



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

EVALUACIÓN DE LA PROTECCIÓN CONFERIDA POR IGY'S (INMUNOPRRS®)
PARA EL CONTROL DE LA ENFERMEDAD DEL SÍNDROME REPRODUCTIVO
Y RESPIRATORIO PORCINO (PRRS)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

GUADALUPE CHÁVEZ FLORES

Asesor:

Dr. José Ivan Sánchez Betancourt



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.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
ANTECEDENTES	3
AGENTE ETIOLÓGICO.....	4
PROPIEDADES VIRALES	6
TRANSMISIÓN	7
SIGNOS CLÍNICOS	8
PATOGENIA.....	9
RESPUESTA INMUNE.....	11
<i>Inmunidad innata</i>	12
<i>Respuesta humoral</i>	12
HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD DE PRRS	15
DIAGNÓSTICO	17
CONTROL.....	20
<i>Bioseguridad</i>	20
<i>Manejo</i>	21
VACUNACIÓN	22
INMUNOGLOBULINAS TIPO Y (IGY).....	23
JUSTIFICACIÓN	26
HIPÓTESIS	27
OBJETIVO	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
MATERIAL Y METODOS	29
ANIMALES	29
VIRUS DE DESAFÍO.....	29
BIOLÓGICO	30
PRUEBAS	33
RESULTADOS	35
<i>Cerdas Gestantes</i>	35
<i>Camadas</i>	35
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	45
REFERENCIAS	46

RESUMEN

El Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PPRS) es una enfermedad que afecta a las producciones porcinas con grandes pérdidas económicas. Esta enfermedad es causada por un virus, caracterizado por ser altamente mutagénico y evadir la respuesta inmune y se ha demostrado que la alta variabilidad antigénica puede generar que las vacunas existentes no protejan contra desafíos de cepas heterólogas en México. Es por esto que la utilización de Inmunoglobulinas de origen aviar (IgY) son una alternativa para la protección de los cerdos. Para determinar el nivel de protección que ejercen estas inmunoglobulinas se realizó este estudio, el cual se dividió en dos etapas: Etapa 1, a seis cerdas en el último tercio de gestación, se les aplicaron las inmunoglobulinas y a tres de ellas se les desafió con virus de PRRS, y se tomaron muestras de ellas y sus lechones durante la lactancia. Etapa 2 se formaron seis grupos de cerdos destetados, dos de ellos como controles y los otros cuatro con diferentes dosis de InmunoPPRS®, a dos de estos grupos se les desafió con virus de PRRS. Se obtuvieron muestras sanguíneas cada cinco días hasta el día 70 de vida, y se eutanasiaron para realizar histopatologías y RT-PCR de tejidos. El estudio demostró que la aplicación de inmunoglobulinas tipo Y disminuye la viremia y los signos clínicos. En cerdos destetados las lesiones en tejidos comparado con los cerdos no inmunizados disminuyeron significativamente.

INTRODUCCION

El síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) es una de las enfermedades infecciosas más importantes en las producciones porcinas en las últimas décadas. Es una enfermedad viral, de distribución mundial, que afecta a los cerdos de todas las edades, con una morbilidad y mortalidad variable (Macías et al., 2006; Sagar 1993; OIE 2008).

Se caracteriza por tener un gran impacto económico en las granjas porcinas debido a la presentación de abortos, baja conversión alimenticia y sinología respiratoria que puede ocasionar infecciones secundarias.

Después de muchos años de estudiar esta enfermedad, ahora se sabe que el causante de este síndrome es un virus que se caracteriza por tener una alta variabilidad genética y antigénica, ocasionando que las vacunas que existen actualmente en el mercado, sean de baja efectividad y se tengan que buscar otras alternativas para la prevención y control de la enfermedad (Li X et al, 2014; XJ Meng et al 2000).

En los últimos años se ha estudiado la opción de utilizar inmunoglobulinas de origen aviar inmunizadas contra una enfermedad en específico, para después ser administradas en humanos u otras especies para crear una inmunidad pasiva. Esto con el fin de conferir protección, sin la necesidad de administrar vacunas. Para controlar PRRS, esta sería una alternativa, que podría ser modificada según la variabilidad del virus, a comparación de las vacunas del mercado, que utilizan los virus de referencia (Gutierrez, *et al.* 2015).

Antecedentes

En el año de 1987, se comenzaron a reportar en Estados Unidos una serie de casos con sinología reproductiva y respiratoria en hembras y en la línea de producción, aumentando la mortalidad en lechones y retraso de crecimiento. Al principio se sospechaba de varios agentes etiológicos, pero una vez descartados, se nombró a la enfermedad "Mystery Swine Disease". A partir de entonces los casos se fueron incrementando causando pérdidas económicas en la porcicultura.

Desde su aparición, esta enfermedad se le ha dado numerosos nombres, dependiendo en muchos casos de la sinología que presentaba la enfermedad, hasta que, en el año de 1991, la Comunidad Económica Europea (C.E.E.), con la finalidad de unificar el nombre a este síndrome, hace un comunicado donde señala que el nombre correcto para esta enfermedad es "Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome" (PRRS).

El síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) fue localizado por primera vez en Carolina del Norte y posteriormente en Canadá en 1987. Posteriormente se reportó en Japón en 1988. En los siguientes años el virus se fue distribuyendo en Europa, llegando a Alemania en 1990, y en 1991 a Holanda, Bélgica, Italia, Suecia, España e Inglaterra (OIE 2008).

En julio de 1991, en Holanda, se hace el aislamiento viral utilizando macrófagos alveolares porcinos (PAM) y fue designado como virus Lelystad. Un año después en Estados Unidos el Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV) se aisló, y caracterizó en una línea celular continua (CL2621) y se le nombro como VR-2332. Estos dos virus, en la actualidad, son reconocidos como los virus de referencia en cada continente (Chand *et al.*, 2012).

Agente etiológico

El síndrome respiratorio y reproductivo porcino, es causado por un Arterivirus, este, junto con el virus de la arteritis equina (EAV), el virus de lactato deshidrogenasa de los ratones (LDV), y el virus de la fiebre hemorrágica del simio (SHFV), forman parte de la familia Arteriviridae del orden de los Nidovirales. Estos poseen varias propiedades relacionadas con la patogénesis viral, incluyendo la replicación citopática en los macrófagos, la capacidad de establecer una infección persistente, así como la enfermedad grave que causa (Chand *et al.*, 2012).

Este es un virus de cadena simple de RNA, envuelto, con sentido positivo (5' a 3'), de un peso aproximado de 15 kb, de forma esférica con un diámetro de 50 a 65nm, con una envoltura lipídica (Figura 1) (Obdulio *et al.*, 2014).

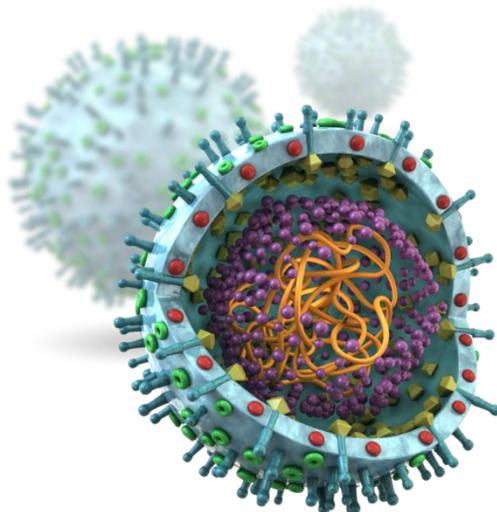


Figura 1. Virus de PRRS

<https://www.prrs.com>

Está compuesto por 10 marcos de lectura abierta "ORF" (open reading frames): ORF 1a, ORF1b, ORF2a, ORF2b, ORF 3, ORF 4, ORF5, ORF5a, ORF 6, ORF 7.

El ORF 1a y ORF 1b, son dos grandes poliproteínas que componen el 80% del genoma del virus. Estas codifican la RNA polimerasa viral y están asociadas a

proteasas y replicasas involucradas en la replicación y transcripción del RNA. Estos dos marcos de lectura abierta, se subdividen en 14 proteínas no estructurales (NSP).

Los ORF 2a, ORF2b y ORF 3 a 7 codifican las proteínas estructurales glicoproteína (GP) 2a, 2b (también definidas como proteína E), GP3, GP4, M y N, respectivamente. La GP5, codificada por ORF5, es la principal proteína de envoltura, contiene el epítipo neutralizante principal del PRRSV. La proteína M, codificada por ORF6, es una proteína de membrana integral no glucosilada y la proteína N, codificada por ORF7, es la proteína de nucleocápside (Figura 2) (Lovinga *et al.*, 2015; XJ, 2000).

Estructura del virus del PRRS

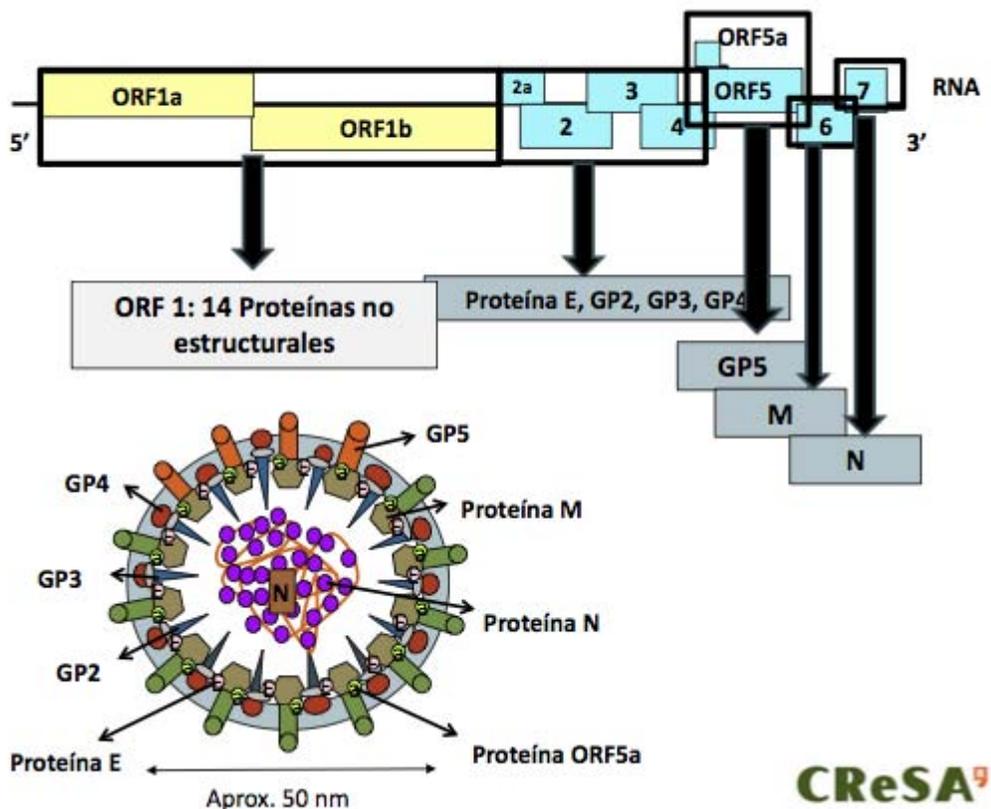


Figura 2. Estructura del Virus de PRRS. <http://chil.org/blogs/liveblogsepor/383/by-tag/virus>

La proteína de la nucleocápside (N) forma un polímero que rodea el genoma viral. La superficie del virus está dominada por la glicoproteína GP 5 unido por disulfuro a la proteína de la matriz (M). Glicoproteínas de superficie menores forman un trímero compuesto por la GP2, GP3, GP4 y proteínas adicionales de envoltura incluyen E y ORF5a (Chand *et al.*, 2012) (Lovinga *et al.*, 2015).

PRRSV se divide en dos genotipos, tipo 1 (europeo) y tipo 2 (americano). A pesar de que los dos se aislaron en diferentes regiones, aparecieron simultáneamente y producen signos clínicos similares, los dos grupos comparten identidad sólo alrededor de 60% a nivel de nucleótidos. Cada genotipo tiene diversidad genética y antigénica del 20% aproximadamente, esto influye en la virulencia durante la infección (Chand *et al.*, 2012) (Drigo *et al.*, 2014) (Han K *et al.*, 2014) (XJ, 2000).

Propiedades virales

La estabilidad del virus es variable en diferentes temperaturas (Cuadro1).

Temperatura °C	Tiempo
-70	Meses
-4	Dos semanas
4	Una semana
21	1 a 6 días
37	3 horas a 2 días
56	30 minutos

Cuadro 1. Persistencia de PRRSV a diferentes temperaturas

Su pH óptimo se encuentra entre 6 y 7.65. Los detergentes son eficaces para reducir la virulencia del virus y los solventes orgánicos, como el cloroformo y el éter, son eficaces para afectar la envoltura viral e inactivar el virus (Lab. Hipra, 2015).

Transmisión

La transmisión de este virus se da principalmente por el contacto con fluidos de algún cerdo enfermo, como semen, heces, secreción nasal, sangre y saliva. En los últimos años se ha demostrado que la transmisión por aerosoles es una de las más importantes ya que el virus se puede desplazar a varios kilómetros en óptimas condiciones.

La transmisión del virus de PRRS se puede dar de manera directa y / o indirecta.

La transmisión directa se puede dar de manera horizontal, la cual se refiere a la transmisión de contacto directo con cerdos que se encuentren en alguna etapa virémica, o bien con la alguna secreción del cerdo enfermo.

La transmisión directa vertical, es cuando la madre se infecta en el último tercio de la gestación. El virus que se encuentra en la sangre, puede traspasar la placenta de la cerda e infectar a los fetos, provocando una viremia en ellos, retardando su crecimiento o matándolos.

La transmisión de manera indirecta, se da por medio de fómites previamente expuestos al virus, como instrumentos de limpieza o médicos, ropa de trabajo o bien el mismo personal, así como el transporte.

Signos clínicos

La sinología de la enfermedad es variable, dependiendo de la etapa de producción a la que afecta. Sin embargo, hay una serie de signos que se presentan en todas las etapas como fiebre, inapetencia, polipnea, disnea, cianosis en orejas, conjuntivitis, eritema, tos y estornudos, así como la presencia de otros agentes infecciosos, principalmente bacterianos (Goyal, 1993).

Además de los signos antes mencionados, llegan a presentarse algunos otros dependiendo del ciclo productivo en el que se afectan los animales.

En cerdas gestantes puede tener una sinología diferente, dependiendo de la etapa de gestación en la que se encuentre. Si la cerda se infecta en el primer tercio de la gestación puede provocar repeticiones irregulares, debido a que el virus puede llegar a los fetos, infectarlos y matarlos, provocando una reabsorción embrionaria y posteriormente el retorno al estro. En el segundo tercio de la gestación puede provocar momificaciones o abortos. Y al final de la gestación, puede haber partos prematuros y los cerdos pueden llegar a nacer débiles o bien, pueden nacer muertos (Goyal, 1993; Han K *et al.*, 2014; Macías *et al.*, 2006; OIE 2008).

En los sementales, puede llegar a afectar el semen, provocando la aglutinación, así como una elevada alteración en los espermatozoides, provocando un bajo rendimiento (OIE 2008).

En cerdos en crecimiento, desarrollo y engorda se presenta en una forma respiratoria causando neumonía intersticial y aumentando la susceptibilidad a la infección con otros patógenos. Aunque la infección con PRRSV puede ser subclínica, la enfermedad clínica se hace evidente cuando las infecciones secundarias están presentes. Así PRRSV contribuye al complejo respiratorio porcino (Macías *et al.*, 2006). En esta etapa es donde el impacto económico es más severo, ya que los cerdos no llegan a la ganancia de peso esperada, y su conversión alimenticia es baja, provocando una extensión en el tiempo de engorda (Zhang, 2014).

Patogenia

La vía de entrada del virus es oro-nasal, viajando por el tracto respiratorio hasta llegar a los alveolos, ahí las células diana para la replicación de PRRSV son los macrófagos alveolares porcinos (PAM's), que son responsables de la fagocitosis de los microorganismos en los alvéolos (Zhang Q, et al 2015).

Inicialmente, el PRRSV se une al heparán sulfato presente en la superficie de macrófagos. Al menos seis moléculas han sido reportadas como receptores celulares para PRRSV: vimentina, heparán sulfato, CD151, CD163, sialoadesina y DC-SIGN también conocido como CD209 (Figura 3).

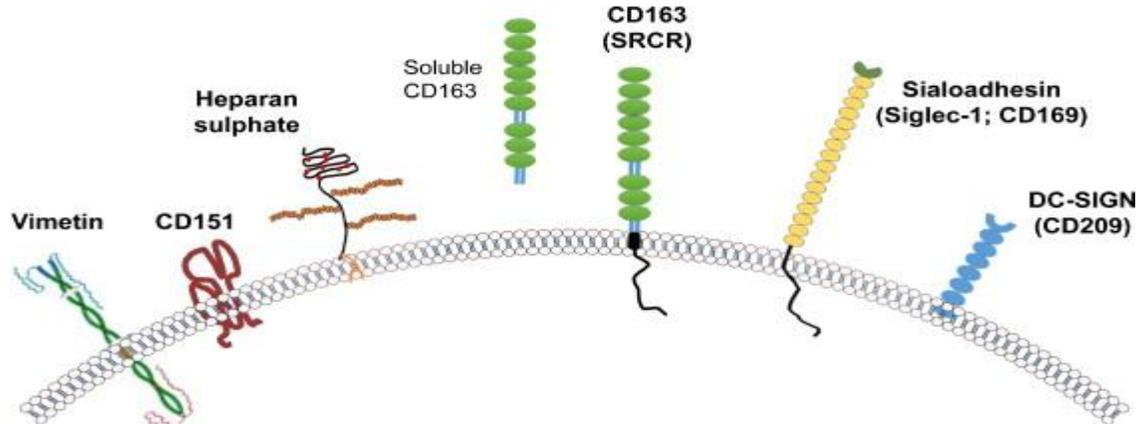


Figura 3. Receptores de Membrana Celular para el virus de PRRS.

(Zhang Q, et al 2015)

Tras la unión a la sialoadesina, el complejo virus-receptor se internaliza a través de un proceso de endocitosis mediada por clatrina. Tras la internalización, el genoma viral se libera del endosoma temprano en el citoplasma de la célula huésped, iniciando la transcripción y traducción necesarias para la formación de nuevos viriones. El receptor CD163 es esencial para la interacción con la GP 2 y GP 4 y formar un endosoma. Además, las proteasas celulares y la acidificación del pH dentro del endosoma temprano es crucial para la liberación del genoma viral dentro de la célula (Figura 4).

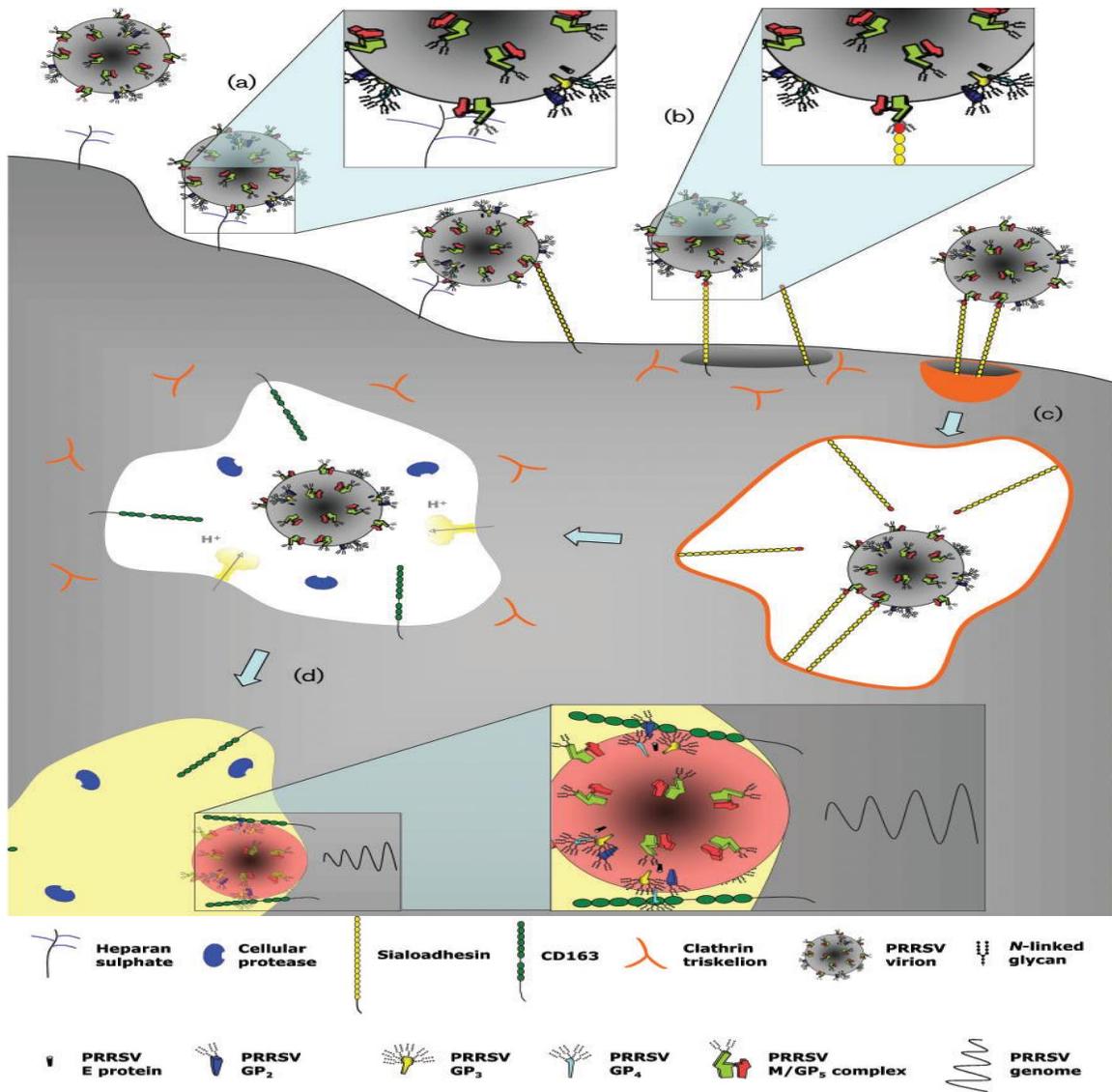


Figura 4. Internalización del virus

(Van Breedam *et al* 2010)

Inicialmente, GAGs heparán de PRRSV se une al sulfato presente en la superficie de macrófagos (a). El virus se une al receptor a través de sialoadhesin M con la GP₅ (b). Tras la unión a sialoadhesin, el complejo virus-receptor se internaliza a través de un proceso de endocitosis mediada por la clatrina (c). Tras la internalización, el genoma viral se libera del endosoma temprano en el citoplasma de la célula huésped (d), iniciando de este modo los acontecimientos de transcripción y traducción necesarias para la formación de nuevos virones.

La replicación del virus del PRRS en PAM's afecta directamente a sus funciones básicas, incluyendo la fagocitosis, presentación de antígenos y la producción de citoquinas. PRRSV induce la apoptosis en PAM y también induce la apoptosis de linfocitos y macrófagos en los pulmones, y los órganos linfoides que afecte a la respuesta inmune del huésped.

Posteriormente, el virus se distribuye a los diversos órganos, produciendo neumonía intersticial, vasculitis, linfadenopatía, miocarditis, encefalitis o rinitis.

En las cerdas gestantes puede atravesar la barrera placentaria e infectar a los fetos, provocando abortos al final de la gestación o partos con lechones débiles o muertos (Goyal, 1993; Gómez, 2013; Han K *et al.*, 2014).

El virus puede estar presente varios días después de la infección en varias secreciones como en saliva (42 días), secreción nasal (21 días), orina (28 días), semen (más de 92 días) y tiene la capacidad de persistir > 250 días en los órganos linfoides. El virus también se ha detectado en calostro y en leche en cerdas expuestas al virus durante la gestación (Morilla *et al.*, 2004).

Respuesta inmune

En el caso del PRRSV la infección puede dividirse claramente en dos fases sucesivas:

1. Una fase virémica, cuya duración oscila entre días y varias semanas en función de la edad del animal afectado y de la cepa.
2. Una fase no virémica de persistencia del virus en los tejidos linfoides que puede durar meses.

No está claro cómo persiste el virus, probablemente se debe a varios factores que incluyen al menos la interacción del virus con el sistema inmunitario del hospedador, el origen genético del animal y la cepa específica de virus que infecta al cerdo.

Inmunidad innata

Las células dianas del PRRSV son los macrófagos y ocasionalmente las células dendríticas mieloides, ambos actúan como intermediario entre las respuestas inmunitarias innata y adaptativa. La susceptibilidad de los macrófagos a la infección depende del genotipo del virus. Se cree que el PRRSV podría intervenir en algunos elementos de estos tipos de células o con ellos. A partir de estudios iniciales se sabe que el PRRSV inhibe las respuestas de interferón de tipo I en macrófagos (Gómez, 2013).

El PRRSV podría replicarse en varios tipos de células dendríticas y provocar inhibición de los interferones de tipo 1 y la funcionalidad o las respuestas a citosinas. Además, se sabe que la infección podría estimular la secreción de citosinas inmunosupresoras como la IL10 (Gómez, 2013; Obdulio *et al.*, 2014).

Después de la infección, la respuesta más temprana está dirigida contra la proteína N que es medible entre el día 5 y 9 PI. Los anticuerpos contra la NSP1 y NSP2 son evidentes a los 14 días PI, y alcanzan su máximo nivel en 28- 35 días PI. Todos estos anticuerpos producidos tempranamente son no neutralizantes mientras que los anticuerpos neutralizantes aparecen por primera vez 4 semanas PI o incluso más tarde. La respuesta de anticuerpos neutralizantes contra el epítipo neutralizante GP5 es poca y retardada, y algunos animales no logran montar una respuesta de anticuerpos (Gómez, 2013; Lovinga *et al.*, 2015).

Respuesta humoral

Los anticuerpos contra el virus aumentan rápidamente (aproximadamente 1 semana después de la infección). Estos anticuerpos se dirigen principalmente contra la proteína estructural inmunodominante de la nucleocápside vírica, pero carecen de capacidades neutralizantes (Lovinga *et al.*, 2015). Sin embargo, los anticuerpos neutralizantes se dirigen principalmente contra GP3,

GP4 y GP5 y al final aparece GP2 de forma tardía en la infección (Lee *et al.*, 2014).

Por otra parte, el virus ha desarrollado mecanismos patogénicos para alterar a su favor la respuesta inmune del cerdo:

- Utilización de escudo de glúcidos (Carbohidratos) para prevenir la neutralización de GP5 y GP3. Estos carbohidratos rodean al epítipo, evitando que lleguen los anticuerpos. A este fenómeno se le llama blindaje N-glicano (Murtaugh *et al.*, 2011).
- El PRRSV tipo 2, utiliza epítipos señuelo o de distracción. Los cuales son producidos por la GP5 que es más inmunodominante que el epítipo neutralizante. Esto con el fin de evitar la neutralización por anticuerpos (Chand *et al.*, 2012).

Debido a que el virus tipo 2, tiene la capacidad de inducir anticuerpos contra el epítipo señuelo, los anticuerpos producidos al inicio de la infección no son neutralizantes, lo que provoca que no se pueda unir al virus para generar una respuesta inmune contra él (Lovinga *et al.*, 2015).

Después de que los anticuerpos no neutralizantes disminuyen a partir de la semana cuatro hay una elevada producción de anticuerpos neutralizantes. Al mismo tiempo la viremia disminuye debido a que el animal comienza a ejercer una respuesta más eficiente hacia el virus (Figura 5) (Lovinga *et al.*, 2015)

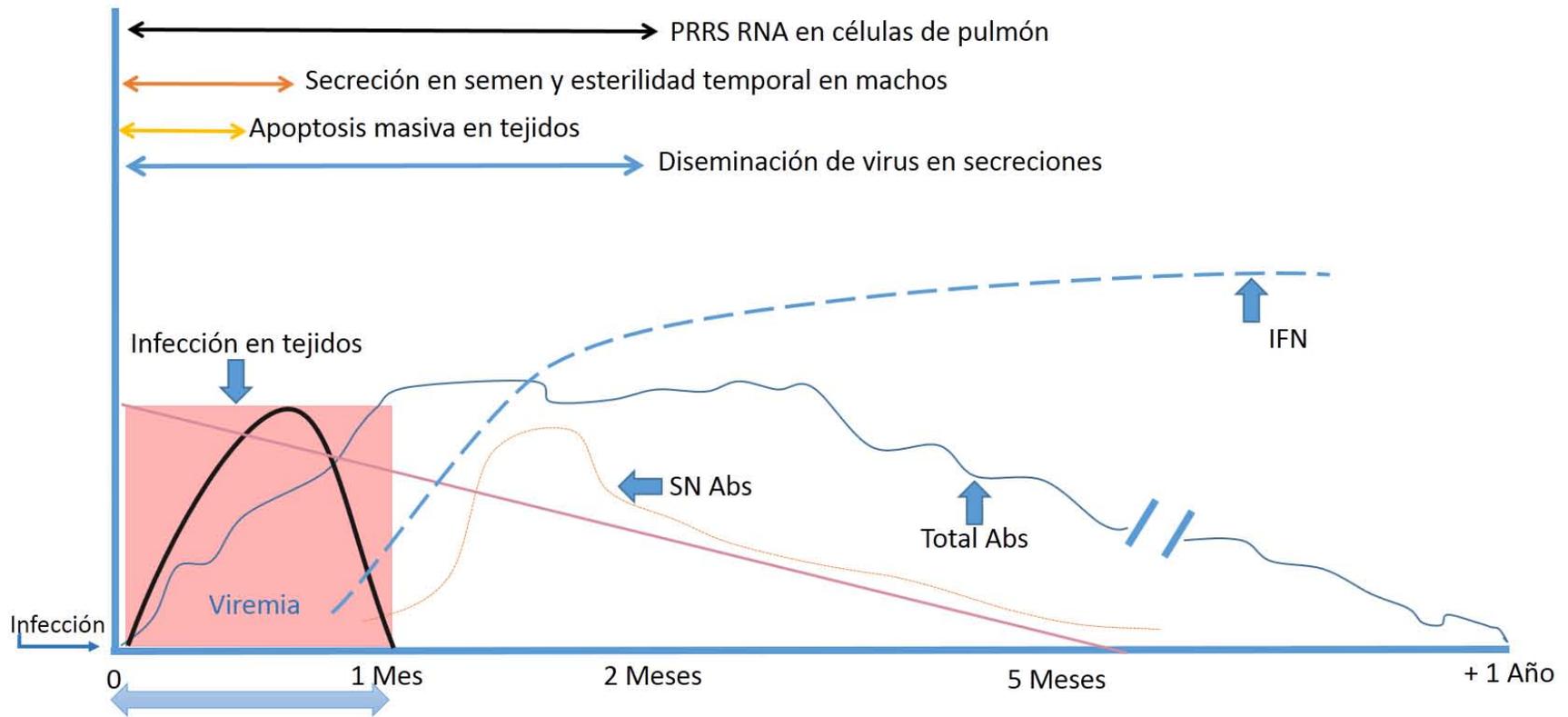


Figura 5. Respuesta inmune ante la infección de PRRS

Modificado: <http://www.veterinaria.org>

Historia natural de la enfermedad de PRRS

El proceso de infección de PRRS se puede dividir en tres partes importantes

- Periodo Prepatogénico. – Durante esta etapa existe una interacción huésped, agente y ambiente (triada epidemiológica) donde estos tres factores se mantienen en equilibrio, si este equilibrio se pierde, comienza la infección dentro del huésped, en este caso a los cerdos. Dando pie a la cadena epidemiológica donde la infección se da por el contacto de secreciones de animales enfermos, ya sea directo o por fómites, el virus se replica en el hospedero (cerdo) provocando la enfermedad y posteriormente la excreción del virus.
- Periodo Patogénico. – Una vez que el virus se comienza a replicar en las células, atraviesa el horizonte clínico y comienza a provocar signos clínicos como neumonía, fiebre, abortos, estornudos etc. Si estos animales no tienen un tratamiento para evitar infecciones secundarias podrían complicar el cuadro respiratorio y causar la muerte.
- Periodo Pospatogénico. – Si los animales sobreviven a la enfermedad, pueden quedar como portadores del virus o bien y posteriormente volverse a enfermar (Figura 6).

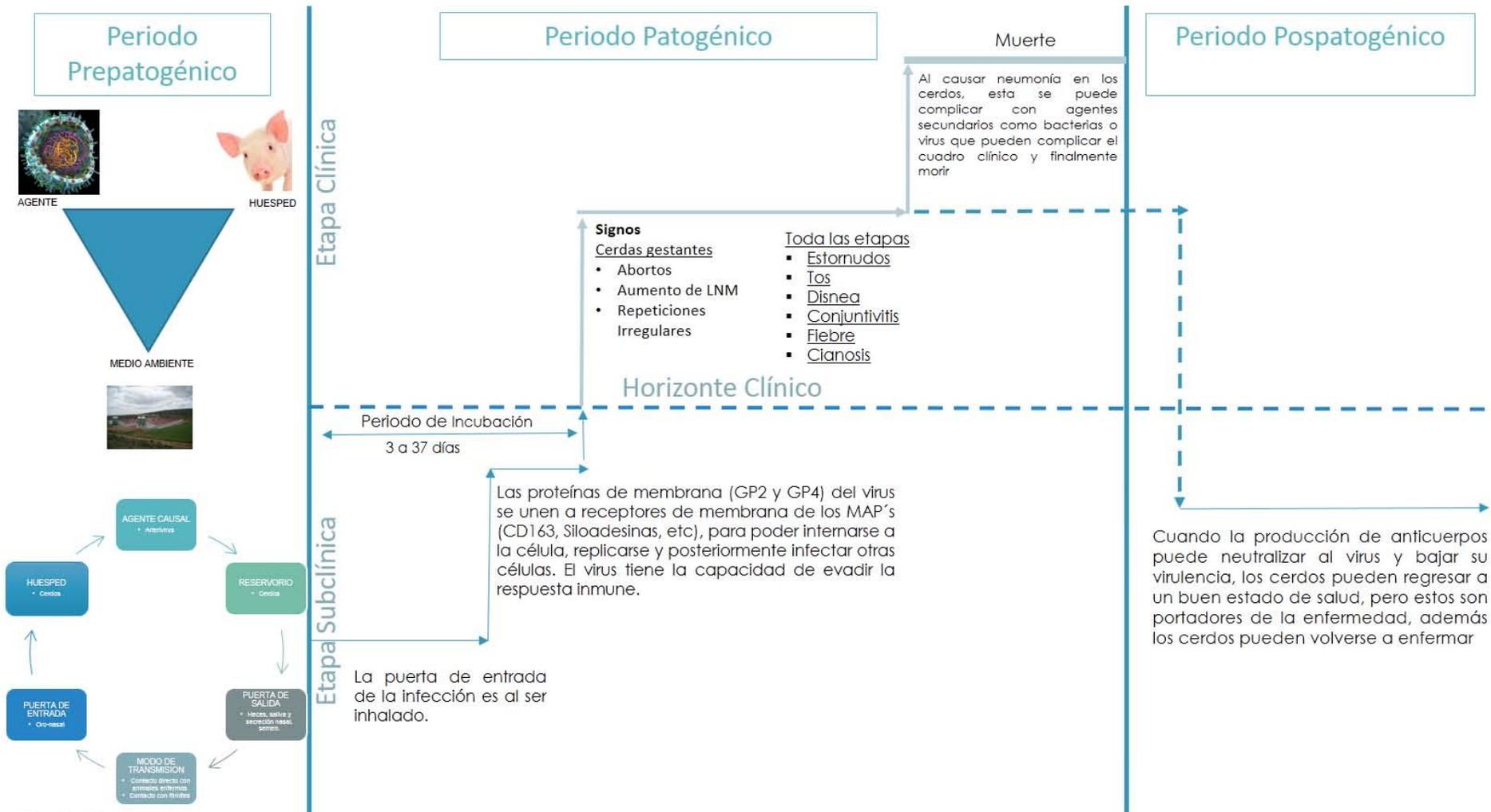


Figura 6. Historia Natural de la Enfermedad de PRRS

Diagnóstico

El diagnóstico de PRRS es importante ya que con el reconocimiento del virus dentro de las granjas se puede llegar a lograr su control y erradicación.

La problemática que se presenta en el diagnóstico, es la falta de signos y lesiones “específicas” de la enfermedad. Su sinología es similar a otras enfermedades, es por esto que se tienen que realizar pruebas específicas.

Es importante saber qué tipo de muestras se enviarán al laboratorio, así como el tipo de estudio que se realizará, lo que dependerá de la etapa de infección en la que se encuentre los cerdos muestreados (Figura 7).

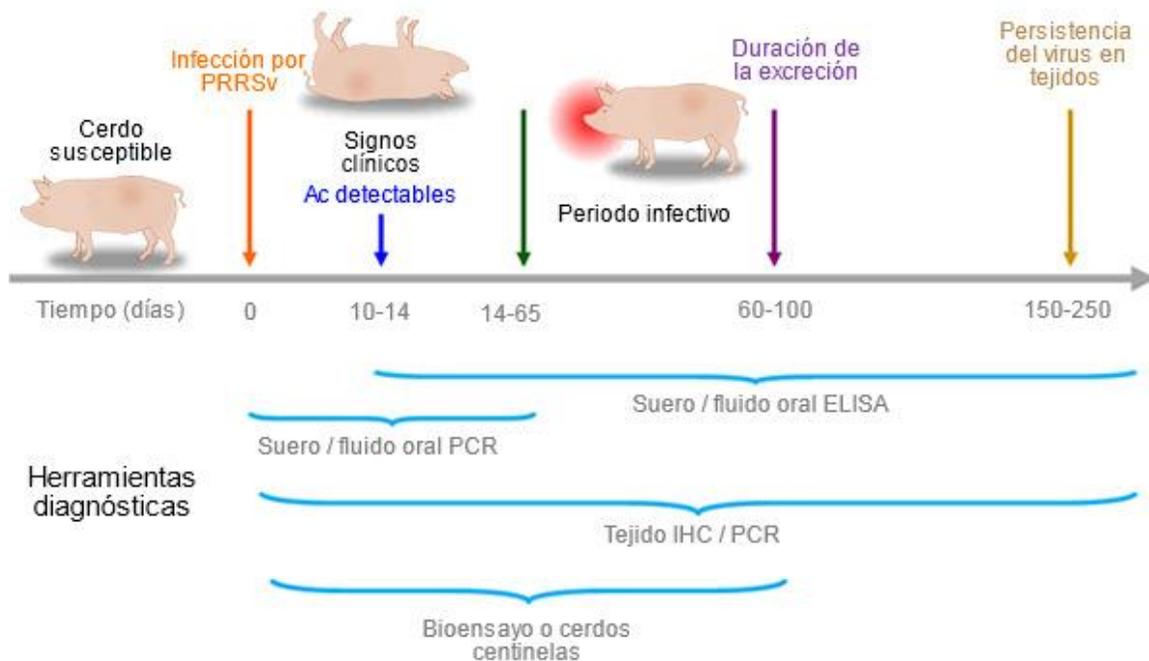


Figura 7. Diagnóstico de PRSS en diferentes momentos de infección

<https://www.pig333.com>

Las pruebas utilizadas para el diagnóstico son muchas, las principales, son mencionadas a continuación.

❖ RT-PCR.

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa- Transcriptasa Reversa (RT-PCR), consiste en la detección del virus, en suero, tejidos o secreciones, a través de la complementación de ARN con nucleótidos y posteriormente su amplificación.

Existen varios tipos de PCR, los más utilizados para la detección de PRRS son:

- RT-PCR Punto Final. - Se realizan copias del material genético a partir de la muestra, y posteriormente se coloca en un gel de agarosa para realizar una electroforesis.
- RT-PCR Tiempo Real. - Al igual que el anterior, se amplifica el material genético y por medio de fluorescencia se determina la cantidad de material genético viral en la muestra.

La diferencia entre estas dos técnicas, es que la RT-PCR Punto Final, es cualitativa y la RT-PCR Tiempo Real es cuantitativa, además de que este último tiene mayor rapidez y en su proceso hay una menor manipulación, además los desechos tóxicos durante su proceso son menores.

❖ Aislamiento viral.

Para realizar el aislamiento viral de PRRS, es necesario la utilización de cultivos celulares adecuados, los cultivos celulares que han mostrado un mejor resultado son:

- Macrófagos alveolares porcinos (a partir de un cultivo primario).
- Líneas Celulares (CL 2621 o MARC 145) (Goyal, 1993).

El efecto citopático ocasionado en las células post-infección se debe confirmar con un RT-PCR, inmunoperoxidasa o inmunofluorescencia. El aislamiento de virus es un trabajo intensivo, tiene un bajo nivel de sensibilidad en comparación con la PCR y depende de los virus viables presentes en la muestra. El tiempo de

realización del aislamiento puede ir de 8 días a varias semanas de trabajo (Boeringer 2015).

❖ Inmunohistoquímica ((IHQ)

La Inmunohistoquímica detecta el antígeno de PRRSV en tejidos fijados con formaldehído utilizando diferentes sistemas de marcado y métodos de detección. Las muestras de elección para ésta técnica son las tonsilas y el pulmón. Es importante señalar que el tipo de fijador utilizado, el tiempo de fijación y el método utilizado para realizar la técnica pueden influenciar los resultados que se obtengan para la misma.

❖ Inmunofluorescencia directa

Prueba rápida y económica. Se utiliza tejido fresco, preferentemente pulmón, el cual se congela a -70 grados centígrados y se hacen cortes finos. Se utiliza un anticuerpo monoclonal contra PRRSV conjugado con fluoresceína. La lectura se realiza en un microscopio de inmunofluorescencia. Prueba específica, pero poco sensible, sobre todo si el tejido ha sufrido de autólisis.

Serología

❖ Inmunoensayo enzimático (ELISA)

Esta prueba consiste en la detección de anticuerpos en el suero de los cerdos, demostrando la exposición previa al virus, así como su circulación en la granja.

Las ELISA más utilizada es la indirecta y posee una sensibilidad del 95% y una especificidad del 95% además de ser rápida. En la actualidad, en México existen varios Kits comerciales para la detección de PRRS en animales infectados, estos detectan los anticuerpos en el suero sanguíneo o saliva.

❖ Prueba de neutralización viral en suero

Es una prueba específica, pero de baja sensibilidad. Los anticuerpos detectables por ésta técnica perduran por más tiempo que los detectables por ELISA. No es una prueba muy utilizada en la actualidad, debido al costo de realización y al tiempo de respuesta para los resultados.

Control

Las medidas que se utilizan para el control de la enfermedad incluyen manejo, bioseguridad y la utilización de biológicos.

Bioseguridad.

Para la prevención y control de PRRS es necesario tener buenas medidas de bioseguridad para evitar el contagio de otras granjas por medio de animales, fómites o aerosoles, así como para evitar la propagación de la enfermedad, dentro de la misma.

Las principales medidas de bioseguridad que se utilizan en las granjas para prevenir la entrada de esta enfermedad son:

- Desinfección de los transportes que vayan a ingresar a la granja, así como los instrumentos y vestimenta de las personas.
- Utilización de cuarentenas largas, sometiendo a pruebas de diagnóstico a los animales.
- Se recomienda un sistema de producción todo dentro, todo fuera, donde la instalación tenga una óptima desinfección
- Debido a que los animales pueden tener una alta carga viral en la sangre, se recomienda utilizar una aguja por animal.
- Evitar la presencia de fauna silvestre dentro de la granja que puedan transportar heces contaminadas.

Manejo

Actualmente en México se utiliza una clasificación donde las granjas se dividen, dependiendo de su estatus con el virus. Esta clasificación consta de cuatro estadios.

1.- Granja Negativa. Esta se refiere a las granjas que nunca han tenido contacto al virus, por lo tanto, la serología y la presencia del virus es nula.

2.- Granja Activa Inestable. Esta clasificación, hace referencia a las granjas con un brote, esto quiere decir que han sido expuestas al virus y la enfermedad aún no se ha controlado, teniendo los signos presentes en todas las etapas que se encuentren dentro de la granja.

3.- Granja Activa Estable. Las granjas localizadas en esta clasificación se encuentran con el pie de cría estable, con presencia del virus, pero sin causar enfermedad, sin embargo, tienen problemas con los cerdos de producción, ya que estos presentan serología y baja conversión alimenticia.

4.- Granja Inactiva Estable. - Se refiere a la granja que es positiva a serología, pero no hay circulación viral. Es decir, la granja no tiene presencia de signos clínicos.

Dependiendo del estado en el que se encuentre la granja, es el manejo que se realizará para su control.

Si la granja es positiva a PRRS, estas son las recomendaciones.

- Control de Infecciones secundarias.
- Mantener Cerrada la Granja. - Una vez que en la granja se detecta la presencia de PRRS se recomienda mantenerla cerrada para evitar la entrada y salida de animales, y mantenerla así hasta que se estabilice.

- Cuarentenas largas a remplazos y animales nuevos. - Debido a que la viremia es larga, se recomienda que la cuarentena también lo sea, incluyendo a remplazos propios de la granja, esto con el fin de adaptar los animales al virus, o detectar algún animal enfermo.
- Multisitios. - Para evitar la recirculación del virus, se recomienda mantener en diferentes sitios las etapas reproductivas.
- “Calentar y enfriar a las cerdas”. - Este procedimiento consiste en exponer a las cerdas nuevas o de remplazo al virus. Esto con el propósito de infectar a las cerdas y mantenerlas en cuarentena mientras se encuentren virémicas. Una vez que los signos hayan pasado, se introducen a la granja. Esto con la finalidad de que las cerdas tengan una producción de anticuerpos contra el virus y cuando entren a la granja o sitio, no se enfermen o bien, no introduzcan una cepa diferente del virus.

Vacunación

La vacunación contra PRRS comenzó en 1994 utilizando los virus aislados, se comenzó por elaborar las vacunas con virus inactivo, sin embargo, estas no tenían la efectividad suficiente para proteger a los animales de la infección de VPRRS (XJ, 2000).

Posteriormente se comenzaron a utilizar vacunas de virus modificado (MLV) las cuales son más eficaces se obtiene un 100% de protección si el virus de campo es homólogo al de la vacuna (Murtaugh *et al.*, 2011).

Actualmente en el mercado existen vacunas MLV las cuales ejercen protección relativamente retardada, entre la tercera y cuarta semana pos- vacunación, ya que, en este tiempo, es cuando se comienza la producción de anticuerpos neutralizantes. Además de ejercer protección contra un genotipo en específico,

puede ejercer interferencia con la vacunación de otras enfermedades como *Mycoplasma* (Murtaugh *et al.*, 2011).

La vacuna MLV confiere una protección efectiva contra un genotipo y cepa específicos, pero con cepas heterólogas, proporcionan una protección parcial (Lee *et al.*, 2014; Murtaugh *et al.*, 2011; XJ, 2000).

Varios experimentos han demostrado que el uso de la vacuna MLV reduce significativamente las lesiones y signos clínicos frente al desafío con cepas homólogas de PRRSV. Además, muestra una reducción en la proporción de cerdos infectados en forma persistente y en el tiempo de excreción viral utilizando cepas homólogas del virus vacunal. Sin embargo, es claro que la vacuna no previene la reinfección con cepas homólogas, sólo disminuye los signos de la enfermedad. Frente a cepas heterólogas, se presenta el mismo escenario, pero la protección es menor.

Inmunoglobulinas tipo Y (IgY)

El nombre IgY proviene del nombre inglés “yolk” o yema y es la principal inmunoglobulina del suero implicada en la respuesta inmune secundaria más predominante en el suero de los anfibios, reptiles y aves. Entre los isotipos aviares (IgY, IgM e IgA), IgY es el más abundante en el suero, con concentraciones que van de 5 a 15 mg/ml en gallinas de postura. Además, es análoga a la IgG presente en los mamíferos (Edzard *et al.*, 2012).

La IgY está conformada por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, contiene en su estructura una parte variable y cuatro constantes, se caracteriza por no tener bisagra, sin embargo, contiene cierta flexibilidad en algunas regiones de sus cadenas (Cu2 y Cu3) (Figura 8). La proteína completa tiene un peso molecular de 180 kDa. Cuando la proteína se encuentra truncada pesa 120 kDa. (Warr *et al.*, 1995; Wilmar *et al.*, 2010)

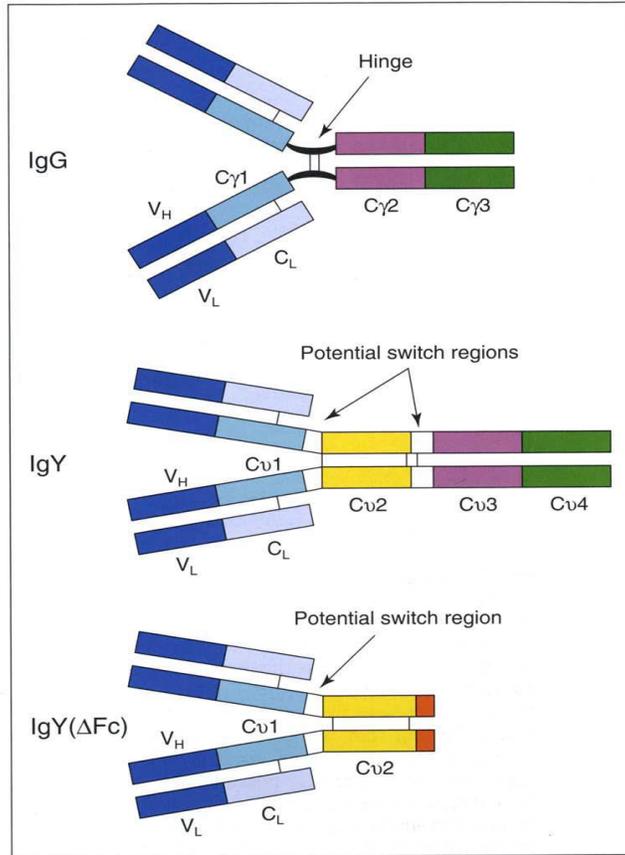


Figura 8. Estructura IgY (Warr *et al.*, 1995)

IgY parece combinar funciones de IgG e IgE en mamíferos, ya que no sólo proporciona una defensa contra las infecciones, también pueden mediar la anafilaxia (Edzard *et al.*, 2012).

Las ventajas que se pueden obtener de la utilización de IgY son muchas, entre ellas está la preservación del bienestar animal, ya que no es un método invasivo como el de mamíferos donde se sacrifica al animal para obtener niveles considerables de anticuerpos, en las aves se deposita en el huevo y de este se puede recolectar fácilmente.

Además, la cantidad de anticuerpos producidos por una gallina es mucho mayor que en mamíferos, siendo fácilmente extraíble de la yema y relativamente sencillo su proceso de obtención.

Debido a la distancia filogenética entre aves y mamíferos, los anticuerpos de aves no tienen reacciones cruzadas con las IgG de mamíferos, minimizando las falsas reacciones positivas a ausencia de reacciones inespecíficas con el complemento, lo que la hace una inmunoglobulina de elección para pruebas de ELISA evitando así resultados falsos positivos. Por otro lado, el sistema inmune de las aves es capaz de producir anticuerpos específicamente dirigidos contra antígenos de mamíferos altamente conservados (Warr *et al.*, 1995).

De este modo la IgY puede reconocer partes específicas de una molécula que no son reconocidas por la IgG, importante en el momento de construir herramientas de diagnóstico. Además, se requiere una baja cantidad de antígenos para obtener una concentración duradera de IgY en la yema de los huevos de gallinas inmunizadas (Warr *et al.*, 1995).

JUSTIFICACIÓN

La alta variabilidad genética y antigénica del virus de PRRS ha provocado que la protección ejercida por las diversas vacunas en el mercado, sean poco efectivas, ya que los anticuerpos generados en la vacunación pueden no ser homólogos a los virus de campo.

Desde hace algún tiempo se han empezado a utilizar inmunoglobulinas de aves como una alternativa para ejercer protección a los animales, siendo una herramienta para el control de la enfermedad.

Actualmente existen en el mercado, algunas inmunoglobulinas de origen aviar para la protección de los cerdos para diferentes enfermedades. Una de ellas es InmunoPRRS®, la cual cuenta con diferentes aislados de campo de PRRSV en México, que pueden proteger contra cepas heterólogas a la cepa VR2332.

HIPÓTESIS

Con el uso de inmunoglobulinas de origen aviar específicas para PRRS, será posible controlar una infección contra PRRS, disminuyendo la viremia, así como los signos clínicos y las lesiones en cerdas gestantes y sus camadas, y cerdos destetados. Disminuyendo el impacto de la enfermedad en diferentes etapas de producción.

OBJETIVO

Evaluar la protección conferida por la inmunización con INMUNOPRRS® ante una infección del virus de PRRS experimental en cerdas gestantes y cerdos en destete contra una cepa de campo aislada recientemente en México.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Evaluar la capacidad protectora de INMUNOPRRS® en hembras gestantes desafiadas y no desafiadas con VPRRS.
- 2.- Evaluar la eficacia de INMUNOPRRS® en cerdos destetados, mediante la excreción viral de VPRRS.
- 3.- Evaluar las lesiones en pulmón y linfonodos de los animales tratados y no tratados con INMUNOPRRS®.

MATERIAL Y METODOS

Animales

Para la realización del experimental se ocuparon seis cerdas gestantes de diferentes partos y 30 cerdos destetados de diferentes camadas. Todos los cerdos provenientes de una granja negativa a PRRS, no obstante, se les realizó una prueba de ELISA de PRRS (IDEXX) y RT-PCR por punto final y tiempo real para PRRS previo a la parte experimental del desafío.

Los cerdos fueron alojados en las unidades de aislamiento del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos. Durante el experimento recibieron alimento y agua a libre acceso, la temperatura en la que se mantuvieron fluctuaba entre 28-30°C.

Las unidades de aislamiento donde se alojaron, cuentan con sistema de flujo de aire filtrado, drenajes independientes; así como, un área para el cambio de ropa adecuada para el ingreso al área de aislamiento.

Para poder identificar la protección ejercida por las que se realizó la investigación en dos etapas, la primera etapa en cerdas próximas al parto y sus lechones, la segunda etapa en cerdos destetados.

Virus de Desafío

El virus utilizado para el desafío se obtuvo de un aislado de campo de noviembre del 2014 con un título de 10^5 copias por reacción.

Manteniendo al cerdo con la jeta hacia arriba, se instiló 1 ml de virus en cada fosa nasal a con una jeringa de insulina (1ml). Se fue instalando poco a poco, conforme el cerdo inspiraba, una vez terminada la dosis, se mantuvo el cerdo dos minutos en esa posición para permitir que el virus se adhiriera en la mucosa nasal y con las degluciones asegurarse que el virus llegara a la nasofaringe.

Biológico

Inmunoglobulinas de origen aviar Inmunizadas contra PRRSV. Fueron obtenidas del producto InmunoPRRS®.

Primera Etapa

Se obtuvieron seis cerdas negativas a PRRS de diferentes partos, las cuales se encontraban en el último tercio de gestación.

A las cerdas se le asignó un número al azar, del 1 al 6. A todas las cerdas se les aplicó InmunoPRRS® dos veces con un intervalo de quince días. La dosis utilizada fue 1 ml (según la recomendación del producto) vía intramuscular. A la cerda 4, 5 y 6 se les desafió al virus de PRRS un día después de la segunda inmunización (Figura 9).

Cerdas Gestantes

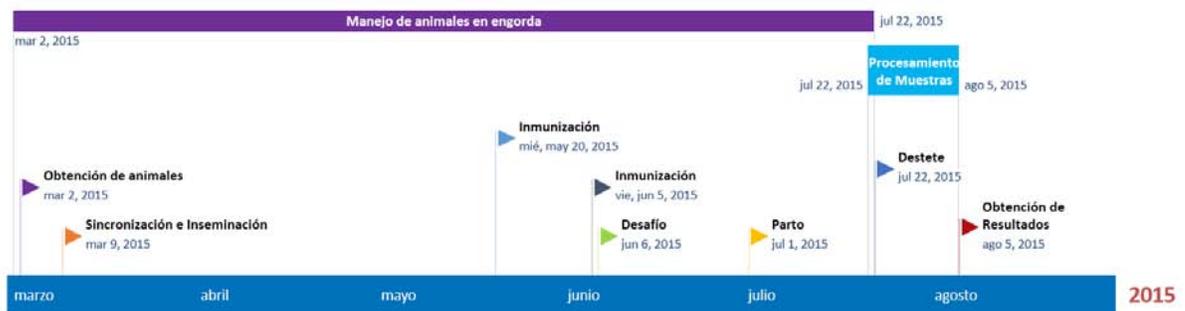


Figura 9. Cronograma Cerdas Gestantes

A las seis cerdas se les tomaron muestras sanguíneas e hisopos nasales cada quince días desde la primera inmunización hasta el parto. De igual manera se les tomaron muestras sanguíneas e hisopos nasales a los lechones de cada cerda al día 1, 10 y 20 de vida.

Las muestras obtenidas se utilizaron para determinar el grado de viremia de los animales, a su vez se analizaron para poder evaluar la protección ejercida por las inmunoglobulinas tipo Y de origen aviar.

Al finalizar el estudio las cerdas fueron enviadas a rastro y las camadas fueron utilizadas para las prácticas dentro del DMZC de FMVZ-UNAM.

Segunda Etapa

Los cerdos destetados se obtuvieron al día 21 de vida de una granja libre de PRRS. Se hicieron seis grupos de cinco cerdos al azar.

Grupo 1 (C-). Control negativo (cerdos sanos).

Grupo 2 (C+). Control positivo (cerdos sanos y posteriormente infectados con PRRS).

Grupo 3 (1N ND). Fueron inmunizado con una dosis de INMUNOPRRS® sin ser desafiados.

Grupo 4 (2N ND). Fueron inmunizado con dos dosis de INMUNOPRRS® sin ser desafiados.

Grupo5 (1N D). Inmunizado con una dosis de INMUNOPRRS® y expuesto al virus de campo.

Grupo 6. (2N D). Inmunizado con dos dosis de INMUNOPRRS® y expuesto al virus de campo.

Se realizaron muestreos de estos animales cada cinco días de hisopos nasales y muestras sanguíneas hasta el día 70 de vida (Figura10) (Figura 11).

Cerdos Destetados

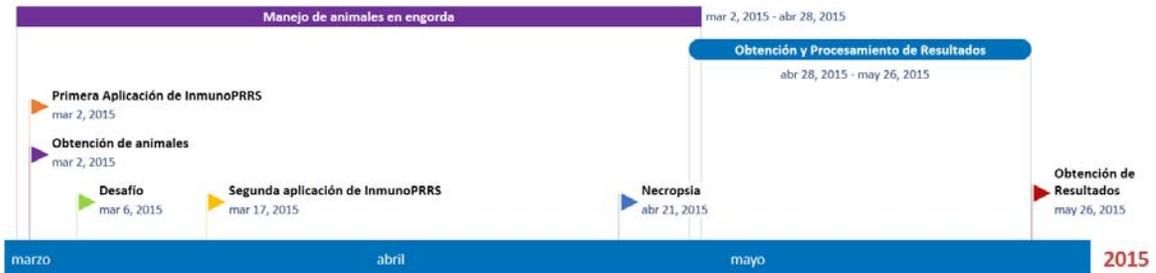


Figura 10. Cronograma Cerdos en Engorda.

Muestreo de Cerdos Destetados



Figura 11. Calendario de toma de muestras.

La dosis de InmunoPRRS® aplicada fue de 3ml. IM, según lo recomendado en la etiqueta.

Una vez que los cerdos llegaron a los 70 días se les realizó la eutanasia para posteriormente hacer la necropsia y observar lesiones macroscópicas, posteriormente se realizó la toma de muestras de pulmón y linfonodos inguinales.

Pruebas

Las pruebas a utilizar para las muestras son:

1. ELISA para la detección de IgY 's.

Esta prueba se realizó en el laboratorio de IASA C.A. de S.V., donde se detectó la presencia de Inmunoglobulinas de origen aviar en el suero. Se utilizó el Kit comercial Abcam para proteínas.

Para poder evaluar a las camadas y grupos de cerdos destetados, se realizó un promedio de valores obtenidos en la ELISA.

2. ELISA UNAM para la detección de anticuerpos contra PRRS.

La prueba se estandarizó en el DMZC y el Instituto de Biomédicas, y se utilizó para la detección de anticuerpos contra PRRS. Esta prueba se ha utilizado en estudios previos y validación por Garcia en el 2016 (Garcia 2016).

3. RT-PCR Tiempo Real para determinar la excreción del virus (hisopos), la detección en el sistema circulatorio (suero) y su presencia en tejidos.

- Para la realización de RT-PCR en hisopos y suero, se realizó la extracción de ARN con el kit comercial de QUIAGEN por el método de columnas, según el protocolo recomendado para el kit. Una vez obtenido el material genético, se llevó a cabo el RT-PCR (FP 100 – Find-IT PRRS) con el protocolo sugerido para el kit.

Los RT-PCR de los hisopos y sueros, fueron individuales y se consideró positivo al grupo si solo un suero salió positivo en cada uno de los muestreos.

- Para la realización de RT-PCR en tejidos se tomó una muestra de la zona más afectada del órgano, posteriormente a cada órgano obtenido se le realizó un macerado con nitrógeno líquido, y se le agregó medio de cultivo. Se centrifugaron las muestras y se obtuvo el sobrenadante, del cual se tomó una parte para realizar la extracción de RNA para el RT-PCR.

El RT-PCR se consideró positivo si al menos un cerdo del grupo o camada fue positivo a la prueba.

4. Histopatología

Se enviaron las muestras de los tejidos en formol al 10% al Departamento de Patología de la FMVZ de la UNAM.

La descripción de los resultados emitidos por el patólogo, se designó un número al grado de severidad de la lesión:

1 = Leve

2 = Moderado

3 = Grave

Con base a esto se hizo un promedio por grupo, por tejido.

RESULTADOS

Etapa 1.

Cerdas Gestantes

Los resultados de la ELISA para la detección de IgY, fueron con valores mayores a 3 ng/ml en las cerdas no desafiadas (ND) mientras que en las cerdas desafiadas (D) los valores oscilan por debajo de 1.70 ng/ml. Por otro lado, en el RT-PCR de suero (PCR S) e hisopos nasales (PCR H), así como las ELISAS para PRRSV, salen negativos en los diferentes muestreos (Cuadro 2).

	Muestreo 1 Día 90 de Gestación				Muestreo 2 Día 105 de Gestación				Muestreo 3 Día 1 de Lactación			
	ELISA IgY	ELISA PRRS	PCR H	PCR S	ELISA IgY	ELISA PRRS	PCR H	PCR S	ELISA IgY	ELISA PRRS	PCR H	PCR S
1 ND	>3	-	-	-	>3	-	-	-	>3	-	-	-
2 ND	>3	-	-	-	>3	-	-	-	>3	-	-	-
3 ND	>3	-	-	-	>3	-	-	-	>3	-	-	-
4 D	>3	-	-	-	1.55	-	-	-	1.70	-	-	+
5 D	>3	-	-	-	1.70	-	-	-	1.70	-	-	+
6 D	>3	-	-	-	1.65	-	-	-	1.50	-	-	+

Cuadro 2. Resultados de cerdas Gestantes

ND: cerdas no desafiadas

D: cerdas desafiadas

PCR S: PCR de suero

PCR H: PCR de hisopos nasales

Camadas

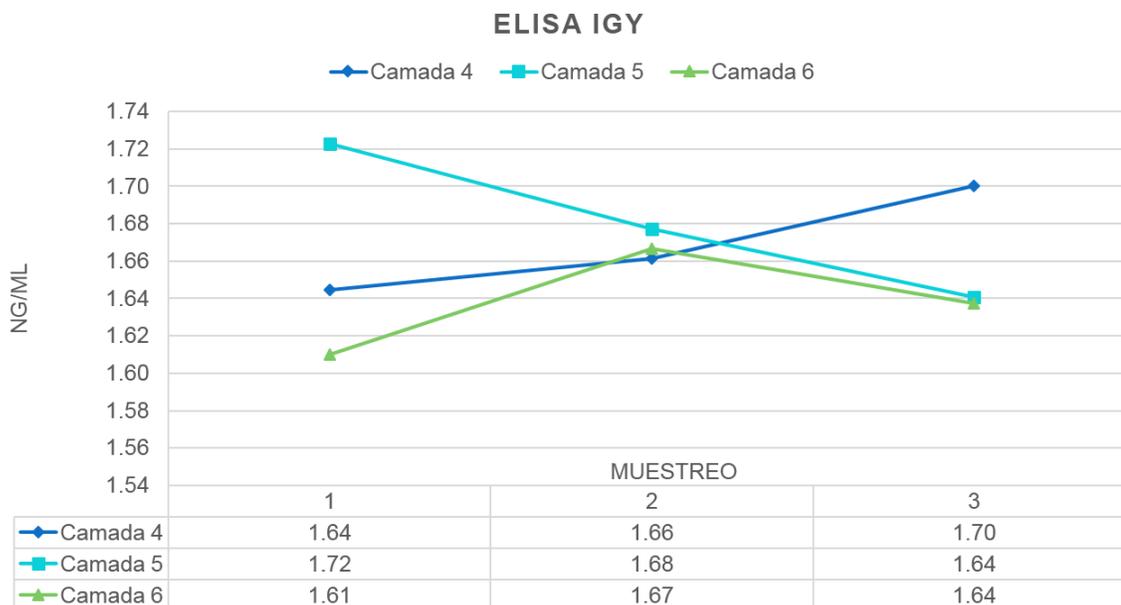
Los resultados de las camadas de las cerdas no desafiadas son similares, ya que resultaron negativos a RT-PCR en hisopos y suero, mientras que en la ELISA para inmunoglobulinas de ave todos los valores fueron superiores a 3 ng/ml (Cuadro 3).

	Día 0				Día 10				Día 20			
	ELISA IgY	ELISA PRRS	PCR H	PCR S	ELISA IgY	ELISA PRRS	PCR H	PCR S	ELISA IgY	ELISA PRRS	PCR H	PCR S
1 ND	>3	-	-	-	>3	-	-	-	>3	-	-	-
2 ND	>3	-	-	-	>3	-	-	-	>3	-	-	-
3 ND	>3	-	-	-	>3	-	-	-	>3	-	-	-
4 D	1.64	-	-	+	1.66	-	-	+	1.70	-	-	+
5 D	1.72	-	-	+	1.68	-	-	+	1.64	-	-	+
6 D	1.61	-	-	+	1.67	-	-	+	1.64	-	-	+

Cuadro3. Resultados de Camadas

ND: cerdas no desafiadas D: cerdas desafiadas PCR S: PCR de suero PCR H: PCR de hisopos nasales

Las camadas de las tres cerdas desafiadas fueron negativas en la excreción del virus (RT-PCR de hisopos), mientras que en suero fueron positivos en los tres muestreos y los valores de IgY en ELISA son por debajo de 1.72 ng/ml (Grafica 1).



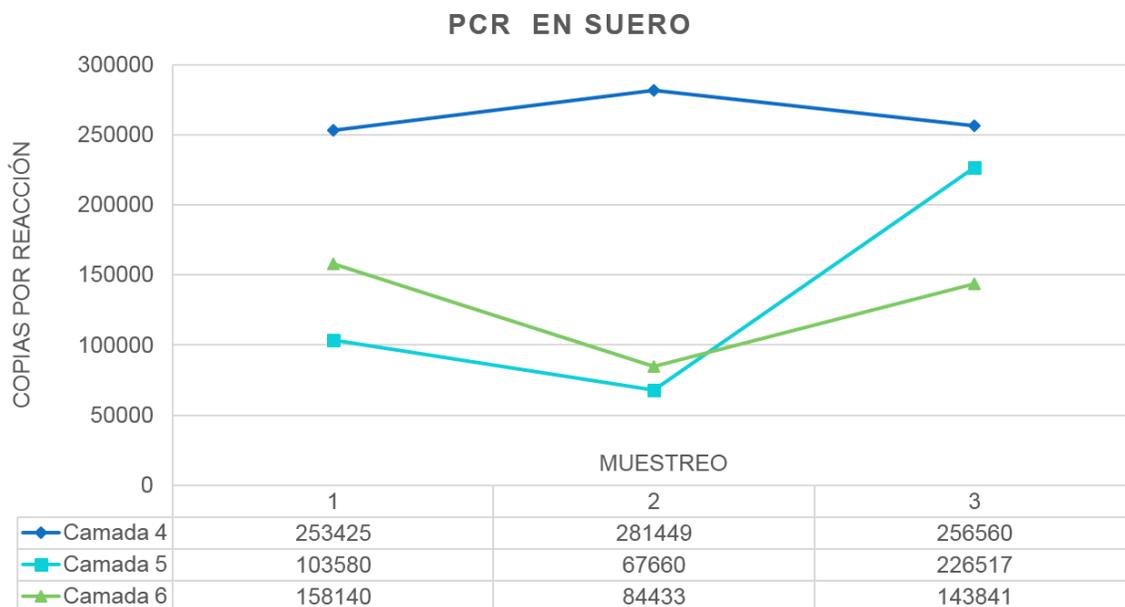
Gráfica 1. ELISA IgY en lechones por camada

Se puede observar en la Grafica 1 que en las camadas 4 y 6 la cantidad de IgY va aumentando conforme van pasando los muestreos, mientras que en la camada 5 ocurre totalmente lo contrario.

Los lechones nacidos bajo un periodo de viremia de la madre, nacen infectados y desde el día de nacidos hasta los 20 días permanecen PCR positivos en suero (Gráfica 2).

Los lechones de la camada cuatro, tienen una mayor concentración de virus durante los tres muestreos, en comparación de la camada 5, donde hubo una marcada disminución de los títulos de virus en el segundo muestreo, al igual que la camada 6.

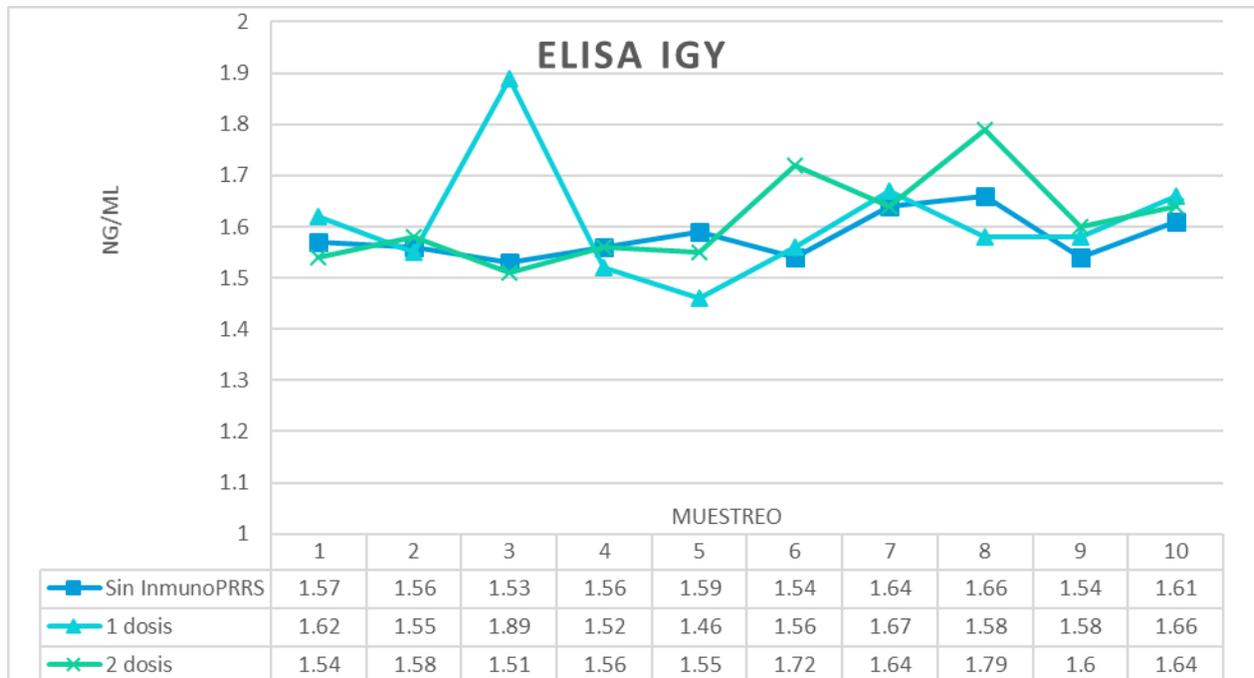
Los lechones provenientes de hembras con InmunoPRRS® y posteriormente desafiadas no presentaron signos clínicos.



Gráfica 2. PCR en suero en lechones

Etapa 2.

La ELISA para IgY los valores de los grupos no desafiados fueron por arriba de 3, mientras que en los grupos desafiados obtuvieron valores muy bajos, acercándose a los valores obtenidos en el grupo sin InmunoPRRS® (Grafica 3).



Gráfica 3. ELISA IgY en cerdos destetados.

Los seis grupos de cerdos fueron negativos al RT-PCR de hisopos y de suero, con excepción del grupo control positivo.

En la ELISA para la detección de anticuerpos contra PRRS se obtuvo un mayor número de positivos en el grupo control positivo, seguido por los grupos desafiados con una y dos dosis de InmunoPRRS® respectivamente (Cuadro 4).

Prueba	Control Negativo	1 Dosis No Desafiado	2 Dosis No Desafiado	1 Dosis Desafiado	2 Dosis Desafiado	Control Positivo	Muestreo
ELISA IgY	-	-	-	-	-	-	1
ELISA PRRS	-	-	-	-	-	-	-5 días
PCR H	-	-	-	-	-	-	
PCR S	-	-	-	-	-	-	
ELISA IgY	-	>3	>3	1.62	1.54	-	
ELISA PRRS	-	-	-	-	-	-	0 días
PCR H	-	-	-	-	-	-	
PCR S	-	-	-	-	-	-	
ELISA IgY	-	>3	>3	1.55	1.58	-	
ELISA PRRS	-	-	-	+	-	+	5 días
PCR H	-	-	-	-	-	-	
PCR S	-	-	-	-	-	-	
ELISA IgY	-	>3	>3	1.89	1.51	-	
ELISA PRRS	-	-	-	-	-	+	10 días
PCR H	-	-	-	-	-	-	
PCR S	-	-	-	-	-	-	
ELISA IgY	-	>3	>3	1.52	1.56	-	
ELISA PRRS	-	-	+	+	-	+	15 días
PCR H	-	-	-	-	-	-	
PCR S	-	-	-	-	-	-	
ELISA IgY	-	>3	>3	1.46	1.55	-	
ELISA PRRS	-	-	-	-	-	+	20 días
PCR H	-	-	-	-	-	-	
PCR S	-	-	-	-	-	-	
ELISA IgY	-	>3	>3	1.56	1.72	-	
ELISA PRRS	-	-	-	-	-	-	25 días
PCR H	-	-	-	-	-	-	
PCR S	-	-	-	-	-	-	
ELISA IgY	-	>3	>3	1.67	1.64	-	
ELISA PRRS	-	-	-	-	-	-	30 días
PCR H	-	-	-	-	-	-	
PCR S	-	-	-	-	-	-	
ELISA IgY	-	>3	>3	1.58	1.79	-	
ELISA PRRS	-	-	-	-	-	-	35 días
PCR H	-	-	-	-	-	-	
PCR S	-	-	-	-	-	-	
ELISA IgY	-	>3	>3	1.58	1.6	-	
ELISA PRRS	-	-	-	-	-	-	40 días
PCR H	-	-	-	-	-	-	
PCR S	-	-	-	-	-	-	
ELISA IgY	-	>3	>3	1.66	1.64	-	
ELISA PRRS	-	-	-	-	-	-	45 días
PCR H	-	-	-	-	-	-	
PCR S	-	-	-	-	-	-	

Cuadro 4. Resultados de Cerdos Destetados

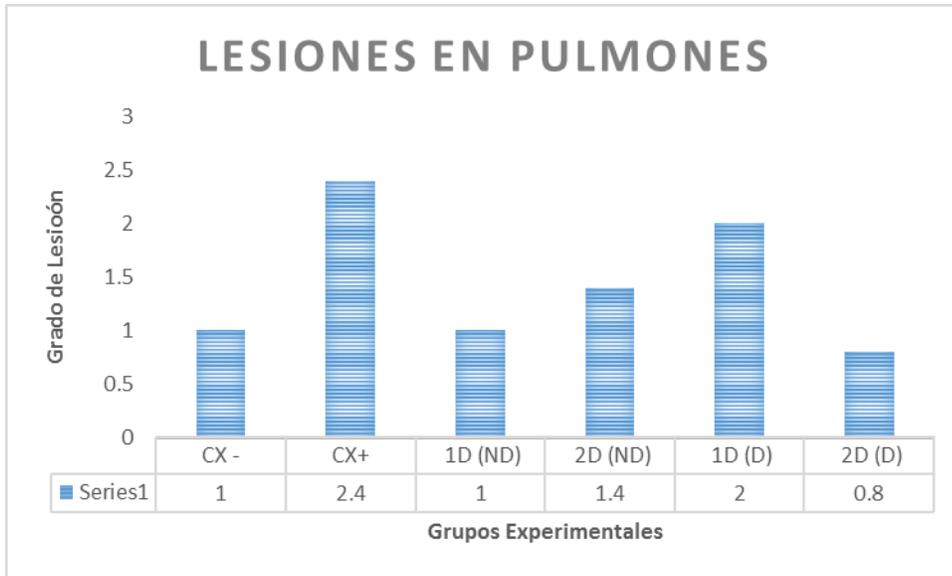
Histopatología

Para los linfonodos, se encontró que los animales del grupo control positivo tienen lesiones más graves que todos los grupos. Seguido por el grupo con una dosis de InmunoPRRS® y desafiado. Por otro lado, el grupo con dos dosis de InmunoPRRS® y desafiado, tiene valores similares al control negativo (Grafica 4).



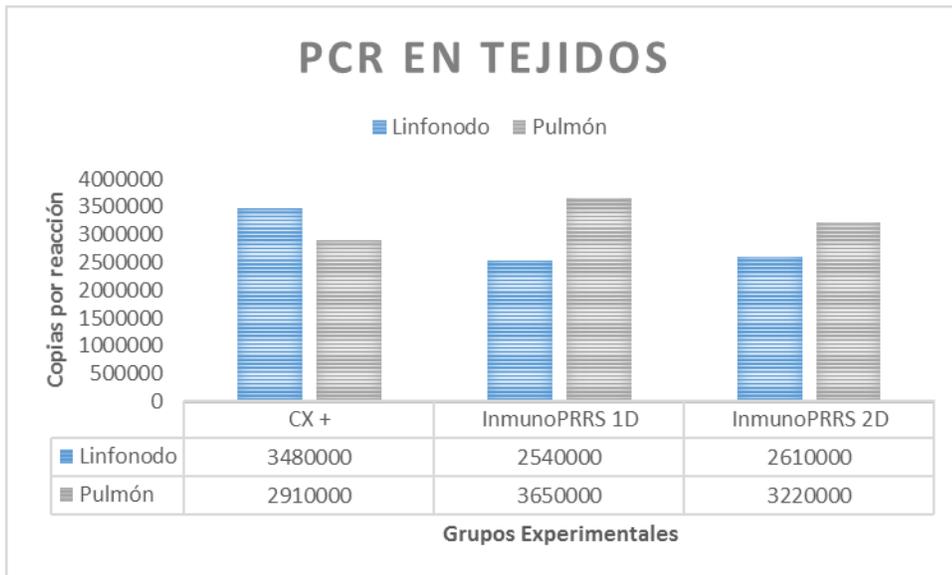
Gráfica 4. Lesiones en Linfonodos

En los pulmones al igual que en linfonodos se observa que el grupo control positivo presenta una mayor severidad en las lesiones, seguido del grupo con una dosis de InmunoPRRS® y desafiado, posteriormente se encuentran los demás grupos con un rango similar al control negativo (Grafica 5).



Gráfica 5. Lesiones en Pulmon

De acuerdo con los resultados de PCR en tejidos, se obtuvo que los tres grupos no desafiados fueron negativos a la prueba, mientras que, en los grupos desafiados con el virus, el tejido con mayor concentración virémica fueron los pulmones en general y por cada grupo, excepto en el control positivo donde la concentración viral fue mayor en linfonodos (Gráfica 6).



Gráfica 6. PCR en Tejidos.

DISCUSIÓN

La alta variabilidad genética del virus de PRRS, representa un problema para la detección y control de esta enfermedad. En los últimos reportes de análisis filogenéticos de este virus en México presentes hasta el 2015 (Galiote A., et al 2015) han detectado nuevas cepas de campo que llegan a un 84% de identidad en el ORF5 con la cepa de referencia americana. Esto sugiere que las vacunas actuales no pueden crear una protección contra algunas cepas de campo y se necesitaría la actualización del virus utilizado en la vacuna. Es por esto que en la actualidad ninguna vacuna con virus vivo, muerto o vivo atenuado, ha demostrado ser una herramienta efectiva frente una infección contra PRRS.

A finales del 2012 el Dr. Fernando Osorio de la Universidad de Nebraska, presento una serie de trabajos donde confirma la protección efectiva de la inmunidad pasiva contra una infección contra PRRSV (Osorio, 2012), lo cual se demostro que la aplicación de anticuerpos de origen aviar inmunizados contra PRRS (InmunoPRRS®) pueden neutralizar el virus, ayudando al sistema inmune a generar una respuesta inmune contra PRRS.

En los últimos años, se ha optado por la utilización de Inmunoglobulinas tipo Y para la transferencia de inmunidad pasiva a varias especies, para poder contrarrestar la infección de diferentes enfermedades. Estas inmunoglobulinas son utilizadas por ser fáciles de obtener, por la cantidad de anticuerpos obtenidos, y sobre todo por la poca manipulación de las aves para generar esta inmunidad.

En este estudio, las inmunoglobulinas que se utilizaron fueron obtenidas a partir de la inmunización de aves con 6 cepas de virus de PRRS aisladas de diferentes partes de la República Mexicana, con el fin de obtener anticuerpos capaces de neutralizar las cepas presentes en campo.

Durante la etapa 1 (cerdas gestantes), ninguna de las cerdas desafiadas aborto o tuvo problemas durante la gestación y el parto, sin retraso de crecimiento en sus camadas, esto similar con lo encontrado por Ochoa (Ochoa *et. al*, 2016), donde la aplicación de InmunoPRRS® en una granja positiva, mejoro sus parámetros reproductivos como porcentaje de abortos y porcentaje de retrasados. Por otra parte, la cantidad de IgY's disminuyó significativamente después al desafío, y la presencia de virus fue detectada hasta el día 30, este último muestreo coincide con el día de parto de las hembras, los lechones fueron positivos a PRRS durante la lactancia.

En el 2009 Blanco (Blanco, 2009) realizo una investigación donde menciona que los anticuerpos en lechones pueden ser transferidos hasta después de 24 horas del nacimiento, considerando que la IgY es de un peso molecular similar a la IgG (Warr *et al.*, 1995), es posible que la trasferencia de las inmunoglobulinas de origen aviar, inmunizadas contra PRRS, se pueden proporcionar en calostro. Esto explica por qué los lechones tuvieron una cantidad de IgY's similar a las cantidades obtenidas en las cerdas.

En la etapa 2, se pueden observar que los animales desafiados al virus, muestran positividad en la prueba de ELISA para anticuerpos contra PRRS al día 5 (tabla 4), similar al trabajo de Martinez (Martinez *et. al*, 2016), donde se comienzan a obtener positividad al día 8 después de una infección controlada. Los resultados que se obtuvieron en este estudio se atribuye a que las inmunoglobulinas ayudan a neutralizar el virus, permitiendo que el sistema inmune puede crear anticuerpos específicos y tener defensas para alguna futura infección (IASA, 2008).

Los resultados obtenidos en la histopatología de los órganos, muestran una marcada afectación a los órganos de los cerdos desafiados al virus con una dosis, similares a las lesiones del control positivo, mientras que en el grupo con dos dosis fueron menos representativa las lesiones, asegurando que entre mayor cantidad de IgY's, la lesiones disminuyen en los órganos, evitando la replicación del virus en estos órganos.

Durante este trabajo se observó que la cantidad de IgY's en los cerdos inmunizados y desafiados, disminuye significativamente a comparación con los cerdos no desafiados, esto asociado a la interacción de los anticuerpos con el virus de PRRS, llegando a neutralizar el virus evitando la replicación dentro de los macrófagos, disminuyendo la viremia y la excreción del virus; por consiguiente, la presencia de signos clínicos, confirma lo mencionado por Gutierrez, donde prueba la utilización de Inmunoglobulinas inmunizadas contra PRRS en sistemas de producción positiva a PRRS, donde los signos clínicos como abortos y cerdos retrasados disminuye, ayudando a incrementar los parámetros de producción, como porcentaje de fertilidad y peso al destete.

CONCLUSIONES

1. Las IgY's proporcionadas a cerdas gestantes, son capaces de neutralizar el virus de PRRS y disminuir la excreción del virus en las cerdas y sus camadas.
2. Durante la infección con VPRRS en cerdos previamente inmunizados con INMUNOPRRS®, la excreción viral no es detectada por PCR, sin embargo, se pueden encontrar anticuerpos contra el virus, 15 días post- infección.
3. La aplicación de IgY's inmunizadas contra VPRRS en cerdos destetados, disminuye el grado de lesión en pulmón y linfonodos, y por consecuencia hay una menor presencia de sinología clínica.
4. La investigación realizada durante este trabajo afirma que la aplicación de IgY's contra PRRS durante una infección con un virus de campo, son capaces de controlar la enfermedad, otorgándole una estabilidad clínica a los cerdos.

REFERENCIAS

- 1) Blanco Luis. 2009. Análisis cuantitativo de IgG en el calostro de cerdas de primer a quinto parto mediante prueba de ELISA en una granja porcícola en Cundinamarca. [Tesis de licenciatura]. Bogotá, Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad La Salle.
- 2) Boehringer Ingelheim http://www.bi-vetmedica.com.mx/content/dam/internet/ah/vetmedica/mx_ES/flash/prrst2.swf
- 3) Chand Ranjni J, Tribble Benjamin R, Rowland Raymond RR. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. 2:256–263
- 4) Drigo Michele, Franzo Giovanni, Gigli Alessandra, Martini Marco, Mondin Alessandra, Gracieux Patrice, Ceglie Letizia. 2014. The impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus genetic heterogeneity on molecular assay performances. Journal of Virological Methods, 202: 79–86
- 5) Edzard, S. Braren. I. Greunke. J., Seismann H., Blank S., Plessis D. 2012. Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy
- 6) Galiote, A., Lucio-de Esesarte, E., Merino, E., Mendoza, MA, Martínez, D., Munguía, J., Morales, J.A. 2015. Análisis genético del gen ORF5 de virus de PRRS aislados en México desde 2009 a 2015. Congreso Amvec 2015.
- 7) Garcia Plata Mariana. 2016. Desarrollo de una prueba de diagnóstico serológico (ELISA) para la detección de anticuerpos específicos en contra del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS). [tesis de licenciatura]. Ciudad de México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.
- 8) Global PRRS Solutions (Boehringer Ingelheim) <https://www.prrs.com/es/prrs-enfermedad/diagnostico-prrs/deteccion-virus-prrs/>
- 9) Gómez-Laguna Jaime, Salguero Francisco J., Pallarés Francisco J., Carrasco Librado. 2013. Immunopathogenesis of porcine reproductive

- and respiratory syndrome in the respiratory tract of pigs. *The Veterinary Journal*, 195:148–155.
- 10) Goyal Sagar M. 1993. Review Article Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet Diagn Invest*, 5: 656-664
 - 11) Gutierrez Z., Munguía J., Trejo F., 2015. Efecto del uso de inmunoglobulinas de origen aviar en los parámetros productivos en una granja comercial. *AMVEC 2015*
 - 12) Han Deping, Hu Yanxin, Li Limin, Tian Haiyan, Chen Zhi, Wang Lin, Ma Haiyan, Yang Hanchun, Teng Kedao. 2014. Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection results in acute lung injury of the infected pigs. *Veterinary Microbiology*, 169: 135–146
 - 13) Han K., Seo H. W., Park C., Kang I., Youn S.-K., Lee S. Y., Kim S.-H., Chae C. 2014. Comparative Virulence of Reproductive Diseases Caused by Type 1 (European-like) and Type 2 (North American-like) Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Experimentally Infected Pregnant Gilts. *Elsevier*, 150: 297-305.
 - 14) IASA. Síndrome respiratorio y reproductivo del cerdo (PRRS). *Boletines Áreas de Enfoque*. 2008-05-21.
http://www.iasa.com.mx/spa/publicaciones.php?t=0&f=&p=&_pagi_pg=1&i d=0#
 - 15) Laboratorios Hipra, S.A. 2015
<http://www.prrscontrol.com/wps/portal/prrscontrol/prrs-knowledge/what-is-prrs-virus>
 - 16) Lee Jung-Ah, Kwon Byungjoon, Osorio Fernando A., Pattnaik Asit K., Lee Nak-Hyung, Lee Sang-Won, Park Seung-Yong, Song Chang-Seon, Choi In-Soo, Lee Joong-Bok. 2014. Protective humoral immune response induced by an inactivated porcine reproductive and respiratory syndrome virus expressing the hypo-glycosylated glycoprotein 5. *Vaccine*, 32 (29): 3617–3622.

- 17) Li X., Galliher-Beckley A., Pappan L., Tribble B., Kerrigan M., Beck A., Hesse R., Blecha F., Nietfeld JC., Rowland RR., Shi J. 2014. Comparison of host immune responses to homologous and heterologous type II porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) challenge in vaccinated and unvaccinated pigs. *Biomed Res Int.*, 1: 1-10
- 18) Lovinga. Crystal L., Osorio. Fernando A., Murtaughc. Michael P., Zuckermann. Federico A. 2015. Innate and adaptive immunity against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, *Veterinary Immunology and Immunopathology*
- 19) Macías MJ., Yépiz-Plascencia G., Osorio F., Pinelli-Savedra A., Reyes-Leyva J., Hernández J. 2006. Aislamiento y caracterización del gen ORF5 del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) en México. *Veterinaria México*, 37 (2): 371-378
- 20) Mang S., Tsan Yuk-Lam T., Hon Ch., Murtaugh M., Davie P., Kin-Hei Hui R., Li J., Tik-Wim Wong L., Yip Ch., Jiang-Wai J., Chi-Ching Leung F. 2010. Phylogeny-Based Evolutionary, Demographical, and Geographical Dissection of North American Type 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses. *Journal of Virology*, 84 (17): 8700-8711.
- 21) Martínez A, Diosdado F, Socci G, Rivera JF, Gómez L, Valera GE, Martínez DM, Alvarado G, Lara-Romero R, Gutierrez A. 2016. Efecto de una cepa de campo del virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino en lechones bajo condiciones controladas. *Memorias L Congreso Nacional AMVEC*. <http://www.amvec.com/blog1/?p=3259>.
- 22) Morilla A. 2004. *Enfermedades Víricas emergentes del cerdo*, Barcelona, España: Multimedia.
- 23) Murtaugh Michael P., Genzow Marika. 2011. Immunological solutions for treatment and prevention of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Vaccine*, 29: 8192– 8204
- 24) Nilubo D. I, Platt K.B., Halbur P.G., Torremorell M. 2004. The effect of a killed porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)

- vaccine treatment on virus shedding in previously PRRSV infected pigs. *Veterinary Microbiology*, 102: 11–18
- 25) Obdulio García-Nicolás, Quereda Juan José, Gómez-Laguna Jaime, Salguero Francisco Javier, Carrasco Librado, Ramis Guillermo, Pallarés Francisco José. 2014. Cytokines transcript levels in lung and lymphoid organs during genotype 1 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 160: 26–40
- 26) Ochoa D, Gutierrez Z, Munguía J, Carrera V, Sanchez J. 2016. Evaluación productiva de una granja comercial de un esquema de control de PRRS a base de inmunoglobulinas de origen aviar. *Memorias L Congreso Nacional AMVEC*. <http://www.amvec.com/blog1/?p=3259>
- 27) OIE. Report of the OIE ad hoc group on Porcine reproductive respiratory syndrome. 9-11 de junio 2008. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/PRRS_guide_web_bulletin.pdf
- 28) Osorio F. El PRRSV vs. el Cerdo: Dinámica de la Infección Individual. 2012. Simposio Internacional de PRRS. <http://www.amvec.com/pdfs/OSORIO.pdf>
- 29) PRRS Control (Hipra) <http://www.prrscontrol.com/wps/portal/hipra/prrscontrol/prrs-knowledge/prrs-diagnosis>
- 30) Sagar M. 1993. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *J Vet Diagn Invest.*, 5: 656-664
- 31) Shi Chongxu, Liu Yali, Ding Yaozhong, Zhang Yongguang, Zhang Jie. 2014. PRRSV receptors and their roles in virus infection. *Arch Microbiology* 197: 503–512.
- 32) Tizard, I. (2009) *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. España: El Servier.
- 33) Van Breedam, Delputte Peter L., Van Gorp Hanne, Misinzo Gerald, Vanderheijden, Nathalie, Duan Xiaobo, Nauwynck Hans J. 2010. Porcine

- reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage. *Journal of General Virology*, 91: 1659–1667
- 34)Warr Gregory W., Magor Katharine E., Higgins David A. 1995. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunology Today*, 8 (16): 392-398.
- 35)Wilmar Dias., Tambourgi D. 2010. IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. *Veterinary Immunology and Immunopatología*, 135: 173-180
- 36)XJ M. 2000. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Veterinary Microbiology*, 74 (4): 309-329
- 37)Yang Keli, Yanhe Li, Duan Zhengying, Guo Rui, Liu Zewen, Zhou Danna, Yuan Fangyan, Tian Yongxiang. 2013. A one-step RT-PCR assay to detect and discriminate porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in clinical specimens. *Gene*, 531: 199–204
- 38)Zhang Haifeng, Kono Hiroichi, Kubota Satoko. 2014. An Integrated Epidemiological and Economic Analysis of Vaccination against Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) in Thua Thien Hue Province. Vietnam, 27 (10): 1499-1512.
- 39)Zhang Qingzhan, Yoo Dongwan. 2015. PRRS virus receptors and their role for pathogenesis. *Veterinary Microbiology*. 177: 229–24