi familia, gracias por su paciencia y su apoyo.

A mi tutora de corazón y mi guía en la ciencia la Dra. Laura Cobos, gracias por integrarme a su equipo, por confiar en mi como su primera alumna de doctorado, fue una tesis con muchos tropiezos, pero al final logramos el objetivo, y además gané una persona a la que admiro y estimo de corazón.

A Aliz y su familia

A las guacamayas virales.

Al equipo inmuno

En memoria del Dr. Atalo Cándido Lara primer persona en ayudarme, apoyarme y orientarme en el cultivo celular del virus de PED, coleguita siempre le estaré agradecida.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Víctor Quintero por su apoyo en los ensayos en las unidades de producción y facilitarme la entrada a “Lombanos”, “Albatri” y “La unión”. Ninguno de estos ensayos experimentales hubiera sucedido sin su apoyo.

A la MC. Ana Delia por su apoyo técnico en la estandarización de los ensayos inmunoenzimáticos empleados en esta tesis.

A la MC. Teresa López por su orientación en la estandarización de la técnica de PCR.

Al Dr. Gerardo Ramírez, jefe del departamento de “Medicina y zootecnia de cerdos” por el apoyo en los ensayos con los lechones dentro de las instalaciones de la FMVZ.

Resumen

La diarrea epidémica porcina (PED) causada por un *Alphacoronavirus*. Produce diarrea acuosa, vómito, anorexia y depresión en cerdos de todas las edades. En granjas sin inmunización, alcanza mortalidades entre 80 y 100% en lechones neonatos. En México no se encuentra controlada a pesar del uso de vacunas, siendo necesarias opciones que mejoren la producción de anticuerpos.

El extracto dializable leucocitario (DLE) es una mezcla de péptidos liberados en la ruptura de leucocitos de sangre periférica que presentan actividad directa o como adyuvante contra bacterias, hongos, parásitos y virus.

Las porinas de *Salmonella typhi* constan de una mezcla de proteínas (Omp C y F) altamente inmunogénicas. Como adyuvantes aumentan la respuesta celular, humoral, la maduración de afinidad y producción de IFN γ , IL17 e IL2.

En este estudio, se evaluaron los anticuerpos en calostro de 20 cerdas vacunadas con la vacuna comercial (multíparas y primerizas). Se probaron el DLE y las porinas como adyuvantes a la vacunación. El DLE se administró en dos unidades de producción porcina (UPP); 1) 3 esquemas (55 mg totales en dos semanas, 27.3 mg totales en una semana y testigo); 2) sólo el esquema B (27.3 mg totales) y el testigo (sin DLE), como inmunoestimulantes en la vacunación. Las porinas se probaron en 2 ensayos: porinas(30ug) más vacuna en 9 lechones y 6 sólo vacuna. El segundo ensayo con 41 cerdas gestantes (multíparas y primerizas) con vacuna o vacuna más porinas (60ug).

Se encontró una mayor cantidad de anticuerpos neutralizantes y mayor supervivencia de lechones de cerdas multíparas en comparación con primerizas vacunadas con la vacuna comercial ($P < 0.05$). Con el DLE no se observaron diferencias. Los grupos tratado con porinas presentaron aumento de anticuerpos IgG (suero y calostro), IgG1 e IgA y disminución de IFN γ ($P < 0.05$).

En conclusión, la vacunación no es efectiva en cerdas primerizas y la aplicación de porinas aumenta el título de anticuerpos en comparación con solo vacunación. Para el DLE se necesitan estudios con más animales y mayor dosis.

Palabras clave

PED Vacuna Adyuvante Porinas DLE

Abstract

Porcine epidemic diarrhea (PED) is an *Alphacoronavirus* that causes watery diarrhea, vomiting, anorexia and depression in pigs of all ages. In farms without immunization, it reaches mortalities between 80 and 100% in neonatal piglets. In Mexico it is not controlled despite the use of vaccines, therefore options that improve the production of antibodies are necessary.

DLE is a mixture of peptides released of peripheral blood leukocyte disruption that have direct activity or as an adjuvant against bacteria, fungi, parasites and viruses.

Salmonella typhi porins consist of a mixture of highly immunogenic proteins (Omp C and F). As adjuvants, they increase cellular and humoral response, affinity maturation, and IFN γ , IL17 and IL2 production.

In this study, antibodies were evaluated in the colostrum of 20 vaccinated sows. DLE and porins were tested as adjuvants to vaccination. The DLE was administered in two PUs; 1) 3 schemes (3.9 mg daily for two weeks, 3.9 mg daily for one week and SSF); 2) only scheme B and SSF as adjuvants to vaccination. Porins were tested in 2 trials: porins (30ug) plus vaccine in 9 piglets and 6 only with vaccine. The second trial with 41 pregnant sows (multiparous and gilts) with vaccine or vaccine plus porins (60ug).

A higher number of neutralizing antibodies and higher survival of piglets from multiparous sows were found compared to gilts (P <0.05). No differences were observed with the DLE. The groups treated with porins showed an increase in IgG antibodies (serum and colostrum), IgG1 and IgA and a decrease in IFN γ (P <0.05).

In conclusion, vaccination is not effective in gilts and the application of porins increases the antibody titer compared to vaccination alone. Studies with more animals and higher doses are needed for DLE.

PED Vaccine Adjuvant Porins DLE

Contenido

Título.....	1
1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes de la diarrea epidémica porcina.....	1
1.2 Etiología.....	2
1.2.1 Genoma y estructura.....	2
1.2.2 Proteína S.....	3
1.2.3 Proteína M.....	4
1.2.4 Proteína E.....	4
1.2.5 Proteína N.....	4
1.2.6 Gen accesorio ORF3.....	4
1.2.7 Epidemiología molecular.....	4
1.2.8 Ciclo de replicación.....	5
1.3 Signos clínicos y lesiones.....	7
1.4 Transmisión y patogenia.....	8
1.5 Respuesta inmune.....	8
1.6 Diagnóstico.....	10
1.7 Tratamiento.....	10
1.8 Prevención y control.....	11
1.8.1 Inmunización.....	12
1.9 Pérdidas económicas.....	13
1.10 Extracto dializable de leucocitos (DLE).....	13
1.11 Porinas Omp C y Omp F de Salmonella entérica serovar typhi.....	15
2. Hipótesis.....	17
3. Objetivo general.....	17
4. Objetivos específicos.....	17
5. Materiales y métodos.....	18
5.1 Determinación del nivel de anticuerpos en calostro de hembras primerizas y múltiparas vacunadas.....	18
5.2 Ensayos con el extracto dializable leucocitario.....	19
5.2.1 Etapa 1: Identificación del esquema de administración efectivo para el DLE.....	19

5.2.2	Etapa 2: Administración del DLE en granja con brote activo de PED.....	22
5.3	Ensayos con porinas Omp C y Omp F	23
5.3.1	Etapa 1: Determinación de la dosis de Porinas	23
5.3.2	Etapa 2: Administración de las porinas en granja con brote activo de PED	25
5.4	Análisis de los datos.....	26
6.	Resultados	26
6.1	Determinación del nivel de anticuerpos en calostro de cerdas vacunadas	26
6.2	Ensayos con con el extracto dializable leucocitario	28
6.2.1	Etapa 1: Identificación del esquema de administración efectivo para el DLE28	
6.2.2	Etapa 2: Administración del DLE en granja con brote activo de PED.....	30
6.3	Ensayos con porinas Omp C y Omp F	31
6.3.1	Etapa 1: Determinación de la dosis de Porinas	31
6.3.2	Etapa 2: Administración de las porinas en granja con brote activo de PED	33
7.	Discusión.....	37
8.	Conclusiones.....	42
9.	Referencias	43
Anexos	54
ANEXO A	Ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos totales (IgG) anti PED en suero y calostro.....	54
ANEXO B	Prueba de reducción de placas por neutralización.....	56
ANEXO C	Reacción en cadena de la polimerasa punto final y tiempo real para la detección del virus de la PED.....	57
ANEXO D	Ensayo inmunoenzimático para la detección de IFN γ	59
ANEXO E	Seroneutralización (SN).....	60
ANEXO F	Ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos IgA anti PED en suero y calostro	61
ANEXO G	Ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos IgG1 anti PED en suero y calostro.	62
ANEXO H	Ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos IgG2 anti PED en suero y calostro.	63
ANEXO I	Ensayo de liberación de interferón gamma	64

Lista de cuadros

Cuadro 1. Promedio de la concentración de IFN γ en sangre periférica de cerdos tratados con dos dosis de DLE. Tomado y adaptado de Hernández-Peralta et. al., 2014.	20
Cuadro 2. Media e IC 95% de los anticuerpos IgA (ug/ml) anti PED en suero de calostro.	35

Lista de figuras

Figura 1. Representación gráfica de la estructura del PEDV.	2
Figura 2. Revisión del ciclo de replicación de PEDV	6
Figura 3. Proceso de preparado del Transferon [®] con el protocolo modificado de Borkowsky y Lawrence (1981)	13
Figura 4. Vista lateral y superior de la Omp C de <i>Escherichia coli</i> .	16
Figura 5. Anticuerpos anti-PED en calostro detectados mediante la prueba de ELISA indirecta (mg/mL) en primerizas y multíparas. Gráfico de dispersión de puntos con media e IC 95%. P<0.01 con la prueba de U Mann-Whitney	26
Figura 6. Índice de neutralización del suero de calostro a una dilución 1/80. Diagrama de cajas con media e IC 95%. P<0.05 de acuerdo con la prueba U de Mann-Whitney.	27
Figura 7. Porcentaje de mortalidad de lechones al destete. Diagrama de violín.	27
Figura 8. Curva de supervivencia Kaplan Meier (P=0.009) de lechones al destete (21 días) nacidos de hembras primerizas y multíparas en la UPP.	28
Figura 9. Anticuerpos anti-PED en suero detectados mediante la prueba de ELISA indirecta. A) Media e IC 95% de anticuerpos totales (ug/ml) de los tres grupos tratados en los tres muestreos. B) Media e IC 95% del índice de variación entre el muestreo basal y los siguientes dos muestreos. (P>0.05)	29
Figura 10. Anticuerpos anti-PED en calostro. A) Media e IC 95% de la cantidad de anticuerpos totales en suero de calostro (ug/ml) mediante la técnica de ELISA (A); media e IC 95% del índice de seroneutralización del suero de calostro. Diagrama de cajas. (P>0.05)	29
Figura 11. Anticuerpos anti-PED en suero detectados mediante la técnica de ELISA. Media e IC 95% de anticuerpos totales (ug/ml) de los dos grupos tratados en los tres muestreos en el suero sanguíneo. (P>0.05)	30
Figura 12. Anticuerpos anti-PED en calostro detectados mediante la técnica de ELISA. Media e IC 95% de anticuerpos totales (ug/ml) de los dos grupos tratados en el suero de calostro. (P>0.05)	30

Figura 13. Anticuerpos anti-PED en suero detectados mediante la técnica de ELISA indirecta (ug/ml). A) Media e IC 95% para el muestreo 2 ($P>0.05$), 3 ($P=0.003$) y 4 ($P>0.05$); B) media e IC 95% de la cantidad de anticuerpos totales en suero sanguíneo (ug/ml) mediante la técnica de ELISA para el muestreo 3	31
Figura 14. Anticuerpos anti-PED en suero detectados mediante la técnica de ELISA indirecta (ug/ml). Media e IC 95% d para el muestreo 2, 3 y 4. Muestreo dos $P=0.030$	32
Figura 15. Media e IC 95% de los ug/ml de IFN γ y producidos por el ensayo de IGRa a las 24 ($P=0.030$) y 48 horas determinado mediante la técnica de ELISA tipo sándwich ($P>0.05$).	33
Figura 16. Anticuerpos anti-PED en suero detectados mediante la técnica de ELISA indirecta. Media e IC 95% del índice de anticuerpos IgG1 de los 4 grupos tratados ($P=0.018$).	34
Figura 17. Anticuerpos anti-PED en calostro detectados mediante la técnica de ELISA indirecta (ug/ml). Media e IC 95% de anticuerpos IgG totales (ug/ml) de los cuatro grupos tratados. $P<0.01$	34
Figura 18. Anticuerpos anti-PED en calostro detectados mediante la técnica de ELISA indirecta (ug/ml). Media e IC 95% de anticuerpos IgA de los cuatro grupos tratados en el calostro. $P= 0.007$	35
Figura 19. Anticuerpos anti-PED en calostro detectados mediante la técnica de ELISA indirecta (ug/ml). Media e IC 95% de anticuerpos IgG1 de los cuatro grupos tratados. $P<0.01$	36
Figura 20. Anticuerpos anti-PED en suero detectados mediante la técnica de ELISA indirecta (ug/ml). Media e IC 95% de anticuerpos IgG2 de los cuatro grupos tratados. $P>0.05$	36

Abreviaturas y siglas

APN	Aminopeptidasa N
CPK	Células de riñón porcino clonadas
DLE	Extracto dializable leucocitario
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
ERK	Quinasas reguladas por señales extracelulares
ESK	Células embrionarias de riñón de cerdo
GET	Gastroenteritis transmisible
HSV-1	Herpesvirus tipo 1
HRP	Horseradish peroxidase
IF	Inmunofluorescencia
IFN	Interferón
IHQ	Inmunohistoquímica
MA-104	Células de riñón fetal de macaco
MARC-145	Células de riñón de mono
MDA5	Proteína 5 asociada a la diferenciación del melanoma
NSPS	Proteínas no estructurales
OMP	Proteínas de membrana externa
ORF	Marco de lectura abierto
PED	Diarrea epidémica porcina
PP1A	Poliproteína de la replicasa A
RIG-1	Gen 1 inducible por ácido retinóico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
UFP	Unidades formadoras de placa
UPP	Unidades de producción porcina
UTR	Regiones no traducibles

Título

Análisis de la eficacia inmunoestimulante del extracto dializable leucocitario y las porinas Omp C y Omp F de *Salmonella typhi* en la inmunización para el control de la diarrea epidémica porcina

1. Introducción.

1.1 *Antecedentes de la diarrea epidémica porcina*

La diarrea epidémica porcina (DEP) es una enfermedad viral que afecta a cerdos de todas las edades, principalmente a lechones lactantes. Se presenta con signos como diarrea aguda, vómito y deshidratación. Debido a la alta morbilidad y mortalidad de lechones recién nacidos, esta enfermedad ocasiona cuantiosas pérdidas económicas.

Fue reportado por primera vez en 1971 en Inglaterra, los signos eran similares a la gastroenteritis transmisible (GET), pero con dos tipos de presentaciones: la primera con signos clínicos en cerdos en crecimiento, engorda y levemente en cerdos lactantes; la segunda afectando cerdos de todas las edades incluyendo lactantes, por lo que posteriormente se le llamó "Diarrea epidémica viral" (Chasey, D., & Cartwright, 1978).

Fue hasta 1978, que investigadores de Bélgica reconocieron como el causante de los brotes a un coronavirus y lo identificaron como "CV777". Desde entonces se han reportado casos en Europa y Asia. En Asia comenzó en Japón en 1982 con brotes severos, con alta mortalidad y morbilidad en lechones lactantes. Desde octubre de 2010 un brote de DEP altamente patógeno ha afectado China, el cual se ha caracterizado con altas tasas de mortalidad (Chen *et al.* 2010)(Chen *et al.* 2012)(Li *et al.*, 2012)(Li *et al.*, 2013).

En mayo de 2013 se identificó por primera vez en Estados Unidos de Norteamérica (EUA) según el reporte de la Red de Laboratorios Nacional de Salud Animal (NAHLN por sus siglas en inglés) del USDA, APHIS. Para septiembre de 2013 se habían identificado 17 estados con muestras positivas al virus. El mismo año se reportó en Canadá y México, describiéndose por primera vez un brote en el estado de México en 2014 (Stevenson *et al.*, 2013; Trujillo-Ortega *et al.*, 2016). En países como Corea del Sur, Taiwan y Japón reemergió la enfermedad en este periodo.

Como resultado de la introducción de DEP a EUA la industria de este país en el primer cuarto del año 2014 sufrió una pérdida de al menos el 6% de su población, lo que asciende a aproximadamente a \$600 millones de dólares (Paarlberg, 2014a).

1.2 Etiología

1.2.1 Genoma y estructura.

El virus de DEP pertenece al orden *Nodovirales*, familia *Coronaviridae*, subfamilia *Coronavirinae*, género *Alphacoronavirus*. Es un virus RNA envuelto, monocatenario de sentido positivo con aproximadamente 28 kb. Incluye una región no traducible (UTRs) en 5' y una en 3'. Tiene 7 marcos de lectura abiertos (ORFs) que son: ORF1a, ORF1b y ORF 2-6. Los ORF 1a y 1b son los más grandes y ocupan las dos terceras partes proximales del genoma que codifican para las proteínas no estructurales (nsps). La traducción de ORF1a produce una poliproteína de replicasa 1a (pp1a), mientras que el ORF1b es expresado por un -1 "frameshift" ribosomal, donde C-terminal extiende pp1a a pp1ab. (Thiel and Siddell, 2005) Estos son anclados post-traducción por proteasas internas generando 16 productos (nsp1-16). Los ORFs restantes en la región proximal del genoma codifican para 4 proteínas estructurales (figura 1): de 150-220 kDa la glicoproteína espiga (S), de 20-30 kDa la proteína de membrana (M), 7kDa la proteína de envoltura (E), de 58 kDa la proteína nucleocápside (N), y por último un gen accesorio ORF3 (Kocherhans *et al.*, 2001; Song and Park, 2012). El genoma del virus está encapsulado por la proteína N, formando una estructura helicoidal envuelta en una cobertura lipídica que contiene 3 proteínas estructurales asociadas a la superficie (S, M y E). El virión tiene un diámetro de 95 a 190 nm y las proyecciones de la proteína S miden entre 18 y 23 nm (Pensaert and de Bouck, 1978).

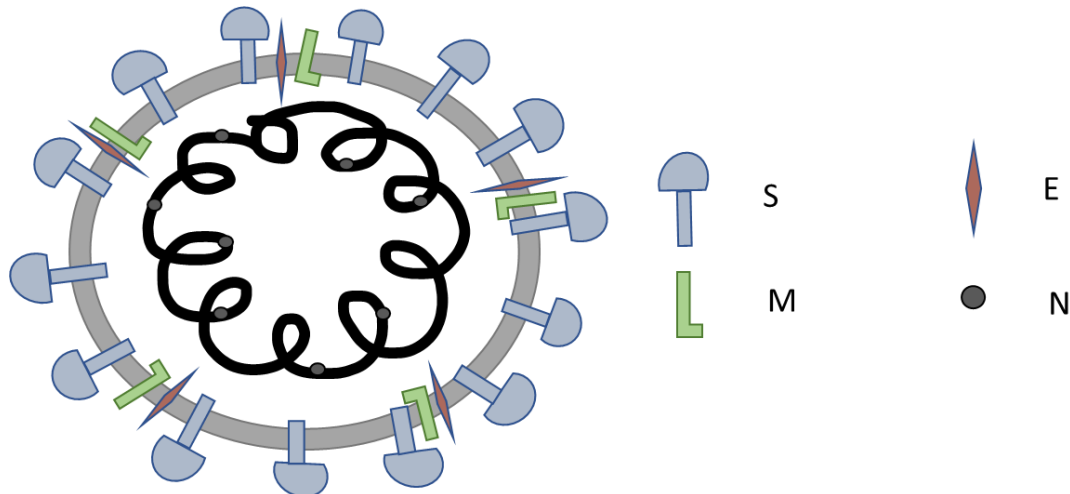


Figura 1. Representación gráfica de la estructura del PEDV.

El virus es estable de 4-50 °C. Después de una incubación en medio de cultivo celular a 4 °C con un rango de pH de 3-10 por 6 horas, presenta baja a moderada infectividad; mientras que a 37 °C por 6 horas conserva su infectividad solo entre un rango de 5 a 8.5 de pH, pero se inactiva completamente con valores de pH menores a 4 y mayores a 9 (Hofmann and Wyler, 1989).

1.2.2 Proteína S

La glicoproteína S se encuentra anclada en la membrana y es determinante para la gama de hospederos que pueda infectar el coronavirus, además es necesaria para la unión al receptor y la fusión a la membrana. La proteína S exhibe un alto grado de diversidad, es responsable de la inducción de anticuerpos neutralizantes, la adaptación al *crecimiento in vitro* y la atenuación de la virulencia *in vivo* (Lee, 2015). Esta proteína es utilizada para determinar la relación entre los aislados de PED, el desarrollo de pruebas diagnósticas y de vacunas eficaces (Temeeyasen *et al.*, 2014). Contiene un dominio externo, un dominio transmembranal y uno C-terminal de la cola citoplasmática.

El dominio externo de S consiste en una subunidad de unión al receptor "S1" y una subunidad de fusión a la membrana "S2" (Li, 2015; Li *et al.*, 2016). En la subunidad "S1" se encuentran dos dominios: S1-NTD y S1-CTD, los cuales pueden funcionar potencialmente como dominios de unión al receptor, la aminopeptidasa N (APN) del hospedero. El dominio S2 anclado a la membrana es responsable de la fusión de las membranas. En relación con la S1, la subunidad S2 es más conservada en su secuencia de aminoácidos y contiene características estructurales como: péptidos de fusión hidrofóbica, regiones repetidas HR1 y HR2 y una región transmembranal C-terminal (Eckert and Kim, 2001).

El APN es una metaloproteasa tipo II dependiente de zinc de entre 150 kDa. Es una enzima presente en una gran variedad de órganos, tejidos y tipos celulares (endotelial, epitelial, fibroblasto y leucocitario) (Luan and Xu, 2007) y está expresada en la superficie epitelial de células del hígado, intestino, riñón y tracto respiratorio. También se encuentra en células endoteliales como astrocitos cerebrales, pericitos y membrana sináptica del sistema nervioso central. (Kamau *et al.*, 2017). Además de la interacción con APN, PED es capaz de unirse al ácido siálico, esta actividad reside en su dominio N-terminal. Aunado a esto, Chang *et al.* demostraron que la subunidad S1 se puede unir a mucinas de origen bovino y porcino, posteriormente se observó una alta afinidad a Neu5Ac (ácido N-acetilneuramínico) (Chang *et al.*, 2002).

Después de la unión al receptor se demostró que el virus de PED ingresa a las células Vero mediante la vía de endocitosis mediada por clatrina (Park, Cruz and Shin, 2011).

Los estudios de las secuencias del gen S han separado a las cepas en 3 grupos (G1, G2 y G3) y G1 se divide en 3 subgrupos (G1-1, G1-2 y G1-3) (Park *et al.*, 2008). De acuerdo con el análisis del G1 las secuencias parciales del gen S son 95 a 100% similares entre ellas y tienen 93.5 – 96.7 y 88.7-91.5% de similitud con los grupos G2 y G3, respectivamente. El G2 tiene 96.7 – 99.8% de identidad entre ellas y un 91.8 – 93.0% de similitud con el G3.

1.2.3 Proteína M

Es el componente más abundante de la envoltura viral, se requiere para el proceso de ensamblaje y tiene la capacidad de producir anticuerpos neutralizantes (de Haan, Vennema and Rottier, 2000; Zhang *et al.*, 2012).

1.2.4 Proteína E

Juega un papel importante durante la salida del coronavirus. La coexpresión de las proteínas E y M puede formar viriones tipo coronavirus sin la proteína S (Baudoux *et al.*, 1998). Se puede encontrar en el retículo endoplásmico junto con la proteína N donde inducen estrés (X. Xu, Zhang, Zhang, Dong, *et al.*, 2013).

1.2.5 Proteína N

La proteína N tiene múltiples funciones en la replicación viral y la patogénesis, es altamente conservada e interactúa con el RNA viral, se asocia con otras moléculas de la proteína N para proteger al genoma viral, sirviendo como la base para la nucleocápside helicoidal (McBride, van Zyl and Fielding, 2014). Es producida abundantemente por células infectadas y se pueden inducir grandes cantidades de anticuerpos contra ella en una fase temprana de la infección (Shi *et al.*, 2017), (Li *et al.*, 2013), por lo que es un objetivo ideal para el diagnóstico de la enfermedad (Li *et al.*, 2013).

La proteína N interrumpe la respuesta antiviral antagonizando la producción de interferón y activa NF- κ B (Ding *et al.*, 2014).

1.2.6 Gen accesorio ORF3

Se cree que funciona como un canal iónico e influencia la producción del virus y su virulencia. (Wang *et al.*, 2012) Se ha utilizado la adaptación al cultivo celular para alterar el gen del ORF 3 y reducir la virulencia (Song *et al.*, 2003).

1.2.7 Epidemiología molecular

En la década de los 80s y 90s los brotes de PED en Europa se volvieron infrecuentes, el virus se mantenía endémico en la población con una baja tasa de morbilidad (Pijpers *et al.*, 1993; Carvajal *et al.*, 1995). No obstante, en 2006 se presentó en Italia la forma típica epidémica de un brote de PED afectando a cerdos de todas las edades, incluyendo lechones lactantes (Martelli *et al.*, 2008).

En Asia, después del primer brote en Japón y los países adyacentes, reemergió en 2007 en Tailandia, donde se presentaron aislados característicos de las cepas epidémicas G2 (Kweon *et al.*, 1993; Temeeyasen *et al.*, 2014). Entre 2008 y 2010 se han reportado en Corea del Sur y China nuevas cepas de PED caracterizadas por múltiples inserciones, deleciones o

mutaciones de la proteína S, comparadas con cepas endémicas previas (Lee *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013)s. Después del primer brote reportado en EUA se tienen identificadas dos tipos de cepas: la original altamente patógena y la conocida como S INDEL PED que tiene deleciones e inserciones en la región N-terminal de la proteína S, con una virulencia media reportada en campo (Stevenson *et al.*, 2013).

Las cepas estadounidenses de PED identificadas en el brote inicial de mayo 2013 estaban estrechamente relacionadas genéticamente con cepas endémicas de China (China/2012/AH2012) reportadas en el 2011 (Huang *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014). En el año subsecuente al brote inicial se encontraron cepas nuevas con múltiples deleciones e inserciones en el gen S, que se agrupan cerca de la cepa China HBQX-2010 en vez de la cepa China AH2012 y se observó que poseían baja identidad de nucleótidos en su extremo 5' de la región S1 y alta identidad de nucleótidos en el gen S restante, en comparación con la mayoría de las cepas en EUA (Vlasova *et al.*, 2014). Una vez presente en los Estados Unidos los aislados de DEP han evolucionado a al menos 4 linajes (Jung and Saif, 2015).

En Japón, desde el 2013 se han reportado diversos casos y se ha realizado la caracterización genética de 15 variantes nuevas provenientes de aislados de campo, con grandes deleciones que van de 582 a 648 nt en el gen de la proteína S; adicionalmente, en algunos aislados se encontraron infecciones mixtas (Van Diep *et al.*, 2017).

En los brotes de Taiwan del 2013-2014 se identificaron cepas con un 99 y 100% de identidad con las cepas estadounidenses; además, en las cepas de los brotes recientes observaron una mutación no sinónima en la posición 1540-1542 de la proteína S comparada con la cepa CV777 (LIN *et al.*, 2014).

1.2.8 Ciclo de replicación

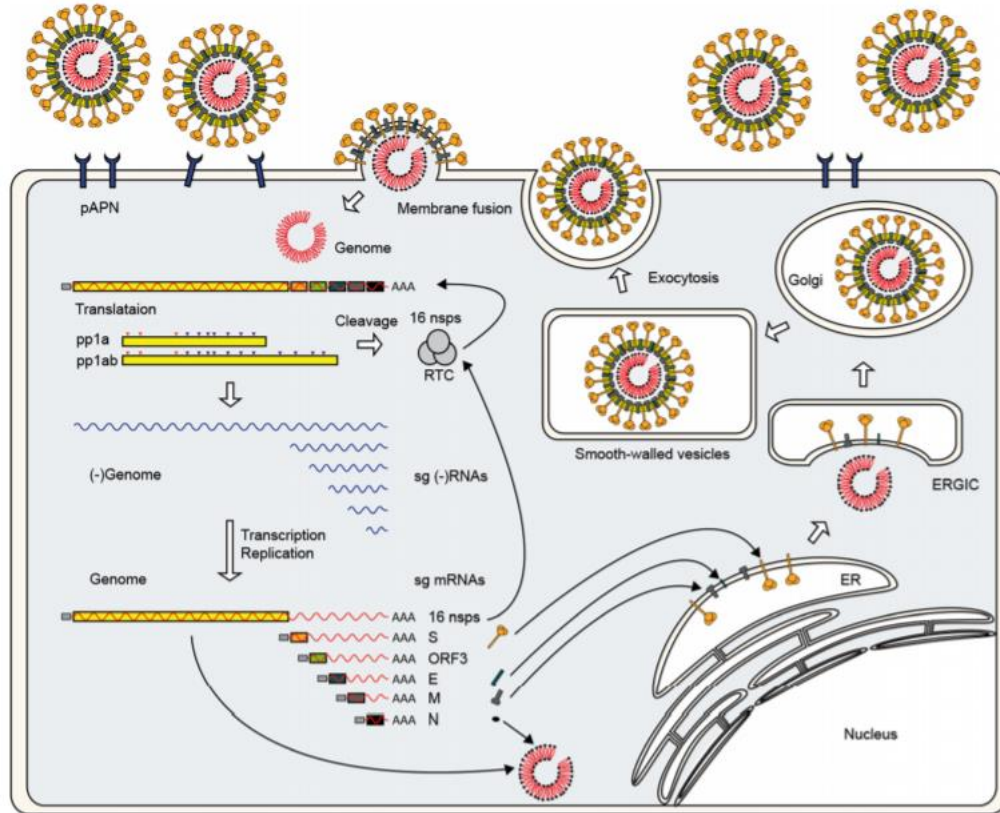


Figura 2. Revisión del ciclo de replicación de PEDV. Imagen tomada de: Lee C. (2015). Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus.

Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0421-2>

La entrada del virus de DEP inicia con la unión al APN porcino presente en los enterocitos de las vellosidades del intestino delgado. La entrada a la célula puede ocurrir por dos mecanismos: fusión directa, fusionándose la membrana viral con la membrana celular y endocitosis, fusionándose con la membrana de la vesícula endosomal. La fusión de membranas se debe a cambios conformacionales de la proteína S. Estos cambios son iniciados por la unión al receptor pero se necesita de la acidificación del pH o de la activación proteolítica para que la fusión se lleve a cabo (Belouzard, Chu and Whittaker, 2009; Park and Shin, 2014).

Como se aprecia en la figura 2, después de la entrada y la liberación del genoma en el citoplasma el ORF1a/1b se traduce en una poliproteína la cual es procesada para formar una RNA polimerasa y otras proteínas implicadas en la síntesis de RNA viral. Sus productos utilizan el RNA genómico como molde para sintetizar RNA de cadena negativa, los cuales son utilizados para sintetizar RNA genómico y los RNAm subgenómicos. Cada RNAm se traduce para producir solo una proteína, ya sean estructurales (S, E, M, N) o no estructurales. La proteína M se transporta del retículo endoplásmico y se ancla en el aparato de Golgi donde se unen a la nucleocápside. La proteína N y el RNA genómico recién sintetizados se unen en el citoplasma para formar la nucleocápside helicoidal. La proteína S y el RNA genómico se unen en el citoplasma para formar la nucleocápside helicoidal.

y E también se transportan del retículo endoplásmico al aparato de Golgi donde interactúan con la proteína M para desencadenar la salida de los viriones. El exceso de proteína S que no se incorpora a los viriones es transportado a la membrana plasmática, la activación proteolítica de esta proteína provoca la fusión de membranas celulares formando una célula gigante multinucleada llamada sincitio que le permite al virus infectar células vecinas. La salida del virus de la célula se produce mediante exocitosis, y debido a la acción de proteasas es liberado (Snijder E. J., 2006; Shirato *et al.*, 2011; Belouzard *et al.*, 2012).

1.3 Signos clínicos y lesiones

El virus de DEP causa diarrea acuosa, vómito, síndrome de malabsorción, anorexia y depresión en cerdos de todas las edades. En lechones neonatos la morbilidad alcanza hasta el 100% y la mortalidad entre 90 y 100%, presentado los signos por 3 o 4 días, seguidos de deshidratación y un desbalance electrolítico que resulta en la muerte de los animales. Las lesiones y la mortalidad de la enfermedad son inversamente proporcionales a la edad de los cerdos (Shibata *et al.*, 2000). La severidad de la presentación clínica es variable y depende en gran parte del estatus previo de la granja y el estado inmunológico de los animales (Pospischil, Stuedli and Kiupel, 2002).

En la mayoría de los casos los signos clínicos duran de 3 a 5 semanas en maternidad (Kim and Chae, 2003).

En hembras los signos incluyen anorexia, depresión, inapetencia, diarrea acuosa y agalactia. El impacto de DEP en el desempeño reproductivo depende del periodo de gestación en el que se infectan. En los primeros 30 días de gestación disminuyen 12.6 % la tasa de parición, 1.4 los lechones nacidos totales por camada y 2.2 lechones nacidos vivos por camada (Pijpers *et al.*, 1993; Sueyoshi *et al.*, 1995). En este periodo también se aumenta a un 5.7 % y 2% de retorno al estro y momias, respectivamente. En hembras infectadas de los 91-120 días de gestación aumentan 1.8% los nacidos totales (Olanratmanee, Kunavongkrit and Tummaruk, 2010). En la etapa de engorda la mortalidad varía entre el 1 y 3% (Hou, Yu and Liu, 2007).

La necrosis masiva de las vellosidades deriva en atrofia y reducción en la actividad enzimática (proteínas de unión estrecha, ZO1 y Caderina E), lo que ocasiona una irrupción en la digestión y la absorción de nutrientes provocando síndrome de malabsorción y deshidratación (Li *et al.*, 2016).

Los signos clínicos y lesiones más severas de la enfermedad se han observado solo en lechones neonatos, las posibles causas fisiológicas son el lento recambio de enterocitos en lechones recién nacidos comparado a lechones destetados, que es de 5 a 7 días y de 2 a 3 días respectivamente (Jung and Saif, 2015).

1.4 Transmisión y patogenicia

La transmisión es por vía fecal-oral, mediante la ingestión de heces, vómito o alimento contaminado (Debouck, Pensaert and Coussement, 1981; Pasick *et al.*, 2014; Dee *et al.*, 2015). La entrada de la enfermedad a las producciones se da principalmente por fómites, reservorios o fauna nociva, también se ha identificado la diseminación por vía aérea a largas distancias (Alonso *et al.*, 2014; Lowe *et al.*, 2014).

Según estudios de campo y de infecciones experimentales el periodo de incubación varía dependiendo del tipo de virus, las cepas presentes en los brotes de EUA presentan una incubación entre 1 y 7 días, y la cepa original (CV777) presenta un periodo de incubación de 5-8 días (Pensaert and de Bouck, 1978; Debouck, Pensaert and Coussement, 1981).

En cerdos inoculados experimentalmente e infectados en campo con títulos entre 4 y 7.6 log EG/mL (equivalentes genómicas por mililitro) se detectó la viremia en la fase aguda, acompañada de diarrea, vómito y excreción viral en heces, pero aún no se ha identificado partículas virales infecciosas en el suero (Park, Cruz and Shin, 2014).

La infección destruye los enterocitos con un sucesivo acortamiento de las vellosidades ocasionando diarrea acuosa con una duración aproximada de 1 semana. El intervalo entre la entrada del agente y el cese de los signos generalmente es de 3 a 4 semanas (Puranaveja *et al.*, 2009)..

1.5 Respuesta inmune

La entrada del virus a los enterocitos requiere penetrar la mucosa y su barrera mecánica, química e inmunológica. Uno de estos componentes son las capas de mucosa en la superficie del epitelio intestinal que consiste principalmente en mucina secretada por las células caliciformes, estas células disminuyen en número en el yeyuno e íleon, lo que permite la entrada de otros patógenos (Jung and Saif, 2017).

En los siguientes cuadros se describen las características de la respuesta del IFN de tipo I y III: (Xing *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2016; Zhang, Shi and Yoo, 2016; Zhang *et al.*, 2017)

IFN I	IFN III
<ul style="list-style-type: none">• Antagonistas: nsp1, nsp3, nsp7, nsp14, nsp15, nsp16, E, M, N y ORF3• PPL2 bloquea IFN B interfiriendo con IRF3<ul style="list-style-type: none">• PEDV Degrada CREB inhibe ensamblaje y también, degrada STAT1	<ul style="list-style-type: none">• Antagonistas: nsp1, nsp3, nsp5, nsp8, nsp14, nsp15, nsp16, ORF3, E, M, y N• Nsp1: inhibe la traslocación nuclear de IRF 1

Las proteínas N y E desencadenan estrés del retículo endoplásmico y activan NF- κ B resultando en la sobre regulación de IL8 en los enterocitos (X. G. Xu *et al.*, 2013; X. Xu, Zhang, Zhang, Huang, *et al.*, 2013b)

Las células epiteliales del intestino delgado forman una barrera para separar el sistema inmune asociado a mucosas y microbiota presente en el lumen. En la infección por DEP hay una disminución en las bacterias comensales presentes en el tracto gastrointestinal sano y se induce un desbalance de la microbiota, sugiriendo una posible modulación del IFN λ , que actualmente se sabe es importante para la restricción de infecciones virales en el epitelio intestinal (Koh *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015). Sin embargo, en otros virus intestinales se ha visto que el IFN λ no es suficiente para controlar la infección.

Después de la unión al APN el virus de DEP es internalizado a la célula y el RNA genómico es liberado en el citoplasma para su replicación. El censado del ácido nucleico del virus se realiza mediante PRRs en el endosoma o en el citoplasma, lo que da inicio a la señalización para activar el sistema inmune (Snijder E. J., 2006). Se ha demostrado que los receptores tipo toll TLR2, TLR3 y TLR9 contribuyen a la activación de NF- κ B en respuesta a la infección *in vitro* de las células epiteliales intestinales (IPEC-J2), pero no activan a RIG-1/MDA5 inhibiendo así al promotor de IFN β (Cao *et al.*, 2015).

El TLR2 en la membrana plasmática responde a las glicoproteínas virales de la envoltura para inducir IFN y citocinas inflamatorias, mientras que los TLR3 y TLR9 están localizados en el endosoma para censar dsRNA y CpG DNA, respectivamente (Boehme *et al.*, 2004). DEP activa la vía ERK durante la fase temprana de la infección independientemente de la replicación viral. La inhibición de ERK suprime la transcripción viral, la expresión de proteínas y la producción de progenie, lo que sugiere que la activación de la vía ERK es benéfica para la replicación de DEP (Kim *et al.*, 2015).

La respuesta adaptativa se basa principalmente en anticuerpos IgA secretores (IgAs) y la respuesta de células T. Adicionalmente, algunos anticuerpos encontrados en suero como la IgG y la IgM pueden ser trasudados a través del epitelio gastrointestinal hacia el lumen (Horton and Vidarsson, 2013; Gerdtts and Zakhartchouk, 2017).

Se tiene poca información de la respuesta celular en PED. En coronavirus respiratorios se ha observado una leucopenia en los pacientes; no obstante, en animales y personas recuperadas se detectaron células T CD8 que pueden controlar la infección a nivel de pulmón (Channappanavar, Zhao and Perlman, 2014).

En los lechones la respuesta ante el virus depende de la inmunidad pasiva transferida por sus madres a través del calostro y la leche, debido a que el tipo de placentación en las cerdas impide el paso de anticuerpos al feto (Borghesi *et al.*, 2014). Las primeras 48 horas postparto la cerda secreta calostro, que contiene a la IgG como inmunoglobulina más abundante. Después de las 48 horas el calostro gradualmente se convierte en leche y predomina la IgA secretora. Se sabe que los anticuerpos maternos pueden proteger al

lechón contra la PED hasta el día 14 de edad mediante la neutralización de las partículas virales al impedir la entrada del mismo a la célula blanco (enterocito), pero esto puede variar dependiendo de la inmunidad de la cerda.

1.6 Diagnóstico

El diagnóstico de PED con base en los signos clínicos es complicado debido a la similitud de presentación entre PED, GET y deltacoronavirus porcino; igualmente, las lesiones histopatológicas no son determinantes de la enfermedad. Por esta razón se debe recurrir a técnicas de detección del antígeno o anticuerpos. Los métodos más utilizados son la “Reacción en Cadena de la Polimerasa” (PCR; punto final y tiempo real) y la prueba de “Ensayo inmunoenzimático” (ELISA). Sin embargo, se han utilizado una gran variedad de técnicas para su diagnóstico, tales como: aislamiento viral, inmunofluorescencia (IF), inmunohistoquímica (IHQ), neutralización viral y microscopía electrónica (Callebaut, Debouck and Pensaert, 1982; van Nieuwstadt, Cornelissen and Vreeswijk, 1988; Sueyoshi *et al.*, 1995; Shibata *et al.*, 2000; Rodák *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007).

Debido a la sensibilidad de la prueba, a la temprana detección y al tipo de muestra empleada, la técnica de PCR es el método más utilizado para la confirmación del agente en brotes o cuarentenas (Kim *et al.*, 2007). Sin embargo, la detección de anticuerpos contra la enfermedad es crucial para determinar el estatus inmunológico de los animales, para ello la técnica de ELISA es ampliamente utilizada y se han desarrollado varias pruebas comerciales y “caseras” diseñadas a partir del virus completo, preparaciones del antígeno o de proteínas recombinantes. Esta técnica ha permitido detectar anticuerpos a partir del día 7 post inoculación y hasta un año después de la infección (Carvajal *et al.*, 1995; Song and Park, 2012). No obstante, la técnica de ELISA no tiene la capacidad de diferenciar a los anticuerpos neutralizantes, por lo que la neutralización viral es la indicada para ello; la desventaja de este método es el tiempo de realización (Oh *et al.*, 2005).

1.7 Tratamiento

No existe un tratamiento efectivo para la eliminación del virus; sin embargo, se han utilizado biológicos como IgY contra el virus de PED o contra la subunidad S1 que disminuyen la mortalidad de lechones neonatos en comparación con animales que no reciben inmunidad pasiva (Kweon *et al.*, 2000; Lee, 2015). Así mismo, se ha observado que el calostro de vacas inmunizadas con el virus de PED reduce la mortalidad de lechones (Shibata, Ono and Mori, 2001).

1.8 Prevención y control

La vacunación es la estrategia más empleada en la prevención y el control de la enfermedad. Como ya se mencionó los lechones son protegidos mediante la transferencia de anticuerpos de la madre por el calostro.

Se han desarrollado una gran variedad de vacunas desde el descubrimiento de la enfermedad, estas difieren entre su secuencia, aplicación y eficacia, algunas de ellas han sido combinadas con GET y Rotavirus, principalmente en Corea y China.

En Japón se ha utilizado desde 1997 un virus atenuado en cultivo celular como vacuna. Otra vacuna atenuada administrada vía oral es usada en Corea desde el 2004 y en Filipinas desde 2011. Estas son consideradas como efectivas; sin embargo, existen reportes en los que refieren que no todas las cerdas vacunadas desarrollan niveles protectores de anticuerpos para sus camadas (Song *et al.*, 2007). Se cree que son varios los factores a los que se debe esta falta de protección. Uno de ellos es la vía de administración ya que se ha demostrado que inoculando oralmente a cerdas seronegativas a PED con una vacuna atenuada (cepa DR13) se reduce la mortalidad de los lechones a un 13% en comparación con la vacuna de aplicación intramuscular que solo lo hace al 60%. Esto coincide con la cantidad de IgA sérica que se produce en mayor cantidad en la inoculación oral. Además, la pérdida de peso y el periodo de eliminación del virus disminuye en una inoculación por vía oral en comparación con la inoculación intramuscular (Song *et al.*, 2007; Song, Moon and Kang, 2015).

En el caso de GET la administración de una vacuna recombinante de la subunidad 1 de la proteína S administrada por vía intramuscular seguida de una administración oral con una vacuna atenuada a cerdas seronegativas demostró aumentar los anticuerpos neutralizantes IgA contra la proteína S presentes en calostro y leche (Kim *et al.*, 2015).

En cerdos de once días de edad inoculados vía oral con la cepa CV777 y desafiados posteriormente, se observaron tasas de protección más elevadas comparadas con las de los cerdos inmunizados por vía oral con virus atenuado (dosis alta y baja) (de Arriba *et al.*, 2002). Sin embargo, el uso de vacunas activas se ha cuestionado ya que después de la vacunación el virus es detectado en heces; en 2010 se aisló una cepa del virus de DEP en China que tenía una estrecha relación filogenética con una cepa vacunal. A pesar de que las vacunas de virus activo provocan una mejor respuesta inmune que las vacunas de virus inactivo, la eficacia a largo plazo de estas vacunas a menudo es baja debido a mutaciones virales y a los cambios antigénicos. La emergencia y re-emergencia de PEDV en Europa y Asia indican que el virus es capaz de evadir las estrategias de vacunación actuales debido a la aparición de varias cepas mutantes, lo que remarca la necesidad de producir nuevas vacunas basadas en las cepas que circulan actualmente (Song *et al.*, 2007; Song, Moon and Kang, 2015). Para el control de la enfermedad en China, desde 1995 se utilizó una vacuna bivalente que contenía el virus inactivado de GET y PED, para 2015 se administraba una

trivalente (GET, PED y rotavirus) todas ellas elaboradas con la cepa CV777 (Gerdtts and Zakhartchouk, 2017).

En Estados Unidos, la primera vacuna con licencia condicional fue desarrollada por Harrisvaccines, que elaboró una vacuna subunitaria con el gen “Spike” de un aislado y se aplicó vía intramuscular (IM), la vacuna demostró que las cerdas habían generado anticuerpos neutralizantes que fueron secretados en la leche y por tanto estos se detectaron en sus lechones (Sawattrakool, K *et. al.* 2017). En cerdos destetados se administraron dos dosis de la vacuna vía intramuscular con un intervalo de tres semanas, y posteriormente se desafiaron con tejido intestinal, en estos lechones se observó una disminución en la severidad de los signos clínicos (Mogler, M.A. *et. al.* 2014) También se observó una reducción en la mortalidad de los lechones (Crawford *et al.*, 2016).

Posteriormente se aprobó una vacuna de virus inactivado con adyuvante desarrollada por Zoetis, de aplicación IM que demostró reducir en un 90% la mortalidad de lechones en maternidad y aumentó 1.8 los lechones destetados. Además, se observaron altos títulos de IgG en las cerdas inicialmente seronegativas. Sin embargo, el título de IgA no mostró diferencias entre las cerdas vacunadas y las previamente expuestas a la infección natural, adicionalmente no se detectaron altos niveles de IgA en las cerdas inicialmente seronegativas (Schwartz *et al.*, 2016).

1.8.1 Inmunización

Debido a que no existen vacunas 100% efectivas para el uso en animales seronegativos y que el virus de DEP se disemina rápidamente e induce altas mortalidades en lechones, algunos veterinarios recomiendan una infección intencional (conocida como “feedback”) de cerdas durante la gestación para inducir inmunidad y transferirla en la lactancia a sus lechones (inmunidad lactogénica). Durante los primeros brotes de la enfermedad en países donde anteriormente era exótico, este era el único método disponible para un control inmunológico de DEP (Chattha, Roth and Saif, 2014). Expertos en enfermedades de cerdos y en producción publicaron consejos en cuanto a procedimientos y conceptos a considerar cuando se infectan intencionalmente a las cerdas a través de una exposición oral controlada. Sin embargo, también advierten del estado incompleto del conocimiento y algunas cuestiones de seguridad relacionadas a la infección intencional (Schwartz *et al.*, 2014).

No obstante, la inoculación intencional tiene diversas desventajas, tales como: el agente puede resultar más virulento de lo anticipado y ocasionar signos clínicos severos, pueden presentarse coinfecciones con agentes previamente controlados y modificar su grado de patogenicidad por los pases repetidos (Chattha, Roth and Saif, 2014).

Diversos estudios han detectado la presencia de anticuerpos neutralizantes a las semanas 3, 6, 7 y 24 posteriores a la administración del “feedback”(Clement, T., Singrey, A., Lawson, S., Okda, F., Nelson, J., Diel, D., Nelson, E., A., Christopher-Hennings, 2016).

1.9 Pérdidas económicas

En Estados Unidos se estima que el brote inicial ocasionó la muerte del 3% de la población de cerdos resultando en una pérdida de aproximadamente un billón de dólares para los productores y consumidores de la carne de cerdo (Paarlberg, 2014b). Aunado al costo por mortalidad, las medidas para el control y la erradicación de la enfermedad generan un aumento en las pérdidas. Se calcula que en una granja de 700 hembras en donde no se practican medidas de control o erradicación la pérdida económica anual es de \$300,000 dólares. Los rendimientos netos por cerda bajan de 255 a 174 dólares, las medidas de control y eliminación pueden disminuir o aumentar estas pérdidas. La administración de “feedback” con buenas medidas de bioseguridad tiene un costo de \$27,000 dólares, pero reduce diez veces las pérdidas por mortalidad y por ello se reporta como la actividad de control más rentable (Weng *et al.*, 2016).

1.10 Extracto dializable de leucocitos (DLE)

En los últimos años se ha incrementado el uso de péptidos como tratamiento para diversas enfermedades, ya que a diferencia de las proteínas tienen una actividad mayor (por masa), mejor penetración tisular y un bajo potencial inmunogénico, algunos tienen efecto antimicrobiano y antiinflamatorio, estimulan la angiogénesis y promueven la reparación de heridas. Dentro de los medicamentos basados en péptidos encontramos al Cetrorelix, Citosporin, Degarelix, Glatimer, DLE, etc. (Diao and Meibohm, 2013; Hilchie, Wuerth and Hancock, 2013).

El extracto dializable de leucocitos es una mezcla heterogénea de péptidos de bajo peso molecular (<10 kDa) que se liberan en la ruptura de leucocitos de sangre periférica de donantes sanos(Kirkpatrick, 2000). Estos extractos tienen efectos inmunomoduladores con diversas propiedades bioquímicas e inmunológicas. El DLE fue descrito por Lawrence en 1955, quien le dio el nombre de “Factor de Transferencia”(Lawrence 1955) . En la figura 3 se describe el proceso de preparación del Transferon®.

Figura 3. Proceso de preparado del Transferon® con el protocolo modificado de Borkowsky y Lawrence (1981) (Borkowsky and Lawrence, 1981)



Actualmente, se ha secuenciado el “Transferon oral” por espectrometría de masas identificando varios péptidos intactos, los más abundante fueron la Ubiquitina monomérica humana, una proteína globular y una variante de la ubiquitina que carece de la Gly dos-terminal (Vallejo-Castillo *et al.*, 2020). Además, se ha estandarizado su producción homogénea comprobando en cada lote el análisis la producción de IFN gamma *in vitro* y su análisis mediante cromatografía fase reversa y SDS-PAGE demostrando consistencia entre lotes con una desviación estándar relativa menor al 7% (Medina-Rivero *et al.*, 2016).

Se han estudiado diversos efectos del DLE, tanto en infecciones como en el tratamiento para el cáncer. En ratas con glioblastoma redujo el tamaño del tumor y aumentó las CD2+, CD4+, CD8+ y las NK (Pineda *et al.*, 2005) y como adyuvante a la quimioterapia en pacientes con osteosarcoma en estadios III y IV se encontró un aumento en las CD3+, CD8+, CD16+ y CD56+ en circulación sanguínea (Juarez, 2011).

El DLE puede inducir la producción de interferón gamma (IFN γ), interleucina 2 (IL2) y factor de necrosis tumoral (TNF). Se ha descrito que la regulación de la producción de TNF, IL-6 e IL-8 se asocia con la capacidad del DLE de alterar vías de señalización innata como la expresión de los TLR2, el factor nuclear NF-kB y la actividad de adenosin monofosfato cíclico (AMPc) (Ojeda *et al.*, 2005). Además, en células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos estimula la producción de TNF, IL10 e IL2 y activa el TLR2 (García-Hernández *et al.*, 2014). También, se ha descrito que participa en la regulación y atenuación de la respuesta inmune mediante la producción de citocinas inhibitoras como la IL-10 por células Th2 (Krishnaveni, 2013).

Otros estudios han demostrado que el DLE aumenta la diferenciación hacia una población de células tipo NK CD56+CD16+CD11c+ con propiedades como la producción de IFN γ , citotoxicidad de células tumorales y la capacidad de inducir la proliferación de células T (Ramírez-Ramírez *et al.*, 2016).

Se ha demostrado que el DLE es eficaz para el tratamiento de infecciones víricas como herpes simplex virus - 1 (HSV- 1) y el herpes zoster. En este caso, se ha observado que aumenta el periodo de vida de ratones BALB/C infectados experimentalmente con HSV-1, modelo que se ha utilizado como ensayo biológico para probar la actividad del DLE (Merchand-Reyes *et al.*, 2015; Salinas-Jazmin *et al.*, 2015).

En medicina veterinaria se ha empleado el DLE en el tratamiento y la prevención de salmonelosis en animales domésticos y pollos, disminuyendo la presencia de *S. entérica* (Kokincakova T, Herich R, 2008).

En cerdos se ha demostrado que el uso del DLE disminuye el tamaño de las lesiones en infecciones con *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Pasteurella multocida*, para la prevención de rinitis atrófica (Torres, 1994).

También se probó que el DLE en lechones clínicamente sanos aumenta la concentración de IFN- γ en suero (Hernández-Peralta *et al.*, 2014); en otros estudios se ha demostrado que la presencia de IFN- γ en el cerdo estimula la producción y diferenciación de inmunoglobulinas de tipo IgG2, que han resultado mejores fijadoras del complemento en comparación con las IgG1 (Crawley and Wilkie, 2003).

En lechones infectados experimentalmente con PRRSV reduce los signos clínicos, la mortalidad y su presencia en órganos (Lopez-Huerta, 2013). En estudios más recientes, en cerdos infectados naturalmente con el PRRSV, se ha comprobado la disminución de la carga viral en sangre después de la administración de DLE intradérmico (Sánchez 2016) .

Hasta el momento no se han descrito efectos adversos tras su aplicación en animales y humanos; un estudio reportó que de 3844 pacientes solo el 1.9 % mostraron efectos adversos leves (dolor de cabeza, urticaria, aumento de la sintomatología de la enfermedad a tratar, tos y fatiga)(Homberg *et al.*, 2015).

1.11 Porinas Omp C y Omp F de Salmonella entérica serovar typhi

Las bacterias Gram negativas tienen una membrana externa que consiste en fosfolípidos, lipopolisacáridos y un grupo de proteínas de membrana externa (OMP por sus siglas en inglés) conocidas como porinas. Las porinas son un barril de láminas beta que se pliegan para formar una estructura curvada cuya primera cadena de láminas se une a la última a través de puentes de hidrógeno, se ensamblan en trímeros para formar poros estables y alcanzan concentraciones por célula de 105 moléculas (figura 4). Estas proteínas funcionan como poros o filtros que permiten el paso de pequeñas moléculas hidrófilas al interior de la bacteria. Los epítomos de las porinas están expuestos en la superficie celular y la inmunogenicidad conservada de las OMP las hace candidatos como inmunógenos vacunales (Koebnik, Locher and Van Gelder, 2000; Tamm, Arora and Kleinschmidt, 2001; Lin, Huang and Zhang, 2002; Dam, Pagès and Masi, 2018).

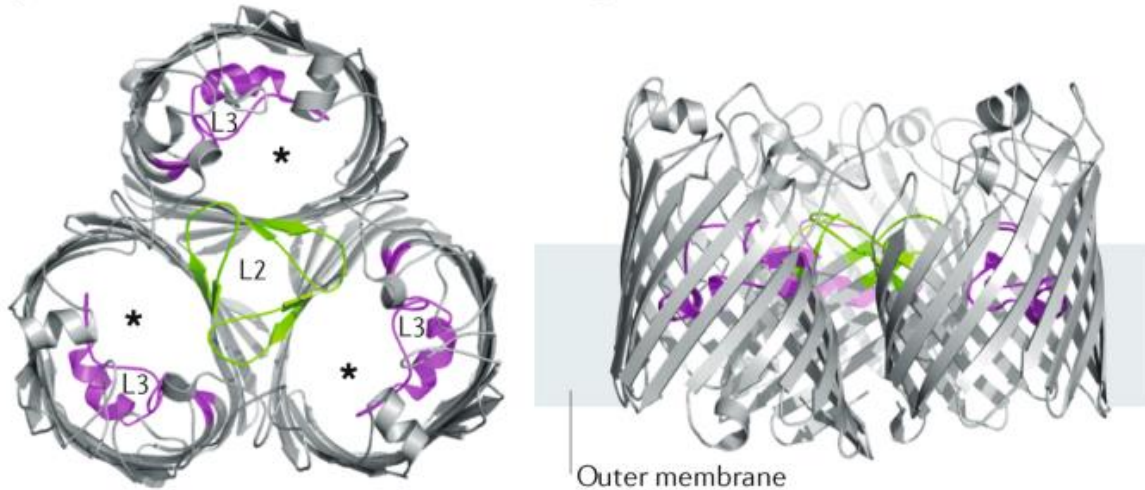


Figura 4. Vista lateral y superior de la Omp C de *Escherichia coli*. Imagen modificada de: Vergalli, J., Bodrenko, I.V., Masi, M. et al. (2020). Porins and small-molecule translocation across the outer membrane of Gram-negative. Recuperado de: <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0294-2>

Las porinas son potentes estimulantes de la respuesta inmune, por su reconocimiento por TLR y de la estimulación de las células presentadoras de antígenos, así mismo proveen una potente estimulación tanto humoral y celular al ser reconocidas por células B y linfocitos T cooperadores (Cervantes-Barragán *et al.*, 2009; Carreño *et al.*, 2017). Debido a estas propiedades las porinas de diversas bacterias se han utilizado de forma experimental como adyuvantes a la vacunación. (Wetzler, 2010; Toussi, Liu and Massari, 2012)

Las porinas purificadas de *Salmonella* entérica serovar *typhi* constan de una mezcla de dos proteínas, Omp C y Omp F que se arreglan como homotrímeros, altamente inmunogénicos en ratones y en humanos. En los ratones se ha demostrado que generan una respuesta inmune protectora y de larga duración, mientras que se ha demostrado que los humanos convalecientes de fiebre tifoidea tienen anticuerpos que reconocen a las porinas (Secundino *et al.*, 2006; Thulasingham *et al.*, 2017).

Se sabe que las porinas que codifican en la *S. typhi* son agonistas del TLR2 y TLR4 e inducen la producción de TNF, IL-6 e IL-10, y la sobreexpresión de MHC II en células dendríticas y de CD40 en células dendríticas y macrófagos (Moreno-Eutimio *et al.*, 2013; Carreño *et al.*, 2016). Pérez-Toledo y colaboradores demostraron que la administración de porinas de *S. typhi* junto con ovoalbúmina (OVA), influenza H1N1 o la vacuna de polisacáridos Vi aumentaban la respuesta de células T a un perfil Th1/Th17 y mejoraba la respuesta inmune de anticuerpos a antígenos poco inmunogénicos; además de aumentar los títulos de anticuerpos IgG, e incrementar IFN γ , IL17 e IL2 (Pérez-Toledo *et al.*, 2017).

2. Hipótesis

La administración del DLE o porinas como adyuvante a la vacunación de cerdas en unidades de producción porcina con brote activo de PED aumentará la producción de anticuerpos en suero y calostro y la producción de IFN γ .

3. Objetivo general

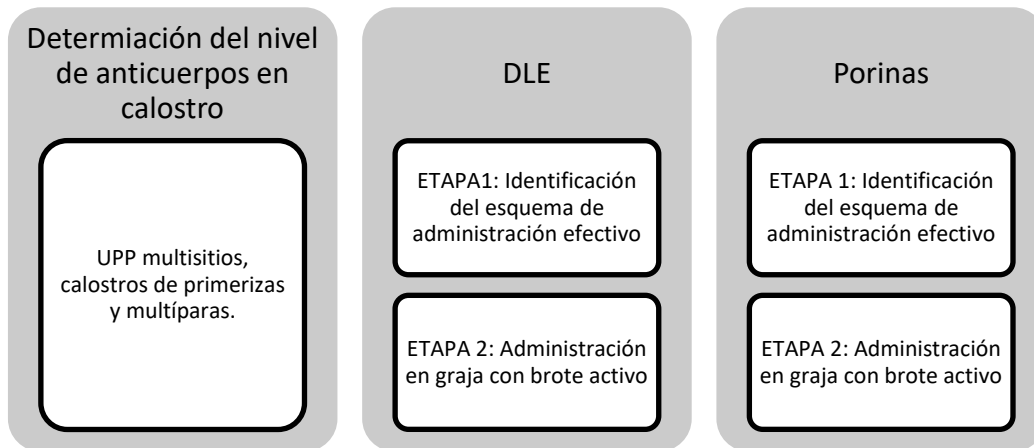
Evaluar la actividad inmunoestimulante del DLE y las porinas aplicadas junto con la vacuna de PED en cerdos mediante la medición de anticuerpos e IFN gamma, para determinar su funcionalidad como posibles adyuvantes vacunales.

4. Objetivos específicos

- Determinar el nivel de anticuerpos de hembras primerizas y multíparas en calostro, midiendo la cantidad de anticuerpos totales y evaluando la mortalidad de los lechones y su correlación con el nivel de anticuerpos
- Identificar el esquema de administración efectivo del DLE y porinas, administrando el tratamiento en unidades con un brote activo de PED. Administrar el tratamiento en unidades de producción con un brote activo de PED
- Administrar la vacuna junto con el DLE o las porinas, evaluando la cantidad de anticuerpos producidos en los diferentes tratamientos tanto en sangre como en calostro y la producción de IFN γ .

5. Materiales y métodos

El ensayo se llevó a cabo en 3 pasos:



Inicialmente se quería determinar si era necesario mejorar la respuesta de las vacunas anti-PED ya existentes por lo que el primer paso en la investigación fue determinar el nivel de anticuerpos en el calostro de las hembras (multíparas y primerizas) y verificar si la inmunización estaba siendo efectiva.

Al reconocer la necesidad de implementar una mejora en la inmunización se decidió utilizar dos reactivos: el DLE y las porinas.

En el caso del DLE, como ya se mencionó en la introducción, se tenía el antecedente de su uso en cerdos destetados para la enfermedad de PRRS, por lo que se utilizaron estos antecedentes para estandarizar dos esquemas de administración que fueron inoculados en una UPP con inmunización via “feedback”. Una vez obtenido el esquema mas conveniente se administró en una UPP aunado a una vacuna comercial.

En las porinas no se contaban con antecedentes de su uso en cerdos, por lo que para determinar la dosis se utilizaron lechones destetados en un ambiente controlado con una vacuna sin adyuvante. Al determinar la eficacia de las porinas en lechones, se administraron en las cerdas gestantes de una UPP con brote activo aunadas a la vacuna ya utilizada en la producción y se determinó en estas su eficacia.

5.1 Determinación del nivel de anticuerpos en calostro de hembras primerizas y multíparas vacunadas

De una unidad de producción porcina semitecnificada multisitios, en el estado de Puebla con brotes de PED anuales nos proporcionaron los calostros de hembras multíparas (2 o más partos) y primerizas. Las hembras primerizas contaban con dos administraciones de

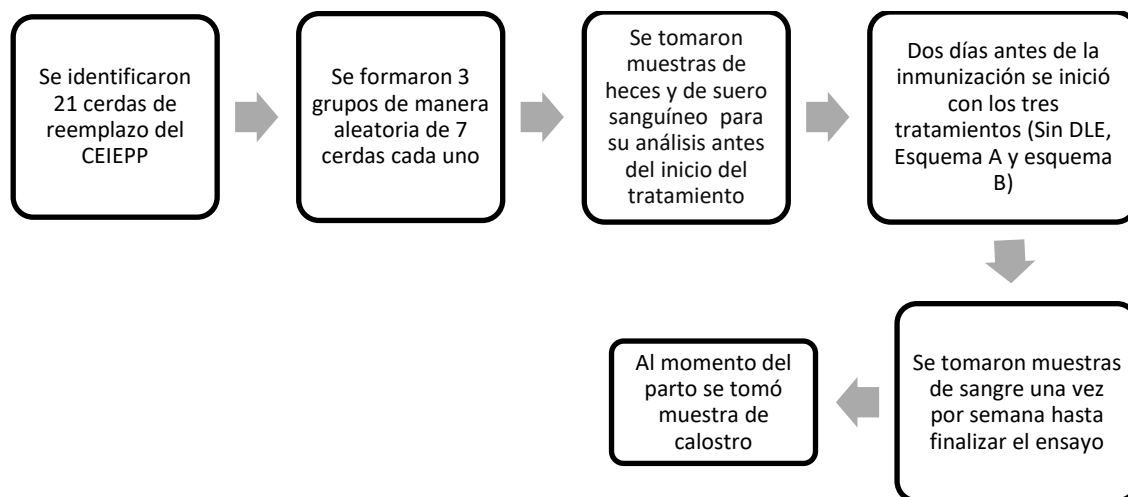
una vacuna inactivada (Zoetis) y las multíparas contaban con al menos 4 dosis vacunales y la exposición anterior a un brote natural de PED. Se recibieron 22 calostros (12 de primerizas y 10 de multíparas) y al momento de proporcionar las muestras la UPP se encontraba en un brote con mortalidades generales entre el 40 al 50%.

El suero del calostro fue separado y se analizó para la detección de anticuerpos totales (IgG) mediante una técnica de ELISA indirecta cuantitativa estandarizada en el laboratorio y descrita en el ANEXO A. También, se analizó el suero del calostro para determinar la cantidad de anticuerpos neutralizantes mediante la prueba de reducción de placas por neutralización (PNRT) descrita en el ANEXO B.

Una vez obtenidos estos resultados se correlacionaron estadísticamente con la mortalidad reportada por cada hembra.

5.2 Ensayos con el extracto dializable leucocitario

5.2.1 Etapa 1: Identificación del esquema de administración efectivo para el DLE



5.2.1.1 Animales

Se utilizaron cerdas de reemplazo que al menos pesaran 200 kilogramos. Los animales no mostraban signos clínicos respiratorios al momento de la administración del DLE y eran positivas al RT-PCR para PEDV. Las hembras recibieron de forma habitual sus inmunizaciones, y su ración normal diaria de alimento, así como agua a libre acceso durante todo el ensayo.

5.2.1.2 Número de repeticiones

El número de repeticiones se calculó por el método de Tang que tiene como base una investigación anterior. Se tomaron los datos de la investigación de Hernández-Peralta y col. en la que reportan lo siguiente:

Cuadro 1. Promedio de la concentración de IFN γ en sangre periférica de cerdos tratados con dos dosis de DLE. Tomado y adaptado de Hernández-Peralta et. al., 2014

Tratamiento	Promedio (ng/ml)
Dosis alta	437.15
Dosis baja	208.84
Control	223.65

Y un error estándar de 36.45. Con estos datos se encontró que con 7 repeticiones tendríamos un 82% de potencia. Por lo que cada tratamiento utilizó 7 cerdas, dando un total de 21 animales en el estudio. En el estudio de Hernández-Peralta et. al., 2014 el tratamiento de dosis alta (77ug/ml) a comparación del de dosis baja (17 ug/ml) de DLE porcino que fue administrado vía intradérmica a lechones destetados, fue el que mostró un incremento significativo en la producción de IFN- γ .

5.2.1.3 Determinación de la dosis

Si bien el objetivo final era el empleo del DLE junto con la vacuna, en esta UPP la inmunización se llevaba a cabo con la administración del “feedback” por lo cual no se utilizó ninguna vacuna en esta fase del estudio.

Para estimar la dosis nos basamos en lo reportado previamente por Hernández-Peralta (2014) quien encontró un aumento significativo en la concentración de IFN- γ sérico al día 30 del estudio a una dosis de 77 ug/kg. Posteriormente, Sánchez 2016 administró una dosis de 0.5 mg por lechón (77 ug/kg) y se ajustó la dosis conforme aumentó el peso hasta 1 mg por lechón, dosis efectiva para disminuir la presencia del virus de PRRS en circulación sanguínea. Aunado a lo anterior, para el tratamiento de herpes en humanos se administran 2 mg diario por 5 días y posteriormente 2 mg dos veces por semana por dos meses.

Con la información disponible y debido a la cantidad y sitio de administración se decidió administrar 3.9 mg por dosis reconstituida en 3 ml de vehículo.

Para el grupo testigo se administraron 3 ml de SSF en los mismos días que el grupo tratado.

5.2.1.4 DLE empleado

Se utilizó un lote producido en la Unidad de Operaciones (PharmaFT) de la Unidad de Investigación, Desarrollo e Innovación Médica y Biotecnológica (UDIMEB) en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

5.2.1.5 Ensayo

El ensayo se realizó en una unidad de producción de ciclo completo en el Estado de México con producción en bandas quincenales, la unidad se encontraba cursando por un brote activo de PED que había iniciado tres semanas antes del ensayo y para el cual se había administrado previo a nuestra llegada “feedback”, por lo que al realizar el ensayo no se pudo utilizar ninguna vacuna comercial y se aplicó el DLE de forma independiente.

Se administraron dos tratamientos y un grupo testigo: 7 cerdas gestantes en el último tercio con administración de 3 ml de solución salina fisiológica diario (grupo testigo) dos semanas antes del parto y hasta el parto; 7 cerdas gestantes en el último tercio con administración de 3.9 mg/3 ml por dosis de DLE diario dos semanas antes del parto y hasta el parto (Esquema A) y 7 cerdas en el último tercio de la gestación con administración de 3.9 mg/3 ml por dosis de DLE diario dos semanas antes del parto y durante una semana (Esquema B). Todas las cerdas siguieron el protocolo de vacunaciones utilizado por la granja, debido a la cantidad de hembras en la granja y por ende la cantidad que entraba en cada banda no se pudieron dividir los tratamientos en primerizas y multíparas, ya que sólo obteníamos 3 animales por grupo de las primerizas; sin embargo, los grupos se balancearon para que todos tuvieran la misma cantidad de primerizas.

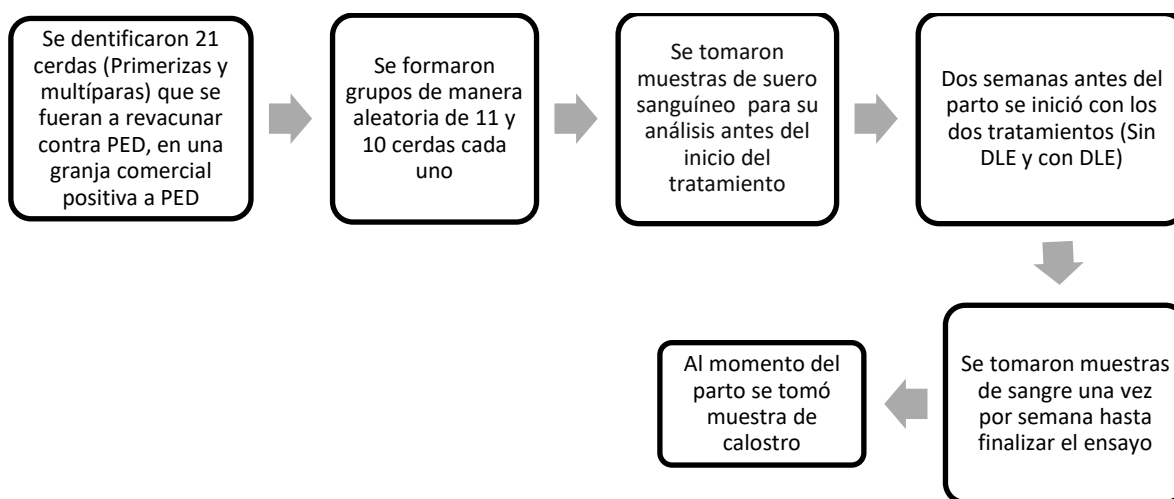
La administración del medicamento fue por vía intradérmica para todos los grupos.

En el día cero se tomaron muestras de sangre y heces a las 21 cerdas del estudio. Las muestras de heces se analizaron para detectar el virus de PED por medio de la técnica RT-PCR descrita en el ANEXO C para determinar que todas las hembras en el estudio fueran positivas a PED. Las muestras de sangre se centrifugaron para obtener suero, almacenándolo en dos alícuotas. El suero se utilizó para la determinación de IFN γ con la técnica de ELISA cuantitativa de tipo sándwich (ANEXO D) y se determinó la presencia de anticuerpos totales (IgG) contra PEDv mediante un ensayo de ELISA cuantitativa estandarizada (ANEXO A). No se determinaron los subtipos IgG1, IgG2 e IgA al no observarse cambios sugerentes en el análisis inicial. Al momento del parto, se tomaron muestras de calostro. La muestra de calostro se utilizó para evaluar los anticuerpos mediante la técnica de ELISA (ANEXO A).

Las muestras se resguardaron a -20°C hasta su uso.

Se analizaron los resultados para determinar normalidad y homocedasticidad para hacer un análisis de varianza entre tratamientos.

5.2.2 Etapa 2: Administración del DLE en granja con brote activo de PED



5.2.2.1 Animales

Se utilizaron 21 cerdas de una unidad de producción de La Piedad, Michoacán multisitio con un brote de PED confirmado por RT-PCR y signos clínicos. Las hembras recibieron previamente una dosis de “feedback” y una inmunización con vacuna de Lapisa. No mostraban signos clínicos respiratorios al momento de la administración de los tratamientos y recibieron su ración normal diaria de alimento, así como agua a libre acceso durante todo el ensayo.

5.2.2.2 Dosis empleada

Derivado del ensayo de la etapa 1 en el que se observó que en el esquema B el título de anticuerpos entre el muestreo 2 y 3 presentó una disminución (no estadísticamente significativa) menor respecto al esquema A y el testigo (Figura 5), y aunado a que esta es una dosis menor, se decidió administrar esta dosis (27.3 mg totales). Debido al manejo de la granja el esquema se modificó a 3 administraciones en lugar de 7, ya que de forma habitual en una UPP administrar los medicamentos por 7 días sería inoperable (un día antes de la vacunación, el día de la vacunación y un día después).

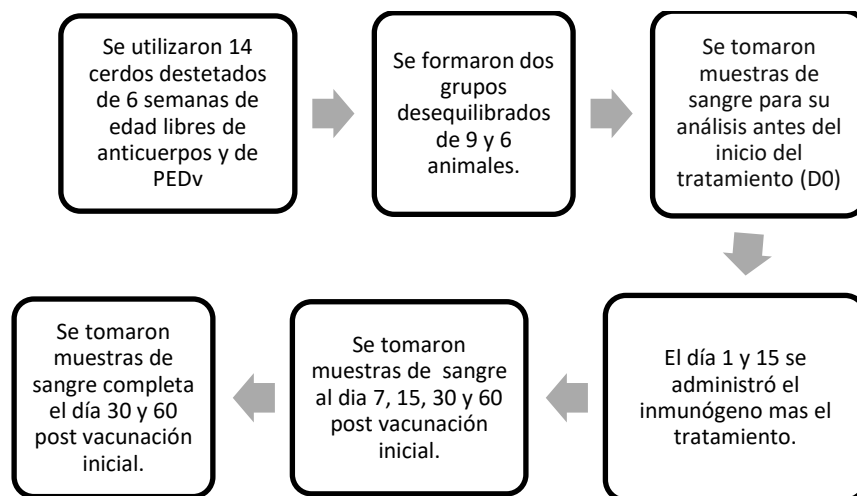
5.2.2.3 Ensayo experimental

Se emplearon dos grupos, uno con tratamiento y un grupo testigo: en el grupo testigo se usaron 6 cerdas de reemplazo y 4 cerdas primerizas y se les administró 9 ml de solución salina fisiológica; para el grupo tratado se utilizaron 6 cerdas de reemplazo y 4 cerdas primerizas y se les administró 9.1 mg por dosis de DLE un día antes, durante y un día después

de la revacunación. Igual que en el ensayo anterior la UPP no contaba con las suficientes hembras primerizas por banda para realizar un ensayo significativo con los grupos diferenciados, por lo que se homogenizaron junto con las multíparas en grupos balanceados. Todas las cerdas siguieron el protocolo de vacunación utilizado por la granja con el inmunógeno de Zoetis (2 ml IM por dosis). La administración del DLE y SSF fue por vía intradérmica para todos los grupos.

En el día cero se tomaron muestras de sangre a las 21 cerdas del estudio. Posteriormente se tomaron muestras de sangre a la semana de la vacunación y 10 días después del parto. Las muestras de sangre se centrifugaron para obtener suero y almacenarlo en dos alícuotas. El suero se utilizó para la determinación de IFN γ mediante la técnica de ELISA (ANEXO D) y presencia de anticuerpos totales (IgG) contra PEDv mediante un ensayo de ELISA (ANEXO A). Al momento del parto, se tomaron muestras de calostro. La muestra de calostro se utilizó para evaluar los anticuerpos totales (IgG) mediante la técnica de ELISA (ANEXO A). Si los resultados de IgG totales mostraban diferencias se realizaba el análisis para cada subtipo.

5.3 Ensayos con porinas *Omp C* y *Omp F*



5.3.1 Etapa 1: Determinación de la dosis de Porinas

5.3.1.1 Animales

Se utilizaron cerdos destetados de 6 semanas a la llegada al aislamiento y de 8 semanas al inicio de la administración. Los animales no mostraban signos clínicos respiratorios o reproductivos al momento de la aplicación de los tratamientos y resultaron negativos a la prueba de RT-PCR para PED y a la ELISA para anticuerpos anti-PED al momento de llegada

al aislamiento. Recibieron su ración normal diaria de alimento, así como agua a libre acceso durante todo el ensayo.

5.3.1.2 Determinación de la dosis

Las porinas de *Salmonella typhi* (Omp C y F) fueron proporcionadas por el grupo de trabajo del Dr. López Macías. En estudios previos realizados por López-Macías C. se identificó una dosis efectiva en ratones desde 10-30 ug por dosis (Secundino *et al.*, 2006). Se determinó que para este ensayo se ocuparían 30 ug por lechón como adyuvante a la dosis de 2 ml de la vacuna contra PED prescrita por el fabricante (Lapisa). Esta dosis se repitió a los quince días después de la primera administración.

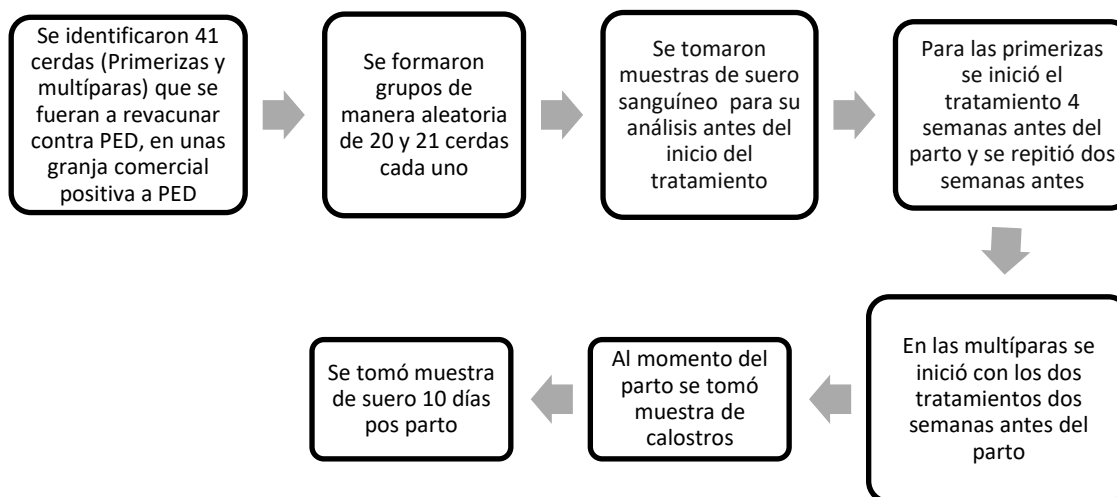
5.3.1.2 Ensayo experimental

Se administró un grupo de tratamiento y un grupo testigo: el primero (9 cerdos destetados) se inmunizó con 2 ml de vacuna anti-PED, junto con 30 ug de porinas de salmonella al día 1 y al día 15 a. Al grupo testigo (6 cerdos destetados) se le administró 2 ml de vacuna anti-PED el día 1 y 15.

La administración del inmunógeno fue vía intramuscular para ambos grupos.

En el día cero (6 semanas de vida) se tomaron muestras de sangre a los 15 cerdos del estudio para corroborar la ausencia de anticuerpos anti-PED maternos. Dos semanas después se inició con el ensayo y posteriormente se tomaron muestras de sangre a los 7, 15, 30 y 60 días post vacunación inicial. Las muestras de sangre se centrifugaron para obtener suero y almacenarlo en dos alícuotas. El suero se utilizó para la determinación de IFN y (ANEXO D) y presencia de anticuerpos totales (IgG) contra PEDv mediante un ensayo de ELISA cuantitativo (ANEXO A). Así mismo, como se observaron diferencias entre los grupos en el análisis inicial, se realizó la determinación de anticuerpos IgA, IgG1 e IgG2 anti-PEDv mediante un ensayo de ELISA cuantitativo (ANEXO F, G y H respectivamente). Al día 30 y 60 post vacunación se tomaron muestras de sangre completa para hacer un ensayo de liberación de IFN y (ANEXO I) en la que se estimularon las células de sangre periférica con el virus vacunal para observar la producción de IFN y con la técnica de ELISA (ANEXO D).

5.3.2 Etapa 2: Administración de las porinas en granja con brote activo de PED



5.3.2.1 Animales

Se utilizaron 41 cerdas entre primerizas y multíparas. Los animales no mostraban signos clínicos respiratorios al momento de la administración del tratamiento y el total de la granja atravesaba un brote de PED confirmado por RT-PCR y signos clínicos. Las hembras recibieron previamente una dosis de “feedback” al inicio del brote.

5.3.2.2 Ensayo experimental

Se emplearon dos grupos uno de tratamiento (formado 12 cerdas de reemplazo y 9 cerdas primerizas) y un grupo testigo (con 12 cerdas de reemplazo y 8 cerdas primerizas). El grupo tratado recibió 60 ug de porinas más 2 ml de vacuna IM; el grupo testigo solo recibió 2 ml de vacuna IM. Las primerizas reciben dos vacunaciones una dosis 4 semanas antes del parto y otra dosis dos semanas después. Las cerdas multíparas sólo reciben la vacunación (refuerzo) dos semanas antes del parto.

Antes de la vacunación se tomaron muestras de suero, en las primerizas fue el día de la primera vacunación. Posteriormente se tomaron muestras de sangre 10 días después del parto. Las muestras de sangre se centrifugaron para obtener suero, almacenándolo en dos alícuotas. El suero se utilizó para la determinación de anticuerpos totales (IgG) contra PEDv mediante un ensayo de ELISA (ANEXO A). Al momento del parto, se tomaron muestras de calostro. La muestra de calostro se utilizó para evaluar los anticuerpos totales (IgG) mediante la técnica de ELISA (ANEXO A). Adicionalmente, las muestras de suero sanguíneo se analizaron para determinar los anticuerpos IgA, IgG1 e IgG2 también por el método de ELISA y así mismo con las muestras de calostro (ANEXOS F, G y H respectivamente).

El resultado del muestro inicial de suero se tomó como el valor basal y con el resultado del segundo muestreo se calculó un índice de aumento o disminución de anticuerpos post vacunación.

5.4 Análisis de los datos

Para todos los resultados cuantitativos de las pruebas se evaluaron la homogeneidad de varianzas (Prueba de Levene) y la normalidad (Prueba de Shapiro-Wilk). Cuando no presentó significancia la prueba de Levene y si la presentó la de Shapiro-Wilk procedimos a evaluar por el método de ANDEVA. En caso de no cumplir con la normalidad y la homocedasticidad se evaluó por el método no paramétrico de Kruskal-Wallis para demostrar igualdad de distribución de varianzas.

6. Resultados

6.1 Determinación del nivel de anticuerpos en calostro de cerdas vacunadas

En el análisis de los anticuerpos totales (IgG) anti PED que se muestran en la figura 5 se encontraron diferencias estadísticamente representativas ($p < 0.01$) entre las hembras primerizas y las multíparas, siendo la media de las primerizas menor a la de las multíparas. Los resultados de esta etapa no pasaron la prueba de normalidad por lo que se evaluaron con pruebas no paramétricas.

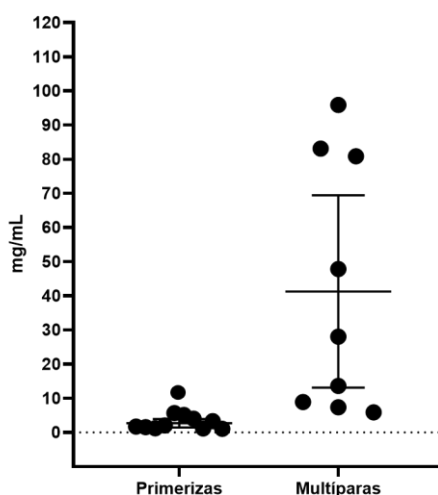


Figura 5. Anticuerpos anti-PED en calostro detectados mediante la prueba de ELISA indirecta (mg/mL) en primerizas y multíparas. Gráfico de dispersión de puntos con media e IC 95%. $P < 0.01$ con la prueba de U Mann-Whitney.

En la figura 6 se muestran los resultados de la prueba de reducción de placas por neutralización, en donde se aprecia una media mayor en el porcentaje de neutralización de las hembras multíparas en la dilución 1/80 de todos los sueros de calostro con una diferencia de $p=0.03$. En cuanto a la mortalidad de sus lechones a causa de PED (figura 6) se observó un 41.80% de mortalidad en los lechones de hembras primerizas, mientras que en hembras multíparas fue del 15.63%. Si bien no hubo diferencias estadísticas en los porcentajes, en una curva de supervivencia se encontró diferencia ($P=0.009$) entre el tiempo de supervivencia de los lechones de las primerizas y los de las multíparas (figura 7). No se encontró una correlación estadística demostrable con el título de anticuerpos totales o con el índice de seroneutralización.

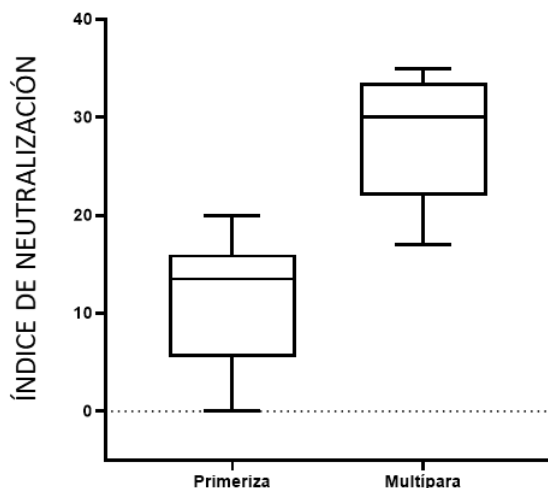


Figura 6. Índice de neutralización del suero de calostro a una dilución 1/80. Diagrama de cajas con media e IC 95%. $P<0.05$ de acuerdo a la prueba U de Mann-Whitney.

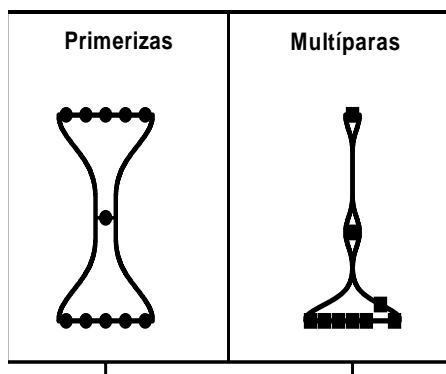


Figura 7. Porcentaje de mortalidad de lechones al destete. Diagrama de violín.

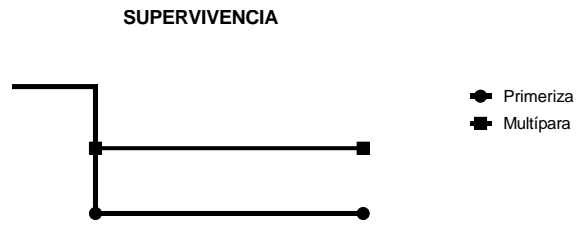


Figura 8. Curva de supervivencia Kaplan Meier (P=0.009) de lechones al destete (21 días) nacidos de hembras primerizas y múltiparas en la UPP.

6.2 Ensayos con con el extracto dializable leucocitario

6.2.1 Etapa 1: Identificación del esquema de administración efectivo para el DLE

Se determinó la presencia del virus de PED en las heces de las hembras del estudio, mediante RT-PCR en punto final. No fue posible cuantificar los niveles de IFN γ en los sueros de ningún grupo.

En el análisis de las muestras de suero para la detección de anticuerpos anti-PED totales en los tres grupos experimentales y los tres muestreos diferentes no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos ni intra-grupo (figura 9)

A

B

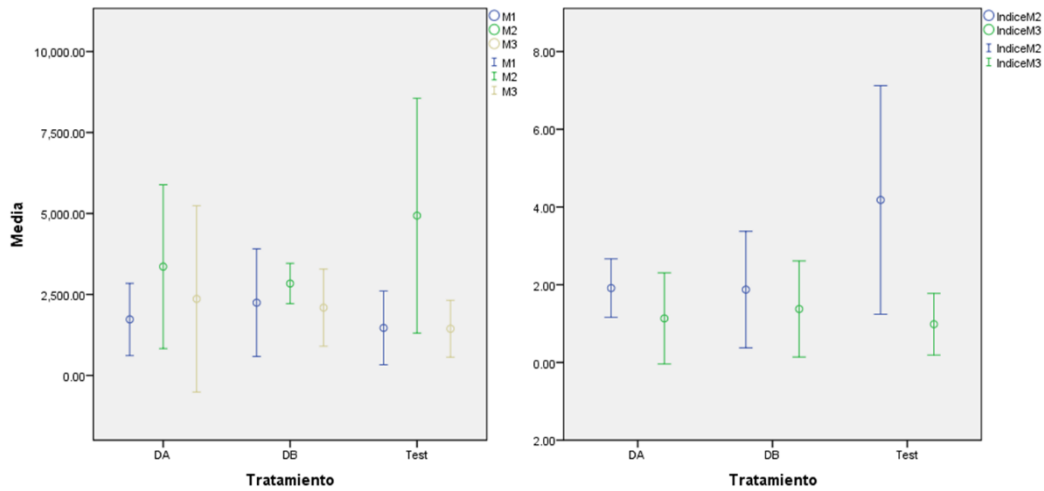


Figura 9. Anticuerpos anti-PED en suero detectados mediante la prueba de ELISA indirecta. A) Media e IC 95% de anticuerpos totales ($\mu\text{g/ml}$) de los tres grupos tratados en los tres muestreos. B) Media e IC 95% del índice de variación entre el muestreo basal y los siguientes dos muestreos ($P > 0.05$).

En el caso de la medición de anticuerpos en suero de calostro no se observaron diferencias entre grupos, ni en el ensayo de ELISA ni en el de seroneutralización (figura 10). Con estos resultados no se pudo concluir la eficacia del adyuvante; sin embargo, ya que no hubo diferencias entre tratamientos, pero se observó una mayor homogeneidad en el esquema B se decidió su uso para el siguiente ensayo.

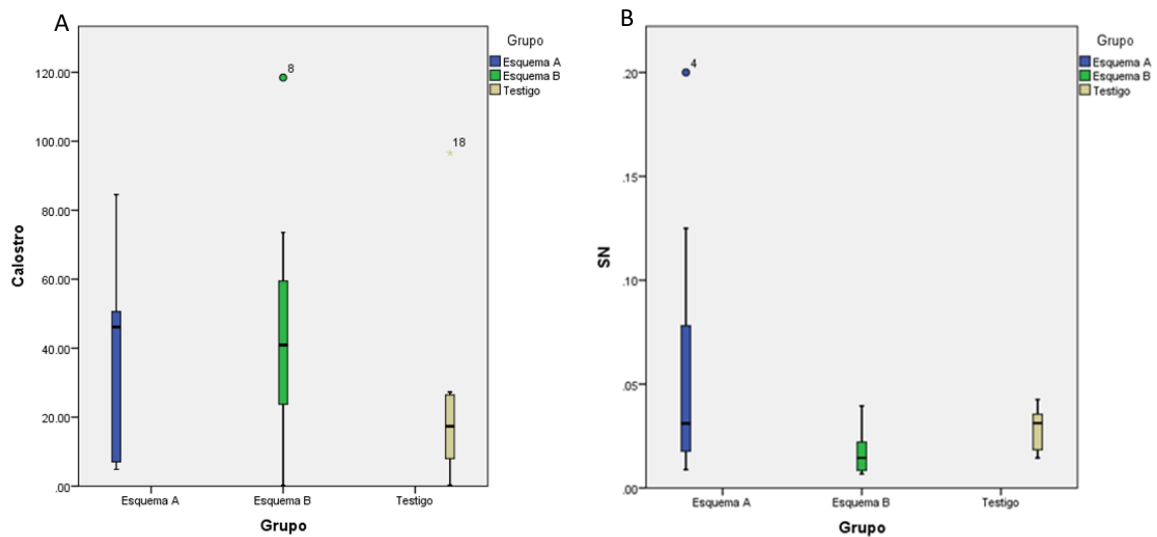


Figura 10. Anticuerpos anti-PED en calostro. A) Media e IC 95% de la cantidad de anticuerpos totales en suero de calostro ($\mu\text{g/ml}$) mediante la técnica de ELISA; B) media e

IC 95% del índice de seroneutralización del suero de calostro. Diagrama de cajas. ($P>0.05$).

M1: muestreo 1; M2: muestreo 2; M3: muestreo 3.

6.2.2 Etapa 2: Administración del DLE en granja con brote activo de PED

En la UPP de la piedad Michoacán sólo se administró el esquema B adjunto a la vacuna de Zoetis (virus inactivado con hidróxido de aluminio). El nivel de anticuerpos anti PED no mostró diferencias estadísticas ni en el suero sanguíneo, ni en el de calostro (figuras 11 y 12).

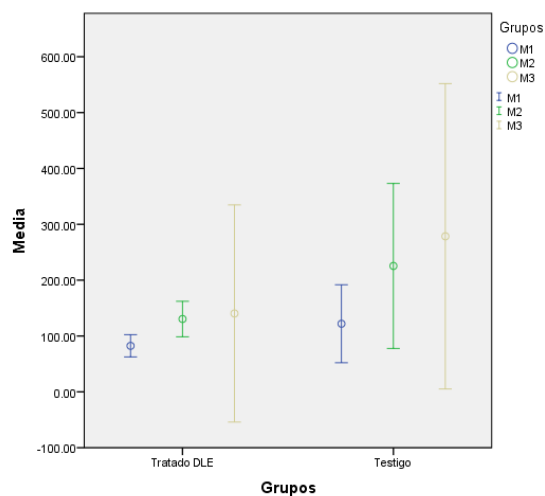


Figura 11. Anticuerpos anti-PED en suero detectados mediante la técnica de ELISA. Media e IC 95% de anticuerpos totales ($\mu\text{g/ml}$) de los dos grupos tratados en los tres muestreos en el suero sanguíneo. ($P>0.05$)

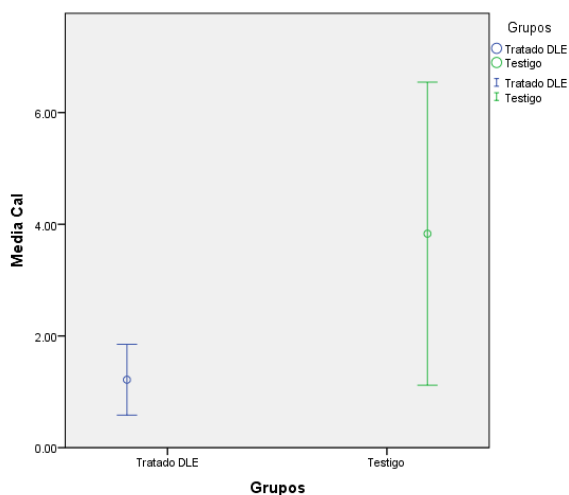


Figura 12. Anticuerpos anti-PED en calostro detectados mediante la técnica de ELISA. Media e IC 95% de anticuerpos totales ($\mu\text{g/ml}$) de los dos grupos tratados en el suero de calostro. ($P>0.05$)

Al momento del parto de las hembras tratadas el brote ya tenía más de 5 semanas activo y ya no se registraban mortalidades debidas a la infección por PED en los lechones lactantes, por lo que no se pudo hacer una correlación con los tratamientos.

6.3 Ensayos con porinas *Omp C* y *Omp F*

6.3.1 Etapa 1: Determinación de la dosis de Porinas

En el análisis de la dosis efectiva de las porinas en lechones, no se observaron anticuerpos anti-PED en el muestreo inicial cuando los lechones llegaron a las instalaciones. En el primer muestreo tampoco se observaron sueros positivos a anticuerpos IgG o IgA; fue hasta el segundo muestreo (15 días pos-vacunación) que se observaron sueros positivos, tanto para IgG como para IgA.

En el análisis de anticuerpos IgG totales se observaron diferencias significativas en el muestreo 3 con la prueba de U de Mann -Whitney con una $P=0.003$ (Figura 13) con una media de anticuerpos en el testigo de $21.6 \mu\text{g/ml}$ (95% IC: 12.07-31.12) y el tratado con una media de anticuerpos de $43.14 \mu\text{g/ml}$ (95% IC: 30.64-55.63).

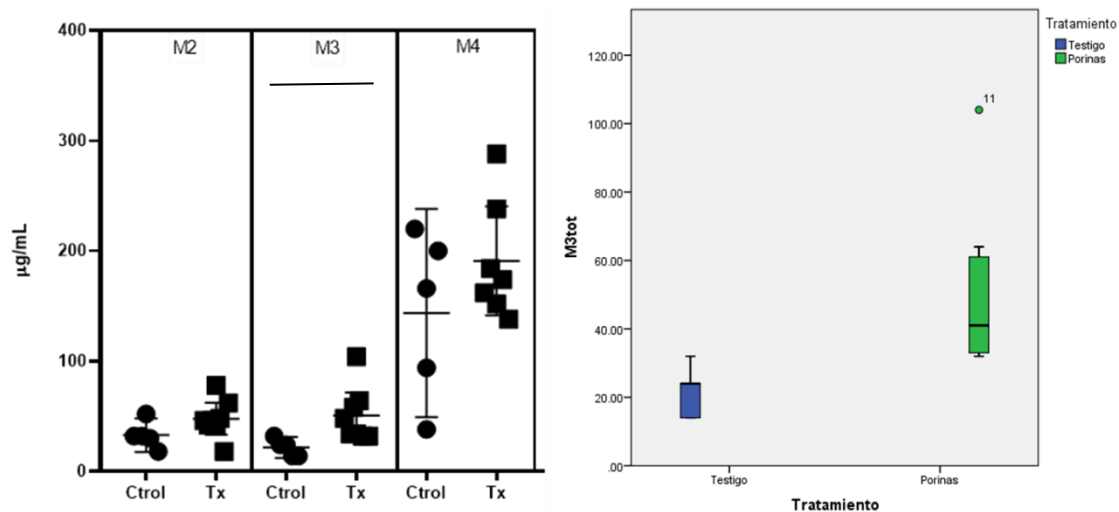


Figura 13. Anticuerpos IgG anti-PED en suero detectados mediante la técnica de ELISA indirecta ($\mu\text{g/ml}$). A) Media e IC 95% para el muestreo 2 ($P>0.05$), 3 ($P=0.003$) y 4 ($P>0.05$); B) media e IC 95% de la cantidad de anticuerpos totales en suero sanguíneo ($\mu\text{g/ml}$) mediante la técnica de ELISA para el muestreo 3

Se encontraron diferencias significativas ($P=0.03$) con la prueba de U de Mann-Whitney entre grupos para los niveles de anticuerpos IgA en el muestreo 2 con una media en el testigo de $31.98 \mu\text{g/ml}$ (95%IC: $-25.73 - 89.69$) y una media en los tratados de $165.95 \mu\text{g/ml}$ (95%IC: $64.77 - 267.12$). Ver figura 14. Respecto a IgG1 e IgG2 no se encontraron diferencias.

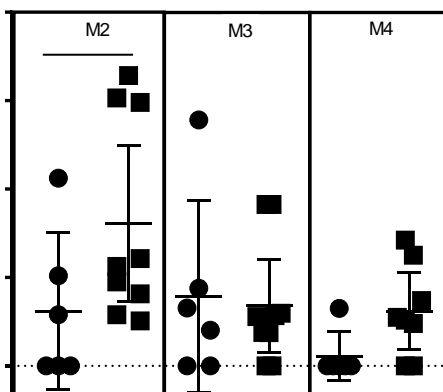


Figura 14. Anticuerpos IgA anti-PED en suero detectados mediante la técnica de ELISA indirecta ($\mu\text{g/ml}$). Media e IC 95% d para el muestreo 2, 3 y 4. Muestreo dos $P=0.030$

En el ensayo para la detección de interferón gamma producto de la estimulación de células en sangre periférica se observaron diferencias estadísticas entre el grupo testigo y el tratado ($P=0.030$) a las 24 horas post estimulación, siendo mayor la producción en el grupo testigo con una media de $128.49 \mu\text{g/ml}$ (95%IC: $12.47 - 244.50$); del grupo tratado solo un sobrenadante presentó niveles detectables por la prueba con una media de $8.43 \mu\text{g/ml}$ (95%IC: $-12.19 - 29.06$) (Figura 15).

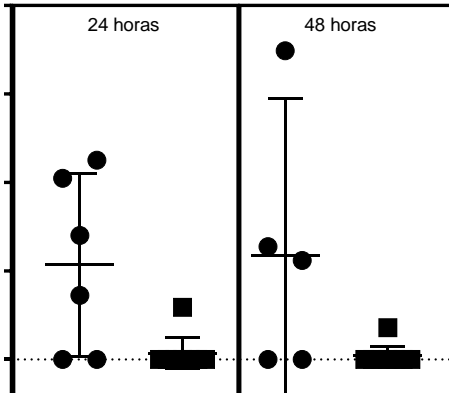


Figura 15. Media e IC 95% de los ug/ml de IFN γ producidos por el ensayo de IGRA a las 24 (P=0.030) y 48 horas determinado mediante la técnica de ELISA tipo sándwich (P>0.05).

6.3.2 Etapa 2: Administración de las porinas en granja con brote activo de PED

En el análisis de los anticuerpos presentes en el suero de las hembras tratadas con la vacuna sola o con la vacuna más las porinas fue posible evaluar por separado las primerizas de las multíparas. Además, se analizaron los valores de los anticuerpos tomando la medición basal como el valor inicial y evaluando el índice de aumento o disminución en el segundo muestreo.

En el análisis de los anticuerpos presentes en el suero de las hembras tratadas con la vacuna sola o con la vacuna más las porinas se encontró una diferencia estadísticamente significativa (P=0.018) con la prueba de Kruskal-Walis, en el índice de los anticuerpos IgG1 entre las primerizas tratadas con las porinas (Media del índice de variación = 3.85 IC 95% +/- 2.32) y las multíparas del grupo testigo (Media del índice de variación = 1.177 IC 95% +/- 0.512). Ver figura 15.

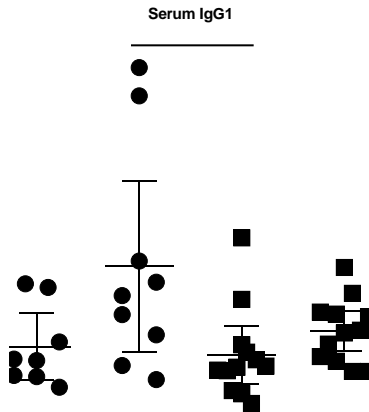


Figura 16. Anticuerpos anti-PED en suero detectados mediante la técnica de ELISA indirecta. Media e IC 95% del índice de anticuerpos IgG1 de los 4 grupos tratados (P=0.018).

En cuanto al calostro, en el análisis para los anticuerpos IgG totales se observaron diferencias estadísticas significativas entre grupos (P<0.01) por el método de Kruskal-Walis. En la prueba post-hoc se observa una diferencia entre el grupo de multíparas tratado con porinas (Media = 1229.25 µg/ml IC95% +/- 697.27) y los dos grupos de primerizas (Primeriza testigo: 94.5 µg/ml IC 95% +/- 88.5; primeriza tratada: 269.33 IC 95% +/- 255.1). Ver figura 16.

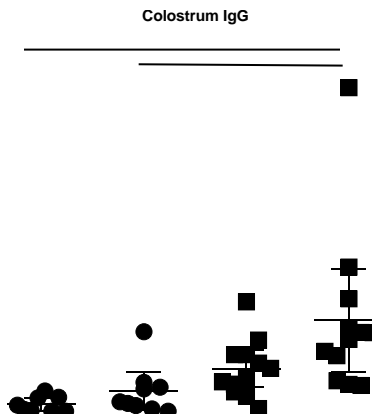


Figura 17. Anticuerpos anti-PED en calostro detectados mediante la técnica de ELISA indirecta (ug/ml). Media e IC 95% de anticuerpos IgG totales (µg/ml) de los cuatro grupos tratados. P<0.01

En los anticuerpos IgA también se observaron diferencias estadísticas en la distribución de los valores con el método de Kruskal-Walis ($P=0.007$). Sin embargo, no se observan diferencias en sus medias en la evaluación pos-hoc. Las medias y sus IC se describen en el cuadro 2 y la figura 17.

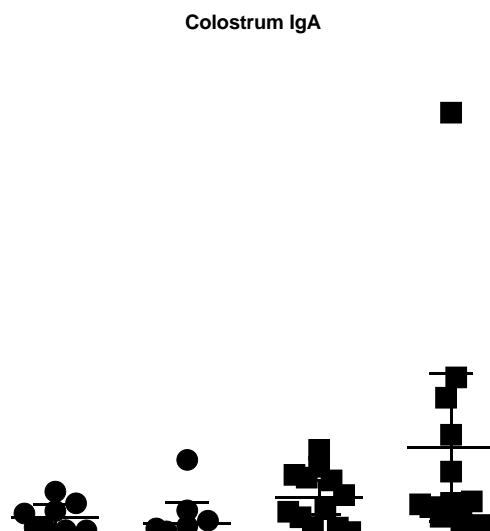


Figura 18. Anticuerpos anti-PED en calostro detectados mediante la técnica de ELISA indirecta ($\mu\text{g/ml}$). Media e IC 95% de anticuerpos IgA de los cuatro grupos tratados en el calostro. $P= 0.007$

Cuadro 2. Media e IC 95% de los anticuerpos IgA ($\mu\text{g/ml}$) anti PED en suero de calostro.

		Media	95% del intervalo de confianza para la media	
			Límite inferior	Límite superior
CallgA	Primeriza testigo	163.7500	89.1291	238.3709
	Primeriza porinas	126.4000	2.2457	250.5543
	Multípara testigo	283.9667	177.9550	389.9783
	Multípara porinas	588.5667	133.8814	1043.2519

En el caso de los anticuerpos IgG1 también se observaron diferencias estadísticas con una $P=0.002$, con la prueba de Kruskal- Walis. Posteriormente, en la evaluación pos-hoc se encontraron diferencias entre el grupo de multíparas tratadas (media= 58,837.83 $\mu\text{g/ml}$ IC 95% +/- 19,552.12) y los dos grupos de primerizas: primerizas testigo (media= 8,672 $\mu\text{g/ml}$

IC95% +/- 4,644.07) y primeriza tratada (media= 20,693.33 $\mu\text{g/ml}$ IC95% +/- 20,595.17). También se observaron diferencias entre las multíparas testigo (media= 46,129.5 $\mu\text{g/ml}$ IC95% +/- 23,118.64) y las primerizas testigo antes mencionadas. Ver figura 18.

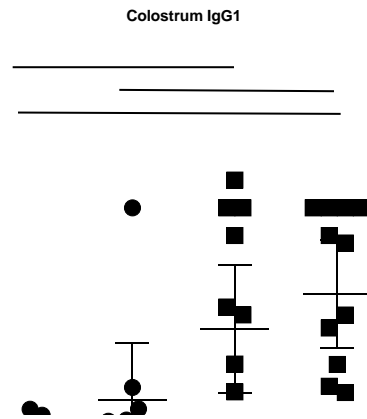


Figura 19. Anticuerpos anti-PED en calostro detectados mediante la técnica de ELISA indirecta ($\mu\text{g/ml}$). Media e IC 95% de anticuerpos IgG1 de los cuatro grupos tratados. $P < 0.01$

En el caso de la medición de IgG2 no se observaron diferencias significativas (Figura 19).

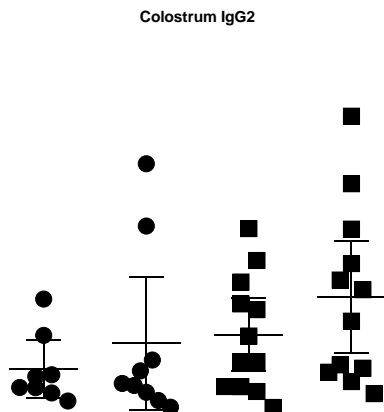


Figura 20. Anticuerpos anti-PED en suero detectados mediante la técnica de ELISA indirecta ($\mu\text{g/ml}$). Media e IC 95% de anticuerpos IgG2 de los cuatro grupos tratados. $P > 0.05$

7. Discusión

Los niveles de anticuerpos en el calostro de las hembras primerizas fueron menores a los de las hembras multíparas, a pesar de haber tenido dos inmunizaciones y la exposición al virus antes del parto. Además, se observó que el bajo título de anticuerpos correlaciona con el índice de seroneutralización, lo que sugiere que las hembras inmunizadas con este esquema de vacunación podrían no estar generando una respuesta protectora. Esto difiere de lo reportado por Paudel *et al.* (2014), quienes evaluaron la vacunación y revacunación de primerizas con 3 tipos de protocolos: primera y segunda inmunización con virus inactivado, primera y segunda inmunización con virus atenuado y por último la primera inmunización con virus activo y la segunda con virus inactivado, observando una mejor respuesta a la doble inmunización con vacuna de virus inactivado (Paudel *et al.*, 2014). Cabe señalar que en el estudio de Paudel *et al.* no evaluaron la capacidad neutralizante de los anticuerpos generados, ni se midió la protección conferida a su camada durante un brote. En nuestro trabajo, las hembras multíparas que estaban previamente expuestas y vacunadas presentaron un mayor título de anticuerpos en comparación con las hembras primerizas vacunadas y sin exposición previa al virus. Esto coincide con lo reportado por Schwartz, *et al.* (2016), que evaluó la eficacia de una vacuna de virus inactivo en diferentes grupos: hembras previamente expuestas al virus (vacunadas y no vacunadas) y hembras no expuestas al virus (vacunadas y no vacunadas). Schwartz, *et al.* (2016) reportan una diferencia en el suero entre todos los grupos, siendo el de las hembras expuestas y vacunadas el que presentó la media de anticuerpos IgG mayor. En cuanto a las IgA solo los grupos previamente expuestos tienen niveles por arriba del límite de positividad. Sin embargo, en el calostro, para alcanzar un buen título de anticuerpos (IgG e IgA) es necesaria la exposición al virus de campo independientemente de la vacunación. Esto se refleja en la mortalidad de los lechones, ya que en las cerdas no expuestas al virus esta fue del 100% (independientemente de la vacunación) y menor al 10% en el grupo previamente expuesto no vacunado (Schwartz, *et al.*, 2016). En nuestro estudio, la mortalidad de los lechones en las primerizas no fue del 100% en todas las camadas, pero si fue significativamente mayor que en la multíparas, lo que podría estar asociado a que no tuvieron exposición al virus de campo previo a la vacunación.

En las producciones porcinas el índice de hembras de reemplazo es alrededor del 20 % anual. Estas son sometidas a un periodo de cuarentena previo a su inmunización contra diversas enfermedades (incluida la PED). Si la inmunización no es efectiva, las hembras de reemplazo y su progenie se convierten en susceptibles a la enfermedad y los lechones neonatos pueden presentar una alta mortalidad y morbilidad (Kweon *et al.*, 2000). El calostro y la leche son la fuente de protección más importante para ellos, particularmente los anticuerpos neutralizantes (Langel *et al.*, 2016), por lo que en este estudio se evaluó la capacidad neutralizante del calostro de hembras primerizas y multíparas vacunadas,

encontrando que las primerizas tuvieron un menor índice de neutralización (IN=10.00) en comparación con las multíparas (IN= 26.16.). Además, se observó una correlación entre la seroneutralización y la técnica de ELISA de 0.86 similar a la descrita por Oh y colaboradores de 84.2 % al evaluar 1,024 muestras de suero (Oh *et al.*, 2005). Song *et al.* (2007) inmunizaron cerdas con una vacuna atenuada por la vía oral e intramuscular y encontraron que en el calostro los títulos de anticuerpos y su capacidad neutralizante se correlacionaban en ambos grupos. No obstante, al desafío de los lechones la mortalidad de aquellos provenientes de hembras vacunadas por la vía oral era del 13% y de los vacunados por la vía IM era del 60% (D. S. Song *et al.*, 2007). Esto podría deberse a la producción de IgA en los animales inmunizados por las mucosas y también podría explicar por qué en nuestro estudio las hembras que son expuestas al virus (multíparas) generan una mejor protección a su camada, semejante a la reportada por Song *et al.* (2007). Sin embargo, tendríamos que medir los niveles de IgA en las hembras para poder demostrarlo.

En nuestro estudio se observó una media de 50% de mortalidad en las primerizas y una media de 17.66% en las multíparas. Sin embargo, Rapp-Gabrielson y colaboradores (2014) realizaron un ensayo en una granja con un brote activo de PED administrando una vacuna de virus inactivado vs. un placebo, en el que se observó una reducción del 90% de la mortalidad entre el grupo vacunado y el placebo. No obstante, la mortalidad de lechones reportada para el grupo que recibió placebo fue del 6.3%, lo cual no parece reflejar las condiciones que se dan en un brote de campo como el de nuestro estudio. En algunos trabajos realizados por Mogler *et al.* (2014) y Crawford *et al.* (2015) reportan que las vacunas de subunidades reducen los signos clínicos y la excreción viral post desafío en cerdos destetados. En cerdas primerizas observaron que después de 3 inmunizaciones previas al parto y al desafío, la mortalidad de la camada disminuyó a un 69% en el grupo tratado con respecto al 91% del grupo control. En hembras previamente expuestas se obtuvieron resultados similares, con la disminución de la mortalidad de sus lechones del 59% a un 45% en las vacunadas. Dichos porcentajes de mortalidad son similares a los reportados en este estudio, no obstante, en el estudio referenciado la infección fue controlada y no en un brote natural (Crawford *et al.*, 2015; Mogler, *et al.*, 2014; Rapp-Gabrielson, *et al.* 2014).

Los resultados de nuestra investigación demostraron que existe una dependencia entre el factor mortalidad y el parto siendo mayor el riesgo en las hembras primerizas. Además, encontramos una diferencia estadística en el tiempo de supervivencia, aún cuando hubo camadas de hembras primerizas sin mortalidad. Se sabe que la principal fuente de infección en los lechones recién nacidos son las heces de su madre, por lo que la excreción viral en heces, junto con la cantidad de anticuerpos transferidos por las hembras, son determinantes en el desarrollo de la enfermedad en sus crías. Brown y colaboradores (2019)

reportaron la excreción viral de PED en primerizas de cuatro diferentes grupos tratados: sin previa exposición al virus (Control), un grupo con previa exposición al virus (Nv), un grupo con dos vacunaciones con virus inactivado antes del desafío (Pre) y un grupo con dos vacunaciones posteriores al desafío (Pos) y encontraron que solo el grupo con una exposición previa al virus acortaba el tiempo de excreción viral después del desafío observando menos del 10% de las hembras positivas a la tercera semana, con un riesgo relativo vs. el control del 4.022. Esto no se observó en los grupos de primerizas vacunados ya que más del 40% de las hembras continuaba excretando al virus en heces a la cuarta semana. Las variaciones de porcentajes de mortalidad en nuestro estudio se pudieron deber al momento de la infección de la hembra ya que la unidad de producción se encontraba en un brote activo no controlado (Brown *et al.*, 2019). Sin embargo, como no se determinó la carga viral de cada hembra al momento del parto, debido a que no se tomaron las muestras de heces, no podemos correlacionar esta variable con el título de anticuerpos y la mortalidad de los lechones.

En el ensayo inicial con el DLE observamos una disminución no estadística en el nivel de anticuerpos séricos en el grupo testigo después del parto, que no se observó en ninguno de los grupos tratados, Butler *et al.* (2006) refieren que la transportación selectiva de IgG de la sangre de la hembra en los últimos días de la gestación a las secreciones mamarias (calostro y leche) deja una marcada caída de los anticuerpos al parto, recuperándose paulatinamente semanas después del mismo (Butler *et al.*, 2006). Dicho evento, también descrito por Klobasa *et al.* (1985), no se observó en los animales tratados, debido a que el DLE no es un tratamiento específico para algún patógeno (Klobasa, F., Habe, F., Werhahn, E., & Butler, 1985). Es probable que el total de inmunoglobulinas de los cerdos tratados se mantuvieran constantes posterior al parto, pero se requieren estudios posteriores para verificar esta hipótesis.

En el ensayo que realizamos en los lechones con la vacuna anti-PED de Lapisa, que aparentemente no tiene adyuvante (ya que no se describe nada en su inserto) más que las porinas, se observó una diferencia entre grupos en la cantidad de anticuerpos IgG totales en suero a los 60 días postvacunación en los lechones. Toussi y colaboradores (2012) reportaron un aumento significativo de IgG e IgM a la semana 6 en ratones inmunizados con ovoalbúmina (OVA) sola y OVA más la porina FomA, diferencia similar a los obtenidos con OVA y aluminio. Pérez-Toledo *et al.* (2017) reportaron al día 30 postinmunización un aumento en los anticuerpos IgG en ratones inmunizados con OVA más porinas OmpC y Omp F de *S. typhi* en comparación con los inmunizados solo con OVA. En la inmunización con influenza H1N1 y porinas (Omp C y F) observaron un aumento de los anticuerpos IgG desde el día 20 y hasta el día 120 postinmunización comparable al obtenido con el adyuvante

aluminio (Pérez-Toledo *et al.*, 2017). Liu *et al.* (2008) describieron que las porinas PorB de *N. lactamica* inoculadas como adyuvantes de OVA aumentan la cantidad de IgG desde la semana 4 postinmunización en comparación con el control solo inmunizado con OVA y que su comportamiento es similar al del aluminio (Liu, Wetzler and Massari, 2008).

En el segundo muestreo de los lechones se observó un aumento de la IgA sérica, coincidiendo con el tiempo en el que estarían pariendo las cerdas si esta administración fuera en hembras gestantes. En humanos la IgA sérica es la segunda más abundante después de la IgG y se han estudiado sus funciones con mayor amplitud que en los cerdos. La IgA sérica funciona como una línea de defensa secundaria eliminando patógenos que atraviesan la mucosa, siendo capaz de inducir la fagocitosis (Snoeck, Peters and Cox, 2006). Así mismo, Van Egmond *et al.* (2000) observaron que las bacterias opsonizadas con la IgA sérica eran eliminadas por las células de Kupffer del hígado. Se encontró también que el entrecruzamiento con el receptor FcαR de la IgA unida a patógenos o complejos inmunes transmite señales de activación que conducen a la fagocitosis, estallido respiratorio, citotoxicidad dependiente de anticuerpos, un aumento en la presentación de antígenos y la degranulación y liberación de citocinas por parte de macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y eosinófilos (Van Egmond *et al.*, 2000; Monteiro, 2010).

En la estimulación de células de sangre periférica la producción de IFN γ fue menor en el grupo tratado a las 24 horas post estimulación. En cerdos se ha demostrado que las citocinas regulan el isotipo de IgG, ya que la IL10 recombinante sobre regula para la producción de IgG1, mientras que, IFN γ o IL2 recombinante sobre regulan la producción de IgG2 en células B cultivadas *in vitro*. Esto concuerda con lo encontrado en los ensayos con las porinas tanto en los lechones como en la granja, en el que vimos una menor producción de IFN γ y en las células estimuladas del grupo tratado en comparación del testigo y este mismo tratamiento en las cerdas generó una mayor producción de IgG1 en los grupos tratados (Crawley, Raymond and Wilkie, 2003).

Si bien en el ensayo con lechones y la vacuna sin adyuvante, no encontramos diferencias en la subclase de IgG producida, en el caso de los grupos de hembras a los que se les vacunó con la vacuna de Zoetis (que si reporta el uso de adyuvante o) observamos un índice mayor de IgG1 en primerizas tratadas en comparación con multíparas testigos en suero y una cantidad mayor de IgG1 en el calostro de las multíparas tratadas en comparación con las primerizas. Ya se han estudiado los efectos del aluminio como adyuvante en humanos y animales y se ha reportado una respuesta inmune de tipo Th2 dependiente de la presencia de IL4 e IL13 (HogenEsch, 2002), y un aumento de las inmunoglobulinas IgG1 e IgE (Lambrecht *et al.*, 2009). Sin embargo, los animales tratados con las porinas mostraron un mayor título de IgG1, en el ensayo ya mencionado de Toussi *et al.* (2012), en el que se observaron aumentadas las IgG en los ratones inmunizados con porinas, así como una

mayor cantidad de la subclase IgG1 en comparación con la IgG2b e IgG2c (Toussi, Liu and Massari, 2012). Así mismo Pérez-Toledo *et al.* (2017), encontraron una mayor cantidad de anticuerpos de la subclase IgG1 en cantidades similares a las producidas con aluminio, tanto en ratones inmunizados con OVA como en los inmunizados con influenza H1N1 (Pérez-Toledo *et al.*, 2017). Por sí solas, las porinas Omp C y F de *S. typhi* inoculadas en ratones, producen cantidades similares de IgG1 e IgG2b que resultan bactericidas contra *S. typhi* (Secundino *et al.*, 2006).

Se ha reportado que de los genes Cy transcritos en un cerdo el 50-80% de ellos son IgG1 (Butler and Wertz, 2006) siendo así la más abundante, al igual que en los humanos. En humanos la IgG1 es eficaz contra patógenos virales ya que se une a proteínas solubles y de membrana, también, se une eficazmente al C1q provocando citotoxicidad mediada por el complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Thomson, 2016).

En calostro se observaron las IgG totales e IgG1 elevadas en múltiparas tratadas en comparación con los dos grupos de primerizas (tratadas y testigos), esto corresponde a los hallazgos a nivel sérico, la IgG es transferida de la sangre hacia el calostro mediante el receptor FcRn lo que se observa posteriormente en una reducción de la cantidad de estas inmunoglobulinas a nivel sérico (Schnulle and Hurley, 2003; Butler *et al.*, 2006). Sin embargo, en las hembras múltiparas tratadas que presentaron mayor cantidad de anticuerpos calostrales no se ven disminuidos sus anticuerpos séricos, teniendo una media de incremento mayor a 2 veces lo obtenido antes del parto, dicho efecto no se observó en las múltiparas testigos donde su media de incremento fue de 1.1 (+/- 0.5).

Adicionalmente a la protección de la vacuna contra PED, se podría usar la vacuna con adyuvante de porinas contra la salmonelosis en cerdos. Liu *et al.* (2016) reportaron la reactividad cruzada entre las OMP de *S. typhimurium*, *S. enteritidis* y *S. choleraesuis* mediante la técnica de ELISA competitiva, usando suero de ratones inmunizados con las diferentes cepas y sensibilizando la placa con *S. typhimurium*, se observó una potente reacción cruzada de dos OMP mutantes de *S. typhimurium* contra *S. choleraesuis*. Para demostrar su eficacia realizaron un ensayo inmunizando ratones con las mutantes de las OMP de *S. typhimurium* y desafiando posteriormente con *S. choleraesuis*, observaron un 66.7% de supervivencia de los ratones posterior al desafío (Liu *et al.*, 2016). Estos antecedentes nos podrían indicar una protección parcial en los cerdos contra salmonelosis porcina, la cual además de ser una zoonosis, ocasiona pérdidas de 100 millones de dólares anuales en los Estados Unidos de Norteamérica (Gray and Fedorka-Cray, 2001) por lo que su control se vuelve esencial para las producciones porcinas.

8. Conclusiones

La administración de porinas junto con las vacunas LAPisa aumentó la cantidad de anticuerpos séricos IgG e IgA en lechones y disminuyó los niveles de IFN γ en células de sangre periférica.

La vacuna de Zoetis aplicada junto con las porinas en cerdas gestantes incrementó los niveles de IgG1 séricos y de IgG e IgA calostrales.

El DLE no mostró un efecto significativo sobre el título de anticuerpos en hembras gestantes vacunadas con PED (LApisa y Zoetis).

Las hembras primerizas tienen menores títulos de anticuerpos en calostro y un mayor número de mortalidad en sus camadas en comparación con las multíparas.

Debido a el aumento de anticuerpos encontrado en los ensayos con porinas se sugiere su uso en hembras primerizas para reducir la mortalidad en las granjas.

Se sugiere realizar el ensayo en una producción sin previa exposición al virus para comprobar si las porinas aumentan la cantidad de anticuerpos y posteriormente si los lechones desafiados con el virus aumentan su supervivencia, adicionalmente probar si las porinas protegen de forma paralela contra la salmonelosis porcina.

Se recomienda continuar con la investigación de las porinas en las cerdas gestantes; estimar la producción de anticuerpos en leche, además plantear la posibilidad de su administración por vía oral junto con el virus de PED inactivado para estimular diferentes vías inmunológicas. Aunado a esto, con los resultados obtenidos se puede estimar una función similar con otros agentes como el virus de influenza, parvovirus, circovirus, rubulavirus y diversas enfermedades que afectan a los cerdos. Si bien el costo de las porinas supera el de los adyuvantes clásicos, puede tener beneficios alternos en el control de la salmonelosis o la administración de vacunas múltiples con el mismo efecto que la vacunación individual, sin embargo, esta teoría se tendría que confirmar.

9. Referencias

- Alonso, C. *et al.* (2014) 'Evidence of infectivity of airborne porcine epidemic diarrhea virus and detection of airborne viral RNA at long distances from infected herds', *Veterinary Research*. doi: 10.1186/s13567-014-0073-z.
- de Arriba, M. L. *et al.* (2002) 'Lymphoproliferative responses and protection in conventional piglets inoculated orally with virulent or attenuated porcine epidemic diarrhoea virus', *Journal of Virological Methods*, 105(1), pp. 37–47. doi: 10.1016/S0166-0934(02)00063-0.
- Baudoux, P. *et al.* (1998) 'Coronavirus pseudoparticles formed with recombinant M and E proteins induce alpha interferon synthesis by leukocytes.', *Journal of virology*, 72(11), pp. 8636–8643.
- Belouzard, S. *et al.* (2012) 'Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein.', *Viruses*. doi: 10.3390/v4061011.
- Belouzard, S., Chu, V. C. and Whittaker, G. R. (2009) 'Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.0809524106.
- Boehme, K. *et al.* (2004) 'Innate Sensing of Viruses by Toll-Like Receptors MINIREVIEW Innate Sensing of Viruses by Toll-Like Receptors', *Journal of Virology*. doi: 10.1128/JVI.78.15.7867.
- Borghesi, J. *et al.* (2014) 'Immunoglobulin Transport during Gestation in Domestic Animals and Humans—A Review', *Open Journal of Animal Sciences*, 04(05), pp. 323–336. doi: 10.4236/ojas.2014.45041.
- Borkowsky, W. and Lawrence, H. S. (1981) 'Deletion of antigen-specific activity from leukocyte dialysates containing transfer factor by antigen-coated polystyrene', *The Journal of Immunology*.
- Bosch, B. J. *et al.* (2003) 'The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein : Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex', *Journal of virology*, 77(16), pp. 8801–8811. doi: 10.1128/JVI.77.16.8801.
- Brown, J. *et al.* (2019) 'Efficacy of a commercial porcine epidemic diarrhea virus vaccine at reducing duration of viral shedding in gilts', *Journal of Swine Health and Production*, 27(5), pp. 256–264.
- Butler, J. E. *et al.* (2006) 'Antibody repertoire development in swine', 30, pp. 199–221. doi: 10.1016/j.dci.2005.06.025.
- Butler, J. E. and Wertz, N. (2006) 'Antibody Repertoire Development in Fetal and Neonatal Piglets. XVII. IgG Subclass Transcription Revisited with Emphasis on New IgG3', *The Journal of Immunology*. doi: 10.4049/jimmunol.177.8.5480.
- Callebaut, P., Debouck, P. and Pensaert, M. (1982) 'Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of the coronavirus-like agent and its antibodies in pigs with porcine epidemic diarrhea', *Veterinary Microbiology*. doi: 10.1016/0378-1135(82)90009-8.
- Cao, L. *et al.* (2015) 'Porcine epidemic diarrhea virus inhibits dsRNA-induced interferon- β production in porcine intestinal epithelial cells by blockade of the RIG-I-mediated pathway', *Virology Journal*. doi: 10.1186/s12985-015-0345-x.

- Carrenõ, J. M. *et al.* (2017) 'c vaccination: A randomized clinical trial', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0178669.
- Carreño, J. M. *et al.* (2016) 'PLGA-microencapsulation protects Salmonella typhi outer membrane proteins from acidic degradation and increases their mucosal immunogenicity', *Vaccine*. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.05.036.
- Carvajal, A. *et al.* (1995) 'Evaluation of a blocking ELISA using monoclonal antibodies for the detection of porcine epidemic diarrhea virus and its antibodies.', *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* doi: 10.1177/104063879500700109.
- Cervantes-Barragán, L. *et al.* (2009) 'TLR2 and TLR4 signaling shapes specific antibody responses to Salmonella typhi antigens', *European Journal of Immunology*. doi: 10.1002/eji.200838185.
- Chang, S.-H. *et al.* (2002) 'Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus.', *Molecules and cells*, 14(2), pp. 295–299. doi: 10.1016/j.virol.2006.04.027.
- Channappanavar, R., Zhao, J. and Perlman, S. (2014) 'T cell-mediated immune response to respiratory coronaviruses', *Immunologic Research*. doi: 10.1007/s12026-014-8534-z.
- Chasey, D., & Cartwright, S. F. (1978) 'Virus-like particles associated with porcine epidemic diarrhoea', *Research in Veterinary Science*, 25(2), pp. 255–256.
- Chattha, K. S., Roth, J. a and Saif, L. J. (2014) 'Strategies for Design and Application of Enteric Viral Vaccines.', *Annual review of animal biosciences*, (September 2014), pp. 1–21. doi: 10.1146/annurev-animal-022114-111038.
- Chen J, Liu X, Shi D, Shi H, Zhang X, F. L. (2012) 'Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea virus variant', *Journal of Virology*, 86(6).
- Chen J, Wang C, Shi H, Qiu H, Liu S, Chen X, et al (2010) 'Molecular epidemiology of porcine epidemic diarrhea virus in China', *Archives of Virology*, 155, pp. 1471–1476.
- Chen, Q. *et al.* (2014) 'Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 disease outbreak among swine in the united states', *Journal of Clinical Microbiology*, 52(1), pp. 234–243. doi: 10.1128/JCM.02820-13.
- Clement, T., Singrey, A., Lawson, S., Okda, F., Nelson, J., Diel, D., Nelson, E., A., Christopher-Hennings, J. (2016) 'Measurement of neutralizing antibodies against porcine epidemic diarrhea virus in sow serum, colostrum, and milk samples and piglet serum samples after feedback', *Journal of Swine Health and Production*, 24(3), pp. 1–10.
- Coussement, W. *et al.* (1982) 'Pathology of Experimental CV777 Coronavirus Enteritis in Piglets. I. Histological and Histochemical Study', *Veterinary Pathology*. doi: 10.1177/030098588201900108.
- Crawford, K. *et al.* (2015) 'Evaluation of porcine epidemic diarrhea virus transmission and the immune response in growing pigs', *Veterinary Research*, 46(1), pp. 1–9. doi: 10.1186/s13567-015-0180-5.
- Crawford, K. *et al.* (2016) 'Status of vaccines for porcine epidemic diarrhea virus in the United States and Canada', *Virus Research*. Elsevier B.V., 226, pp. 108–116. doi: 10.1016/j.virusres.2016.08.005.
- Crawley, A., Raymond, C. and Wilkie, B. N. (2003) 'Control of immunoglobulin isotype production by porcine B-cells cultured with cytokines', *Veterinary Immunology and*

- Immunopathology*. doi: 10.1016/S0165-2427(02)00293-3.
- Crawley, A. and Wilkie, B. N. (2003) 'Porcine Ig isotypes : function and molecular characteristics', 21(December 2002), pp. 2911–2922. doi: 10.1016/S0264-410X(03)00142-7.
- Dam, S., Pagès, J. M. and Masi, M. (2018) 'Stress responses, outer membrane permeability control and antimicrobial resistance in enterobacteriaceae', *Microbiology (United Kingdom)*. doi: 10.1099/mic.0.000613.
- Debouck, P., Pensaert, M. and Coussement, W. (1981) 'The pathogenesis of an enteric infection in pigs, experimentally induced by the coronavirus-like agent, CV 777', *Veterinary Microbiology*. doi: 10.1016/0378-1135(81)90007-9.
- Dee, S. *et al.* (2015) 'An evaluation of porcine epidemic diarrhea virus survival in individual feed ingredients in the presence or absence of a liquid antimicrobial', *Porcine Health Management*. *Porcine Health Management*, 1(1), p. 9. doi: 10.1186/s40813-015-0003-0.
- Diao, L. and Meibohm, B. (2013) 'Pharmacokinetics and pharmacokinetic-pharmacodynamic correlations of therapeutic peptides', *Clinical Pharmacokinetics*, 52(10), pp. 855–868. doi: 10.1007/s40262-013-0079-0.
- Van Diep, N. *et al.* (2017) 'Novel porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) variants with large deletions in the spike (S) gene coexist with PEDV strains possessing an intact S gene in domestic pigs in Japan: A new disease situation', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0170126.
- Ding, Z. *et al.* (2014) 'Porcine Epidemic Diarrhea Virus Nucleocapsid Protein Antagonizes Beta Interferon Production by Sequestering the Interaction between IRF3 and TBK1', *Journal of Virology*, 88(16), pp. 8936–8945. doi: 10.1128/JVI.00700-14.
- Eckert, D. M. and Kim, P. S. (2001) 'Mechanisms of Viral Membrane Fusion and Its Inhibition', *Annual Review of Biochemistry*, 70(1), pp. 777–810. doi: 10.1146/annurev.biochem.70.1.777.
- Van Egmond, M. *et al.* (2000) 'FcαRI-positive liver Kupffer cells: Reappraisal of the function of immunoglobulin A in immunity', *Nature Medicine*. doi: 10.1038/76261.
- García-Hernández, U. *et al.* (2014) 'Dialyzable leukocyte extracts activate TLR-2 on monocytes', *Natural Product Communications*, 9(6), pp. 853–856. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84903608434&partnerID=tZ0tx3y1>.
- Gerdtts, V. and Zakhartchouk, A. (2017) 'Vaccines for porcine epidemic diarrhea virus and other swine coronaviruses', *Veterinary Microbiology*. Elsevier B.V., 206, pp. 45–51. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.11.029.
- Graham, R. L. and Baric, R. S. (2010) 'Recombination, Reservoirs, and the Modular Spike: Mechanisms of Coronavirus Cross-Species Transmission', *Journal of Virology*, 84(7), pp. 3134–3146. doi: 10.1128/JVI.01394-09.
- Gray, J. T. and Fedorka-Cray, P. J. (2001) 'Survival and infectivity of Salmonella Choleraesuis in swine feces', *Journal of Food Protection*. doi: 10.4315/0362-028X-64.7.945.
- Guo, L. *et al.* (2016) 'Porcine Epidemic Diarrhea Virus Infection Inhibits Interferon Signaling by Targeted Degradation of STAT1', *Journal of Virology*. doi: 10.1128/jvi.01091-16.
- de Haan, C. A. M., Vennema, H. and Rottier, P. J. M. (2000) 'Assembly of the coronavirus

envelope: homotypic interactions between the M proteins', *Journal of virology*, 74(11), pp. 4967–4978. doi: 10.1128/JVI.74.11.4967-4978.2000.Updated.

Hernández-Peralta, P. *et al.* (2014) 'El extracto leucocitario dializable aumenta la concentración de interferón gamma sérico en cerdos destetados', *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46(3), pp. 425–430. doi: 10.4067/S0301-732X2014000300012.

Hilchie, A. L., Wuerth, K. and Hancock, R. E. W. (2013) 'Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides', *Nature Chemical Biology*, 9(12), pp. 761–768. doi: 10.1038/nchembio.1393.

Hofmann, M. and Wyler, R. (1989) 'Quantitation, biological and physicochemical properties of cell culture-adapted porcine epidemic diarrhea coronavirus (PEDV)', *Veterinary Microbiology*, 20(2), pp. 131–142. doi: 10.1016/0378-1135(89)90036-9.

HogenEsch, H. (2002) 'Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants', *Vaccine*. doi: 10.1016/S0264-410X(02)00169-X.

Homberg, T. *et al.* (2015) 'The Adverse Event Profile in Patients Treated with Transferon TM (Dialyzable Leukocyte Extracts): A Preliminary Report', (February), pp. 65–74.

Horton, R. E. and Vidarsson, G. (2013) 'Antibodies and their receptors: Different potential roles in mucosal defense', *Frontiers in Immunology*. doi: 10.3389/fimmu.2013.00200.

Hou, X., Yu, L. and Liu, J. (2007) 'Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant nucleocapsid protein for detection of porcine epidemic diarrhea (PEDV) antibodies', 123, pp. 86–92. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.02.014.

Huang, Y. *et al.* (2013) 'Origin , Evolution , and Genotyping of Emergent Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strains in the United States', *mBio*, 4(5), pp. 1–8. doi: 10.1128/mBio.00737-13.Editor.

Juarez, P. (2011) *Effect of Transferon as an adjuvant in the treatment of osteosarcoma*. Instituto Politécnico Nacional.

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

Jung, K. and Saif, L. J. (2017) 'Goblet cell depletion in small intestinal villous and crypt epithelium of conventional nursing and weaned pigs infected with porcine epidemic diarrhea virus', *Research in Veterinary Science*. doi: 10.1016/j.rvsc.2016.10.009.

Kamau, A. N. *et al.* (2017) 'Porcine amino peptidase N domain VII has critical role in binding and entry of porcine epidemic diarrhea virus', *Virus Research*. Elsevier B.V., 227, pp. 150–157. doi: 10.1016/j.virusres.2016.10.004.

Kim, O. and Chae, C. (2003) 'Experimental infection of piglets with a Korean strain of porcine epidemic diarrhoea virus', *Journal of Comparative Pathology*. doi: 10.1016/S0021-9975(02)00170-6.

Kim, O., Chae, C. and Kweon, C.-H. (1999) 'Monoclonal Antibody-Based Immunohistochemical Detection of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Antigen in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Intestinal Tissues', *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. doi: 10.1177/104063879901100512.

Kim, S.-H. *et al.* (2015) 'Genetic characterization of porcine epidemic diarrhea virus in Korea from 1998 to 2013', *Archives of Virology*. doi: 10.1007/s00705-015-2353-y.

- Kim, S. H. *et al.* (2007) 'Multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and quantification of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus', *Journal of Virological Methods*, 146(1–2), pp. 172–177. doi: 10.1016/j.jviromet.2007.06.021.
- Kim, Y. S. and Ho, S. B. (2010) 'Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress', *Current Gastroenterology Reports*. doi: 10.1007/s11894-010-0131-2.
- Kirkpatrick, C. H. (2000) 'Transfer Factors : Identification of Conserved Sequences in Transfer Factor Molecules', *Molecular Medicine*.
- Klobasa, F., Habe, F., Werhahn, E., & Butler, J. E. (1985) 'Changes in the concentrations of serum IgG, IgA and IgM of sows throughout the reproductive cycle', *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 10(4), pp. 341–353.
- Kocherhans, R. *et al.* (2001) 'Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence', *Virus Genes*, 23(2), pp. 137–144. doi: 10.1023/A:1011831902219.
- Koebnik, R., Locher, K. P. and Van Gelder, P. (2000) 'Structure and function of bacterial outer membrane proteins: Barrels in a nutshell', *Molecular Microbiology*. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01983.x.
- Koh, H.-W. *et al.* (2015) 'Changes in the Swine Gut Microbiota in Response to Porcine Epidemic Diarrhea Infection', *Microbes and environments*. doi: 10.1264/jsme2.ME15046.
- Kokincakova T, Herich R, L. M. (2008) 'Effect of application of dialyzable leukocyte extract on experimental salmonellosis in chickens.', *Folia Veterinaria.*, 1, pp. 36–37.
- Krishnaveni, M. (2013) 'A review on transfer factor an immune modulator', *Drug Invention Today*. Elsevier, 5(2), pp. 153–156. doi: 10.1016/j.dit.2013.04.002.
- Kusanagi, K. *et al.* (1991) 'Isolation and serial propagation of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in cell culture and partial characterization of the isolate', *Nippon Institute for Biological Science*. doi: 10.1248/cpb.37.3229.
- Kweon, C. *et al.* (1993) 'Isolation of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in Korea', *Korean J Vet Res*.
- Kweon, C. *et al.* (2000) 'Immunoprophylactic effect of chicken egg yolk immunoglobulin (Ig Y) against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in piglets', *J Vet Med Sci*, pp. 961–964. doi: 10.1292/jvms.62.961.
- Lambrecht, B. N. *et al.* (2009) 'Mechanism of action of clinically approved adjuvants', *Current Opinion in Immunology*. doi: 10.1016/j.coi.2009.01.004.
- Langel, S. N. *et al.* (2016) 'Lactogenic immunity and vaccines for porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): Historical and current concepts', *Virus Research*. doi: 10.1016/j.virusres.2016.05.016.
- LAWRENCE, H. S. (1955) 'The transfer in humans of delayed skin sensitivity to streptococcal M substance and to tuberculin with disrupted leucocytes.', *The Journal of clinical investigation*. doi: 10.1172/JCI103075.
- Lawrence, P. K. *et al.* (2014) 'Genome Sequences of Porcine Epidemic Diarrhea Virus : In Vivo and In Vitro Phenotypes', *Genome Announcements*, 2(3), pp. 2013–2014. doi: 10.1128/genomeA.00503-14.Copyright.
- Lee, C. (2015) 'Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic

- swine virus', *Virology Journal*. *Virology Journal*, 12(1), p. 193. doi: 10.1186/s12985-015-0421-2.
- Lee, D. K. *et al.* (2010) 'Heterogeneity in spike protein genes of porcine epidemic diarrhea viruses isolated in Korea', *Virus Res*. doi: 10.1016/j.virusres.2010.01.015.
- Li, F. (2015) 'Receptor Recognition Mechanisms of Coronaviruses: a Decade of Structural Studies', *Journal of Virology*, 89(4), pp. 1954–1964. doi: 10.1128/JVI.02615-14.
- Li, W. *et al.* (2012) 'New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011', *Emerging Infectious Diseases*, 18(8), pp. 1350–1353. doi: 10.3201/eid1808.120002.
- Li, W. *et al.* (2016) 'Cellular entry of the porcine epidemic diarrhea virus', *Virus Research*. Elsevier B.V., 226, pp. 117–127. doi: 10.1016/j.virusres.2016.05.031.
- Li, Z. *et al.* (2013) 'Sequence and phylogenetic analysis of nucleocapsid genes of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) strains in China', *Archives of Virology*, 158(6), pp. 1267–1273. doi: 10.1007/s00705-012-1592-4.
- Lin, C.-M. *et al.* (2015) 'Antigenic Relationships among Porcine Epidemic Diarrhea Virus and Transmissible Gastroenteritis Virus Strains', *Journal of Virology*. doi: 10.1128/JVI.03196-14.
- LIN, C.-N. *et al.* (2014) 'US-Like Strain of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Outbreaks in Taiwan, 2013–2014', *Journal of Veterinary Medical Science*. doi: 10.1292/jvms.14-0098.
- Lin, J., Huang, S. and Zhang, Q. (2002) 'Outer membrane proteins: Key players for bacterial adaptation in host niches', *Microbes and Infection*. doi: 10.1016/S1286-4579(02)01545-9.
- Liu, C. *et al.* (2015) 'Receptor usage and cell entry of porcine epidemic diarrhea coronavirus', *J Virol*, 89(11), pp. 6121–6125. doi: 10.1128/jvi.00430-15.
- Liu, Qiong *et al.* (2016) 'Outer membrane vesicles derived from Salmonella Typhimurium mutants with truncated LPS induce cross-protective immune responses against infection of Salmonella enterica serovars in the mouse model', *International Journal of Medical Microbiology*. doi: 10.1016/j.ijmm.2016.08.004.
- Liu, X., Wetzler, L. M. and Massari, P. (2008) 'The PorB porin from commensal *Neisseria lactamica* induces Th1 and Th2 immune responses to ovalbumin in mice and is a potential immune adjuvant', *Vaccine*. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.11.080.
- Lopez-Huerta, C. (2013) *Evaluación del efecto inmunomodulador del extracto dializable de leucocitos (DLE) en lechones infectados con Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV)*. Instituto Politécnico Nacional.
- Lowe, J. *et al.* (2014) 'Role of transportation in spread of porcine epidemic diarrhea virus infection, United States', *Emerging Infectious Diseases*. doi: 10.3201/eid2005.131628.
- Luan, Y. and Xu, W. (2007) 'The Structure and Main Functions of Aminopeptidase N', *Current Medicinal Chemistry*, 14(6), pp. 639–647. doi: 10.2174/092986707780059571.
- Luna-Baca (2007) 'Immunological Study of Patients with Herpetic Stromal Keratitis Treated with Dialyzable Leukocyte Extracts', (January), pp. 67–71.
- Madson, D. M. *et al.* (2014) 'Pathogenesis of porcine epidemic diarrhea virus isolate (US/Iowa/18984/2013) in 3-week-old weaned pigs', *Veterinary Microbiology*. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.09.002.
- Martelli, P. *et al.* (2008) 'Epidemic of diarrhoea caused by porcine epidemic diarrhoea virus in Italy', *Veterinary Record*. doi: 10.1136/vr.162.10.307.
- McBride, R., van Zyl, M. and Fielding, B. C. (2014) 'The coronavirus nucleocapsid is a

multifunctional protein', *Viruses*, 6(8), pp. 2991–3018. doi: 10.3390/v6082991.

Medina-Rivero, E. *et al.* (2016) 'Physicochemical Characteristics of Transferon™ Batches', *BioMed Research International*. doi: 10.1155/2016/7935181.

Merchand-Reyes, G. *et al.* (2015) 'Swine Dialyzable Spleen Extract as Antiviral Prophylaxis', *Journal of Medicinal Food*. doi: 10.1089/jmf.2014.0176.

Mogler, M.A., Gander, J.R., Ray, D.D., Harris, D. L. (2014) 'Vaccination of PEDV-naïve dams with replicon RNA particle vaccine protects suckling piglets from challenge', in *2014 North American PRRS Symposium*.

Monteiro, R. C. (2010) 'Role of IgA and IgA Fc receptors in inflammation', *Journal of Clinical Immunology*. doi: 10.1007/s10875-009-9338-0.

Moreno-Eutimio, M. A. *et al.* (2013) 'Salmonella Typhi OmpS1 and OmpS2 porins are potent protective immunogens with adjuvant properties', *Immunology*. doi: 10.1111/imm.12093.

van Nieuwstadt, A. P., Cornelissen, J. B. and Vreeswijk, J. (1988) 'Solid phase immune electron microscopy for diagnosis of transmissible gastroenteritis in pigs', *Res Vet Sci*.

Oh, J. S. *et al.* (2005) 'Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay with serum neutralization test for serodiagnosis of porcine epidemic diarrhea virus infection', *J Vet Sci*. doi: 200512349 [pii].

Ojeda, M. O. *et al.* (2005) 'Dialyzable Leukocyte Extract differentially regulates the production of TNF α , IL-6, and IL-8 in bacterial component-activated leukocytes and endothelial cells', *Inflammation Research*, 54(2), pp. 74–81. doi: 10.1007/s00011-004-1326-5.

Olanratmanee, E. on, Kunavongkrit, A. and Tummaruk, P. (2010) 'Impact of porcine epidemic diarrhea virus infection at different periods of pregnancy on subsequent reproductive performance in gilts and sows', *Animal Reproduction Science*. Elsevier B.V., 122(1–2), pp. 42–51. doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.07.004.

Paarlberg, P. L. (2014a) 'Updated Estimated Economic Welfare Impacts of Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV)', *Dept. of A*.

Paarlberg, P. L. (2014b) 'Updated Estimated Economic Welfare Impacts of Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV)', *Dept. A*, pp. 1–38.

Park, C. K. and Lee, C. H. (2009) 'Clinical examination and control measures in a commercial pig farm persistently infected with porcine epidemic diarrhea(PED) virus', *Journal of Veterinary Clinics*.

Park, J. E., Cruz, D. J. M. and Shin, H. J. (2011) 'Receptor-bound porcine epidemic diarrhea virus spike protein cleaved by trypsin induces membrane fusion', *Archives of Virology*, 156(10), pp. 1749–1756. doi: 10.1007/s00705-011-1044-6.

Park, J. E., Cruz, D. J. M. and Shin, H. J. (2014) 'Clathrin- and serine proteases-dependent uptake of porcine epidemic diarrhea virus into Vero cells', *Virus Research*. Elsevier B.V., 191(1), pp. 21–29. doi: 10.1016/j.virusres.2014.07.022.

Park, J. E. and Shin, H. J. (2014) 'Porcine epidemic diarrhea virus infects and replicates in porcine alveolar macrophages', *Virus Research*. Elsevier B.V., 191(1), pp. 143–152. doi: 10.1016/j.virusres.2014.07.038.

Park, S. J. *et al.* (2008) 'Cloning and further sequence analysis of the ORF3 gene of wild- and attenuated-type porcine epidemic diarrhea viruses', *Virus Genes*, 36(1), pp. 95–104.

doi: 10.1007/s11262-007-0164-2.

Pasick, J. *et al.* (2014) '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*. doi: 10.1111/tbed.12269.

Paudel, S. *et al.* (2014) 'Evaluation of antibody response of killed and live vaccines against porcine epidemic diarrhea virus in a field study', *Veterinary Quarterly*. Taylor & Francis, 34(4), pp. 194–200. doi: 10.1080/01652176.2014.973999.

Pensaert, M. B. and de Bouck, P. (1978) 'A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine', *Archives of Virology*, 58(3), pp. 243–247. doi: 10.1007/BF01317606.

Pérez-Toledo, M. *et al.* (2017) 'Salmonella typhi porins OmpC and OmpF are potent adjuvants for T-dependent and T-independent antigens', *Frontiers in Immunology*. doi: 10.3389/fimmu.2017.00230.

Pijpers, A. *et al.* (1993) 'Porcine epidemic diarrhoea virus as a cause of persistent diarrhoea in a herd of breeding and finishing pigs.', *The Veterinary record*. doi: 10.1136/vr.132.6.129.

Pineda, B. *et al.* (2005) 'Interstitial transfer factor as adjuvant immunotherapy for experimental glioma.', *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*.

Pospischil, A., Stuedli, A. and Kiupel, M. (2002) 'Diagnostic notes Update on porcine epidemic diarrhea', *Journal Of Swine Health And Production*, 10(2), pp. 81–85.

Puranaveja, S. *et al.* (2009) 'Chinese-like strain of porcine epidemic diarrhea virus, Thailand', *Emerging Infectious Diseases*. doi: 10.3201/eid1507.081256.

Ramírez-Ramírez, D. *et al.* (2016) 'Early Differentiation of Human CD11c⁺NK Cells with $\gamma\delta$ T Cell Activation Properties Is Promoted by Dialyzable Leukocyte Extracts', *Journal of Immunology Research*, 2016. doi: 10.1155/2016/4097642.

Rapp-Gabrielson, VJ., Frederickson, DF., Bandrick, M., Taylor, LP., Marx, J., E. al. (2014) 'Field efficacy of an experimental Porcine Epidemic Diarrhea (PED) vaccine administered to pregnant sows', in *2014 North American PRRS Symposium*.

Robledo-Ávila, F. *et al.* (2013) 'Low-dose amphotericin b and murine dialyzable spleen extracts protect against systemic candida infection in mice', *Clinical and Developmental Immunology*, 2013. doi: 10.1155/2013/194064.

Rodák, L. *et al.* (2005) 'An ELISA optimized for porcine epidemic diarrhoea virus detection in faeces', *Veterinary Microbiology*. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.09.020.

Salinas-Jazmin, N. *et al.* (2015) 'Herpes murine model as a biological assay to test dialyzable leukocyte extracts activity', *Journal of Immunology Research*. doi: 10.1155/2015/146305.

Sanchez, H. (2016) *Efecto del extracto dializable leucocitaria en lechones infectados con el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino en un granja de crianza intensiva en hidalgo, México*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Sawattrakool, K. Stott, Christopher. Bandalaria-Marca, R.D. Temeeyasen, Gun. Srijangwad, A. Palabrica, D.J. Nilubol, D. (2017) 'Field trial evaluating the efficacy of porcine epidemic diarrhea vaccine, RNA (Harris vaccine) in the Philippines.', *Thai J Ved Med*, 47(March).

Schnulle, P. M. and Hurley, W. L. (2003) 'Sequence and expression of the FcRn in the porcine mammary gland', *Veterinary Immunology and Immunopathology*. doi: 10.1016/S0165-2427(02)00294-5.

- Schwartz, K. *et al.* (2014) 'Exposing sows to PEDV to build herd immunity', *National Hog Farmer*.
- Schwartz, T. J. *et al.* (2016) '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', *American Association of Swine Veterinarians*, pp. 363–366. Available at: https://www.aasv.org/foundation/research/Schwartz_QReport_2015_12.pdf.
- Secundino, I. *et al.* (2006) 'Salmonella porins induce a sustained, lifelong specific bactericidal antibody memory response', *Immunology*. doi: 10.1111/j.1365-2567.2005.02263.x.
- Shi, D. *et al.* (2014) 'Molecular characterizations of subcellular localization signals in the nucleocapsid protein of porcine epidemic diarrhea virus', *Viruses*, 6(3), pp. 1253–1273. doi: 10.3390/v6031253.
- Shi, D. *et al.* (2017) 'Nucleocapsid Interacts with NPM1 and Protects it from Proteolytic Cleavage, Enhancing Cell Survival, and is Involved in PEDV Growth', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 7(678), p. 39700. doi: 10.1038/srep39700.
- Shibata, I. *et al.* (2000) 'Isolation of porcine epidemic diarrhea virus in porcine cell cultures and experimental infection of pigs of different ages.', *Veterinary microbiology*, 72(3–4), pp. 173–82. doi: 10.1016/S0378-1135(99)00199-6.
- Shibata, I., Ono, M. and Mori, M. (2001) 'Passive protection against porcine epidemic diarrhea (PED) virus in piglets by colostrum from immunized cows.', *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*. doi: 10.1292/jvms.63.655.
- Shirato, K. *et al.* (2011) 'Role of Proteases in the Release of Porcine Epidemic Diarrhea Virus from Infected Cells', *Journal of Virology*, 85(15), pp. 7872–7880. doi: 10.1128/JVI.00464-11.
- Snijder E. J., S. W. J. M. (2006) 'Arteriviruses', in *Fields Virology*., pp. 1337–1355.
- Snoeck, V., Peters, I. R. and Cox, E. (2006) 'The IgA system: A comparison of structure and function in different species', *Veterinary Research*. doi: 10.1051/vetres:2006010.
- Song, D., Moon, H. and Kang, B. (2015) 'Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines', *Clinical and Experimental Vaccine Research*. doi: 10.7774/cevr.2015.4.2.166.
- Song, D. and Park, B. (2012) 'Porcine epidemic diarrhoea virus: A comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines', *Virus Genes*, 44(2), pp. 167–175. doi: 10.1007/s11262-012-0713-1.
- Song, D. S. *et al.* (2003) 'Differentiation of a Vero cell adapted porcine epidemic diarrhea virus from Korean field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF 3', *Vaccine*, 21(17–18), pp. 1833–1842. doi: 10.1016/S0264-410X(03)00027-6.
- Song, D. S. *et al.* (2007) 'Oral efficacy of Vero cell attenuated porcine epidemic diarrhea virus DR13 strain', *Research in Veterinary Science*. doi: 10.1016/j.rvsc.2006.03.007.
- Stevenson, G. W. *et al.* (2013) 'Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: Clinical signs, lesions, and viral genomic sequences', *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25(5), pp. 649–654. doi: 10.1177/1040638713501675.
- Sueyoshi, M. *et al.* (1995) 'An immunohistochemical investigation of porcine epidemic

diarrhoea', *Journal of Comparative Pathology*. doi: 10.1016/S0021-9975(05)80069-6.

Tamm, L. K., Arora, A. and Kleinschmidt, J. H. (2001) 'Structure and Assembly of β -Barrel Membrane Proteins', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.R100021200.

Tang, X. C. *et al.* (2006) 'Prevalence and Genetic Diversity of Coronaviruses in Bats from China', *Journal of Virology*. doi: 10.1128/JVI.00697-06.

Temeeyasen, G. *et al.* (2014) 'Genetic diversity of ORF3 and spike genes of porcine epidemic diarrhea virus in Thailand', *Infection, Genetics and Evolution*. Elsevier B.V., 21, pp. 205–213. doi: 10.1016/j.meegid.2013.11.001.

Thiel, V. and Siddell, S. G. (2005) *Current topics in microbiology and immunology. Coronavirus replication and reverse genetics*, *Current topics in microbiology and immunology*.

Thomson, C. A. (2016) 'IgG Structure and Function', in *Encyclopedia of Immunobiology*. doi: 10.1016/B978-0-12-374279-7.05002-5.

Thulasingham, M. *et al.* (2017) 'Characterization of Salmonella typhi OmpC and OmpF porins engineered with HIV-gp41 epitope on the surface loops', *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*. doi: 10.1002/prot.25246.

Torres, M. (1994) *Efecto del factor de transferencia específico en contra de Actinobacillus pleuroneumoniae serotipo 5 y Pasteurella multocida A, en cerdos*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Toussi, D. N., Liu, X. and Massari, P. (2012) 'The FomA porin from Fusobacterium nucleatum is a toll-like receptor 2 agonist with immune adjuvant activity', *Clinical and Vaccine Immunology*. doi: 10.1128/CVI.00236-12.

Trujillo-Ortega, M. E. *et al.* (2016) 'Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea virus associated with the 2014 disease outbreak in Mexico: Case report', *BMC Veterinary Research*. BMC Veterinary Research, 12(1), pp. 8–10. doi: 10.1186/s12917-016-0763-z.

Vallejo-Castillo, L. *et al.* (2020) 'Sequencing Analysis and Identification of the Primary Peptide Component of the Dialyzable Leukocyte Extract "Transferon Oral": The Starting Point to Understand Its Mechanism of Action', *Frontiers in Pharmacology*. doi: 10.3389/fphar.2020.569039.

Vlasova, A. N. *et al.* (2014) 'Distinct characteristics and complex evolution of pedv strains, North america, May 2013–february 2014', *Emerging Infectious Diseases*. doi: 10.3201/eid2010.140491.

Wang, J. *et al.* (2013) 'Porcine epidemic diarrhea virus variants with high pathogenicity, China', *Emerging Infectious Diseases*. doi: 10.3201/eid1912.121088.

Wang, K. *et al.* (2012) 'PEDV ORF3 encodes an ion channel protein and regulates virus production', *FEBS Letters*, 586(4), pp. 384–391. doi: 10.1016/j.febslet.2012.01.005.

Weng, L. *et al.* (2016) 'An economic evaluation of intervention strategies for Porcine Epidemic Diarrhea (PED)', *Preventive Veterinary Medicine*. Elsevier B.V., 134, pp. 58–68. doi: 10.1016/j.prevetmed.2016.09.018.

Wetzler, L. M. (2010) 'Innate immune function of the neisserial porins and the relationship to vaccine adjuvant activity', *Future Microbiology*. doi: 10.2217/fmb.10.41.

Wicht, O. *et al.* (2014) 'Proteolytic Activation of the Porcine Epidemic Diarrhea Coronavirus Spike Fusion Protein by Trypsin in Cell Culture', *Journal of Virology*, 88(14),

pp. 7952–7961. doi: 10.1128/JVI.00297-14.

Woo, P. C. Y. *et al.* (2012) 'Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavi', *Journal of Virology*, 86(7), pp. 3995–4008. doi: 10.1128/JVI.06540-11.

Xing, Y. *et al.* (2013) 'The papain-like protease of porcine epidemic diarrhea virus negatively regulates type I interferon pathway by acting as a viral deubiquitinase', *Journal of General Virology*. doi: 10.1099/vir.0.051169-0.

Xu, X., Zhang, H., Zhang, Q., Dong, J., *et al.* (2013) 'Porcine epidemic diarrhea virus E protein causes endoplasmic reticulum stress and up-regulates interleukin-8 expression.', *Virology journal*, 10, p. 26. doi: 10.1186/1743-422X-10-26.

Xu, X., Zhang, H., Zhang, Q., Huang, Y., *et al.* (2013a) 'Porcine epidemic diarrhea virus N protein prolongs S-phase cell cycle, induces endoplasmic reticulum stress, and up-regulates interleukin-8 expression', *Veterinary Microbiology*. Elsevier B.V., 164(3–4), pp. 212–221. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.01.034.

Xu, X., Zhang, H., Zhang, Q., Huang, Y., *et al.* (2013b) 'Porcine epidemic diarrhea virus N protein prolongs S-phase cell cycle, induces endoplasmic reticulum stress, and up-regulates interleukin-8 expression', *Veterinary Microbiology*. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.01.034.

Xu, X. G. *et al.* (2013) 'Porcine epidemic diarrhea virus E protein causes endoplasmic reticulum stress and up-regulates interleukin-8 expression', *Virology Journal*. doi: 10.1186/1743-422X-10-26.

Zhang, Q. *et al.* (2017) 'Type III Interferon Restriction by Porcine Epidemic Diarrhea Virus and the Role of Viral Protein nsp1 in IRF1 Signaling', *Journal of Virology*, 92(4), p. JVI.01677-17. doi: 10.1128/JVI.01677-17.

Zhang, Q., Shi, K. and Yoo, D. (2016) 'Suppression of type I interferon production by porcine epidemic diarrhea virus and degradation of CREB-binding protein by nsp1', *Virology*. Elsevier, 489, pp. 252–268. doi: 10.1016/j.virol.2015.12.010.

Zhang, Z. *et al.* (2012) 'Identification of a conserved linear B-cell epitope in the M protein of porcine epidemic diarrhea virus', *Virology Journal*. *Virology Journal*, 9(1), p. 1. doi: 10.1186/1743-422X-9-225.

Anexos

ANEXO A Ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos totales (IgG) anti PED en suero y calostro

Para sensibilizar la placa de ELISA se aisló el virus como a continuación se describe:

- Se utilizaron células de riñón de mono verde africano (VERO) pase 13 mantenidas en medio "Dulbecco's Modified Eagle Medium" (DMEM) mas 10 % de suero fetal bovino irradiado a 37 ° C con 5% de CO₂.
- Una muestra positiva a PEDv mediante PCR fue macerada con 500 ul de DMEM y filtrada, se inoculó en células VERO (pase 27) con medio DMEM suplementado con 10 ugr/ml de tripsina y 1% de penicilina-estreptomicina (medio de infección). Se dejó en incubación por 48 horas observándolo diario en busca del efecto citopático característico (sincitios). Después del periodo de incubación se pasaron 500 ul del sobrenadante a otro cultivo de células VERO con medio de infección. Dicho procedimiento fue realizado en 3 ocasiones observando efecto citopático en el cuarto pase del virus, se continuó con los pases hasta llegar al octavo en el cual se observa el mayor efecto citopático con la monocapa al 50% de sincitios a las 48 horas y el desprendimiento celular a las 72 horas.

Para poder determinar la cantidad de anticuerpos en el ensayo se elaboró una curva de detección precipitando las proteínas de sueros de hembras múltiparas inmunizadas contra el virus de PED en repetidas ocasiones, se realizó la precipitación de la siguiente forma:

- A 3 ml de suero se le agregaron 1.5 ml de sulfato de amonio (solución saturada) en agitación por 10 minutos, posteriormente la solución lechosa se centrifugó a 3500 rpm a 4°C por 15 minutos, el pellet se reconstituyó en 3 ml de PBS.
- Este procedimiento se repitió dos veces más y al final se reconstituyó el 1.5 ml de PBS.
- El concentrado se introdujo en una membrana y se dializó en SSF por dos días o hasta no encontrar rastros del sulfato de amonio.
- Al finalizar el dializado se cuantificó la cantidad de proteína en el concentrado.

ELISA:

Para obtener el suero del calostro se centrifugó a 6000g por 60 minutos a 4°C y se tomó la parte media evitando la grasa superficial y los desechos del fondo, el suero de calostro obtenido se inactivó a 56°C por 30 minutos al igual que el suero sanguíneo.

Se sensibilizó una placa de 96 pozos Maxisorp con el virus de PED proveniente del aislamiento viral antes descrito, que se encontraba a una concentración proteica de 169 ug/ml. Cada pozo se sensibilizó a una dosis de 0.5 ug por pozo en 50 ul de buffer de carbonatos, la placa se incubó por 18hs a 4°C. Pasado el tiempo de incubación se lavó la

placa 4 veces con solución de lavado (PBS+Tween 0.5%). La placa fue bloqueada por una hora con 50 ul de BSA al 1% en solución de fosfatos a 30°C y posteriormente se lavó 4 veces con solución de lavado. Se añadió por pozo 50 ul de muestra (calostro diluido 1/300 y 1/200 en caso del suero), se incubó a 30°C por dos horas. La placa fue lavada 4 veces con solución de lavado. El conjugado secundario (Proteína A HRP) se adicionó a una dilución 1/8000 en el calostro y 1/4000 en suero en 50 ul de solución de fosfatos incubándolo por 1 hora a 30°C. Se lavó la placa 4 veces y finalmente se añadió 100 ul de TMB. La lectura se realizó 20 minutos posterior a la aplicación del TMB con un filtro de 650 nm.

Para determinar la cantidad aproximada de anticuerpos en cada suero se utilizó el concentrado de anticuerpos procesado previamente, haciendo al menos 10 diferentes concentraciones por cada ensayo y extrapolando los resultados a una curva sigmoidea creada con el programa AssayZap. La curva de detección de anticuerpos precipitados se realizó a partir de 50 ug/ml hasta 0.05 ug/ml diluidos en solución de fosfatos con una base de calostro negativo diluida en 1/600 en el caso de calostro, en el caso del suero no se utilizó una matriz en la curva. La curva debía tener un BO superior a 0.8 analizado mediante el programa.

ANEXO B Prueba de reducción de placas por neutralización

- Se tituló el pase 6 del virus (aislado descrito en el ANEXO A) por la técnica de unidades formadora de placa (UFP). En una placa de 12 pozos se sembraron 100,000 células por pozo con medio DMEM con SFB al 10%, 24 horas después con el 80% de confluencia se les retiró el medio y se inocularon 500 ul de medio de infección con las diluciones 1:10, 1:20, 1:100, 1:200 y 1:1000 del virus. Se dejó el inóculo por 2 horas y posteriormente se retiró y se añadió un ml de medio de infección (DMEM suplementado con 10 ugr/ml de tripsina y 1% de penicilina-estreptomicina) al 1.5% de carboximetilcelulosa. La placa se incubó por 96 horas y se retiró el medio con formol absoluto por dos horas a 4°C, se descartó el formol y se fijaron con formol al 10% por 20 minutos a temperatura ambiente y se tiñeron con cristal violeta. Se encontró un título de 100 UFP a una dilución de 1:221.
- El ensayo de reducción de placas se realizó con las diluciones del suero de calostro de 1/8 a 1/128, se tomaron 250 ul de suero y 250 ul de la dilución correspondiente a 50 UFP del virus, se incubaron juntos por 30 minutos, esta mezcla se inocula a un pozo de una placa de 12 pozos con 80% de confluencia y se deja incubar por dos horas. Una vez concluido el periodo de incubación se retira el inóculo y se adiciona medio de infección con 1.5% de carboximetilcelulosa dejándose incubar por 96 horas y se retiró el medio como se describió en la titulación.
- La placa se tiñe y se contabilizan las placas, las cuales se comparan con el control del virus y se hace una relación de porcentaje.

ANEXO C Reacción en cadena de la polimerasa punto final y tiempo real para la detección del virus de la PED

Con el programa Primer3 y utilizando la secuencia reportada en el Genbank (KR265766) del genoma de la proteína N, se diseñaron oligonucleótidos con las siguientes características:

Secuencia	Longitud	TM	Tamaño del producto
5'-GAATGCAAAACCCAGAGAA-3'	20 pb	45°	156 pb
5'-GTGTCACCACCATCAACAGC-3'	20pb	56°	

Los oligonucleótidos se compararon con una prueba previamente estandarizada y se corrieron con el tejido positivo y el aislamiento viral. Se utilizó la enzima “Verso 1-step RT-PCR ReddyMix” (AB1454LDA) como indica su protocolo. Las muestras fueron amplificadas utilizando un programa que incluía 50° por 30 minutos, 95° por 15 minutos y 35 ciclos de desnaturalización a 95° por 30 segundos, alineación a 56° por 30 segundos y extensión a 72° por 1 minuto, ya terminados los 35 ciclos se da un periodo de extensión final de 72° por 10 minutos. Finalmente, se corría el producto de PCR en un gel de agarosa al 2% para revisar la presencia de la banda correspondiente.

Se clonó el fragmento de PCR en un vector TOPO 2.1 (TOPO TA Cloning Kit Cat. K450002) para usarlo como estándar en el qPCR. Brevemente, al terminar la extensión final del PCR se adicionó in ul de Taq y se incubó 10 minutos a 72°. El producto fue cuantificado con el equipo “Quibit fluorometer” dando 3.84 ug/ml. Se realizó una mezcla de reacción con 1 ul de vector TOPO, 1 ul de solución de sal, 2.5 ul de producto de PCR y 1.5 ul de agua, la mezcla fue incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. Se adicionaron 2 ul de la mezcla a 100 ul de células competentes DH5a, incubándose en hielo por 20 minutos, posteriormente 60 segundos en baño María a 42° y de nuevo en hielo por 5 minutos. Se agregan 250 ul de SOC media y se dejan en agitación a 37°C por una hora. En una caja de agar LB con ampicilina, IPTG y Xgal se esparcieron 100 ul de células competentes transformadas y se dejan incubando a 37° por 16 horas. Después del periodo de incubación las cajas fueron revisadas en busca de colonias blancas, se observaron dos colonias blancas las cuales fueron propagadas en medio LB líquido con ampicilina.

El plásmido fue extraído con el kit “QIAprep Spin Miniprep Kit” (27104) siguiendo el protocolo indicado por le kit, brevemente:

- Resuspender el pellet bacteriano en 250 ul de buffer P1 y transferirlo a un tubo para microcentrífuga.
- Agregar 250 ul de buffer P2 y mezclar por inversión de 4 a 6 veces.
- Agregar 350 ul buffer N3 y mezclar por inversión de 4 a 6 veces.
- Centrifugar por 10 minutos a 13,000 rpm.
- Tomar el sobrenadante y ponerlo en una columna.
- Centrifugar de 30 a 60 segundos a 13,000 rpm y decantar el líquido.
- Lavar la columna con 750 ul de buffer PE y centrifugar de 30 a 60 segundos a 13,000 rpm.

- Decantar el líquido y centrifugar un minuto.
- Para eluir el DNA, pasar la columna a un tubo de microcentrífuga nuevo y añadir 50 ul de buffer EB al centro de la columna, dejar incubando por un minuto y centrifugar un minuto.

Una vez hecha la extracción se corrió un gel de agarosa al 1% para verificar la presencia del plásmido en un peso de 3 000 pb aproximadamente.

Para confirmar la presencia del fragmento de PCR insertado en el vector se corrió una PCR con el kit "PCR Master Mix" (K0171) de acuerdo al protocolo indicado por el fabricante y se corrió un gel de agarosa para demostrar la presencia de una banda de entre 200 y 100 pb.

El plásmido se multiplicó y se extrajo como se indicó anteriormente, fue cuantificado dando una cantidad de 9.31 ng/ml lo que corresponde a 2.21×10^9 copias. La cantidad de copias fue calculada con la formula = (cantidad en ng* 6.022×10^{23}) / (longitud en bp* 1×10^9 *650). Para establecer la curva estándar se inició con una dilución a 1 ng en 5ul y 5 diluciones decuples seriadas posteriormente. La dilución inicial contenía 2.37×10^8 copias totales y la dilución mínima contenía 23700 copias totales.

Para detectar las copias del plásmido mediante la qPCR se utilizó el kit "Maxima SYBR Green /Rox qPCR Master Mix" (K0221) en una mezcla de reacción con las siguientes características:

Maxima SYBR Green /Rox qPCR Master Mix 2x	12.5 ul
Oligonucleótido forward	0.5 ul
Oligonucleótido reverse	0.5 ul
Agua	5.2 ul
DNA	5 ul

La curva estándar fue amplificada con un programa de 35 ciclos de desnaturalización a 95° por 30 segundos, alineación a 56° por 30 segundos y extensión a 72° por 1 minuto, ya terminados los 35 ciclos se da un periodo de extensión final de 72° por 10 minutos.

Se estableció la curva estándar y el número de ciclos de detección de la prueba.

ANEXO D Ensayo inmunoenzimático para la detección de IFN γ

Para determinar la detección de la citocina IFN γ se estandarizó una ELISA con los siguientes anticuerpos y controles:

	IFN
Anticuerpo primario	R&D systems AF985
Citocina	R&D systems 985PI
Anticuerpo secundario biotinado	R&D systems BAF985

Una placa de 96 pozos Maxisorp fue sensibilizada con el anticuerpo primario a una dosis de 1 μ g por pozo en 50 μ l de buffer de carbonatos, la placa se dejó por 18hs a 4°C. Pasado el tiempo de incubación se lavó la placa 4 veces con solución de lavado (PBS+Tween 0.5%). La placa fue bloqueada por una hora con 100 μ l de BSA al 1% en solución de fosfatos a 30°C y posteriormente se lavó 4 veces con solución de lavado. Se añadió por pozo 50 μ l de muestra (suero diluido 1/2) por duplicado y se añadió la curva control de citocina a dosis conocida (1000, 500, 250 y 125 pg/ml) por duplicado, se incubó a 30°C por dos horas. La placa fue lavada 4 veces con solución de lavado. El anticuerpo secundario se adicionó a una dilución 1/1000 en 50 μ l de solución de fosfatos incubándolo por dos horas a 30°C. Se lavó la placa 4 veces y se agregó 50 μ l de estreptavidina peroxidasa (SAHRP) diluida 1/300 incubada por una hora a 30°C. Se lavó la placa 4 veces y finalmente se añadió 100 μ l de TMB. La lectura se realizó 20 minutos posterior a la aplicación del TMB con un filtro de 650 nm.

Para la estandarización se evaluó el límite de detección de ambas citocinas en un suero diluido 1/10 y adicionado con 4,000 pg/ml, 2,000 pg/ml, 1,000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml y 125 pg/ml.

ANEXO E Seroneutralización (SN)

Para obtener el suero del calostro se centrifugo a 6000g por 60 minutos a 4°C y se tomó la parte media evitando la grasa superficial y los desechos del fondo, el suero de calostro obtenido fue inactivado a 56°C por 30 minutos. Se hicieron diluciones dobles del calostro desde 1/4 hasta 1/128, se tomaron 50 ul de cada dilución y se unió a 50 ul del virus previamente obtenido y titulado a una dosis de 100 DICC 50%. La mezcla fue incubada a 37°C por media hora.

A una placa de 96 pozos de cultivo celular se sembraron 10,000 células Vero (p. 25) por pozo en 100 ul de medio DMEM+SFB 10% y se incubaron por 24 horas. Posteriormente, fue lavada con DMEM y se adicionaron los 100 ul de la mezcla de calostro y virus antes descrita. Cada dilución se incubó por duplicado, la mezcla se dejó con las células por 2 horas y posteriormente se retiró, se lavó el cultivo con DMEM y se suplemento cada pozo con 100 ul de medio de infección.

Las placas fueron revisadas a las 24 horas y a las 48 horas se realizó la lectura dando como positivos a las SN a aquellos cultivos que no presentaran el efecto citopático característico.

* Calostros negativos y positivos a la prueba de ELISA para anticuerpos contra PED fueron donados para la estandarización.

ANEXO F Ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos IgA anti PED en suero y calostro

Se sensibilizó una placa de 96 pozos Maxisorp con el virus de PED proveniente del aislamiento viral antes descrito, que se encontraba a una concentración proteica de 169 ug/ml. Cada pozo se sensibilizó a una dosis de 0.5 ug por pozo en 50 ul de buffer de carbonatos, la placa se incubó por 18hs a 4°C. Pasado el tiempo de incubación se lavó la placa 4 veces con solución de lavado (PBS+Tween 0.5%). La placa fue bloqueada por una hora con 50 ul de BSA al 1% en solución de fosfatos a 30°C y posteriormente se lavó 4 veces con solución de lavado. Se añadió por pozo por duplicado 50 ul de muestra (suero diluido en solución de fosfatos 1/10 y calostro diluido 1/20), se incubó a 30°C por dos horas. La placa fue lavada 4 veces con solución de lavado. El anticuerpo secundario (goat anti-porcine IgA HRP Novus) se adicionó a una dilución 1/8000 en 50 ul de solución de fosfatos incubándolo por 1 hora a 30°C. Se lavó la placa 4 veces y finalmente se añadió 100 ul de TMB. La lectura se realizó 20 minutos posterior a la aplicación del TMB con un filtro de 650 nm.

Para determinar la cantidad aproximada de anticuerpos en cada suero se utilizó el concentrado de anticuerpos procesado previamente, haciendo al menos 10 diferentes concentraciones por cada ensayo y extrapolando los resultados a una curva sigmoidea creada con el programa AssayZap. La curva de detección de anticuerpos precipitados se realizó a partir de 50 ug/ml hasta 0.05 ug/ml diluidos en solución de fosfatos. La curva debía tener un B0 superior a 0.8 analizado mediante el programa.

ANEXO G Ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos IgG1 anti PED en suero y calostro.

Se adquirió el anticuerpo “mouse anti-pig IgG1” marca Bio-rad y para poder usarlo como secundario se marcó con biotina con el kit BiotinTag de Sigma.

Se sensibilizó una placa de 96 pozos Maxisorp con el virus de PED proveniente del aislamiento viral antes descrito, que se encontraba a una concentración proteica de 169 ug/ml. Cada pozo se sensibilizó a una dosis de 0.5 ug por pozo en 50 ul de buffer de carbonatos, la placa se incubó por 18hs a 4°C. Pasado el tiempo de incubación se lavó la placa 4 veces con solución de lavado (PBS+Tween 0.5%). La placa fue bloqueada por una hora con 50 ul de BSA al 1% en solución de fosfatos a 30°C y posteriormente se lavó 4 veces con solución de lavado. Se añadió por pozo por duplicado 50 ul de muestra (suero diluido en solución de fosfatos 1/50 y el calostro en 1/200), se incubó a 30°C por dos horas. La placa fue lavada 4 veces con solución de lavado. El anticuerpo secundario (mouse anti-pig IgG1 biotinado) se adicionó a una dilución 1/5000 en suero y 1/7000 en el caso del calostro en 50 ul de solución de fosfatos incubándolo por 1 hora a 30°C. Se lavó la placa 4 veces. Se añadió estreptavidina peroxidasa a una dilución 1/300 y se dejó incubar por 30 minutos, se lava 4 veces y finalmente se añadió 100 ul de TMB. La lectura se realizó 20 minutos posterior a la aplicación del TMB con un filtro de 650 nm.

Para determinar la cantidad aproximada de anticuerpos en cada suero se utilizó el concentrado de anticuerpos procesado previamente, haciendo al menos 10 diferentes concentraciones por cada ensayo y extrapolando los resultados a una curva sigmoidea creada con el programa AssayZap. La curva de detección de anticuerpos precipitados se realizó a partir de 400 ug/ml hasta 0.39 ug/ml diluidos en solución de fosfatos. La curva debía tener un B0 superior a 0.8 analizado mediante el programa.

ANEXO H Ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos IgG2 anti PED en suero y calostro.

Se adquirió el anticuerpo “mouse anti-pig IgG2” marca Bio-rad y para poder usarlo como secundario se marcó con biotina con el kit BiotinTag de Sigma.

Se sensibilizó una placa de 96 pozos Maxisorp con el virus de PED proveniente del aislamiento viral antes descrito, que se encontraba a una concentración proteica de 169 ug/ml. Cada pozo se sensibilizó a una dosis de 0.5 ug por pozo en 50 ul de buffer de carbonatos, la placa se incubó por 18hs a 4°C. Pasado el tiempo de incubación se lavó la placa 4 veces con solución de lavado (PBS+Tween 0.5%). La placa fue bloqueada por una hora con 50 ul de BSA al 1% en solución de fosfatos a 30°C y posteriormente se lavó 4 veces con solución de lavado. Se añadió por pozo por duplicado 50 ul de muestra (suero diluido en solución de fosfatos 1/50 y el calostro a una dilución de 1/200), se incubó a 30°C por dos horas. La placa fue lavada 4 veces con solución de lavado. El anticuerpo secundario (mouse anti-pig IgG2 biotinado) se adicionó a una dilución 1/5000 para el suero y 1/7000 en el caso del calostro en 50 ul de solución de fosfatos incubándolo por 1 hora a 30°C. Se lavó la placa 4 veces. Se añadió estreptavidina peroxidasa a una dilución 1/300 y se dejó incubar por 30 minutos, se lava 4 veces y finalmente se añadió 100 ul de TMB. La lectura se realizó 20 minutos posterior a la aplicación del TMB con un filtro de 650 nm.

Para determinar la cantidad aproximada de anticuerpos en cada suero se utilizó el concentrado de anticuerpos procesado previamente, haciendo al menos 10 diferentes concentraciones por cada ensayo y extrapolando los resultados a una curva sigmoidea creada con el programa AssayZap. La curva de detección de anticuerpos precipitados se realizó a partir de 200 ug/ml hasta 0.39 ug/ml diluidos en solución de fosfatos. La curva debía tener un B0 superior a 0.8 analizado mediante el programa.

ANEXO I Ensayo de liberación de interferón gamma

Para determinar la respuesta inmune celular se estandarizó la detección de interferón gamma tras la exposición de las células de sangre periférica al virus de PED. Se extrajo 2 ml de sangre completa con EDTA e inmediatamente después de la toma a 300 ul de sangre se adicionaron con 300 ul de vacuna diluida 1:2 con medio RPMI. Esta mezcla se dejó incubando a 37°C por 24 y 48 horas y se tomó 100 ul del sobrenadante en cada periodo de incubación. La determinación se realizó por duplicado. El sobrenadante se utilizó en la prueba de ELISA para determinar interferón gamma descrita en el ANEXO D.