



Evaluación de la seroconversión de cerdas con el uso de un inóculo a diferentes dosis y vehículos contra la diarrea epidémica porcina



Nancy Paulina García Cano Rubí ^a

Francisco Ernesto Martínez-Castañeda ^b

Elein Hernández Trujillo ^c

Rosa Elena Sarmiento Silva ^a

Rolando Beltrán Figueroa ^a

Montserrat Eleme García-Hernández ^a

María Elena Trujillo-Ortega ^{a*}

^a Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Ciudad Universitaria, Av. Universidad #3000, Colonia, C.U., Coyoacán, 04510 Ciudad de México, México.

^b Universidad Autónoma del Estado de México. Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales. México.

^c Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México.

*Autor de correspondencia: elenam@unam.mx

Resumen:

La diarrea epidémica porcina (PED) es una enfermedad entérica altamente contagiosa en los cerdos, que ha provocado grandes pérdidas económicas a la industria porcina a nivel mundial. Las medidas conocidas para el control de la PED, antes del desarrollo y lanzamiento de las vacunas en el 2017 en México, fue el “feedback” o “licuado”. Aunque fue una medida muy

utilizada durante el brote de PED en 2013, entre los diversos autores que lo recomiendan no hay una homogeneidad en su uso. Actualmente, diversos estudios han experimentado otro tipo de profilaxis, como la inmunización oral con el virus de la PED obtenido a partir del aislamiento en cultivo celular, lo que permite cuantificar el virus infectivo, así como asegurar que solo se está utilizando como inóculo al virus y no otros agentes. El objetivo del presente estudio fue comparar el tiempo de seroconversión, en cerdas inoculadas con virus cuantificado, con cuatro diferentes vehículos (leche, trigo, directo y agua) y diferentes dosis del vehículo (1 ml, 2 ml y 3 ml), en diferentes momentos de gestación y número de partos. El estudio se realizó en el CEIEPP, granja de ciclo completo con 170 hembras. El presente estudio demostró que los vehículos con mejores resultados fueron el inóculo con agua y el inóculo directo combinado con la dosis de 1 ml, ya que la combinación de estos vehículos y dosis del inóculo generó que más del 90 % de las cerdas mostraran seroconversión a partir de la segunda semana post-inoculación.

Palabras clave: Diarrea Epidémica Porcina, Inóculo, Seroconversión.

Recibido: 25/01/2022

Aceptado: 13/10/2022

La diarrea epidémica porcina es una enfermedad entérica altamente contagiosa en los cerdos causada por el virus de la Diarrea Epidémica Porcina (PED)⁽¹⁾, es un virus de ARN monocatenario de sentido positivo y envuelto que pertenece al género *Alphacoronavirus*, familia *Coronaviridae*⁽²⁾. Infecta principalmente las células epiteliales del intestino de los cerdos, produciendo atrofia, necrosis y desprendimiento de las vellosidades intestinales, lo que afecta la absorción de nutrientes⁽³⁾, ocasionando problemas como diarrea acuosa, vómitos agudos, anorexia, deshidratación extensa, electrolitos sanguíneos desequilibrados y pérdida de peso en cerdos de todas las edades⁽⁴⁾. Es especialmente grave en los lechones seronegativos, entre los que la tasa de morbilidad y mortalidad es de hasta el 100 %⁽⁵⁾. El virus se identificó en la década de 1970 en Reino Unido y Bélgica. En 1976 se produjo una epidemia similar en varios países europeos, y se denominó EVDII; desde entonces, la enfermedad ha sido reportada en muchos otros países^(6,7). En octubre de 2010, se identificó una variante altamente patógena de la cepa del virus de PED en China, y más tarde en mayo de 2013, esta misma variante causó enfermedad en EE.UU., que se extendió a Canadá y otros países de centro y Sudamérica, entre ellos, México^(6,8), se estimó que en los EE. UU., el brote de PED afectó a más de 8,400 granjas⁽⁹⁾, matando a más de 7 millones de cerdos equivalente al 10 % de su población porcina⁽¹⁰⁾, con pérdidas de \$1.1 mil millones de dólares para los productores⁽¹¹⁾.

Las medidas conocidas para el control había sido el “feedback” o “licuado”, sin embargo, no existe una homogeneidad en el uso de esta técnica^(12,13). Consiste en la ingesta de intestino delgado, contenido gástrico o diarrea de los cerdos que presentan signos clínicos de la PED en las primeras 6 a 12 h. Así mismo puede prepararse con el raspado intestinal de lechones sacrificados que presentan diarreas en las últimas 4 h y se pueden mezclar con leche evaporada, tratando de lograr una consistencia líquida y no pastosa. Su uso puede ocasionar la transmisión de otras enfermedades presentes en la piara⁽¹⁴⁾. Existe otro tipo de profilaxis como la inmunización oral con el virus de la DEP obtenido a partir del aislamiento en cultivo celular, lo que permite cuantificar el virus infectivo y calcular una dosis protectora, así como asegurar que solo se está utilizando como inóculo al virus y no otros agentes^(15,16). La mayoría de las vacunas que se comercializan en México son vacunas vivas atenuadas o inactivadas que utilizan cepas similares a CV777 y que se administran por la vía oral⁽¹⁵⁾, en las que se recomienda el uso en hembras gestantes en la 2da y 3ra semana antes del parto⁽¹⁶⁾. Se ha observado estrés con el uso de la vacuna en las cerdas gestantes⁽¹⁷⁾, y su efectividad continúa en evaluación.

El objetivo del presente estudio fue comparar el tiempo de seroconversión, en cerdas inoculadas con virus cuantificado, con cuatro diferentes vehículos (leche, trigo, directo y agua) y diferentes dosis del vehículo (1 ml, 2 ml y 3 ml), en diferentes momentos de gestación y paridad de las cerdas.

El estudio se realizó en una granja semi-tecnificada de ciclo completo que se localiza en el noreste del Estado de México, tiene 170 hembras promedio en el inventario, cruza de Landrace x Yorkshire.

El método para la manipulación de los animales fue sometido y aprobado por el Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (SICUAE), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica FMVZ CU-UNAM, con número de aprobación MC-2020/4-4.

El virus se obtuvo del Laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional Autónoma de México, identificado en el Gen Bank con el número de acceso KM044335.1, que tiene un título de 1×10^8 DIC50%/ml^(18,19).

Las cerdas se inmunizaron con 12 diferentes protocolos de intervención contra el PED el 26 de enero del 2018. Las variantes de este protocolo fueron administrar el virus cuantificado en cuatro diferentes vehículos los cuales fueron: leche, trigo, agua y sin vehículo-directo (suspensión viral en medio de cultivo), con tres diferentes dosis de cada vehículo, 1 ml, 2 ml y 3 ml (Cuadro 1). El protocolo de inoculación se realizó en todas las cerdas de la granja en forma de sabana.

Cuadro 1. Resumen del diseño experimental

Grupo	Vehículo	Dosis	Concentración del virus (DICC _{50%} /ml)	No. de animales
1	Leche	1 ml	1x10 ⁸	8
2	Leche	2 ml	2x10 ⁸	6
3	Leche	3 ml	3x10 ⁸	10
4	Trigo	1 ml	1x10 ⁸	8
5	Trigo	2 ml	2x10 ⁸	8
6	Trigo	3 ml	3x10 ⁸	10
7	Agua	1 ml	1x10 ⁸	8
8	Agua	2 ml	2x10 ⁸	8
9	Agua	3 ml	3x10 ⁸	10
10	Directo	1 ml	1x10 ⁸	7
11	Directo	2 ml	2x10 ⁸	8
12	Directo	3 ml	3x10 ⁸	9

Posterior a la administración de los diferentes protocolos de intervención, en la semana 2, 4, 8 y 13 se tomaron muestras sanguíneas a las cerdas, en tubos para recolección de muestras sanguíneas sin aditivo. Estas muestras se transfirieron en cajas de hielo entre 2 a 8 °C al Laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las muestras se procesaron mediante la técnica de ELISA del Kit ID Screen® PEDV indirect (ID-VET), con las especificaciones del proveedor, ID Screen® PEDV Indirecto – IDVet⁽¹⁸⁾. La prueba de ELISA se utilizó con el fin de monitorear los diferentes protocolos de inmunización de las hembras y poder identificar a las hembras que mostraron seroconversión.

Los datos de seroconversión se analizaron con estadística descriptiva y con la curva de supervivencia de Kaplan-Meier y la prueba de rango logarítmico de Mantel-Cox, respectivamente, Se consideró estadísticamente significativo un valor de $P < 0.05$. Los protocolos de intervención se muestran en el Cuadro 2.

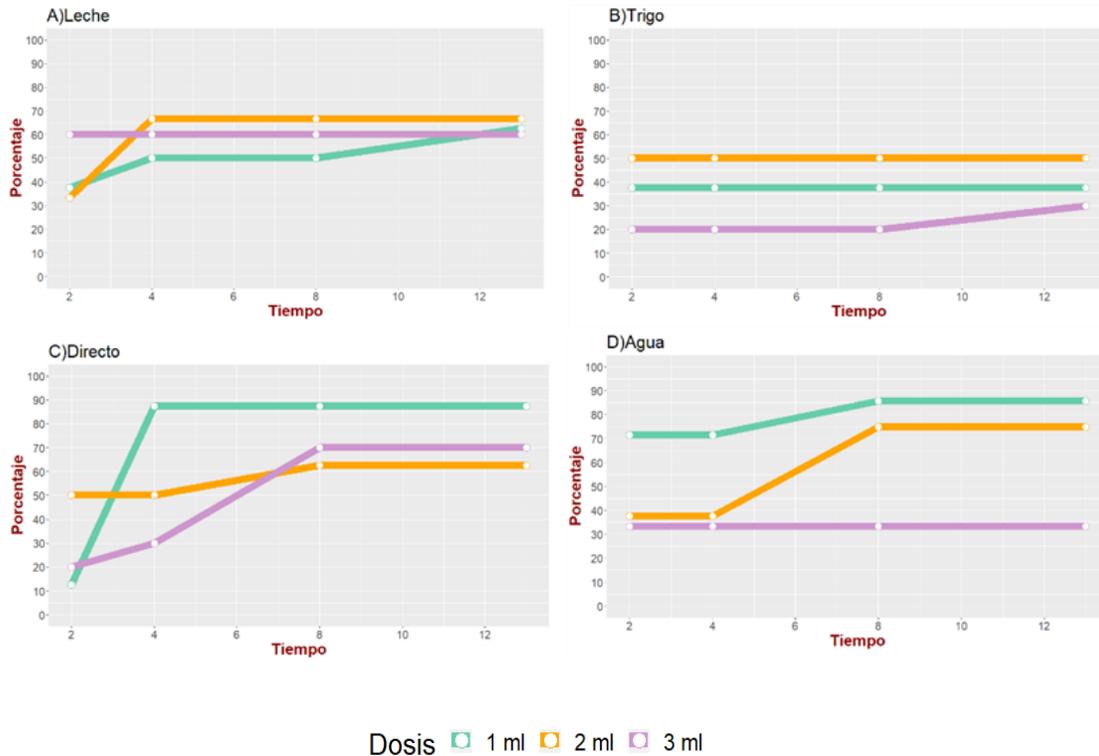
Cuadro 2: Grupos como se compararon los diferentes vehículos y dosis, en la prueba de la curva de supervivencia de Kaplan-Maier y la prueba de rango logarítmico de Mantel-Cox

Grupos	Comparación
1	Leche 1 ml, leche 2 ml y leche 3 ml
2	Trigo 1 ml, trigo 2 ml y trigo 3 ml
3	Directo 1 ml, directo 2 ml y directo 3 ml
4	Agua 1 ml, agua 2 ml y agua 3 ml
5	Leche 1 ml, trigo 1 ml, directo 1 ml y agua 1 ml
6	Leche 2 ml, trigo 2 ml, directo 2 ml y agua 2 ml
7	Leche 3 ml, trigo 3 ml, directo 3 ml y agua 3 ml

Cada ml de los vehículos contiene 1x10⁸ DICC_{50%}/ml del virus PED.

Se observó que dos vehículos fueron los que presentaron mejor respuesta de seroconversión con la dosis de 1 ml (vehículo directo y el vehículo con agua), mientras que el vehículo que tuvo la seroconversión más baja fue el trigo (Figura 1).

Figura 1: Porcentaje de seroconversión de los cuatro diferentes vehículos del inóculo (agua, directo, leche y trigo) con tres diferentes dosis, en cuatro diferentes tiempos posterior a la administración del inóculo

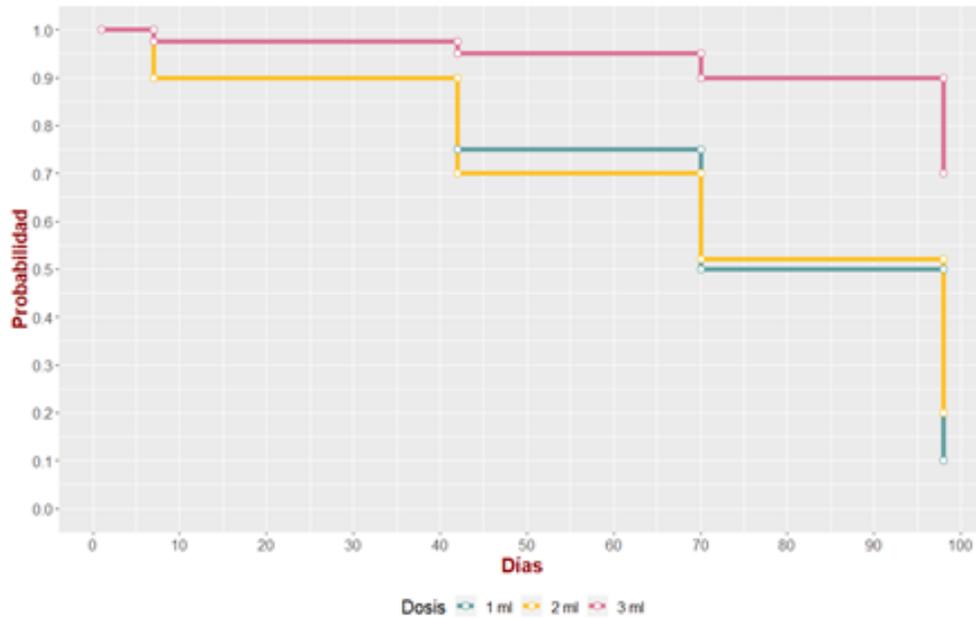


Solo se encontró diferencia en los grupos 2 y 7, en cuanto al tiempo de supervivencia, Mantel-Cox, $\chi^2 = 12.56$, 2 gl; $P= 0.0019$ y $\chi^2 = 15.75$, 3 gl; $P= 0.0013$ (Figura 2), respectivamente, Los vehículos agua y leche mostraron una seroconversión mayor a 45 % y del 60 %, en la semana 2 y 6, respectivamente.

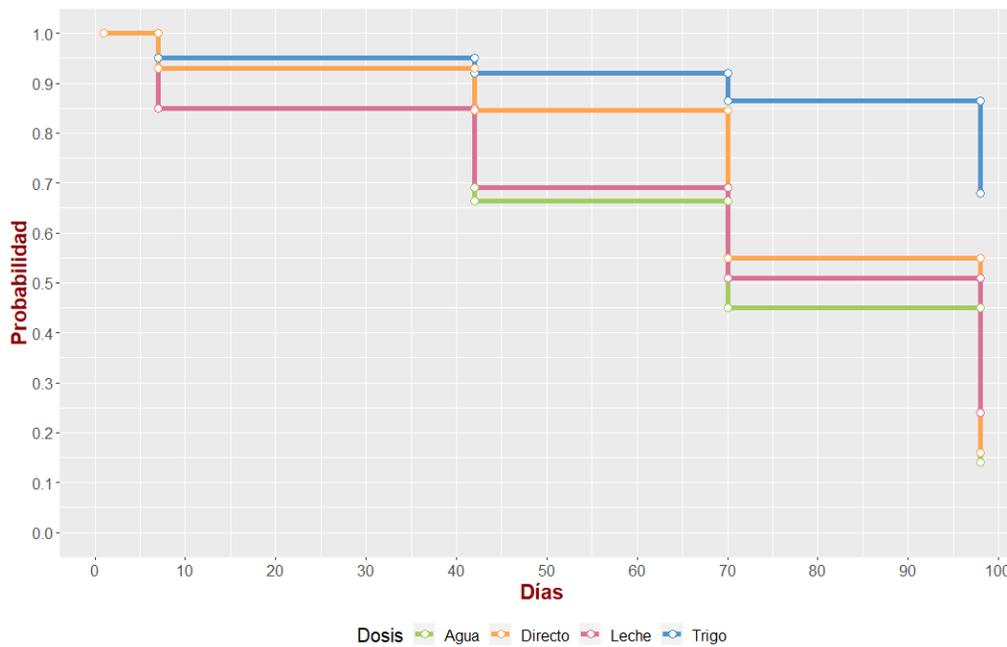
El uso de diferentes vehículos y dosis han sido usadas y descritos por diferentes autores^(12,13,20), aunque no se ha comprobado la efectividad de uno sobre otro. En este trabajo el inóculo agua y directo con 1 ml fueron los mejores. Sin embargo, no hubo diferencia entre los diferentes vehículos y dosis, con excepción del inóculo con trigo y las dosis de tres mililitros con los diferentes vehículos (Figura 2)

Figura 2: Curva de supervivencia de Kaplan-Meier, A) curva de cerdos domésticos inoculados con el vehículo de trigo, días posteriores a la inoculación. B) cerdos domésticos inoculados con 4 diferentes vehículos con dosis de 3 ml, días posteriores a la inoculación

A



B



En ensayos serológicos, en promedio, los anticuerpos se detectan por primera vez en el suero entre los 6 y 14 días después del contacto con el virus⁽²¹⁾. En el presente trabajo se encontró que a partir de la segunda semana un pequeño porcentaje de cerdas ya presentaron anticuerpos de PED, mientras que durante la semana 10 y 14 la mayoría de las cerdas

expuestas al virus de PED presentaron anticuerpos. También se encontró que el efecto de seroconversión difirió según el vehículo o dosis con la que se exponían al virus de PED a las cerdas.

Los niveles de anticuerpos en cerdas naturalmente infectadas por el virus de PED permanecen altos hasta por seis meses, aunque los niveles recuperados de heces desaparecen entre uno y dos meses postinfección⁽²²⁾.

Se ha reportado que la inmunización de las cerdas gestantes es importante para el control del PED y para reducir la muerte de lechones^(23,24). Existen reportes en donde el 100 % de los lechones provenientes de cerdas inmunizadas entre los 57 a 59 días de gestación sobreviven⁽²⁴⁾, mientras que aquellas expuestas entre los 19 y 22 así como las expuestas después de los 96 días de gestación, mostraron tasas de supervivencia de lechones de 87 y 56 %, respectivamente⁽²⁵⁾.

La eficacia de la vacuna y del refuerzo por vía intramuscular, depende de la inducción de células B de memoria de anticuerpos IgA en cerdas expuestas previamente al virus de campo o inmunizadas oralmente⁽²⁶⁾. En este trabajo se utilizaron protocolos de inmunización vía oral con diferentes vehículos y diferente dosis.

Algunos trabajos resaltan el mejor desempeño de la inoculación por vía oral (inclusive feedback) contra la vía intramuscular. Sin embargo, ambos protocolos pueden ser ineficientes debido a: 1) no existen protocolos estandarizados de feedback; 2) la pobre capacidad de las actuales vacunas intramusculares de inducir inmunidad lactogénica; 3) la diferencia antigénica de la vacuna vs las cepas epidémicas; y 4) la posible y continua reinfección de PED por el uso de feedback⁽²⁷⁾.

El presente estudio demostró que los vehículos que mejores resultados presentaron fueron el inóculo con agua y el inóculo directo combinado con la dosis de 1 ml, ya que la combinación de estos vehículos y dosis con el inóculo generó que más del 90 % de las cerdas seroconvirtieran a partir de la segunda semana post-inoculación.

Agradecimientos

Este trabajo se desarrolló gracias al Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) No. IN221218; con el proyecto “Análisis diferencial de proteínas expresadas en cultivo celular con diferentes aislados del virus de la Diarrea Epidémica Porcina obtenidos en México y su relación con cambios de antigenicidad” del cual es responsable la Dra. María Elena Trujillo Ortega. A CONACYT por el apoyo a través del programa de becas para la investigación; No. registro: 933765.

Literatura citada:

1. Wang XY, Ji CJ, Zhang X, Xu DP, Zhang DL. Infection, genetic and virulence characteristics of porcine epidemic diarrhea virus in northwest China. *Infect Genet Evol* 2018;62:34-39. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.04.001>.
2. Díaz I, Pujols J, Cano E, Cuadrado R, Navarro N, Mateu E, *et al.* Assessment of three commercial ELISAs for the detection of antibodies against Porcine epidemic diarrhea virus at different stages of the immune response. *Vet Immunol Immunopathol* 2021;234:110206. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2021.110206>.
3. Li Z, Ma Z, Li Y, Gao S. Virus de la diarrea epidémica porcina: mecanismos moleculares de atenuación y vacunas. *Microb Pathog* 2020;149:104553. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104553>.
4. Yang S, Li Y, Wang B, Yang N, Huang X, Chen Q, *et al.* Acute porcine epidemic diarrhea virus infection reshapes the intestinal microbiota. *Virology* 2020;548:200-212. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.07.001>.
5. Antas M, Woźniakowski G. Current status of porcine epidemic diarrhoea (PED) in European pigs. *J Vet Res* 2019;63(4):465–470.
6. Chen P, Wang K, Hou Y, Li H, Li X, Yu L, *et al.* Genetic evolution analysis and pathogenicity assessment of porcine epidemic diarrhea virus strains circulating in part of China during 2011–2017. *Infect Genet Evol* 2019;69:153–165.
7. Li HJ, Gao DS, Li YT, Wang YS, Liu HY, Zhao J. Antiviral effect of lithium chloride on porcine epidemic diarrhea virus in vitro. *Res Vet Sci* 2018;118:288–294.
8. Gonzalo MB, Cáceres GG, Muñoz HB, Romero GL. Situación mundial de las nuevas cepas de la diarrea epidémica porcina. *Albéitar publicación Vet Indep* 2016;(193):24–26.
9. Weng L, Weersink A, Poljak Z, Lange K De, Massow M. An economic evaluation of intervention strategies for Porcine Epidemic Diarrhea (PED). *Prev Vet Med* 2016;134:58–68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.09.018>.
10. Zentkovich MM, Nelson SW, Stull JW, Nolting JM, Bowman AS. Inactivation of porcine epidemic diarrhea virus using heated water. *Vet Anim Sci* 2016;2:1–3.
11. Paarlberg PL. Updated estimated economic welfare impacts of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) 2014:1–38.

12. Rogers-Montoya NA, Martínez-Castañeda FE, Trujillo-Ortega ME. Costo y efecto del virus de la Diarrea Epidémica Porcina en el desempeño reproductivo de una granja de ciclo completo en México. ITEA. 2022. <https://doi.org/10.12706/itea.2021.034>.
13. Amador-Cruz, J, Martínez-Castañeda FE, Trujillo-Ortega ME. Impacto económico de la Diarrea Epidémica Porcina en México [en prensa]. *Agroproductividad* 2022.
14. Goede D, Morrison RB. Production impact y time to stability in sow herds infected with porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). *Prev Vet Med* 2016;123:202–207.
15. Lee C. Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virology* 2015;12(1):1–16. <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-015-0421-2>.
16. ZOETIS. Otorga Zoetis licencia condicional para vacuna contra la Diarrea Epidémica Porcina 2014: <https://www.zoetis.mx/news-and-media/index.aspx>.
17. Park JE, Shin HJ. Porcine epidemic diarrhea vaccine efficacy evaluation by vaccination timing and frequencies. *Vaccine* 2018;36(20):2760–2763. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.03.041>.
18. Trujillo-Ortega ME, Beltrán-Figueroa R, García-Hernández ME, *et al.* Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea virus associated with the 2014 disease outbreak in Mexico: case report. *BMC Vet Res* 2016;12(1):132. doi:10.1186/s12917-016-0763-z.
19. Becerra HJF. Aislamiento del virus de la diarrea epidémica porcina en cultivo celular. [tesis Licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 2016. <https://repositorio.unam.mx/contenidos/296209>.
20. Clement T, Singrey A, Lawson S, Okda F, Nelson J, Diel D, *et al.* Measurement of neutralizing antibodies against porcine epidemic diarrhea virus in sow serum, colostrum, and milk samples and in piglet serum samples after feedback. *J Swine Heal Prod* 2016;24(3):147–153.
21. Diel DG, Lawson S, Okda F, Singrey A, Clement T, Fernandes MHV, *et al.* Porcine epidemic diarrhea virus: An overview of current virological and serological diagnostic methods. *Virus Res* 2016;226:60–70.
22. Ouyang K, Shyu DL, Dhakal S, Hiremath J, Binjawadagi B, Lakshmanappa YS, *et al.* Evaluation of humoral immune status in porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) infected sows under field conditions. *Vet Res* 2015;46:140.
23. Jung K, Saif LJ. Porcine epidemic diarrhea virus infection: etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *Vet J* 2015;204(2):134–143.

24. Langel SN, Wang Q, Vlasova AN, Saif LJ. Host factors affecting generation of immunity against porcine epidemic diarrhea virus in pregnant and lactating swine and passive protection of neonates. *Pathogens* 2020;9:130.
25. Langel SN, Paim FC, Alhamo MA, Buckley A, Van Geelen A, Lager KM, Vlasova AN, Saif LJ. Stage of gestation at porcine epidemic diarrhea virus infection of pregnant swine impacts maternal immunity and lactogenic immune protection of neonatal suckling piglets. *Frontiers in Immunology* 2019;10:727.
26. Gillespie T, Song Q, Inskeep M, Stone S, Murtaugh MP. Effect of booster vaccination with inactivated porcine epidemic diarrhea virus on neutralizing antibody response in mammary secretions. *Viral Immunology* 2018;31(1):62–68.
27. Jung K, Saif L, Wang Q. Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): An update on etiology, transmission, pathogenesis, and prevention and control. *Virus Research* 2020; 286:198045.