

UNIVERSIDAD DE LEÓN

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Patología Animal: Sanidad Animal



**INMUNIDAD INDUCIDA POR LAS VARIANTES VIRULENTA Y
ATENUADA DE LA CEPA CV-777 DEL VIRUS DE
LA DIARREA EPIDÉMICA PORCINA**

Memoria presentada por la licenciada
M^a Luisa de Arriba Martín para optar
al grado de Doctora en Veterinaria

León, Febrero de 2000

PEDRO RUBIO NISTAL, Titular de Universidad, del Departamento de Patología Animal: Sanidad Animal de la Universidad de León, ANA CARVAJAL URUEÑA e IGNACIO LANZA SUÁREZ,

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada **“Inmunidad inducida por las variantes virulenta y atenuada de la cepa CV-777 del virus de la diarrea epidémica porcina”**, que presenta la Licenciada en Veterinaria por la Universidad de León,

Dña. M^a LUISA DE ARRIBA MARTÍN

para optar al grado de Doctora en Veterinaria, ha sido realizada en el Departamento de Patología Animal: Sanidad Animal, de la Universidad de León bajo su dirección, cumple los requisitos exigibles para la obtención de dicho grado y autorizan su presentación.

Y para que conste, a todos los efectos, firmamos el presente en León a 12 de diciembre de 1999.

Fdo. Pedro Rubio Nistal

Fdo. Ana Carvajal Urueña

Fdo. Ignacio Lanza Suárez

UNIVERSIDAD DE LEÓN
COMISIÓN DE DOCTORADO

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

Los Dres. PEDRO RUBIO NISTAL, ANA M^a CARVAJAL URUEÑA E IGNACIO LANZA SUÁREZ, como directores de la Tesis Doctoral “**Inmunidad inducida por las variantes virulenta y atenuada de la cepa CV-777 del virus de la diarrea epidémica porcina**”, realizada en el Departamento de PATOLOGÍA ANIMAL: SANIDAD ANIMAL, por la Doctoranda Dña. MARÍA LUISA DE ARRIBA MARTÍN, autorizamos la presentación de la citada Tesis Doctoral, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

En León, a 15 de diciembre de 1999

Los Directores de la Tesis

Fdo. Dr. Pedro Rubio Nistal

Dra. Ana M^a Carvajal Urueña

Dr. Ignacio Lanza Suárez



**UNIVERSIDAD DE LEÓN
COMISIÓN DE DOCTORADO**

CONFORMIDAD DEL DEPARTAMENTO

El Departamento de PATOLOGÍA ANIMAL: SANIDAD ANIMAL, en su reunión del día 15 de diciembre de 1999, ha acordado dar conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada: **“Inmunidad inducida por las variantes virulenta y atenuada de la cepa CV-777 del virus de la diarrea epidémica porcina”**, dirigida por los Dres. PEDRO RUBIO NISTAL, ANA CARVAJAL URUEÑA e IGNACIO LANZA SUÁREZ y presentada por Dña. M^a LUISA DE ARRIBA MARTÍN, ante este departamento.

En León a 15 de diciembre de 1999

V^oB^o LA DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO

EL SECRETARIO DEL DEPARTAMENTO

Fdo. Susana Suárez Ramos

Fdo. Miguel Aller Gancedo

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de un trabajo de varios años han sido muchas las personas que me han ayudado y sin las que hubiera sido prácticamente imposible que mi tesis hubiese salido adelante. Por ello me gustaría expresarles mi agradecimiento más sincero.

En primer lugar quiero dar las gracias a los directores de esta tesis:

A Pedro Rubio por dirigir mi formación en el campo de las Enfermedades Infecciosas y por su confianza y entusiasmo en el desarrollo de este trabajo.

A Ana Carvajal por ser un apoyo constante y en todas las fases de la tesis. No sólo ha sido una excelente directora, sino también una gran compañera de tareas, que ha dedicado a lo que aquí se presenta una buena cantidad de su tiempo y siempre con la mejor disposición del mundo.

Y a Nacho Lanza porque a pesar de la distancia ha estado dispuesto a echarme una mano cuando lo he necesitado.

A Gloria F. Bayón, con la que he compartido muchas horas vestida de naranja y a la que ha tocado luchar a veces con animales que tenían casi más fuerza que ella, además de ayudarme con toneladas de material que había que preparar cada día. Pasamos muy buenos ratos, aunque sigo pensando, Gloria, que era un poco temprano para mi gusto.

A mis compañeros del laboratorio. Siempre estuvieron dispuestos a echarme una mano con lo que necesitase, es más, alguno incluso llegó a pensar en bordar su nombre en el bolsillo del mono naranja que usaba tan frecuentemente, ¿no, Javi?. Además, no todo el mundo puede presumir de tener compañeros que a la vez se han convertido en buenos amigos.

A Bea Escudero, que junto con Ana tuvo mucho que ver con la linfoproliferación.

A los chicos del Laboratorio de Técnicas Instrumentales, porque siempre hubo una centrífuga y un café para mí.

A Linda J. Saif, por aceptarme en su laboratorio y permitirme aprender muchas de las cosas sobre inmunidad de mucosas que se presentan aquí. También al resto de los compañeros y amigos de Wooster, que hicieron que lo que empezó siendo bastante duro acabase siendo muy agradable.

Al resto de mis amigos, que han soportado bastante bien momentos de agobios, esperas... y sobre todo a aquellos que llegaron a tener muy claro que hiciésemos lo que hiciésemos, antes tenía que pasar por la Facultad.

A Juan Pablo, que ha estado a mi lado en casi todos los momentos de este trabajo. Y porque también a él le ha tocado su parte de trabajo con los animales, a pesar de que no tenga nada que ver con este mundillo.

A mi familia, porque me han apoyado incondicionalmente, han llevado como han podido mis ausencias (peor cuanto más lejos) y siempre han confiado en mí.

Finalmente quiero tener un recuerdo muy especial para Pedro Cármenes. Con él empecé esta etapa y me hubiese gustado haberla acabado. La admiración y respeto que sentía por él y alguna de sus opiniones me influyeron mucho al tomar decisiones con las que hoy estoy muy contenta. Probablemente algunas cosas serían diferentes si siguiese aquí.

A mi familia

A Juan Pablo

ÍNDICE

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1.- LA DIARREA EPIDÉMICA PORCINA	1
1.1.1.- HISTORIA	1
1.1.2.- ETIOLOGÍA	2
1.1.2.1.- Clasificación.....	2
1.1.2.2.- Morfología	3
1.1.2.3.- Estructura	4
1.1.2.4.- Genoma	5
1.1.2.5.- Propiedades físico-químicas	6
1.1.2.6.- Multiplicación en cultivos celulares.....	7
1.1.3.- EPIDEMIOLOGÍA	8
1.1.4.- PATOGENIA	11
1.1.5.- CUADRO CLÍNICO	12
1.1.6.- LESIONES	13
1.1.7.- DIAGNÓSTICO	14
1.1.7.1.- Diagnóstico clínico y lesional.....	14
1.1.7.2.- Diagnóstico laboratorial directo	15
1.1.7.3.- Diagnóstico laboratorial indirecto	17
1.1.8.- INMUNIDAD	18
1.1.8.1.- Inmunidad activa	18
1.1.8.2.- Inmunidad pasiva.....	19
1.1.9.- TRATAMIENTO Y CONTROL.....	20
1.1.10.- PROFILAXIS E INMUNOPROFILAXIS	21
1.2.- MECANISMOS DE DEFENSA DEL TRACTO	
GASTROINTESTINAL	23
1.2.1.- MECANISMOS INESPECÍFICOS DE DEFENSA	23
1.2.1.1.- Barrera extrínseca.....	23
1.2.1.2.- Barrera intrínseca	25

1.2.2.- MECANISMOS ESPECÍFICOS: INMUNIDAD DE MUCOSAS	25
1.2.2.1.- ORGANIZACIÓN DEL TEJIDO LINFOIDE DEL TRACTO GASTROINTESTINAL	26
1.2.2.1.1.- Tejido linfoide organizado	26
1.2.2.1.2.- Tejido linfoide difuso	28
1.2.2.2.- PENETRACIÓN DE LOS ANTÍGENOS	29
1.2.2.3.- PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA	31
1.2.2.4.- DIFERENCIACIÓN DE LOS LINFOCITOS	34
1.2.2.5.- RECIRCULACIÓN LINFOCITARIA: MIGRACIÓN Y ANIDAMIENTO	35
1.2.2.6.- MADURACIÓN DE LOS LB Y PRODUCCIÓN DE MOLÉCULAS EFECTORAS	36
2.- PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	41
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	43
3.1.- CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR VERO	43
3.2.- PRODUCCIÓN DEL VDEP	44
3.2.1.-Producción en cultivos celulares	44
3.2.1.1.- Titulación del virus producido en cultivos celulares	45
3.2.2.- Producción del virus en lechones	46
3.3.- OBTENCIÓN DE ANTÍGENO VÍRICO	47
3.3.1.- Antígeno vírico semipurificado (virus completo)	47
3.3.2.- Extracción de las proteínas N y S del VDEP	48
3.4.- HIPERINMUNIZACIÓN DE ANIMALES	49
3.4.1.- Obtención de suero hiperinmune de conejo frente al VDEP	49
3.4.2.- Hiperinmunización de cerdos frente al VDEP	51
3.5.- DISEÑO EXPERIMENTAL	52
3.5.1.- Animales	53
3.5.2.- Grupos experimentales	54
3.5.3.- Recogida de muestras	55
3.5.4.- Sacrificios	56
3.6.- EXTRACCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES	57
3.6.1.- Extracción de CMN del bazo y los ganglios linfáticos mesentéricos	57
3.6.2.- Extracción de CMN de la lámina propia del duodeno y el íleon	58
3.6.3.- Extracción de CMN de la sangre	59
3.7.- ANTICUERPOS MONOCLONALES ESPECÍFICOS DE CLASE DE INMUNOGLOBULINA PORCINA	59
3.7.1.- Purificación	59
3.7.2.- Marcado con biotina	59

3.8.- ELISPOT	60
3.8.1.- Antígeno	60
3.8.2.- ELISPOT	61
3.9.- ENSAYO <i>IN VITRO</i>	63
3.10.- ENSAYO DE LINFOPROLIFERACIÓN.....	64
3.11.- TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DIRECTO.....	65
3.11.1.- Inmunofluorescencia directa.....	65
3.11.2.- ELISA doble <i>sandwich</i> de anticuerpos (DAS-ELISA)	66
3.12.- TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO INDIRECTO	67
3.12.1.- ELISA de bloqueo	67
3.12.2.- ELISA de inmunocaptura (MAC-ELISA).....	68
3.12.3.- N-ELISA y S-ELISA.....	70
3.13.- CODIFICACIÓN DE LOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS Y ANTÍGENO.....	71
3.14.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	71
3.15.- APÉNDICE 1: MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES UTILIZADAS.....	73
4.- RESULTADOS	79
4.1.- ESTANDARIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE TRABAJO.....	79
4.1.1.- ELISPOT	79
4.1.2.- Ensayo <i>in vitro</i>	80
4.1.3.- Ensayo de linfoproliferación	80
4.2.- SIGNOS CLÍNICOS Y ELIMINACIÓN DE VIRUS EN LAS HECES	81
4.2.1.- Sintomatología tras la inoculación.....	81
4.2.2.- Sintomatología tras el desafío	82
4.2.3.- Eliminación de virus tras la inoculación	83
4.2.4.- Eliminación de virus tras el desafío	86
4.3.- CÉLULAS SECRETORAS DE ANTICUERPOS FRENTE AL VDEP TRAS LA INOCULACIÓN.....	90
4.3.1.- Células secretoras de anticuerpos en el grupo 1, inoculado con la cepa virulenta	91
4.3.2.- Células secretoras de anticuerpos en los grupos inoculados con la cepa atenuada	94
4.3.3.- Correlaciones.....	96
4.4.- CÉLULAS SECRETORAS DE ANTICUERPOS FRENTE AL VDEP TRAS EL DESAFÍO	97
4.4.1.- Respuesta en los tejidos linfoides asociados al intestino	98
4.4.2.- Respuesta en los tejidos del sistema inmune sistémico.....	103

4.5.- CÉLULAS SECRETORAS DE ANTICUERPOS TRAS LA ESTIMULACIÓN SECUNDARIA <i>IN VITRO</i>	106
4.5.1.- Células secretoras de anticuerpos tras la inoculación.....	107
4.5.2.- Células secretoras de anticuerpos tras el desafío	108
4.6.- PROLIFERACIÓN LINFOCITARIA.....	110
4.6.1.- Respuestas de proliferación linfocitaria específicas frente al VDEP tras la inoculación.....	111
4.6.2.- Respuestas de proliferación linfocitaria específicas frente al VDEP tras el desafío.....	114
4.6.3.- Correlaciones.....	118
4.7.- ANTICUERPOS FRENTE AL VDEP EN EL SUERO SANGUÍNEO.....	119
4.7.1.- ELISA de bloqueo	119
4.7.2.- ELISA de isotipos	120
4.7.2.1.- MAC-ELISA	121
4.7.2.2.- S-ELISA	124
4.7.2.3.- N-ELISA.....	127
4.7.2.4.- Correlaciones	129
4.8.- APÉNDICE 2	131
5.- DISCUSIÓN	137
5.1.- SIGNOS CLÍNICOS Y ELIMINACIÓN DE ANTÍGENO VÍRICO EN LAS HECES	138
5.2.- PROTECCIÓN FRENTE AL DESAFÍO	141
5.3.- CÉLULAS SECRETORAS DE ANTICUERPOS FRENTE AL VDEP TRAS LA INOCULACIÓN.....	143
5.4.- CÉLULAS SECRETORAS DE ANTICUERPOS FRENTE AL VDEP TRAS EL DESAFÍO	146
5.5.- RESPUESTA DE CÉLULAS SECRETORAS DE ANTICUERPOS TRAS LA ESTIMULACIÓN SECUNDARIA <i>IN VITRO</i>	149
5.6.- RESPUESTA DE PROLIFERACIÓN LINFOCITARIA.....	150
5.7.- RESPUESTA DE ANTICUERPOS SÉRICOS.....	153
6.- CONCLUSIONES	157
7.- RESUMEN	159
8.- BIBLIOGRAFÍA	163

1.- INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- LA DIARREA EPIDÉMICA PORCINA

La diarrea epidémica porcina (DEP) es una enfermedad del tracto digestivo del cerdo que está causada por un coronavirus, el virus de la diarrea epidémica porcina (VDEP). Aunque puede afectar a animales de todas las edades, cursa con mayor gravedad en los lechones lactantes.

Las infecciones por rotavirus y la gastroenteritis transmisible porcina (GET) constituyen junto con la DEP las tres principales afecciones víricas del tracto digestivo del ganado porcino. Respecto a la gravedad de las manifestaciones clínicas y lesionales de la enfermedad, se puede decir que la DEP ocupa un lugar intermedio, siendo por lo general más leve que la GET, aunque a su vez los brotes de DEP suelen presentar una mayor virulencia que los causados por rotavirus.

1.1.1.- HISTORIA

Las primeras referencias a la enfermedad datan de 1971, cuando en Inglaterra se detectaron brotes agudos de diarrea en cerdos de cebo, cuya apariencia clínica era muy similar a la de la GET, pero con la diferencia de que no afectaban a los animales lactantes (95). No se pudo demostrar la participación de ningún agente patógeno conocido hasta el momento, pero parecía muy probable que se tratara de una infección vírica y por ello, al nuevo proceso se le denominó Diarrea Epidémica Vírica.

Unos años más tarde, en 1976, también en Inglaterra, se describieron brotes similares de diarrea aguda, pero que esta vez afectaban a animales de todas las edades, incluidos los lechones (151). Nuevamente, en ninguno de los brotes pudo ser demostrada la implicación del virus de la GET (VGET), ya que no se detectó el virus ni en las heces ni en el contenido intestinal de los animales afectados, como tampoco anticuerpos dirigidos frente a él en los animales convalecientes. También en este caso se sospechó una etiología vírica y no se descartó que pudiera estar relacionado con los brotes descritos en 1971. Ambos procesos recibieron el nombre de Diarrea Epidémica Vírica, pero para diferenciarlos se denominó tipo I a los brotes en los que no estaban implicados los animales lactantes y tipo II a los últimos brotes descritos, en los que se afectaban animales de todas las edades (151).

En 1978 se logró reproducir experimentalmente la enfermedad en cerdos de distintas edades, inoculando a los animales por vía oral con un material procedente de animales infectados naturalmente y sacrificados en la fase aguda (30, 100). En las heces y el contenido intestinal de los animales inoculados se detectaron por microscopía electrónica partículas víricas de morfología similar a los coronavirus. En trabajos posteriores se demostró que los tipos I y II de la diarrea epidémica vírica estaban causados por el mismo agente o por virus estrechamente relacionados antigénicamente (43, 103). A partir de ese momento se propuso denominar al proceso y al agente etiológico como actualmente se los conoce, Diarrea Epidémica Porcina y Virus de la Diarrea Epidémica Porcina, respectivamente.

1.1.2.- ETIOLOGÍA

1.1.2.1.- Clasificación

El VDEP es uno de los cuatro coronavirus que tiene como hospedador al cerdo. Está incluido dentro del género Coronavirus, que junto al género Torovirus forman la familia *Coronaviridae*.

Muy relacionado con estos dos géneros está el género Arterivirus. Respecto a éste ha existido una gran controversia ya que, aunque según algunos autores debería clasificarse junto a los coronavirus y los torovirus, presenta diferencias,

fundamentalmente el tamaño de su genoma y algunas características morfológicas, que hacen difícil su inclusión dentro de la misma familia. Así se propusieron dos clasificaciones taxonómicas diferentes: bien una familia con dos subfamilias o bien dos familias independientes (*Coronaviridae* y *Arteriviridae*) en un mismo orden (28, 29). La propuesta más aceptada ha sido esta última y en la actualidad la familia *Coronaviridae*, con los géneros *Coronavirus* y *Torovirus*, está incluida junto con la familia *Arteriviridae* en el Orden *Nidovirales* (90).

Basándose en sus relaciones antigénicas y posteriormente también en las relaciones genómicas, los coronavirus han sido divididos en dos grupos taxonómicos. Los representantes más característicos de estos dos grupos son el VGET (del grupo I) y el virus de la encefalitis del ratón (del grupo II).

El VDEP fue incluido provisionalmente dentro del grupo I (29) y esta clasificación fue posteriormente confirmada por los estudios realizados por Tobler *et al.* y Bridgen *et al.* (15, 135, 136) en los que se determinaba la secuencia de diferentes fragmentos del genoma del virus. Según estos trabajos, el VDEP estaría estrechamente relacionado con el VGET y, más aún, con el coronavirus humano 229E, ambos pertenecientes al grupo I.

Hasta el momento sólo se ha descrito un único serotipo del VDEP y todas las cepas aisladas en diferentes países, incluido España, son antigénicamente idénticas o muy similares entre sí (15, 23, 46, 47, 77)

1.1.2.2.- Morfología

El VDEP presenta características morfológicas similares al resto de los coronavirus (30). Las partículas víricas detectadas por microscopía electrónica en muestras de heces son pleomórficas, con tendencia a presentar formas redondeadas.

En su superficie, regularmente distribuidas, presentan unas proyecciones, las espículas o peplómeros, de unos 20 nm de longitud, que le dan la forma en corona que da nombre a la familia.

El tamaño medio de los viriones es de 130 nm, incluidas las espículas. En general, el tamaño del resto de los miembros de la familia oscila entre los 100 y los 200 nm.

1.1.2.3.- Estructura

Al igual que el resto de los coronavirus, el VDEP posee una nucleocápside de simetría helicoidal y una envoltura lipídica.

Mediante inmunoprecipitación y electroforesis en geles de poliacrilamida se detectaron y caracterizaron inicialmente las tres proteínas estructurales características de los coronavirus en la cepa CV-777 del VDEP, las proteínas M, N y S (50). Recientemente ha sido descrita una cuarta proteína estructural, la sM, que también está presente en otros miembros de la familia (47).

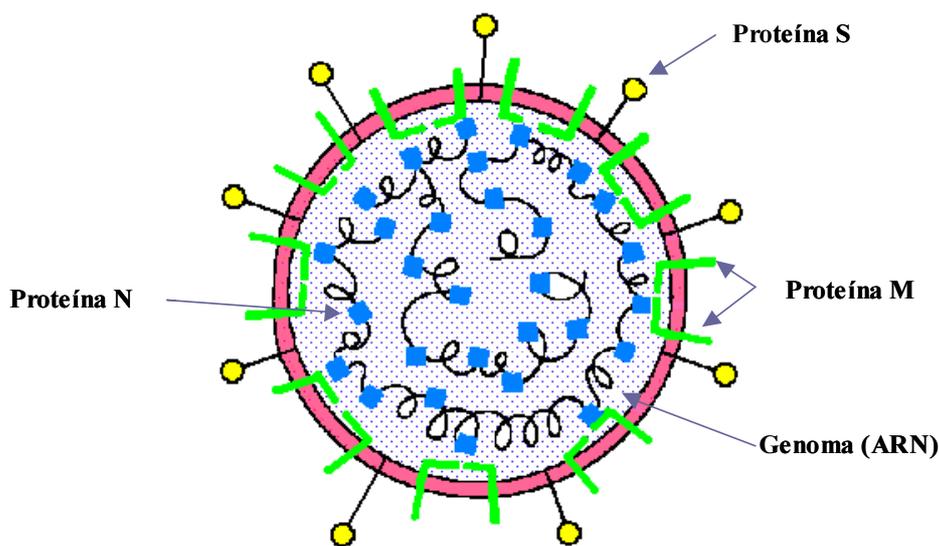


Figura 1.- Representación esquemática de la estructura del VDEP.

La proteína que se presenta en mayor cantidad es la proteína N, que tiene un peso molecular de 58 kDa. Es una proteína fosforilada y la única no glicosilada de las cuatro proteínas estructurales del virus (141). Está unida al ARN del virus y junto con él forma la nucleocápside de simetría helicoidal.

La proteína S, glicosilada y con un peso molecular de 85-135 kDa, es la que forma las espículas. Se supone que es la responsable tanto del tropismo entérico del

virus como de su especificidad de especie, por producirse a través de ella la unión del virus a los receptores de membrana de la célula hospedadora. Como en el VGET y a diferencia de otros coronavirus, esta proteína carece de un lugar específico para que se produzca su escisión en dos subunidades (S1 y S2) (14, 46). A pesar de que en el caso del VDEP no existen estudios al respecto, se piensa que en esta proteína se encuentran los principales determinantes antigénicos inductores de anticuerpos neutralizantes, como ocurre en otros coronavirus (40, 41, 114).

La proteína M o proteína de la matriz es de menor peso molecular (20-32 kDa) y, junto con la doble capa lipídica que los viriones adquieren de las membranas de la célula hospedadora, forma la envoltura vírica. Está glicosilada y aparece incluida en la envoltura, quedando sólo la parte glicosilada proyectada hacia el exterior, mientras que el resto de la molécula puede interactuar con la proteína N de la nucleocápside.

La cuarta proteína estructural, de pequeño tamaño (10 kDa), es la proteína sM. Por el análisis de la secuencia de la región genómica que codifica esta proteína, se deduce que es muy similar a la del resto de los coronavirus (141). Su función no está claramente definida, pero parece ser que juega un papel muy importante en la multiplicación de los virus de esta familia, especulándose que pueda intervenir en el ensamblaje o en la replicación de los viriones (54).

1.1.2.4.- Genoma

El genoma del VDEP está formado por una única cadena de ARN con polaridad positiva.

Además de las regiones que codifican para la síntesis de la polimerasa, se han descrito cinco regiones abiertas de lectura (ORF) (47). Cuatro de ellas corresponden a las cuatro proteínas estructurales del virus mientras que la quinta, denominada ORF 3, se piensa que podría corresponder a una proteína no estructural (26), que puede ser detectada por inmunofluorescencia en células en las que el virus está multiplicándose. Aunque actualmente no se sabe cual es su función, en un estudio reciente en el que se ha conseguido la clonación de este gen en *E. coli*, se indica que, al menos en estas células

procariotas, el producto del ORF 3 podría tener una función biológica relacionada con la reducción de la cantidad de proteínas sintetizadas (125).

La disposición de los genes que codifican para las proteínas estructurales se mantiene constante en todos los coronavirus. Del extremo 5' a 3', aparecen los genes que codifican para las proteínas S, sM, M y N (Figura 2). En el VDEP, entre el gen de la proteína S y el de la sM se encuentra el ORF 3 (47).

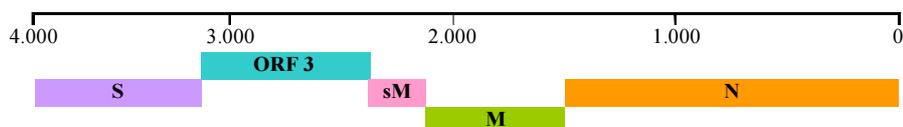


Figura 2.- Organización genómica del VDEP. Tomado de Uttiger *et al.* (141).

Los estudios realizados hasta el momento en las secuencias génicas de los distintos aislados demuestran una elevada homología entre todos ellos (15, 23, 46, 47, 77)

1.1.2.5.- Propiedades físico-químicas

Algunas de estas propiedades fueron estudiadas por Hoffman y Wyler en 1989, en cepas de virus adaptadas a cultivos celulares de la línea Vero (60).

La infectividad del VDEP disminuye mediante tratamientos con disolventes lipídicos como éter o cloroformo durante 5 minutos, pero no se ve reducida significativamente cuando se somete a múltiples ciclos de congelación y descongelación, así como a períodos relativamente largos de sonicación.

Ante tratamientos por calor el virus se muestra moderadamente estable a 50°C, pero se inactiva cuando se mantiene durante 30 minutos a una temperatura de 60°C o superior.

El VDEP se mantiene estable en un rango de pH entre 5 y 9 a una temperatura de 4°C, aunque se inactiva con un pH mayor de 9 ó menor de 4, independientemente de la temperatura.

1.1.2.6.- Multiplicación en cultivos celulares

Durante muchos años no fue posible adaptar el VDEP al crecimiento ni en cultivos celulares primarios ni en ninguna línea celular. En 1988, Hoffman y Wyler lograron la adaptación a la línea Vero, manteniendo una concentración constante de tripsina en el medio de 10 µg/ml (59). La función de la tripsina para permitir esta multiplicación no es conocida, aunque, como ocurre en el caso de los rotavirus (98) podría consistir en la activación proteolítica de la proteína S, permitiendo la adsorción y penetración del virus a la célula hospedadora.

El efecto citopático (ECP) producido por el virus en la línea Vero se caracteriza por la formación de sincitios tras la fusión de las membranas citoplasmáticas de las células infectadas. Inicialmente los núcleos se sitúan en la parte central y después se desplazan hacia la periferia, apareciendo en la masa citoplasmática numerosas vacuolas refringentes. Finalmente acaba desprendiéndose el tapiz celular.

Durante los primeros pases del VDEP en cultivo celular, los sincitios son pequeños, de unos 5-10 núcleos, y tardan en aparecer unos 3-5 días. En las cepas totalmente adaptadas se alcanza un 100 % de ECP en menos de 24 horas y el tamaño de los sincitios es mucho mayor, llegando a incluir más de 100 núcleos por sincitio.

Se ha descrito también la penetración del virus y la aparición del ECP típico del VDEP utilizando otras líneas celulares como MA-104, ESK o CPK (75). Sin embargo, la propagación eficiente del virus sólo es posible, en la actualidad, en la línea Vero, donde se logró inicialmente.

Hasta el momento, sólo ha sido descrita la adaptación al cultivo celular de cinco cepas del virus, la cepa CV-777 procedente de Bélgica, la cepa inglesa Wey1/87, la española SG1/85 (23), una cepa japonesa, la 83P-5 (75) y una coreana, la KPEDV-9 (76).

Aunque, como ya hemos señalado, las secuencias genómicas de los distintos aislados han mostrado una alta homología, las comparaciones con los correspondientes aislados adaptados a cultivo celular realizados con las cepas belga, inglesa y española, han mostrado variaciones en el ORF 3 y en el gen que codifica para la proteína S (14). Las variaciones en el gen de la proteína S han sido detectadas en la cepa belga y

afectaban a 5 nucleótidos que producían un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína, variando por tanto su estructura primaria. Así mismo, en todas las cepas adaptadas al cultivo celular estudiadas se detectaron variaciones y deleciones en el ORF 3, muy similares en todos los casos aunque no coincidentes, que daban lugar a un gen de menor tamaño que el detectado en las formas del virus no adaptadas al cultivo celular, en las que el ORF 3 se mantiene intacto. Se ha sugerido la incompatibilidad entre esta forma intacta del ORF 3 y la replicación del VDEP en cultivos celulares, lo que podría explicar la dificultad de la adaptación de cepas del virus al crecimiento en líneas celulares (3, 135).

Las cepas del virus adaptadas al cultivo celular muestran una virulencia mucho menor que las correspondientes no adaptadas, cuando se han realizado infecciones experimentales tanto en animales convencionales como en lechones gnotobióticos (6, 77). Este hecho también podría tener su origen en las variaciones encontradas en el genoma.

1.1.3.- EPIDEMIOLOGÍA

A partir del primer brote de la enfermedad descrito en Inglaterra en 1971 (95), la infección ha sido detectada en numerosos países tanto de Europa como de Asia (102). Se ha comprobado la existencia de anticuerpos frente al virus, así como del antígeno vírico, en casi todos los países europeos con una producción porcina relevante: Bélgica, Holanda, Inglaterra, Alemania, Francia, España, Suiza y Bulgaria. En Asia también se han detectado anticuerpos en Taiwan y se ha demostrado la presencia del virus en China, Corea y Japón. Hasta el momento no existe ningún indicio de que el VDEP se haya expandido hacia el continente americano.

En España, la enfermedad fue detectada por primera vez en 1985 en la provincia de Segovia, por Jiménez *et al.* en lechones importados y no se conocían más datos relativos a su importancia y distribución hasta el estudio epidemiológico llevado a cabo en la Comunidad Autónoma de Castilla y León durante los años 1992-1994 por Carvajal *et al.* (25). Mediante ese trabajo se comprobó la gran difusión de la infección por el VDEP en nuestra región, detectándose anticuerpos frente al virus en un 54 % de las explotaciones y en un 29 % del total de sueros analizados. Esta situación contrasta con

las bajas prevalencias detectadas para la infección por el VGET en distintas áreas de nuestro país (36, 80, 83).

No se sabe mucho acerca de la importancia relativa de las infecciones por el VDEP respecto a otros agentes enteropatógenos asociados a episodios de diarrea. En Bélgica, Van Reet *et al.* (145), en un seguimiento realizado a 17 grupos de cerdos al entrar en la fase de cebo, demostraron que 7 de ellos, tras superar un brote de diarrea, seroconvertían frente al VDEP, no detectándose, en cambio, anticuerpos frente al VGET. Así mismo, en un estudio llevado a cabo en nuestro laboratorio durante los años 1992-1993 sobre brotes de diarrea en los que, por sus características, se sospechaba una etiología vírica, se detectó la participación del VDEP en 8 de los 17 casos estudiados; todos, excepto uno, fueron de presentación epizootica (22). Más recientemente, durante los años 1995-96 se amplió este estudio, recogiendo para ello muestras de cerdos, fundamentalmente en la fase de cebo, procedentes de explotaciones porcinas de todo el país y con problemas de diarrea. Se confirmó la presencia del VDEP en las heces de 19 de 73 explotaciones estudiadas, algo más del 25% (A. Carvajal y J. Pozo, comunicación personal).

Hasta 1993, la DEP se consideró una enfermedad autolimitante, con una presentación exclusivamente epizootica. Sin embargo, Pijpers *et al.* (106) demostraron por primera vez la existencia de una forma enzoótica de la enfermedad en una granja de ciclo completo, donde el virus se mantenía circulando en la población gracias a la entrada periódica de cerdas de reposición seronegativas. Casos semejantes han sido descritos en nuestro país por Carvajal *et al.*, que han comprobado que en las formas enzoóticas la cantidad de antígeno vírico eliminada en heces es sensiblemente menor que en el caso de los brotes epizooticos (22).

En Europa, parece que la tendencia actual es la aparición de la enfermedad en su forma enzoótica, fundamentalmente en los cebaderos, siendo más rara la afectación de los animales lactantes (102). Esta evolución del proceso está probablemente debida a que por la gran difusión que ha tenido el virus, una elevada proporción de la población de reproductoras posee anticuerpos frente a él, lo que hace que las camadas estén protegidas por la inmunidad lactogénica hasta fases cercanas al cebo (38, 102, 106). Por el contrario, en Asia, donde presumiblemente el nivel de inmunidad de la población es

menor, los brotes descritos en los últimos años han sido casi exclusivamente de carácter epizootico y extremadamente graves, clínicamente semejantes a los brotes agudos de GET y con una elevada mortalidad (102, 129).

El VDEP se transmite únicamente por la vía fecal-oral, llegando generalmente a una explotación libre con la entrada de animales infectados o con las heces de éstos transportadas por vehículos, calzado del personal y similares (102). Aunque no se han realizado estudios sobre la resistencia del virus en el ambiente, se estima que debe ser capaz de mantenerse viable al menos durante cierto tiempo, explicándose así la aparición cada vez más frecuente de la forma enzoótica de la enfermedad (21, 102).

La infección tiene un marcado carácter estacional, con mayor incidencia durante los meses de otoño e invierno o coincidiendo con cambios de temperatura, elevada humedad relativa y baja radiación solar (102).

Tradicionalmente se han descrito dos formas de presentación de la enfermedad. En la denominada de tipo I, no se afectan los lechones menores de 4 ó 5 semanas de edad, mientras que en la de tipo II pueden enfermar cerdos de cualquier edad. Sin embargo, hasta el momento actual no se ha encontrado la causa que determina estas dos formas de la enfermedad.

Cuando el virus llega por primera vez a una explotación, la morbilidad puede alcanzar valores cercanos al 100 %. Este valor es más variable en las granjas de cría, ya que pueden no estar afectados los lechones. En cuanto a la mortalidad, en lechones se señala como media el 50 %, aunque a veces puede llegar al 90 %, siendo mucho menor en animales adultos, entre el 1 y el 3 % (102). Tras un brote, el virus puede desaparecer de la explotación o bien permanecer dando lugar a la forma enzoótica de la enfermedad. Esta segunda posibilidad puede presentarse si en la explotación existen de forma consecutiva poblaciones receptivas, no inmunes, como animales de reposición seronegativos o camadas destetadas sucesivamente, que van perdiendo la inmunidad lactogénica (102, 106).

Finalmente, son relativamente frecuentes las infecciones mixtas del VDEP con otros agentes enteropatógenos. Así, el virus ha sido detectado en muestras de animales

con diarrea en las que también se ha demostrado la presencia de *Serpulina hyodisenteriae* (Javier Pozo, comunicación personal) o *Lawsonia intracellularis* (107)

1.1.4.- PATOGENIA

La patogenia del VDEP ha sido estudiada tanto en animales gnotobióticos como en cerdos convencionales (43, 44), encontrándose que, en rasgos generales, es similar a la de los otros virus entéricos que afectan a la especie porcina (VGET y Rotavirus).

Tras su entrada por vía oral, el VDEP pasa al intestino delgado sin verse afectado por el pH ácido del jugo gástrico. Al contrario que en la infección por el VGET, no se ha demostrado la replicación del virus en las tonsilas o el estómago, habiéndose detectado únicamente en el intestino delgado, el colon y los ganglios linfáticos mesentéricos.

Es de suponer que la entrada del virus a los enterocitos se produzca mediante la unión de las espículas al receptor celular formado por la proteína N-aminopeptidasa, como ocurre con el VGET y el coronavirus humano 229E, los coronavirus del grupo I con los que mayor homología genética presenta (45, 62, 152). La N-aminopeptidasa es una metaloproteasa, una glicoproteína que está expresada en la membrana apical que forma el borde en cepillo de las células de las vellosidades (63).

Las primeras células infectadas se detectan entre las 12 y las 18 horas tras la entrada del virus, en el duodeno y el yeyuno. La infección progresa rápidamente, alcanzándose el máximo de células fluorescentes entre las 22 y las 36 horas. En este periodo se detecta el antígeno vírico en un 90-100 % de las células del yeyuno y el íleon y en el 70-80 % de las del duodeno (43, 44).

Hacia el cuarto día del inicio del proceso existe un segundo pico de células fluorescentes y el antígeno es detectado de nuevo en el 90-100% de las células epiteliales, demostrándose que el VDEP tiene una elevada capacidad para infectar las células en regeneración del epitelio (44).

La replicación del virus se produce en todas las células de las vellosidades e incluso se ha detectado en células aisladas en las criptas. Sin embargo, parece que afecta preferentemente a las células de la base de las vellosidades. En el caso del VGET la

infección comienza por las células de la base para extenderse posteriormente a las de la zona apical (27, 116). En las infecciones por rotavirus, en cambio, el virus sólo afecta a los enterocitos maduros, situados en el extremo apical (86).

En las células infectadas se produce degeneración, lisis y descamación a la luz intestinal, lo que ocasiona un importante acortamiento de las vellosidades intestinales que es más pronunciado entre las 20 y 40 horas tras la entrada del virus (43, 44). A pesar de que en las criptas también se observa la presencia de células infectadas, en ellas no se producen lesiones histológicas y su capacidad regenerativa no se ve alterada, sino que aumenta su actividad mitótica tratando de reemplazar las células perdidas en las vellosidades. Las células procedentes de las criptas que migran hacia las vellosidades son células inmaduras, no completamente diferenciadas, apreciándose en las vellosidades células cúbicas en lugar del epitelio cilíndrico normal. En el epitelio del colon, aunque se ha demostrado la multiplicación del VDEP, no se han observado cambios degenerativos.

El principal síntoma de la enfermedad, la diarrea, comienza a las 20-40 horas de la entrada del virus. Como consecuencia de la pérdida de enterocitos, se produce una disminución de la capacidad de digestión y absorción que conduce a un cuadro de diarrea por malabsorción cuando la cantidad de material de la ingesta supera la capacidad de absorción del colon (88). Además, la situación se agrava con el proceso de maldigestión, ya que durante la infección por el VDEP las células que recubren las vellosidades presentan un perfil enzimático alterado (33), que hace que la actividad digestiva esté disminuida. Este hecho conduce a una retención de metabolitos en la luz intestinal y a una elevación de la presión osmótica, que a su vez origina la retención de un exceso de líquido, agravándose así el cuadro con una diarrea de tipo osmótico.

1.1.5.- CUADRO CLÍNICO

El síntoma más manifiesto de la enfermedad es la diarrea acuosa, de color amarillo-verdoso, que puede ir precedida de vómitos. Estos síntomas, como se ha comprobado en animales infectados experimentalmente, aparecen entre las 20 y las 40 horas posteriores a la inoculación del virus (43, 44). La diarrea tiene una duración variable, produciéndose la recuperación generalmente en 7-10 días. Durante ese tiempo,

los animales afectados presentan también depresión y anorexia y, como consecuencia de la diarrea, suele haber deshidratación (102). La sintomatología es más severa cuanto menor es la edad del animal (43).

En las granjas de cría, el cuadro clínico es muy variable en gravedad, pudiendo afectar de manera muy grave a los lechones, que pueden morir por deshidratación en 3 ó 4 días. En otros casos, los únicos afectados son los animales adultos y los lechones no enferman o lo hacen muy levemente.

Cuando la enfermedad se produce en cebaderos, el proceso se extiende a todo el efectivo en una semana. Los cerdos presentan depresión, anorexia y diarrea acuosa, pero la mortalidad suele ser muy baja, del 1 al 3 % y afectar a los animales en las fases finales de cebo, principalmente a los más sensibles al estrés. Los animales mueren en las fases iniciales de la diarrea e incluso antes del inicio y en la necropsia se suelen encontrar focos de necrosis muscular (102)

En el caso de la forma enzoótica de la enfermedad, generalmente la sintomatología es menos acusada y sólo un número limitado de animales presenta diarrea (22, 106).

1.1.6.- LESIONES

Las lesiones macroscópicas se limitan al intestino delgado, exceptuando el estado general de deshidratación que puede ocurrir en casos graves de la enfermedad. El intestino delgado aparece con las paredes adelgazadas, distendidas y lleno de líquido amarillento-verdoso (44, 129). En estados avanzados, el intestino delgado puede aparecer casi vacío y el intestino grueso con contenido mucoso (43). En ocasiones se observa también congestión en los ganglios linfáticos mesentéricos (150).

Microscópicamente se observa vacuolización y descamación de los enterocitos así como lo que, sin duda, es la lesión más característica, el acortamiento de las vellosidades intestinales. La relación entre la longitud de las vellosidades y la profundidad de las criptas disminuye de forma importante, pasando del valor normal de 8:1 a 2,3-3:1 (44), habiéndose descrito en algunos casos una relación de incluso 1,5:1, lo que demuestra una gravedad en las lesiones similar a la que ocurre con el VGET (129).

El grado máximo de acortamiento de las vellosidades tiene lugar alrededor de las 20 horas del comienzo de la diarrea (43, 44).

Los cambios ultraestructurales se observan fundamentalmente en el citoplasma de los enterocitos. Disminuye considerablemente el número de orgánulos intracelulares, dejando áreas de menor densidad electrónica. También se observa la desaparición del borde en cepillo característico de las células de las vellosidades así como un aplanamiento de éstas. Finalmente, se comprueba la desaparición de las uniones firmes que normalmente existen entre los enterocitos y su descamación a la luz intestinal (49, 102).

1.1.7.- DIAGNÓSTICO

1.1.7.1.- Diagnóstico clínico y lesional

El diagnóstico de la enfermedad no puede hacerse únicamente basándose en la sintomatología y los hallazgos de necropsia ya que éstos son prácticamente idénticos a los de la GET y muy similares a los de otros procesos gastroentéricos.

Las características epidemiológicas de la enfermedad pueden servir de ayuda, aunque en ningún caso son suficientes para el diagnóstico. Así, en el caso de que afecte sólo a animales adultos se pueden descartar procesos como infecciones por rotavirus, colibacilosis e incluso GET. Cuando están afectados animales menores de 10 días de edad puede ayudar el hecho de que la mortalidad media descrita para la DEP en animales tan pequeños es de aproximadamente el 50 %, mientras que en el caso de la GET suele ser del 100 % y las infecciones por rotavirus tienen una incidencia prácticamente nula durante la primera semana de vida (21, 113).

En cualquier caso, el diagnóstico clínico de la enfermedad será únicamente presuntivo, siendo necesario recurrir a las técnicas de diagnóstico laboratorial, bien directas mediante la detección del antígeno vírico o indirectas mediante la detección de anticuerpos en suero.

1.1.7.2.- Diagnóstico laboratorial directo

Algunas de las técnicas laboratoriales clásicas para la detección de agentes infecciosos como son el aislamiento e identificación del agente y la microscopía electrónica o su variante, la inmunomicroscopía electrónica, han jugado un papel muy importante en las primeras descripciones de la enfermedad (43, 44, 49, 100). Sin embargo, debido fundamentalmente a su complejidad, estas técnicas no pueden ser empleadas en el diagnóstico rutinario de la enfermedad

En la actualidad existen otros métodos más adecuados para detectar la presencia del VDEP en muestras de heces o tejidos, como los que se describen a continuación.

1.- Inmunofluorescencia directa

La inmunofluorescencia directa realizada sobre secciones del intestino delgado (yeyuno e íleon) es una técnica relativamente sencilla, rápida y específica. En las muestras positivas se observa la presencia de fluorescencia en el citoplasma de los enterocitos de las vellosidades. Sin embargo, esta técnica sólo puede ser aplicada en animales sacrificados durante la fase aguda de la diarrea, debido a la rápida descamación de los enterocitos infectados (104).

2.- Métodos inmunohistoquímicos

Esta técnica ha de ser realizada sobre secciones del intestino delgado, fijadas en formalina y embebidas en parafina. Se utilizan anticuerpos monoclonales (AcM) o sueros hiperinmunes frente al VDEP, que posteriormente se evidencian mediante un segundo anticuerpo biotinado seguido del sistema estreptavidina peroxidasa (56, 129).

Esta técnica parece tener una gran fiabilidad cuando se realiza sobre las muestras adecuadas, pero presenta las mismas restricciones que la inmunofluorescencia, siendo necesario realizarla sobre animales muertos en la fase aguda de la diarrea.

3.- Enzimoimmunoensayo (ELISA)

Han sido descritas varias técnicas de ELISA para detectar el VDEP en las heces. La primera fue desarrollada por Callebaut *et al.* en 1982 y consistía en un método doble *sandwich* en el que se utilizaban anticuerpos policlonales anti-VDEP purificados a partir de suero hiperinmune producido en cerdo, tanto para la captura como para la detección

del virus (19). Para conseguir una mayor especificidad incluían una etapa de bloqueo, incubando cada muestra en dos pocillos, con un suero positivo y con un suero negativo frente al VDEP. Se consideraba positiva una muestra cuando el valor de la absorbancia en el pocillo incubado con suero positivo era menor del 50 % de la absorbancia obtenida en el pocillo incubado con el suero negativo.

En 1992, Van Nieuwstadt y Zetstra pusieron a punto una técnica similar, pero utilizando anticuerpos monoclonales frente al VDEP para la captura y detección (144). Carvajal *et al.* describieron en 1995 una modificación de este ELISA, empleando los mismos AcM para la captura y la detección, y una etapa de bloqueo con sueros positivo y negativo (25). Este ELISA demostró una mayor sensibilidad que la inmunofluorescencia directa.

En 1998, Guscetti *et al.* realizaron un estudio en el que comparaban los resultados en la detección del virus mediante una prueba histoquímica, la inmunofluorescencia sobre cortes de tejidos y el ELISA de bloqueo con AcM, concluyendo que, a pesar de los buenos resultados de la técnica inmunohistoquímica, el ELISA tenía una gran fiabilidad en cuanto a la investigación de muestras clínicas (56).

4.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica se basa en la amplificación y detección de fragmentos de ADN utilizando para ello los denominados cebadores o *primers*, que son secuencias específicas de ADN, complementarias a secuencias propias del agente que trata de demostrarse. En el caso de la DEP, al tratarse de un virus con ARN ha de intercalarse un paso de transcripción inversa en el que se sintetizan cadenas de ADN complementarias a las de ARN del virus, que son las que en realidad se amplifican y detectan.

En 1996, Tobler *et al.* (134) describieron por primera vez para este virus, una PCR precedida de transcripción inversa (RT-PCR) en la que se utilizaba como cebador una secuencia del ORF 3. Esta técnica sin embargo, se reveló como poco eficaz para el diagnóstico de la infección en un estudio comparativo realizado por Guscetti *et al.* (56), al presentar una baja sensibilidad.

Posteriormente, en 1997, Kweon *et al.* desarrollaron una técnica de RT-PCR orientada al diagnóstico de la enfermedad en muestras de campo (78). La técnica fue

capaz de detectar el virus producido en cultivos celulares desde concentraciones de 10 DICC₅₀/ml. Así mismo, en animales infectados experimentalmente, se detectó la presencia del virus en las heces desde el primer día postinoculación. A pesar de estos buenos resultados, se desconocen su sensibilidad y especificidad con muestras de casos clínicos de la enfermedad.

Otra RT-PCR fue descrita en Japón por Ishikawa *et al.* (64). Los cebadores utilizados en esta técnica amplificaban una secuencia del gen de la proteína M. Esta PCR se probó con homogeneizados de heces o intestino que contenían el VDEP producido en cultivos celulares, siendo capaz de detectar pequeñas cantidades del virus. En muestras de casos clínicos de diarrea la prueba mostraba una buena concordancia con la técnica histoquímica que servía de referencia.

1.1.7.3.- Diagnóstico laboratorial indirecto

1.- Inmunofluorescencia indirecta

Se realiza sobre cortes de intestino de animales infectados experimentalmente o sobre cultivos de células Vero, infectados y fijados cuando el ECP aún no está muy extendido. El revelado se realiza con un conjugado anti-inmunoglobulinas de cerdo marcado con fluoresceína (104).

2.- Enzimoimmunoensayo (ELISA)

Al igual que para el diagnóstico directo, se han descrito varias técnicas de ELISA para el diagnóstico serológico de esta enfermedad.

Callebaut *et al.* (19) describieron un ELISA de bloqueo empleando anticuerpos policlonales para la captura y detección de un antígeno vírico producido en lechones gnotobióticos. El suero problema se incuba con este antígeno, de forma que si existen anticuerpos frente al VDEP, bloquean epítomos del virus, impidiendo la unión del segundo anticuerpo anti-VDEP marcado con peroxidasa. El bloqueo se traduce en una reducción de la absorbancia respecto a un pocillo testigo en el que la misma cantidad de antígeno vírico se incuba con un suero de referencia negativo.

Hofman y Wyler (1990) pusieron a punto un método ELISA indirecto utilizando un antígeno obtenido a partir de sobrenadante de cultivos celulares de la línea Vero,

infectados con VDEP, purificado mediante ultracentrifugación a través de un doble colchón de sacarosa (61). Otro ELISA indirecto fue descrito en 1992 por Knuchel *et al.* (72), pero en este caso empleando para el tapizado de las placas un antígeno vírico soluble que se obtiene a partir de células Vero infectadas con VDEP. En función de sus solubilidades específicas, las proteínas S y N del VDEP se extraen con un detergente no iónico a su pH óptimo (4 para la proteína S y 9 para la N), utilizándose como antígenos en los denominados S-ELISA y N-ELISA (72).

Finalmente, se han desarrollado métodos de ELISA de bloqueo, semejantes al descrito por Callebaut, pero utilizando AcM dirigidos frente a distintos epítomos del VDEP tanto para la captura como para el revelado(25, 144)

1.1.8.- INMUNIDAD

1.1.8.1.- Inmunidad activa

Son pocos los estudios que se han realizado hasta el momento sobre la inmunidad relacionada con el VDEP y la información que existe se refiere fundamentalmente a la presencia de anticuerpos séricos frente al virus.

En infecciones experimentales realizadas en lechones, los anticuerpos séricos pueden ser detectados al cabo de una semana de la inoculación (25, 144), alcanzándose los títulos máximos entre las 4 y las 9 semanas siguientes (25, 42).

Estos anticuerpos persisten durante largo tiempo en la sangre, pudiendo ser detectados incluso uno o dos años después de la infección, tanto en animales infectados experimentalmente como tras brotes ocurridos naturalmente (42, 102).

Sin embargo, debido a la naturaleza entérica de la infección, no se puede asociar la presencia de anticuerpos en la sangre con la protección frente a una reinfección, igual que ocurre en otros procesos gastroentéricos en el cerdo (113, 115, 118, 133, 146). Hasta el momento actual, no existe ningún otro estudio relacionado con la inmunidad de mucosas asociada a este proceso, aunque se piensa que la protección local tras una infección es de corta duración, ya que se puede provocar experimentalmente una

reinfección con manifestaciones clínicas de la enfermedad 5 meses después de una primera inoculación (42).

1.1.8.2.- Inmunidad pasiva

Debido al tipo de placentación epiteliocorial de la cerda, durante la vida fetal no hay transferencia de anticuerpos de la madre al feto, por lo que los lechones al nacer son prácticamente agammaglobulinémicos (110, 132). Estos animales recién nacidos son perfectamente inmunocompetentes, pudiendo elaborar una respuesta inmune primaria frente a gran número de antígenos, aunque ésta resulta insuficiente en tiempo e intensidad para la prevención de infecciones durante los primeros días de vida. En estas circunstancias es de vital importancia la inmunidad pasiva aportada por la madre a través del calostro y la leche.

El calostro, producido durante las primeras horas después del parto, tiene un elevado contenido de inmunoglobulinas, de las cuales la más abundante es la IgG (aproximadamente un 80 % del total), seguida de la IgA (16 %). La procedencia de estos anticuerpos es distinta dependiendo del isotipo. Así, mientras las IgG e IgM proceden del torrente sanguíneo, las IgA, salvo una pequeña proporción, son sintetizadas localmente en la glándula mamaria (71, 110, 132). Durante las primeras horas de vida los lechones pueden absorber intactas las inmunoglobulinas del calostro, que se incorporan a la circulación general, aportando al animal recién nacido un cierto grado de inmunidad sistémica frente a las infecciones.

Tras la toma de calostro, el animal lactante sigue ingiriendo anticuerpos con la leche. El tipo de inmunoglobulina mayoritaria en la leche es la IgA, cuyo origen es la síntesis local por las células inmunocompetentes de la glándula mamaria. Debido a sus características, estas inmunoglobulinas pueden llegar intactas a la luz intestinal, proporcionando allí protección local frente a las infecciones (71, 110, 132).

En un estudio realizado en nuestro laboratorio con 11 cerdas que habían superado una infección natural por el VDEP varios meses antes, fueron detectados anticuerpos de las clases IgG e IgA frente al virus en el calostro y en la leche (38). Los títulos, tanto de IgG como de IgA, detectados en el calostro fueron muy elevados y se comprobó que en la transición de calostro a leche, los niveles de IgG disminuían

bruscamente. La IgA, en cambio, siguió siendo detectada en la leche durante las cuatro semanas siguientes al parto.

En este estudio también se investigó la cinética de los anticuerpos adquiridos pasivamente por los lechones de esas reproductoras. En el suero de los lechones se detectó la presencia tanto de IgA como de IgG, aunque el primer tipo de anticuerpos desapareció de la sangre en la primera semana de vida, mientras que los títulos de IgG permanecieron relativamente altos durante las cuatro semanas del estudio. Los títulos de IgG detectados en los lechones durante la primera semana de vida mostraron una correlación elevada con los de la IgG sérica de la madre.

Sin embargo, se desconoce cual es el grado de protección real que estos anticuerpos adquiridos pasivamente proporcionan a los lechones. Así, mientras que Pijpers *et al.* (106), en las explotaciones con problemas de DEP enzoótica, explican la nula incidencia de la enfermedad durante el periodo de lactación por la inmunidad maternal, Debouck y Pensaert sostienen que ésta es insuficiente para proteger a los animales lactantes frente a la infección o al menos frente a dosis elevadas del virus, como comprobaron inoculando a lechones de 4 semanas de edad hijos de una madre inmune (42).

1.1.9.- TRATAMIENTO Y CONTROL

Al igual que ocurre en el resto de los procesos diarreicos de origen vírico, no existe ningún tratamiento etiológico específico para esta enfermedad, sino que el único posible es el tratamiento sintomático, encaminado a mantener a los lechones vivos, evitando la deshidratación y a minimizar las pérdidas de peso en el resto de los animales.

Es imprescindible la restricción de los alimentos, e incluso la dieta total en los animales adultos, ya que la ingesta de alimentos agrava el cuadro de diarrea. Para evitar la deshidratación debe facilitarse a los animales agua limpia y a libre disposición. También sería conveniente la rehidratación con soluciones electrolíticas isotónicas con glucosa y glicina. La inyección intraperitoneal de estas soluciones en animales de corta

edad es también eficaz, pero la dificultad de aplicar este procedimiento para tratar a grandes efectivos hace que, en la práctica, sea poco útil.

Se ha propuesto también la utilización de agentes terapéuticos que ayuden al restablecimiento del epitelio dañado como poliamidas y factores de crecimiento (13).

El tratamiento con antibióticos sólo tiene un efecto favorable en el caso de que existan infecciones bacterianas secundarias, en otro caso podrían incluso contribuir al agravamiento del cuadro por alteración de la flora intestinal.

Para controlar la infección una vez que ha ocurrido dentro de una explotación, se recomienda prestar una especial atención a los animales lactantes. Así, sería recomendable infectar a las reproductoras gestantes para lograr una buena inmunidad que pueda ser transmitida pasivamente a los animales recién nacidos.

Para evitar que la infección permanezca de forma enzoótica en la explotación han de extremarse las medidas de higiene y desinfección de locales, así como limitar la entrada de animales, al menos temporalmente. En las granjas de ciclo completo en las que se haya detectado la persistencia del virus sería necesario trasladar a los animales inmediatamente después del destete a otro lugar, al menos durante el período de transición, para romper el ciclo de transmisión del virus. En los cebaderos se hace necesaria la utilización de sistemas todo dentro/todo fuera.

1.1.10.- PROFILAXIS E INMUNOPROFILAXIS

En las explotaciones libres, las mejores medidas para reducir el riesgo de una infección son las encaminadas a prevenir la entrada del virus, teniendo en cuenta que ésta ocurre fundamentalmente vinculada al tráfico de personas y animales entre distintas granjas.

Hasta el momento no existe ninguna vacuna comercial contra la DEP. Únicamente ha sido descrita una prueba vacunal realizada en Corea en la que se utilizaba la cepa KPEDV-9 del virus, atenuada mediante 93 pases en la línea celular Vero (77). Esta cepa mostraba una virulencia notablemente reducida cuando era inoculada oralmente en lechones de 4 días de edad, así como una elevada seguridad sobre cerdas gestantes, ya que cuando era aplicada parenteralmente a reproductoras en

diferentes estados de gestación no se observaba ningún efecto en el tamaño o la viabilidad de las camadas.

La inmunogenicidad de la cepa fue probada en cerdas gestantes entre 4 y 5 semanas antes del parto, a las que se aplicaba por vía intramuscular el virus atenuado. Tras el nacimiento de las camadas, se comprobaba que la inmunidad pasiva adquirida de las madres proporcionaba una tasa de protección frente al desafío con la cepa homóloga virulenta del 20 al 100% (dependiendo de la dosis de virus utilizada para el desafío).

Los resultados de esta prueba resultan sorprendentes ya que este tipo de estrategias de inmunización parenteral han sido probadas, sin mucho éxito, en otros procesos gastroentéricos del cerdo (89, 96, 114, 119, 149, 153). Como los mismos autores señalan, resulta difícil explicar la relación exacta entre una aplicación parenteral del antígeno y la estimulación del sistema de mucosas, ya que es un hecho probado que la protección frente a este tipo de procesos está vinculada al sistema inmune de mucosas (114, 115, 117). En cambio, este método de inmunización parenteral de cerdas gestantes o lactantes resulta altamente eficaz para la inducción de un fuerte incremento en las IgA de la leche en animales que previamente habían tenido un contacto con el agente por la vía oral (ya sea por infección natural o una inoculación previa) (96, 112, 130).

1.2.- MECANISMOS DE DEFENSA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL

La mucosa intestinal es una de las superficies del organismo que más directamente está en contacto con antígenos de diversa procedencia y, además, es el lugar de penetración y multiplicación de muchos agentes patógenos, como el que nos ocupa. Por ello, en esta localización existe un complejo y eficaz sistema de defensa constituido por el sistema inmunitario de mucosas, además de un conjunto de barreras no inmunológicas que tienden a impedir la entrada de agentes exógenos.

1.2.1.- MECANISMOS INESPECÍFICOS DE DEFENSA

Los mecanismos inespecíficos de defensa del tracto gastrointestinal se encaminan a limitar la penetración de cualquier tipo de antígeno. Para ello existe una doble barrera, por un lado una barrera extrínseca, que limita la cantidad de partículas capaces de alcanzar la superficie mucosa, y por otro una barrera intrínseca, derivada de las propias características físicas de la pared intestinal.

1.1.2.1.- BARRERA EXTRÍNSECA

1.- Acidez gástrica

El pH ácido de los jugos gástricos hace disminuir el transporte de antígenos al interior de la mucosa del intestino y se ha comprobado que neutralizando esta acidez se consiguen mayores tasas de entrada de antígenos a través de la mucosa. Este efecto se debe fundamentalmente a la desnaturalización de proteínas, así como a la activación de enzimas proteolíticas que ocasiona (123).

Los propios enterocitos contribuyen también al mantenimiento de este microclima ácido proporcionado por los jugos gástricos, ya que tanto el glicocálix como el *mucus* secretado impiden la difusión de iones H^+ y con ello, los cambios en el pH (123).

2.- Enzimas gastrointestinales

Muchos agentes patógenos y otros antígenos son destruidos antes de que puedan alcanzar la superficie mucosa por acción de enzimas proteolíticas. Estas enzimas son sintetizadas por glándulas exocrinas, principalmente por el páncreas, y liberadas a las superficies mucosas. Algunas de las más importantes son la tripsina, la pepsina, la lactoferrina, la lisozima y las peroxidasas.

Sus mecanismos de acción son variados. Enzimas como la tripsina o la pepsina ejercen una acción protectora debida a su actividad proteolítica (123). La lactoferrina interfiere con el metabolismo microbiano al secuestrar el hierro (82). El efecto antibacteriano de la lisozima incluye distintos mecanismos, desde la capacidad de lisis de la pared bacteriana, hidrolizando el peptidoglicano, a la activación de autolisinas en las bacterias o el bloqueo de su capacidad de adherencia (66). Las peroxidasas protegen las superficies mucosas ya que, al catalizar determinadas reacciones de peroxidación, dan origen a productos con potentes efectos antibacterianos (108).

3.- Peristaltismo intestinal

El tiempo disponible para la entrada de microorganismos y otros antígenos está directamente relacionado con la velocidad del tránsito intestinal y, por tanto, con el peristaltismo intestinal. La acción combinada de la captación de antígenos por los anticuerpos secretados a la luz intestinal y el peristaltismo es una eficaz forma expulsión de posibles agentes patógenos (123).

4.- *Mucus* intestinal

Está formado por una serie de glicoproteínas o mucinas de composición y pesos moleculares variables. Estas proteínas se depositan sobre la superficie del epitelio y ejercen una función protectora compitiendo con los microorganismos y otras proteínas por unirse a los enterocitos en el intestino. Además de dificultar la adhesión, debido a su viscosidad, también actúan disminuyendo la motilidad de los microorganismos.

Por otra parte, en determinados momentos, como respuesta a algunos agentes extraños, la liberación de mayores cantidades de *mucus* junto con el peristaltismo

intestinal ejercen una función de barrido o arrastre de los posibles agentes agresores (33, 108).

5.- Flora intestinal

La microflora habitual del intestino tiene diferentes mecanismos por los que restringe o impide el crecimiento de microorganismos extraños en su hábitat. A pesar de que estos mecanismos no son del todo conocidos, se sabe que uno de los más importantes es la competencia nutricional. Sin embargo, hay también otros como la toxicidad de los productos metabólicos que generan o la competición por los lugares de adhesión que, sin duda, juegan un papel igualmente importante. (124).

1.1.2.1.- BARRERA INTRÍNSECA

1.- Membrana plasmática de los enterocitos

Como en otras células, está formada por una bicapa lipídica asociada a proteínas unidas a ella. La propia estructura de la membrana constituye una importante barrera física para la penetración de microorganismos, pero presenta regularmente invaginaciones de la porción apical que pueden permitir el paso de agentes que se hayan adherido a ella (123).

2.- Uniones entre los enterocitos

Las firmes uniones que existen entre los enterocitos suponen una barrera importante que impide el paso de macromoléculas a los espacios subepiteliales, aunque permite el paso de agua e iones de pequeño tamaño.

Esta resistencia parece estar directamente relacionada con el número de uniones intercelulares que se establecen entre las paredes laterales de las células. Estas uniones están formadas por una familia de proteínas, las cadherinas, de elevada elasticidad, y son conservadas incluso durante la renovación del epitelio en la porción apical de las criptas, ya que las nuevas células forman inmediatamente estos puentes de unión, en el mismo momento en que se pierden las células viejas (123).

1.2.2.- MECANISMOS ESPECÍFICOS: INMUNIDAD DE MUCOSAS

Los mecanismos específicos de defensa del tracto gastrointestinal forman parte de un sistema altamente especializado, el sistema inmune de mucosas. Este sistema, aunque está relacionado con el sistémico, goza de un grado de autonomía tal que lleva a considerarlo como un componente separado de éste. Abarca tanto el tejido linfóide de las mucosas como el de las glándulas exocrinas.

Una de las características fundamentales de este sistema es que la principal molécula efectora, en cuanto a la inmunidad humoral, es la IgA, al contrario que en el sistema inmune sistémico, donde ese papel es desempeñado por la IgG.

1.2.2.1.- ORGANIZACIÓN DEL TEJIDO LINFOIDE DEL TRACTO GASTROINTESTINAL

En el intestino existe una gran cantidad de tejido linfóide (tejido linfóide asociado al tracto gastrointestinal o GALT, según las siglas del término inglés *gut associated lymphoid tissue*), de forma que, cuantitativamente, respecto al número de células linfoides, el tracto gastrointestinal es el mayor órgano linfóide del organismo (65, 74). Por su morfología y organización, este tejido puede dividirse en dos grupos:

- Tejido linfóide organizado (O-GALT): formado por los ganglios linfáticos mesentéricos y las placas de Peyer. En ellos se inicia la respuesta inmune frente a los antígenos presentes en el intestino y por ello son también llamados tejidos linfoides eferentes.
- Tejido linfóide difuso (D-GALT): se localiza en el seno del epitelio y en la lámina propia intestinal. Aquí se desarrollan las funciones efectoras de la respuesta inmune (producción de anticuerpos y citotoxicidad) y se denominan tejidos linfoides aferentes.

1.2.2.1.2.-Tejido linfóide organizado

Ganglios linfáticos mesentéricos

Los ganglios linfáticos mesentéricos en el cerdo presentan la misma estructura que los sistémicos y su principal característica es poseer una estructura anatómica

invertida. Este hecho, aunque peculiar, no está restringido a la especie porcina sino que aparece también en otras como el elefante, el delfín y el rinoceronte (105).

La corteza, con los folículos linfoides, se localiza en el centro del ganglio. Los folículos linfoides son las áreas ricas en células B y se dividen en dos tipos, los folículos linfoides primarios, con linfocitos B (LB) maduros pero todavía no estimulados antigénicamente y los folículos secundarios, donde se localizan los centros germinales. Éstos últimos son los lugares de estimulación antigénica, que proliferan en respuesta a antígenos y tienen, además de células B, abundantes células dendríticas. Entre los folículos, se encuentran las áreas parafoliculares de la corteza, ricas en linfocitos T (LT), principalmente LT cooperantes con fenotipo CD4+ (1, 105).

La médula, que se localiza en la periferia del ganglio, entre la corteza y la cápsula, presenta mayor densidad celular que en otras especies, aunque sigue siendo menos rica en células que la corteza. En ella se localizan abundantes macrófagos, eosinófilos y células plasmáticas (105).

Placas de Peyer

En el intestino del cerdo existen dos tipos diferentes de placas de Peyer. En primer lugar hay placas de pequeño tamaño e individuales, localizadas fundamentalmente a lo largo del yeyuno y la porción proximal del íleon. En un animal adulto se pueden encontrar aproximadamente 20-30 de estas placas. En segundo lugar existen placas continuas, de más de 1 m de longitud. En el cerdo existen dos de estas placas, una en la porción terminal del íleon y la otra en el colon espiral (9, 105).

Cada placa de Peyer contiene de 200 a 400 folículos linfoides, cada uno de ellos formado por un centro germinal, más claro y una zona periférica más densa. Los folículos contienen células B en distintas fases de maduración, localizándose en los centros germinales las que se encuentran en los estados iniciales. También hay algunas células dendríticas y LT CD4+. Los diferentes folículos están separados entre sí por las áreas interfoliculares, muy ricas en células T.

Separando los folículos linfoides del epitelio de la mucosa existe una zona con forma de cúpula que se denomina corona y que contiene gran cantidad de LB, así como células T CD4+ y numerosas células dendríticas y macrófagos (57, 74, 91, 92).

Los folículos linfoides están separados de la luz intestinal por un epitelio especializado, el epitelio asociado a los folículos, que adopta la forma de cúpula de la corona. Está formado por células epiteliales convencionales y unas células denominadas membranosas o células M, que aparecen exclusivamente en esta localización y están especializadas en la captación y transporte de antígenos (57, 74, 91, 92).

1.2.2.1.2.- Tejido linfoide difuso

Linfocitos intraepiteliales

Se encuentran diseminados en el epitelio intestinal, intercalados entre las células epiteliales y constituyen una primera línea de células inmunitarias en la defensa del intestino (65, 74, 81). Lo más peculiar de este grupo de células es la abundancia de LT con receptores del tipo $\gamma\delta$. En el ratón constituyen entre el 20 y el 80 % del total (9, 131), siendo también muy elevada esta proporción en el cerdo (9, 105).

De los LT que expresan el receptor $\alpha\beta$, la gran mayoría son CD8+ (9, 65, 74, 81, 105), fenotipo que corresponde a LT citotóxicos.

Las funciones de los linfocitos intraepiteliales no están perfectamente definidas. Una de ellas, quizás la más conocida, es la de contribuir al mantenimiento de la integridad del epitelio intestinal mediante la destrucción rápida de células dañadas o infectadas por virus (65, 74, 81). También se piensa que pueden participar en funciones de regulación de la respuesta inmune, ejerciendo una acción supresora que contribuiría al establecimiento de la tolerancia oral (52).

Lámina propia intestinal

En la lámina propia intestinal se localizan fundamentalmente células linfoides activadas, tanto LB como LT, predominando las células B alrededor de las criptas y las T en las vellosidades (105). Los LB suponen alrededor del 40 % y de ellos una alta proporción son células plasmáticas, muchas de ellas productoras de IgA (74, 105). Del 60 % restante de LT, la mayoría (60-70 %) presentan el fenotipo de LT cooperantes de tipo 2 CD4+, el tipo de LT más directamente implicado en la inducción de respuestas inmunes con producción de anticuerpos, aunque existe también una notable cantidad de LT citotóxicos (el 30-40 % de los LT son CD8+) (70).

También aparecen en esta localización eosinófilos, mastocitos y basófilos, así como macrófagos (74, 105).

1.2.2.2.-PENETRACIÓN DE LOS ANTÍGENOS

La inducción de una respuesta inmune en la mucosa digestiva comienza con la penetración de los antígenos a través del intestino y su puesta en contacto con las células inmunocompetentes existentes en esa localización o en los ganglios linfáticos mesentéricos. La entrada de los antígenos puede tener lugar por cuatro vías distintas:

1.- A través de las uniones entre las células epiteliales

Principalmente cuando existan alteraciones del epitelio, como en la inflamación.

2.- A través del extremo apical de las vellosidades

Durante la sustitución de células viejas por células en proceso de maduración procedentes de las criptas.

3.- A través de los enterocitos

Debido a su elevada capacidad para la absorción y el procesado de partículas, los enterocitos pueden captar antígenos de la luz intestinal y actuar ellos mismos como células presentadoras de antígenos.

Los enterocitos captan fundamentalmente antígenos solubles, bien sean péptidos solubles o macromoléculas, mediante transporte activo en vesículas (endocitosis o pinocitosis), que serán transportadas a través del citoplasma celular hacia la membrana basal aprovechando la polaridad de estas células (67, 74, 91).

4.- A través de las células M

Las células M son células que se localizan exclusivamente en el epitelio asociado a los folículos de las placas de Peyer y que están especializadas en la captación y transporte de antígenos.

Se originan, como los enterocitos, a partir de las células pluripotenciales de las criptas, pero sufren una diferenciación separada, encaminada a facilitar el acceso de partículas exógenas al interior de las placas de Peyer (91, 92, 93). Estas células M

carecen del borde en cepillo característico de los enterocitos, presentando en cambio una serie de micropliegues en su borde apical que participan activamente en la endocitosis de partículas. También poseen un glicocálix delgado y carecen de algunas de las enzimas digestivas propias de las células de alta capacidad de absorción.

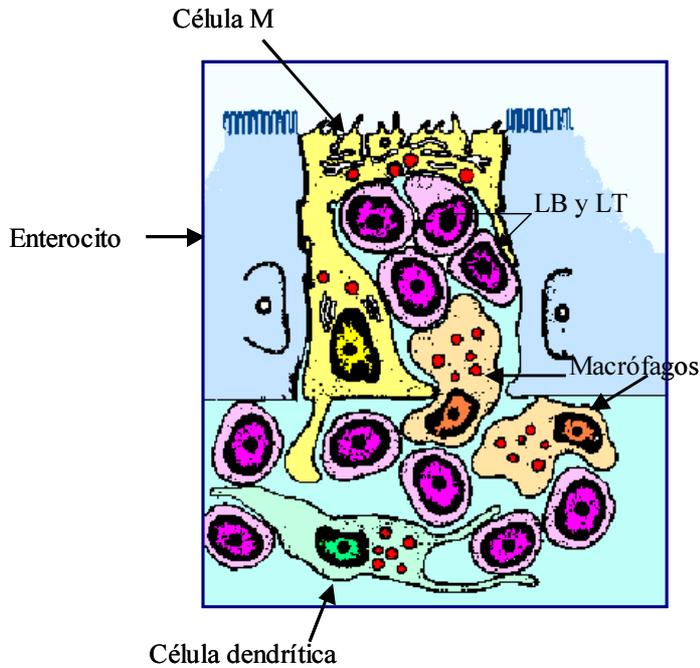


Figura 3.- Representación esquemática de una célula M en el epitelio asociado a los folículos de las placas de Peyer. Tomado de Neutra *et al.* (93).

Su membrana basolateral está profundamente invaginada, formando un amplio fondo de saco intraepitelial. El interior de este fondo de saco contiene LT (la gran mayoría CD4+), LB (maduros pero no diferenciados frente a un antígeno concreto) y algunos macrófagos, que forman aparentes sitios de adhesión con la membrana de las células M (92, 93). Esta modificación estructural disminuye la distancia de transporte en el interior de la célula M, dejando la superficie basolateral a pocas micras de la apical.

La captación de macromoléculas y microorganismos se produce activamente, mediante endocitosis de fase fluida, en el caso de antígenos solubles, o fagocitosis con formación de procesos celulares que envuelven a los antígenos particulados (91, 92). En ambos casos se forman vesículas que contienen el material exógeno y que son transportadas desde el borde apical de la célula, para, finalmente, liberar por exocitosis

su contenido al fondo de saco intraepitelial. Todo el proceso de captación y transporte es muy rápido, llevándose a cabo en menos de una hora (5).

Se piensa que estas células podrían también actuar como células presentadoras de antígenos, ya que tienen capacidad digestiva para procesar los antígenos y se ha visto que pueden expresar en su membrana antígenos de la clase II del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) (91, 92).

1.2.2.3.- PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA

Una vez que los antígenos han penetrado, para el inicio de la respuesta inmune es necesario que sean presentados a los linfocitos, principalmente a los LT aunque también a las células B, presentes en el tejido linfoide organizado.

Esta fase es llevada a cabo por las células presentadoras de antígenos (CPA), que se encargan de procesarlos y exponerlos en su membrana asociados a moléculas del CPH. Los péptidos que derivan de proteínas citosólicas, sintetizadas en la propia célula, son expresados en la membrana asociados a moléculas de la clase I del CPH y son reconocidos por LT citotóxicos. En contraste, los péptidos que derivan de proteínas extracelulares son expresados en la membrana asociados a moléculas del CPH de clase II y son reconocidos por LT CD4+ (generalmente LT cooperantes) (1).

A pesar de que la presentación antigénica puede ser desempeñada por diferentes poblaciones celulares, existen tres tipos de CPA especializadas, los macrófagos, las células dendríticas y los LB (1, 8, 85, 128). Estos tres tipos de células están ampliamente representados en el tejido linfoide asociado al intestino, principalmente en el tejido linfoide organizado. Actúan capturando el antígeno proporcionado por las células M en las placas de Peyer o transportado por la linfa, en el caso de los ganglios linfáticos mesentéricos, y exponiéndolo a los LT y LB.

Células dendríticas

Son células muy pleomórficas, caracterizadas por presentar largas proyecciones citoplasmáticas que facilitan el contacto entre los antígenos y los linfocitos, así como un alto nivel de expresión de moléculas del CPH. Derivan de precursores de la médula ósea y están relacionadas con los fagocitos mononucleares.

Estas células están presentes en todos los tejidos, salvo en el sistema nervioso central, y particularmente en las superficies mucosas (128). Las placas de Peyer contienen una población específica de estas células (111), al igual que la piel, donde se denominan Células de Langerhans, o el pulmón. Se localizan fundamentalmente en las áreas donde se concentran las células T en los órganos linfoides (1, 8).

Las células dendríticas son fundamentalmente no fagocíticas y contienen pocos lisosomas. Aunque tienen cierta capacidad fagocítica, ésta se asocia principalmente a células inmaduras y se va perdiendo a medida que avanza el proceso de diferenciación. El mecanismo principal de internalización de antígenos en estas células es la endocitosis, bien mediada por receptores o bien por pinocitosis, y el procesamiento es muy rápido y eficiente (128). Este procesamiento no se realiza por la vía clásica de la asociación a lisosomas, sino que lo que tiene lugar es una fragmentación del antígeno en múltiples y pequeñas vacuolas cuya membrana es rica en moléculas del CPH de clase II, en las que el antígeno se degrada rápidamente. A continuación las vacuolas son transportadas a la membrana celular, donde se expresa el conjunto del péptido y la molécula del CPH de clase II (121).

Las células dendríticas pueden activar tanto a los LT cooperantes como a los LT citotóxicos. Esta activación comienza por la adhesión de las moléculas expresadas en su superficie celular a los receptores celulares de los LT (receptores $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$). Al mismo tiempo se produce un incremento en los niveles de expresión de coestimuladores, unas moléculas expresadas en la superficie de las células dendríticas, necesarias para la activación de células linfoides no diferenciadas antigénicamente. También producen citocinas, fundamentalmente interleucina (IL) 12 e interferón γ , potentes inductores de respuestas inmunes con un marcado carácter celular, mediadas por los LT cooperantes de tipo 1 (128).

Macrófagos

Derivan de la médula ósea y presentan un característico núcleo arriñonado y gran cantidad de lisosomas y vesículas fagocíticas en el citoplasma. Están presentes en todos los tejidos del organismo, donde reciben distintos nombres. En el tracto gastrointestinal

se presenta la mayor concentración de macrófagos de todo el organismo, localizándose fundamentalmente en la lámina propia, bajo el epitelio (1, 128).

Su principal función es la fagocitosis y la eliminación de microorganismos, participando tanto en la inmunidad específica, en la presentación antigénica y la coordinación de la respuesta inmune, como en la inespecífica, fagocitando microorganismos y tejidos dañados (1, 128).

Los macrófagos producen también citocinas, principalmente IL 12, por lo que, al igual que las células dendríticas, están involucrados en la inducción de respuestas de fuerte componente celular (1, 8, 51).

En la activación de los macrófagos intervienen principalmente los productos de los LT, siendo el principal activador el interferón γ (también sintetizado por las células NK).

El procesamiento de los antígenos, en este caso, se realiza mediante la fagocitosis de los mismos. Tras su captación, se produce la asociación de las vesículas que los contienen a lisosomas con un alto contenido en proteasas. Éstas degradan los antígenos protéicos, generándose péptidos que, posteriormente, se unen a moléculas de la clase II del CPH de nueva síntesis procedentes del retículo endoplásmico de la célula. El complejo formado es transportado a la membrana y expresado en su superficie (53).

Linfocitos B

Los LB aparte de su función de síntesis de anticuerpos poseen también capacidad fagocítica. La captación más eficaz tiene lugar con antígenos específicos a través de las inmunoglobulinas de membrana. Una vez que las proteínas solubles están unidas a las inmunoglobulinas, son captadas por la célula mediante endocitosis, procesadas en vesículas lisosómicas y los fragmentos peptídicos son presentados en la superficie celular, asociados a las moléculas de clase II del CPH (1, 85).

Esta forma de generar una respuesta inmune resulta muy eficiente debido a que, al ser un sistema más específico, requiere menores cantidades de antígeno (85). Sin embargo, parece que estas células son menos eficientes que el resto de las CPA para desencadenar respuestas inmunes primarias (1).

La presentación antigénica por los LB es particularmente importante en la inducción de respuestas inmunes mediadas por LT cooperantes de tipo 2, con carácter fundamentalmente humoral (1).

Células epiteliales intestinales

En el intestino existe una cuarta población celular importante en la presentación antigénica, los enterocitos. Las células epiteliales de las superficies mucosas, y particularmente los enterocitos del intestino delgado, expresan en su membrana moléculas de la clase II del CPH y pueden actuar como células presentadoras de antígenos no especializadas (74).

Estas células parecen desempeñar un importante papel en la inducción de tolerancia a antígenos adquiridos por vía oral, ya que activan principalmente a LT supresores (11, 12), aunque también se ha demostrado su capacidad para activar LT cooperantes (68). De esta manera, parece que en la mayoría de los casos en que se produce la presentación antigénica por los enterocitos predominarían las reacciones de supresión, aunque bajo determinadas circunstancias, como estados inflamatorios, podría ocurrir la activación de LT cooperantes (85).

Así pues, la respuesta inmune en el intestino se desencadena fundamentalmente en el tejido linfoide organizado, en las placas de Peyer y en los ganglios linfáticos mesentéricos, y en menor medida en el tejido linfoide difuso de la lámina propia, ya que en éste apenas hay células que presenten moléculas de la clase II del CPH, siendo los enterocitos los únicos que pueden actuar como CPA (65, 74).

1.2.2.4.- DIFERENCIACIÓN DE LOS LINFOCITOS

Una vez que los LT y B han interactuado con las CPA, comienza un proceso de activación y maduración que conduce a su transformación en células efectoras o células de memoria.

La maduración y diferenciación de las células B del tejido linfoide asociado a las mucosas es considerablemente distinta a la que tiene lugar en el tejido linfoide sistémico (2, 34, 65). En el cerdo, como en el resto de los animales monogástricos, la mayoría de estas células son precursoras de células plasmáticas productoras de IgA, siendo éste el

tipo de respuesta humoral predominante. Por el contrario, en los tejidos periféricos la inmunoglobulina predominante es la IgG.

Cuando los LB indiferenciados presentes en la región de la cúpula de las placas de Peyer u otro tejido linfoide organizado son activados por la presentación antigénica, entran en una fase de división celular. Se incrementa en ellos la expresión de receptores para la IL 5, secretada por los LT cooperantes de tipo 2 activados por el antígeno. Esta linfocina actúa potenciando la proliferación de los LB y su migración hacia los centros germinales (34, 74).

En estado de reposo, la mayoría de las células B no diferenciadas expresan en su membrana inmunoglobulinas de la clase IgM. Tras la estimulación de la división celular, el segundo paso en la diferenciación de los LB es el cambio de isotipo, por el cual pasan de ser IgM+ a IgA+. Este cambio se produce mediante una reorganización de elementos específicos del ADN que llevan a la expresión de la cadena pesada α de las inmunoglobulinas en lugar de la μ , propia de las IgM.

La regulación del cambio de isotipo está también mediada por los LT cooperantes de tipo 2 activados por el antígeno. Estas células son las que producen y liberan las linfocinas IL 4, IL 5, IL 6 y el TGF (*Transforming Growth Factor*) β , inductores directos del proceso (2, 34, 74).

Estas células B IgA+ todavía no son capaces de producir inmunoglobulinas y han de sufrir una diferenciación terminal que tiene lugar en los tejidos linfoides aferentes de diferentes localizaciones del sistema inmune de mucosas.

1.2.2.5.- RECIRCULACIÓN LINFOCITARIA. MIGRACIÓN Y ANIDAMIENTO

Para que se complete la diferenciación, los linfocitos han de dirigirse desde los lugares de inducción de la respuesta inmune, a través de la circulación linfática regional y el conducto torácico, hacia la circulación sistémica, y por ésta hasta los lugares efectores del sistema de mucosas: la lámina propia de las superficies mucosas del organismo y las distintas glándulas exocrinas. Esta migración de los linfocitos para distribuirse por los diferentes sitios efectores y completar su maduración constituye una

de las principales características del sistema inmune de mucosas y se conoce como anidamiento o *homing* (69, 74, 122).

Una vez que las células linfoides alcanzan el órgano o la superficie de destino, su extravasación tiene lugar en unas vénulas postcapilares especializadas que se denominan vénulas de endotelio alto (*high endothelial venules* o HEV), caracterizadas por poseer un endotelio formado por células epiteliales cúbicas con un abultado glicocáliz (122). Estas células poseen unos receptores en su membrana, las adresinas vasculares, que reconocen específicamente a sus receptores recíprocos en la membrana de los linfocitos, los receptores de anidamiento (34, 74, 122). La extravasación requiere un paso inicial de contacto y unión de los linfocitos y las células endoteliales mediante esas moléculas de adhesión, que se ve favorecido por el volumen de las células cúbicas y su abultado glicocáliz que, al hacerlas destacar en la luz del vaso, incrementan las probabilidades de colisión entre los dos tipos de células. A continuación los linfocitos han de situarse entre las células endoteliales y contactar con la membrana basal del vaso, para finalmente cruzarla, lo que requiere su digestión enzimática, y pasar a la lámina propia o la glándula correspondiente (74, 122).

Algunas adresinas vasculares están específicamente distribuidas en determinados tejidos del organismo, lo que da como resultado un proceso de anidamiento específico de los linfocitos que expresan el correspondiente receptor (34, 67, 69, 74, 122). Así por ejemplo, los linfocitos que presentan como receptor de anidamiento la integrina $\alpha 4\beta 7$ son retenidos en los vasos de la mucosa intestinal. Estudios recientes indican que el factor determinante para el desarrollo de un tipo u otro de receptor de anidamiento es el lugar donde ocurra la estimulación antigénica (67, 69).

1.2.2.6.- MADURACIÓN DE LOS LB Y PRODUCCIÓN DE MOLÉCULAS EFECTORAS

Una gran proporción de los linfocitos sensibilizados llegan al tejido linfoide difuso de la lámina propia del intestino, donde se transforman en células plasmáticas secretoras de inmunoglobulinas, principalmente de IgA.

Esta última fase de maduración consiste, básicamente, en la aparición de un aparato secretor bien desarrollado, la inducción de la expresión de la cadena J,

responsable de la polimerización de las IgA, y la eliminación del sistema de anclaje de las IgA a la membrana para permitir su secreción. Esta diferenciación terminal parece estar inducida por las IL 2, IL 5 e IL 6 (2, 34, 74).

Estructura de la IgA

La IgA es el anticuerpo más eficaz en la protección de las superficies mucosas, pero para ello ha de presentarse en su forma polimérica, la denominada IgA secretora (S-IgA), ya que es esta estructura polimérica la que le proporciona las características que la hacen particularmente adecuada para la actuación en el medio intestinal y las otras superficies mucosas (4, 34). Sus propiedades más importantes son:

- Estabilidad ante el bajo pH de los jugos gástricos.
- Resistencia a la digestión proteolítica por las enzimas tanto digestivas como de la flora bacteriana.
- Afinidad por las superficies mucosas.

La S-IgA consta de dos monómeros de IgA, unidos por una cadena denominada cadena J, y otra cadena peptídica adicional, el componente secretor. Tanto las inmunoglobulinas como las cadenas J son sintetizadas por las células plasmáticas, en cuyo citoplasma se produce también su ensamblaje. El componente secretor, en cambio, es sintetizado por células epiteliales de las superficies mucosas, como los enterocitos del intestino, y de las glándulas exocrinas siendo adquirido en el proceso de transporte hacia la superficie de la mucosa.

Transporte transepitelial de las IgA

Las IgA producidas por las células plasmáticas de la lámina propia han de alcanzar la superficie luminal de la mucosa, su lugar de actuación. La principal vía de transporte es a través de los enterocitos, que presentan en la porción basolateral de su membrana celular un receptor, el receptor de inmunoglobulinas poliméricas. Una porción de este receptor es lo que constituirá el componente secretor de la S-IgA. Las IgA poliméricas que presentan la cadena J se unen específicamente al receptor y, junto con él, son englobadas en una vesícula de pinocitosis y transportadas a la superficie

apical de la célula. Una vez allí, mediante la escisión del receptor, se libera a la luz intestinal el componente secretor unido al dímero de IgA (34, 74).

Otra vía de transporte de las IgA a la superficie intestinal es a través de los hepatocitos que permiten su liberación a la luz intestinal a través de la bilis. Sin embargo, este mecanismo sólo se ha demostrado eficaz en tres especies: la rata, el conejo y la gallina. En el resto de especies se trataría más bien de un sistema de eliminación de inmunocomplejos de IgA procedentes de la circulación sanguínea (138).

Funciones de la S-IgA

1.- Exclusión inmune

Se denomina exclusión inmune al fenómeno por el cual la S-IgA, debido a su estructura polimérica, puede formar enlaces cruzados con microorganismos y macromoléculas, facilitando su eliminación por los mecanismos inespecíficos de defensa como el peristaltismo intestinal. Además, al formar agregados antigénicos, la motilidad de los posibles agentes patógenos queda muy disminuida, haciéndose más difícil su acceso a los receptores celulares (34, 74, 87).

2.- Neutralización y opsonización

La S-IgA puede bloquear la unión de los microorganismos a las superficies epiteliales, bien de forma directa, al fijarse sobre los sistemas de adhesión de los microorganismos, o bien indirectamente, uniéndose a las células epiteliales de la mucosa en zonas próximas a los receptores celulares para virus o bacterias, dificultando así la adsorción y penetración (34, 87).

Aunque no se ha podido demostrar directamente que las IgA puedan opsonizar bacterias es posible que puedan intervenir en reacciones de citotoxicidad, ya que se han detectado receptores para su fracción cristalizable en neutrófilos, macrófagos y linfocitos (138). Este papel de las IgA en puntos donde predominan las IgG es mínimo, pero en las mucosas, donde la presencia de las IgG es menor, podría tener una especial importancia.

3.- Neutralización intracelular

Los microorganismos que son captados por células epiteliales en vesículas endosómicas pueden ser neutralizados intracelularmente mediante la unión de estas vesículas con endosomas que contengan IgA (34).

2.- PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

2.- PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

Las afecciones digestivas son una de las principales causas de pérdidas económicas en la producción porcina. Provocan mortalidad, principalmente en animales jóvenes y retrasos del crecimiento y aumentos del índice de conversión en cerdos de cebo. Durante los últimos años, en trabajos llevados a cabo en nuestro laboratorio, se ha puesto de manifiesto la importancia del VDEP como agente etiológico de muchos de estos procesos en explotaciones porcinas de todo el país. Se ha demostrado que, a diferencia del VGET, este virus está muy difundido, detectándose anticuerpos específicos frente a él en más de la mitad de las explotaciones porcinas de la Comunidad Autónoma de Castilla y León.

El VDEP infecta a cerdos de todas las edades, pero la enfermedad es especialmente grave en los animales más jóvenes. Al tratarse de un proceso vírico no existen tratamientos eficaces frente a él, por ello, resulta de especial interés el conseguir una protección eficaz frente a esta enfermedad, fundamentalmente entre los animales más jóvenes. Sin embargo, a pesar de su importancia, hasta el momento actual no existen estudios relacionados con la inmunidad frente al VDEP.

Nos planteamos la realización de este trabajo con el fin de conocer algunos de los aspectos elementales de la inmunidad producida por el VDEP, que pudieran servir como base para el futuro desarrollo de métodos inmunoprolácticos y de control de la enfermedad. Tratamos de que este estudio incluyera tanto la inmunidad humoral como la celular, haciendo especial referencia a la respuesta generada en el tracto gastrointestinal, ya que es precisamente esta respuesta inmune local la que está más directamente implicada en la protección frente a las infecciones entéricas de los animales monogástricos.

Por ello, como primer objetivo, nos propusimos la puesta a punto de técnicas para el estudio de la respuesta inmune inducida por el VDEP, incluyendo además de las técnicas serológicas, técnicas nuevas, más sensibles y específicas, que nos permitieran estudiar tanto la inmunidad humoral de mucosas como la inmunidad celular.

En segundo lugar tratamos de describir el desarrollo de la respuesta inmune inducida por la infección por el VDEP tal y como tendría lugar de forma natural. Con este fin realizamos una infección experimental en animales de corta edad que reprodujera del modo más similar posible las condiciones de campo.

También se valoró la posibilidad de utilizar como cepas vacunales las cepas del virus atenuadas mediante pases en cultivos celulares, para lo cual investigamos la respuesta inmune inducida por una de estas cepas, inoculando lechones convencionales con dos dosis diferentes de este virus, y la comparamos con la respuesta producida por la infección con el virus de campo.

Finalmente, para conocer la protección conferida por las respuestas inmunes inducidas por la inoculación con las diferentes cepas, sometimos a los animales inoculados a un desafío con el virus no atenuado.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.-CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR VERO

Para la replicación en cultivos celulares del VDEP se utilizó la línea Vero (ATCC, CCL81) de células fibroblásticas de riñón de mono verde africano, cedida por Laboratorios Sobrino S.A. (Olot, Gerona) e INGENASA (Madrid). El cultivo se realizó en frascos de plástico de 150 cm² (TPP) y botellas rotatorias de plástico de 800 cm² (Corning).

Para su crecimiento se empleó medio mínimo esencial (MEM) con sales de Earle y L-glutamina (Gibco), al que se añadieron 2,2 g/l de bicarbonato sódico, 10 mg/l de estreptomicina y 10.000 UI/l de penicilina (Penicilina-Estreptomicina, Gibco). El medio se adquirió deshidratado y se reconstituyó con agua desionizada (sistema milli-Q, Millipore). Tras añadir el bicarbonato, su pH se ajustó a 7,2 y se esterilizó por filtración utilizando filtros Sterivex-GV de 0,22 µm de diámetro de poro (Millipore). El medio se suplementó con un 2 % (v/v) de extracto de levadura (Difco) y un 5 % (v/v) de suero fetal bovino inactivado (Gibco). El extracto de levadura se preparó al 2 % en PBS sin calcio ni magnesio (PBS-CMF) y se esterilizó en autoclave.

Para los pases, las células en cultivo se lavaron tres veces con PBS-CMF y posteriormente se trataron durante 2 minutos con una solución de tripsina-EDTA con el fin de desprender el tapiz celular. A continuación, las células se resuspendieron en medio de crecimiento, con una proporción 1:4 (s/s), formándose de nuevo una monocapa confluyente a las 48-60 horas de incubación a 37°C. El número de células obtenido por cada frasco de cultivo de 150 cm² fue aproximadamente de $3,2 \times 10^7$.

Para el crecimiento de las células en placas de cultivo de 96 pocillos (TPP) se dispensaron 2×10^5 células por pocillo, incubándose durante 72 horas a 37°C en una atmósfera con un 5 % de CO₂.

3.2.- PRODUCCIÓN DEL VDEP

Para este trabajo se ha utilizado la cepa CV-777 del VDEP, tanto en su forma virulenta, no adaptada al crecimiento en cultivos celulares, como en la forma ya adaptada al crecimiento en células Vero y atenuada por un número alto de pases. Ambas fueron cedidas amablemente por el Dr. M. Pensaert (Gante, Bélgica) y el Dr. M. Ackermann (Zurich, Suiza).

3.2.1.- Producción del virus en cultivos celulares

La multiplicación en cultivos celulares del VDEP se realizó siguiendo el protocolo descrito por Hofmann y Wyler (61). Para la infección de células Vero se utilizó el mismo medio que para el crecimiento, pero sin añadir el suero fetal e incorporando 10 µg/ml de tripsina (Tripsina 1:250, Gibco).

Tras lavar el tapiz celular 2 veces con PBS-CMF, se añadió el inóculo vírico, utilizando una multiplicidad de infección de 0,1. Como inóculo se empleó el sobrenadante de cultivos celulares infectados que habían sido congelados y descongelados 3 veces y que contenían $10^{6,5}$ DICC₅₀/ml. Esta dosis se diluyó en medio de infección hasta un volumen total de 15 ml en los frascos de 150 cm² y 30 ml en las botellas de 800 cm² y se incubó durante 2 horas en agitación suave y a 4°C en los frascos y a 37°C en el caso de las botellas giratorias, con objeto de que se produjera la adsorción del virus. Finalizada esta fase, se añadió medio de infección fresco, manteniéndose a 37°C durante 14-20 horas, momento en el que el ECP alcanzaba el 90-100 %.

En cada infección se utilizaron como testigos un número igual de frascos de cultivo, sustituyendo el inóculo vírico por una cantidad igual de medio de infección sin virus.

3.2.1.1.-Titulación del virus producido en cultivo celular

La titulación del virus se realizó en placas de cultivo de 96 pocillos.

Determinación de la DICC₅₀

Para mayor precisión, las diluciones de la suspensión de virus a titular se prepararon en una placa aparte. En los pocillos de la columna 1 de esta placa se agregaron 200 µl de la suspensión del virus a titular, mientras que en los restantes se dispensaron 180 µl de medio de infección. Transfiriendo 20 µl de cada columna a la siguiente, se obtuvieron diluciones decimales del virus desde la 10⁰ hasta la 10⁻¹¹.

Cada pocillo de la placa de titulación, con una monocapa confluyente de células Vero, se lavó dos veces con PBS-CMF y, a continuación, se transfirieron a las diez primeras columnas de esta placa 100 µl/pocillo de la dilución correspondiente de virus, comenzando por la 10⁻⁹ hasta la 10⁰. Las columnas 11 y 12 se mantuvieron como testigos de células sin infectar y en ellas se dispensaron 100 µl de medio de infección.

La placa se incubó a 37°C en una estufa con 5 % de CO₂, controlándose diariamente la presencia de ECP. La lectura definitiva se realizó a los cuatro días de la infección, tras fijar las placas con paraformaldehído al 4 % (p/v) durante 1 hora a temperatura ambiente y teñirlas con una solución de cristal violeta al 0,5 % (p/v) durante 10 minutos.

El título de la suspensión de virus se calculó a partir del número de pocillos que presentaban ECP en cada dilución, utilizando el método descrito por Reed y Muench para el cálculo del número de la DICC₅₀/ml (109).

Determinación de las unidades formadoras de focos fluorescentes (UFFF)

Las microplacas se infectaron con diluciones dobles del inóculo de manera análoga a la descrita anteriormente. Tras 15 horas de incubación a 37°C en un 5 % de CO₂, se fijaban con acetona al 80 % (v/v) en PBS-CMF durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se realizaba una inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo monoclonal 213B dirigido frente a la proteína S del VDEP (cedido por el Dr. M. Ackermann, Zurich, Suiza) y se contaba el número de focos fluorescentes por pocillo.

El título del virus se expresaba como el número de focos fluorescentes por ml del inóculo (UFFF/ml).

3.2.2.- Producción del virus en lechones

Para la propagación de la cepa del VDEP no adaptada al crecimiento *in vitro* se utilizaron lechones de 4 días de edad. Esta cepa conservaba su virulencia inicial, produciendo en los animales los síntomas clínicos de la enfermedad.

Inóculo

Como inóculo para la infección se utilizó un macerado de intestino de lechones infectados experimentalmente en un estudio anterior. Este macerado fue clarificado por centrifugación a $4.000 \times g$ durante 15 minutos y posteriormente tratado con antibióticos 2 horas a temperatura ambiente (500 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina (Gibco), 20 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina y 20.000 UI/l de penicilina (Penicilina-Estreptomicina, Gibco)).

Animales

Los lechones procedían de la granja de la Facultad de Veterinaria de León, de cerdas que eran seronegativas al VDEP.

Un total de 6 lechones de 4 días de edad fueron trasladados al área de infecciones experimentales del Hospital Clínico de la Facultad de Veterinaria de León. Los lechones se alojaron en una sala aislada del exterior, en un parque elevado sobre el suelo y con cama de viruta de papel, manteniéndose una temperatura ambiente próxima a 31°C. La alimentación se realizó con un reemplazante lácteo comercial para lechones (Prolac Extra, Nutrifeed) al que tenían libre acceso y que se cambiaba cada ocho horas.

A la llegada y en los días sucesivos se les sometió a un tratamiento antibiótico preventivo, aplicándoles 100 mg de enrofloxacin (Baytril, Bayer) por vía intramuscular.

Infección

La inoculación de los animales tuvo lugar a las 24 horas de su entrada en el Hospital Clínico y se realizó administrándoles por vía oral, mediante una jeringuilla, un volumen de 3 ml del inóculo.

Los síntomas de la DEP aparecieron entre 18 horas y 4 días después de la inoculación, manifestando inicialmente anorexia y depresión y unas horas más tarde diarrea, con heces líquidas o pastosas, de color amarillento.

Los lechones fueron sacrificados en el momento del inicio de la diarrea mediante la inoculación intracardiaca de pentotal sódico (Eutalender, Normon). En la necropsia se observaron las paredes del intestino delgado adelgazadas y con un contenido líquido de color amarillo en su interior, recogiendo por separado el contenido intestinal, el intestino delgado y el intestino grueso.

El intestino delgado y el colon de cada animal fueron cortados en fragmentos pequeños y resuspendidos en PBS-CMF con una relación aproximada de 1:3 (v/v). Cada suspensión fue homogeneizada en un Stomacher (Setward Medical) y congelada y descongelada 4 veces. Los contenidos intestinales fueron diluidos 1:2 (v/v) en PBS-CMF y, al igual que los macerados de intestino, clarificados por centrifugación a $5.000 \times g$ durante 20 minutos a 4°C. Finalmente, los sobrenadantes fueron titulados mediante ELISA y aquellos con un mayor título fueron mezclados y guardados en alícuotas de volúmenes variables a -70°C.

3.3.- OBTENCIÓN DE ANTÍGENO VÍRICO

3.3.1.- Antígeno semipurificado (virus completo)

Se infectaron monocapas de células Vero, crecidas en botellas giratorias de 800 cm², con el VDEP a una multiplicidad de infección de 0,1, tal como se ha descrito anteriormente. Cuando el tapiz celular mostró un ECP del 90-100 %, las botellas fueron congeladas (-30°C) y descongeladas 3 veces, para provocar la rotura de las células y la liberación de los viriones.

La suspensión de células infectadas fue sometida a tres ciclos de sonicación de 10 segundos cada uno, separados entre sí un minuto, empleando un sonicador Branson B-12 a potencia media y manteniendo la suspensión en un baño de hielo. Los restos celulares fueron separados por centrifugación a $2.000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C.

El sobrenadante así obtenido, se concentró mediante ultracentrifugación a $100.000 \times g$ en un rotor Beckman SW-28 durante 2 horas a 4°C. Tras retirar el

sobrenadante, los sedimentos se resuspendieron añadiendo 0,5 ml de PBS-CMF estéril por tubo y dejándolos durante una noche a 4°C.

Esta suspensión se llevó hasta un volumen total de 20 ml con PBS-CMF y se semipurificó haciéndola pasar a través de un colchón de sacarosa al 20 %, para lo que se repitió la ultracentrifugación en las mismas condiciones. Los restos de proteínas celulares y de sacarosa fueron eliminados y el sedimento fue resuspendido en 1 ml de PBS-CMF durante toda la noche a 4 °C. Finalmente, se realizó un lavado con PBS-CMF seguido de ultracentrifugación (100.000 × g, 2 horas, 4°C) y se resuspendió definitivamente el sedimento en PBS-CMF, en un volumen 50 veces inferior al volumen inicial del sobrenadante procesado.

Con el fin de romper los agregados de partículas víricas que hubiesen podido formarse durante la ultracentrifugación, se aplicó otro tratamiento de sonicación en las mismas condiciones que el inicial.

El antígeno destinado a la estimulación *in vitro* de las células mononucleares se repartió en alícuotas de 2 ml y se almacenó hasta su uso congelado a -80°C. En cambio, el antígeno preparado para su utilización en ELISA se diluyó a partes iguales con glicerol y se le añadieron 3 µl/ml de una solución de PMSF (Sigma-Aldrich) al 1,7% (p/v) en DMSO (Merck), con el fin de eliminar la actividad proteásica. Este antígeno de ELISA se almacenó a -30°C.

Con el objetivo de obtener un antígeno testigo o antígeno negativo, se procesaron de igual manera el mismo número de botellas con células Vero no infectadas.

3.3.2.- Extracción de las proteínas S y N del VDEP

La extracción de estas dos proteínas del VDEP se realizó siguiendo el protocolo descrito por Knuchel y col. (72), basado en sus diferentes propiedades de solubilidad. El método de extracción es igual para ambas proteínas, variando únicamente las condiciones finales de pH, que permiten solubilizar una u otra, debido a sus diferentes puntos isoeléctricos.

La extracción se llevó a cabo a partir de monocapas de células Vero, crecidas en frascos de 150 cm² e infectadas con el VDEP, a una multiplicidad de infección de 0,15 y

cuando el cultivo celular infectado presentaba un ECP del 90-100 %, pero antes de que las células comenzaran a desprenderse. Se retiró el sobrenadante de los cultivos y el tapiz celular se lavó dos veces con PBS-CMF. Posteriormente, las células se levantaron con la ayuda de un policia de silicona y la suspensión celular se recogió en 20 ml de PBS-CMF, lavando el frasco, una vez más, para recuperar la mayor cantidad posible de células. El PBS se eliminó por centrifugación a $3.000 \times g$ y el sedimento de células así obtenido se sometió a un tratamiento hipotónico con el fin de romper sus membranas. Para ello, las células se resuspendieron en agua desionizada estéril, ajustando su concentración a $7,5 \times 10^7$ células por ml. Esta suspensión se mantuvo 30 minutos en un baño de hielo, agitando periódicamente.

La solubilización de las proteínas se consiguió con el detergente no iónico OBG (Sigma) a una concentración del 1,5 % (p/v). En este paso fue necesario ajustar el pH a las condiciones óptimas de solubilidad para cada proteína, añadiéndose para ello 25 μ l/ml de Tris pH 4,0 para la extracción de la proteína S y la misma cantidad de Tris pH 9,0 para la proteína N. Se mantuvo la suspensión con el detergente durante 30 minutos en baño de hielo, agitando periódicamente. Finalmente, para obtener la fracción soluble, se centrifugó durante 20 minutos a $10.000 \times g$ en una microcentrífuga, recogándose el sobrenadante.

Para su conservación se añadieron 3 μ l/ml de una solución de PMSF al 1,7 % (p/v) en DMSO y se almacenó alicuotado a -80°C hasta su utilización.

Al igual que en el caso anterior, un testigo de células sin infectar fue procesado de la misma manera, para obtener un testigo de antígeno o antígeno negativo.

3.4.- HIPERINMUNIZACIÓN DE ANIMALES

3.4.1.- Obtención de suero hiperinmune de conejo frente al VDEP

La finalidad de estos sueros fue su utilización en la etapa de bloqueo del ELISA empleado para la detección del virus (ELISA-DAS).

Animales

Los sueros hiperinmunes se produjeron en cuatro conejos de raza Neozelandesa que fueron alojados en jaulas individuales, en el animalario de la Facultad de Veterinaria de León, y alimentados con una dieta comercial.

Inóculo

Para la inmunización de los animales se empleó la cepa del virus CV-777 adaptada al cultivo celular. Los cultivos celulares infectados fueron congelados y descongelados 3 veces cuando presentaban un ECP del 90-100 %. A continuación fueron clarificados por centrifugación a $5.000 \times g$ durante 30 minutos a 4°C , para eliminar los restos celulares de mayor tamaño, y el sobrenadante fue concentrado por ultracentrifugación a $100.000 \times g$ durante 2 horas a 4°C . El pellet obtenido se resuspendió en 6 ml de PBS.

Con el fin de ajustar la dosis que iba a ser utilizada se determinó la concentración de proteínas del inóculo mediante el método Bradford (Bio-Rad).

Protocolo de inmunización y recogida de muestras

Cada conejo fue inoculado con una dosis de 1 mg de proteína en 1 ml de PBS. Este inóculo se mezcló con una cantidad igual de adyuvante completo de Freund (Sigma) y se aplicó por vía intramuscular profunda en dos puntos diferentes de la extremidad posterior. La inmunización se repitió otras dos veces, a intervalos de 21 días, pero utilizando adyuvante incompleto (Sigma).

Semanalmente se tomaron muestras de sangre de la vena de la oreja, para comprobar la evolución del título de anticuerpos frente al VDEP. Finalmente, a los 10 días de la tercera inoculación, los animales fueron sacrificados y sangrados. La sangre se mantuvo durante 1 hora a 37°C y toda la noche a 4°C . Tras una centrifugación a $1.500 \times g$ durante 15 minutos a 4°C se recogió el suero, que se guardó a -20°C , en alícuotas de pequeño volumen.

3.4.2.- Hiperinmunización de cerdos frente al VDEP

Una parte importante de este trabajo fue el desarrollo y la estandarización de las técnicas para el estudio de la inmunidad humoral y celular frente al VDEP (ELISPOT, ensayo *in vitro* y ensayo de proliferación linfocitaria). Para ello fue necesario contar con animales que hubiesen desarrollado una respuesta inmune muy fuerte, que nos sirviesen como fuente segura de linfocitos sensibilizados frente al virus. Con este fin se procedió a la hiperinmunización de cerdos frente al VDEP.

Animales

Se utilizaron 3 cerdos convencionales, de cuatro semanas de edad, procedentes de la Granja de la Universidad de León. Los animales fueron mantenidos en la zona de experimentación animal del Hospital Clínico de la Facultad de Veterinaria de León, en un habitáculo aislado, con ventilación forzada y una temperatura constante de 27° C, en un parque con suelo de rejilla. La alimentación se realizó con una dieta comercial adecuada a la edad de los animales en cada momento.

Inóculo

Se utilizó la cepa CV-777 no adaptada al cultivo celular producida en lechones, como se ha descrito anteriormente, tanto para la inoculación por vía oral como por vía intraperitoneal. La razón de emplear este inóculo también para la inmunización intraperitoneal, a pesar de su mayor contaminación, en lugar de utilizar virus procedente de cultivos celulares infectados, fue la necesidad de evitar la sensibilización de los animales frente a las proteínas celulares del cultivo. Esta sensibilización se hubiese producido con toda seguridad al ser administrados restos de células por una vía parenteral y hubiese interferido con la detección de una respuesta específica frente al virus.

Para la inoculación por vía oral se utilizó directamente el virus producido en lechones, sin tratamiento posterior.

Para la inoculación intraperitoneal, sin embargo, 25 ml del virus producido en lechones fueron ultracentrifugados a $100.000 \times g$ durante 2 horas a 4°C y resuspendidos en 4 ml de PBS-CMF con 500 µg/ml de gentamicina (Gibco), 20 µg/ml de estreptomycinina y 20.000 UI/l de penicilina (Penicilina-Estreptomycinina, Gibco).

Protocolo de inmunización y recogida de muestras

La primera inmunización se realizó por vía oral, para que el virus estimulase el sistema inmune por su ruta natural. A las 24 horas de la llegada de los lechones, cuando tenían 30 días de edad, se les inoculó con 2 ml del virus. Diariamente y hasta el día 10 postinoculación, se tomaron hisopos rectales para controlar la eliminación de virus en las heces y comprobar la aparición de diarrea.

A los 24 y 90 días de la primera inmunización, se reinocularon los lechones por vía intraperitoneal. Se eligió esta vía para las inoculaciones posteriores por considerarse muy adecuada para estimular el sistema inmune y obtener así una respuesta de gran intensidad (79). Para ello, se inyectó 1 ml del inóculo mezclado a partes iguales con adyuvante de Freund, completo en la segunda inoculación e incompleto en la tercera.

Semanalmente se tomaron muestras de sangre de los lechones para realizar un seguimiento de la evolución del título de anticuerpos en el suero. A partir del momento en que se alcanzó un título elevado y hasta el final del experimento, se realizaron extracciones periódicas de sangre, que era recogida asépticamente en un 25 % (v/v) de ácido cítrico y dextrosa. De esta sangre se purificaban las CMN que se utilizaron como testigos positivos para el ELISPOT, el ensayo *in vitro* y el ensayo de proliferación linfocitaria.

Finalmente, los lechones fueron sacrificados entre los días 110 y 115 tras la primera inoculación. El bazo y los ganglios linfáticos mesentéricos fueron recogidos asépticamente y utilizados para la extracción de CMN.

Paralelamente, se tomaron y procesaron de la misma manera muestras de sangre de animales convencionales, seronegativos al VDEP, para obtener CMN que sirvieran como testigos negativos en la estandarización de las pruebas.

3.5.- DISEÑO EXPERIMENTAL

Uno de los objetivos fundamentales de este trabajo fue el estudio del desarrollo y evolución de la respuesta inmune inducida por el VDEP. Para ello, se realizó una infección experimental con el virus de campo en animales convencionales mediante la cual tratamos de reproducir lo que ocurre en la infección natural.

También, se pretendió investigar la respuesta inducida por cepas atenuadas del virus y comprobar el grado de protección que conferirían ante el contacto posterior de los animales con la cepa de campo. En este caso, los lechones se inocularon con 2 dosis diferentes de la cepa CV-777 adaptada al cultivo celular. Para el estudio de protección, parte de los animales inoculados con esta cepa fueron sometidos a un desafío con la cepa virulenta. Como testigos positivos empleamos lechones que habían sufrido una primoinfección con la cepa de campo y como testigos negativos, animales de la misma edad que no habían tenido ningún contacto previo con el VDEP.

3.5.1.-Animales

Para esta parte del experimento se utilizaron, al igual que en los casos anteriores, lechones convencionales seronegativos al VDEP. Su origen, así como las condiciones de alojamiento y alimentación fueron las descritas para los utilizados en la estandarización de las pruebas.



Foto 1.- Lechones utilizados para las infecciones experimentales con distintos aislados del VDEP

Los lechones se trajeron a las instalaciones de experimentación animal cuando contaban con 11 ó 12 días de edad, salvo los del grupo utilizado como testigo negativo que llegaron cuando tenían 32 días de edad. Para evitar contaminaciones cruzadas entre los distintos grupos experimentales, además del aislamiento de los habitáculos, se evitó que coincidieran al mismo tiempo dos grupos con inóculos diferentes. En los escasos

períodos de tiempo en que esto no fue posible y se simultanearon dos grupos, éstos fueron atendidos por diferente personal y con distintos equipos de limpieza.

3.5.2.- Grupos experimentales

Grupo 1

El grupo 1 estuvo constituido por un total de 37 lechones que fueron inoculados a su llegada, a los 11 días de edad, con 3 ml del inóculo de la cepa CV-777 no adaptada a cultivo celular y replicada en lechón. Al igual que el resto de las inoculaciones y para todos los grupos, ésta se realizó por vía oral, ayudándonos de una jeringuilla convencional. A los 21 días de la primera inoculación, parte de los animales fueron separados del resto y desafiados con una dosis más alta (6 ml) del mismo inóculo del virus de campo. Estos serían los lechones que constituirían el grupo testigo positivo en el ensayo de protección.

Grupo 2

El grupo 2 estuvo formado por 20 lechones que fueron inoculados a su llegada con sobrenadante de cultivo celular infectado con la cepa CV-777 del VDEP. La dosis total administrada a cada uno fue de aproximadamente $2,55 \times 10^5$ UFFF. Al cabo de 21 días de la inoculación, 12 lechones del grupo fueron sometidos al desafío con la cepa de campo del VDEP (6 ml del virus producido en lechón).

Grupo 3

Los 15 lechones que formaban el grupo 3 fueron también inoculados con la cepa de virus adaptada al cultivo celular, pero con una dosis superior a la aplicada al grupo 2. Para este grupo se utilizó una dosis aproximada de $5,04 \times 10^6$ UFFF (alrededor de 20 veces mayor que la dosis aplicada al grupo 2). Al cabo de 24 días de la inoculación, 8 de estos animales fueron sometidos al desafío con la misma dosis del virus de campo que los grupos anteriores.

El grupo 4

El grupo 4 se utilizó como testigo negativo de protección. Los 13 lechones de este grupo fueron traídos a los 32-33 días de edad y sometidos directamente a lo que sería el desafío para los grupos tratados con el virus de campo o atenuado.

Grupo 5

Finalmente, se incluyó un 5º grupo, que sirvió como testigo negativo de las inoculaciones, constituido por 3 animales a los que no se sometió a ningún tipo de tratamiento.

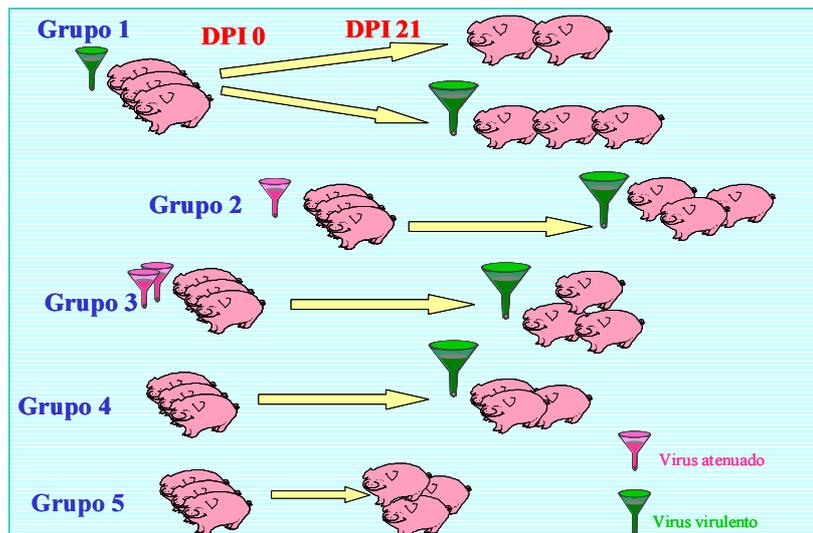


Figura 4.- Representación esquemática del tratamiento aplicado a cada uno de los grupos experimentales.

3.5.3.- Recogida de muestras

Diariamente, durante los 12 días siguientes a las inoculaciones y los 9 posteriores al desafío de cada grupo, se recogieron muestras de heces mediante hisopos rectales y se valoró la aparición y grado de diarrea según el siguiente criterio :

- 0: Normal, heces de consistencia y coloración normales.
- 1: Blandeó, con heces de consistencia pastosa.
- 2: Diarrea moderada, con heces de coloración verdosa y semilíquidas.
- 3: Diarrea severa, con heces de coloración amarillo-verdosa o mucus y de consistencia líquida.

En todos los casos, las muestras de heces fueron resuspendidas en 1 ml de MEM y congeladas a -20°C hasta el momento de su procesado por ELISA para determinar la eliminación de virus.

Dos veces por semana, comenzando a los 4 días de la primera inoculación, se tomaron muestras de sangre de cada animal, por punción de la vena cava anterior. La sangre recogida se mantenía una hora a 37°C y toda la noche a 4°C para facilitar la coagulación y desuerado. Seguidamente se centrifugaba a 1.600 × g durante 15 minutos y se recogía el suero, que se conservaba a -20°C.

3.5.4.- Sacrificios

Los animales de cada grupo fueron sacrificados en diferentes días postinoculación y/o postdesafío. El número de lechones utilizado para cada punto de sacrificio varió entre 2 y 5 animales. La secuencia de sacrificios y el número de animales sacrificados por día se distribuyó como se expone en la tabla 1.

	n*	Días postinoculación/ Días postdesafío									
		0/0	4/0	7/0	14/0	21/0	25/0	32/0	25/4	28/7	32/11
Grupo 1	37		4	5	4						
Grupo 2	20		2	2	2	2			4	4	4
Grupo 3	15		3			2	2		2	3	3
Grupo 4	13								4	4	5
Grupo 5	3	3									
* Número total de animales en el grupo											

Tabla 1.- Distribución temporal de los sacrificios realizados para cada grupo experimental

La eutanasia de los animales se practicó mediante la inyección intracardiaca de pentotal sódico (Eutalender, Normon). Inmediatamente se procedió a la extracción de sangre de las cavidades cardiacas, obteniéndose aproximadamente 100 ml que se diluyeron en un 25 % de anticoagulante (acido cítrico-dextrosa).

A continuación se realizó la necropsia de los animales, recogiendo de forma aséptica el bazo y los ganglios linfáticos mesentéricos, que eran depositados en tubos de plástico estériles, de 50 ml, que contenían una solución de lavado con antibióticos (RPMI 1640 (Gibco), HEPES 10 Mm (Sigma), Gentamicina 200 µg/ml (Gibco) y Ampicillina, 20 µg/ml(Gibco)) y mantenidos en hielo picado.

También se tomaron de cada animal 2 fragmentos del intestino delgado, de unos 40 cm de largo y distantes entre sí, que se correspondían con una porción del duodeno, comenzando a unos 5 cm del píloro y una porción del íleon inmediatamente anterior a la válvula ileocecal. Los fragmentos intestinales eran cortados longitudinalmente y limpiados frotando contra un paño de campo estéril para eliminar en lo posible todo el contenido intestinal. Estas secciones se depositaban igualmente en medio con antibióticos y se mantenían en un baño con hielo picado.

3.6.- EXTRACCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES

El aislamiento y purificación de las CMN se realizó siguiendo procedimientos previamente descritos por otros autores (31,142, 146,154). Se siguieron protocolos diferentes para el procesado de las muestras de intestino (duodeno e íleon), para el bazo y los ganglios linfáticos mesentéricos y para la sangre.

3.6.1.- Extracción de CMN del bazo y los ganglios linfáticos mesentéricos

Tras realizar 2 lavados con la solución de lavado con antibióticos, se procedió a la disgregación mecánica, para lo cual, una porción de aproximadamente 4 g de cada tejido se hacía pasar a través de colectores de tejidos de acero inoxidable (E-C Apparatus Corp., St Petersburg, FL) con un tamaño de poro de 0,19 mm. El macerado de los tejidos fue recogido en solución de lavado.

Tras una centrifugación a $500 \times g$ durante 20 minutos (Beckman), las CMN fueron purificadas mediante dos centrifugaciones consecutivas en gradiente de densidad. En primer lugar se centrifugaban las células en un gradiente continuo de Percoll al 30 % (Pharmacia) en solución de lavado, durante 30 minutos a $1200 \times g$ a $4^{\circ}C$. Seguidamente se sometían a una segunda centrifugación, a $1800 \times g$ durante 30 minutos a $4^{\circ}C$, en un gradiente discontinuo de Percoll. Para ello, las células recogidas en el paso anterior se resuspendían en una solución de Percoll isotónico al 43 % en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) y se disponían sobre un colchón de percoll isotónico al 70 % en HBSS.

Las CMN recogidas de la interfase se lavaban dos veces con solución de lavado y se resuspendían en RPMI enriquecido (E-RPMI) que contenía un 8 % de suero fetal

bovino inactivado, 2 mM L-Glutamina (Gibco), 1 mM Piruvato sódico (Gibco), 0,1 mM aminoácidos no esenciales (Gibco), 20 mM HEPES, ampicilina (10 µg/ml) y gentamicina (100 µg/ml).

3.6.2.- Extracción de CMN de la lámina propia del duodeno y el íleon

Para el aislamiento y purificación de las CMN del duodeno y el íleon se procesaban 20 g de cada uno de estos tejidos, previamente cortados en fragmentos pequeños. Tras lavar los tejidos 2 veces con solución de lavado y una vez con HBSS, se realizó un tratamiento químico para desprender las células epiteliales de la mucosa, así como los linfocitos intraepiteliales. Para ello, los segmentos de intestino se suspendían en HBSS con 0,29 mg/ml de ditioneitol (Sigma) y 5 mM EDTA (Sigma) y se incubaban durante dos periodos de 30 minutos a 37°C en agitación suave, renovando la solución entre las incubaciones.

A continuación se lavaban de nuevo los tejidos con la solución de lavado y se sometían a una segunda digestión con una solución de RPMI que contenía 0,29 mg/ml de ditioneitol, 8 % de suero fetal bovino inactivado, 5 mM EDTA y 400 unidades por ml de colagenasa tipo II (Sigma). La digestión se realizó en otros dos periodos de 30 minutos, a 37°C y en agitación suave. Los sobrenadantes digeridos se recogían y se mantenían en hielo mientras que el resto de los tejidos eran parcialmente homogeneizados mediante los colectores de tejidos descritos anteriormente.

Las suspensiones celulares obtenidas y los sobrenadantes digeridos se mezclaban y resuspendían en una solución de Percoll al 30 %, siguiéndose a partir de este paso el protocolo de purificación descrito para el bazo y los ganglios linfáticos mesentéricos.

3.6.3.- Extracción de CMN de la sangre

La sangre se recogía de forma aséptica en una solución al 30 % de ácido cítrico (Merk) y dextrosa (Merk). Los linfocitos de la sangre periférica se obtenían mediante una centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (Pharmacia) a 500 × g y 18°C durante 30 minutos. Las células recogidas de la interfase fueron lavadas 2 veces con HBSS y finalmente resuspendidas en E-RPMI.

En todos los casos, la viabilidad de las células extraídas se comprobó mediante la prueba de exclusión del tripán azul, ajustándose su concentración a la óptima para cada prueba.

3.7.- ANTICUERPOS MONOCLONALES ESPECÍFICOS DE CLASE DE INMUNOGLOBULINAS PORCINAS

Se emplearon los siguientes AcM específicos de clase de inmunoglobulinas (99):

- 3H7, que reacciona con las cadenas gamma de las inmunoglobulinas.
- 6D11, dirigido frente a las cadenas alfa.

Se obtuvieron en forma de líquido ascítico y fueron amablemente cedidos por la Dra. Linda J. Saif (The Ohio State University, EE.UU.).

3.7.1.- Purificación

Se realizó mediante cromatografía de afinidad sobre una resina de Avid AL (BioProbe International Inc). La resina, una vez empaquetada en la columna, se equilibró con 10 ml de TBS $5\times$ y a continuación se hizo pasar el líquido ascítico, diluido 1:5 en TBS. Posteriormente se lavó con 20 ml de TBS con un 5 % de Tween 20, seguidos de 10 ml de TBS. Para la elución de las inmunoglobulinas adsorbidas se utilizó una solución 0,1 M de ácido acético, que fue aplicada en fracciones sucesivas de 500 μ l, recogiendo el eluido en tubos de ensayo que contenían 100 μ l de tampón de neutralización (3 % Tris p/v). Simultáneamente se iba determinando la presencia de proteínas en las diferentes fracciones, añadiendo 2,5 μ l de la muestra a una mezcla de 500 μ l de agua desionizada y 500 μ l de Azul Coomassie G250. Se utilizaron sólo las 3 fracciones en las que el contenido proteico fue más alto.

3.7.2.- Marcado con biotina

Los AcM purificados fueron dializados contra una solución 0,1 M de HNaCO_3 durante una noche a 4°C. Seguidamente se añadieron 120 μ l/ml de una solución de biotina (Sigma) en DMSO (Sigma) que había sido preparada a la misma concentración que la determinada para el anticuerpo. Tras mezclarlo se incubó 4 horas a temperatura ambiente para que se produjera la unión de la biotina a los anticuerpos.

Finalmente, los AcM biotinados se dializaron frente a TBS durante una noche a 4°C y se almacenaron diluídos 1:2 con glicerol a 4°C.

3.8.- ELISPOT

3.8.1.- Antígeno

Se probaron 2 tipos de placas con antígeno para la realización del ELISPOT, por un lado placas de microtitulación de 96 pocillos en las que se había infectado con el VDEP una monocapa de células Vero y por otro, placas en las que se había inmunocapturado el virus semipurificado.

Células infectadas y fijadas

Se infectaron con el VDEP monocapas de células Vero cultivadas sobre placas de microtitulación de 96 pocillos y se mantuvieron en incubación a 37°C con un 5 % de CO₂ hasta que presentaron un ECP del 90-100 %. En ese momento, las placas fueron fijadas con acetona al 80 % en PBS-CMF durante 20 minutos a temperatura ambiente y se mantuvieron congeladas a -20°C hasta el momento de utilizarlas, en que se descongelaban y rehidrataban con PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Se probaron diferentes diluciones del inóculo vírico con el fin de encontrar la multiplicidad de infección óptima, que nos permitiese alcanzar el ECP deseado entre 12 y 15 horas después de la infección sin que se produjese ninguna solución de continuidad en la monocapa.

En cada lote de placas, la expresión antigénica de la monocapa de células infectadas se comprobaba mediante una inmunofluorescencia, utilizando el AcM 113 B dirigido frente a la proteína S del VDEP. Sólo las placas en las que se observase más de un 80 % de superficie fluorescente eran utilizadas para el desarrollo de la prueba.

Se produjeron también varios lotes de placas sin infectar o placas testigo, en las que el inóculo vírico era sustituido por medio de infección sin virus, pero que fueron sometidas al mismo tratamiento. Estas placas se utilizaron paralelamente a las placas infectadas, para comprobar la especificidad de la prueba.

Antígeno inmunocapturado

Para la inmunocaptura del virus se utilizaron placas de ELISA de 96 pocillos (Costar) tapizadas con el anticuerpo monoclonal CVI-PEDV 66.31 (Lelystadt, Holanda), dirigido frente a la proteína S del virus. El tapizado de la placa se realizó con 250 ng/pocillo del AcM, diluido en tampón carbonato-bicarbonato (pH 9,6), incubándose a 4°C durante 16 horas.

Tras lavar las placas 3 veces con PBS-0,05 % Tween 20 (PBS-Tween), los antígenos víricos positivo y negativo semipurificados, obtenidos como se ha descrito anteriormente y diluidos en PBS-Tween, se incubaban en filas alternativas de pocillos. Las condiciones de trabajo fueron determinadas probando diferentes periodos y temperaturas de incubación, así como concentraciones de los antígenos.

Para este tipo de placa el control de especificidad de la prueba se realizaba a partir de los pocillos incubados con el antígeno control negativo.

3.8.2.- ELISPOT

Este ensayo fue modificado a partir de métodos previamente publicados (31, 37, 126, 143, 154) y adaptado por nosotros para la detección de células secretoras (CS) de anticuerpos frente al VDEP.

Las placas de células infectadas se descongelaban y rehidrataban con PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente, mientras que las placas con el antígeno inmunocapturado se lavaban 3 veces con PBS-Tween. Los volúmenes utilizados en todos los pasos fueron de 100 µl por pocillo y después de cada incubación se lavaban las placas 6 veces con PBS-Tween. Tanto las diluciones de los anticuerpos conjugados como de la estreptavidina-peroxidasa, se realizaron igualmente en PBS-Tween.

En pocillos consecutivos de la placa se añadían por duplicado 5×10^3 , 5×10^4 y 5×10^5 CMN de cada tejido. A continuación, las placas se centrifugaron durante 5 minutos a baja velocidad ($50 \times g$) y se incubaron entre 12 y 15 horas a 37°C en una atmósfera con un 5 % de CO₂.

La detección de los anticuerpos producidos por los linfocitos sensibilizados frente al VDEP y presentes en los diferentes tejidos se realizó empleando los AcM

biotinados específicos de clase de inmunoglobulina porcina, 3H7 para las IgG (1:5.000) y 6D11 para las IgA (1:20.000), así como un suero hiperinmune producido en cabra y también marcado con biotina (KPL Inc.) para las IgM (1:20.000).

Tras 2 horas a temperatura ambiente, se añadió a cada pocillo la solución de estreptavidina conjugada con peroxidasa (1:20.000) (KPL Inc.) y se incubó 1 hora a temperatura ambiente.

Finalmente, los *spots* o focos de producción de anticuerpos se detectaron empleando TMB, para lo cual se dispensaron 50 µl por pocillo de un sistema comercial de tinción de membranas (KPL Inc.).

La lectura de la reacción se realizaba contando los *spots* desarrollados en las placas mediante un microscopio óptico invertido. Se consideraban óptimos para el recuento los pocillos en los que el número de *spots* fuese inferior a 40.

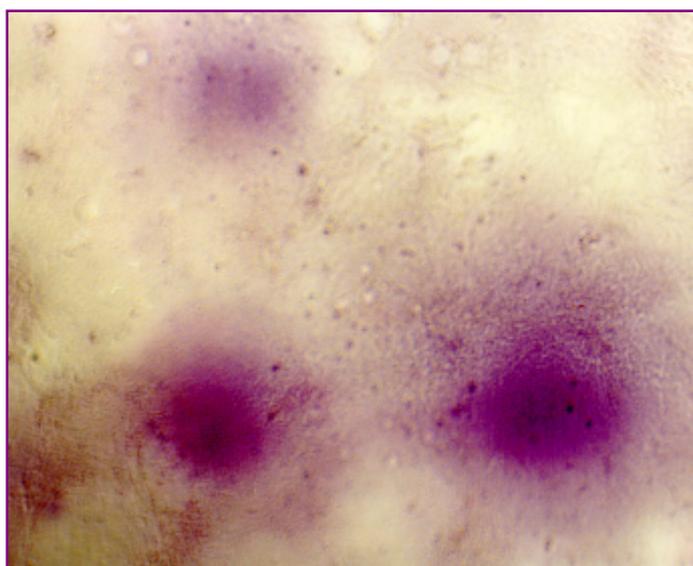


Foto 2.- Imagen de *spots* específicos frente al VDEP obtenidos mediante ELISPOT realizado sobre placas con células infectadas y fijadas (100 ×).

Para determinar las condiciones óptimas de realización de la prueba se utilizaron como testigo positivo las CMN procedentes de los animales hiperinmunizados descritos anteriormente. Las CMN que sirvieron como testigo negativo procedían de animales convencionales seronegativos frente al VDEP que no habían sido sometidos a ningún tratamiento.

Las condiciones de trabajo fueron optimizadas par conseguir la detección del mayor número posible de *spots* específicos frente al VDEP.

3.9.- ENSAYO *IN VITRO*

Se desarrolló una técnica de ensayo *in vitro* basándonos en protocolos descritos por otros autores (142, 143) a los que se incorporaron varias modificaciones. El objetivo de este ensayo fue realizar una medida indirecta de la potencial respuesta inmune de memoria de los animales sacrificados. Para ello se realizaba la estimulación *in vitro* de los linfocitos sensibilizados en el animal vivo, incubándolos con el antígeno vírico y posteriormente, se determinaba el número de CS de anticuerpos producidas frente al virus.

Los cultivos de CMN purificadas a partir de la lámina propia del intestino no pudieron mantenerse viables durante el tiempo requerido por esta prueba debido a la dificultad para controlar las contaminaciones microbianas por la flora presente en el intestino del animal. Por ello, la respuesta de memoria se investigó en la sangre y el bazo como representantes del sistema inmune sistémico y en los ganglios linfáticos mesentéricos como representantes del sistema de mucosas.

Las CMN purificadas a partir del bazo, los ganglios linfáticos mesentéricos y la sangre se diluían en E-RPMI con una concentración 50 μ M de 2-mercaptoetanol (Sigma) (medio de mantenimiento), hasta una concentración de 5×10^6 células por ml. En 2 pocillos consecutivos de placas de cultivo celular de 12 pocillos se dispensaban 750 μ l de cada suspensión celular y se añadían 750 μ l por pocillo del antígeno vírico semipurificado (obtenido como se ha descrito anteriormente) igualmente diluido en medio de mantenimiento.

Las placas se mantenían en un incubador a 37° C con un 5 % de CO₂ y a partir del segundo día, se añadían diariamente 500 μ l por pocillo de medio de mantenimiento fresco.

El quinto día de incubación las células eran recogidas por pipeteo, lavadas 2 veces con solución de lavado y resuspendidas en medio de mantenimiento.

Posteriormente, se realizaban diluciones desde 5×10^3 hasta 5×10^5 células por ml de las células estimuladas, que eran probadas mediante el ELISPOT.

La magnitud de la respuesta secundaria se cuantificaba como el número de CS de anticuerpos producidas en los cultivos estimulados *in vitro* con el antígeno vírico.

La cantidad de antígeno añadido por pocillo se determinó mediante ensayos de dosis-respuesta, seleccionando aquella con la que se obtenía mayor número de *spots*.

3.10.- ENSAYO DE LINFOPROLIFERACIÓN

Esta prueba se diseñó tomando como modelo las descritas previamente por otros autores (16, 17, 32, 146). En ella, se mide la proliferación de los linfocitos sensibilizados por el VDEP tras una nueva estimulación con el virus, tomando como indicador la incorporación de timidina marcada con tritio en el ADN de las células en división.

Al igual que en el ensayo anterior, debido a las contaminaciones de las suspensiones celulares del intestino, sólo se pudieron realizar las pruebas de proliferación linfocitaria con las células aisladas del bazo, los ganglios linfáticos mesentéricos y la sangre.

Las CMN purificadas se diluían en el medio de mantenimiento descrito en el ensayo *in vitro*, a una concentración final de 5×10^6 células por ml. En placas de cultivo celular de 96 pocillos se dispensaban 100 μ l por pocillo de cada una de las suspensiones celulares, que era incubada por triplicado con el antígeno vírico semipurificado y con el antígeno negativo (de células sin infectar) o medio de mantenimiento, para determinar la proliferación celular inespecífica.

Las cantidades de antígeno necesarias fueron determinadas para cada lote mediante curvas de dosis respuesta y fueron llevadas a un volumen final de 100 μ l por pocillo en medio de mantenimiento.

Como testigo positivo de la prueba, se comprobaba la proliferación celular incubando cada muestra, también por triplicado, con 1 μ l por pocillo de fitohemaglutinina (Gibco), un mitógeno específico, que fue reconstituido siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las células se incubaron durante 72 horas a 37°C en una atmósfera con un 5 % de CO₂. Tras este tiempo, se añadió a cada pocillo 1 µCi de timidina tritiada con una actividad específica de 5 Ci/mmol (Amersham Pharmacia Biotech) y se incubaron las placas 18 horas más en las mismas condiciones.

Finalmente las células fueron recogidas en filtros de fibra de vidrio (FilterMAT, SKATRON) mediante un recolector de células (Semiautomatic Cell Harvester, SKATRON) y la incorporación de timidina radiactiva se determinó mediante centelleo líquido (Beckman LS 6000 TA).

Para cada muestra se obtuvo la media de cuentas por minuto (cpm) de los 3 pocillos en los que había sido incubada con el antígeno vírico y, posteriormente, se calculó su índice de estimulación (IE) como el cociente entre ese número medio de cpm y la media de cpm obtenidas al incubar la muestra con el antígeno negativo.

$$IE = \frac{\text{cpm con el antígeno vírico}}{\text{cpm con el antígeno testigo negativo}}$$

3.11.- TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DIRECTO

3.11.1.- Inmunofluorescencia directa (IFD)

La inmunofluorescencia sobre cultivos celulares fue utilizada para comprobar la calidad de las placas de células infectadas producidas para la realización del ELISPOT, así como para la titulación de inóculos víricos.

Las placas habían sido previamente fijadas con acetona al 80 % en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente y mantenidas en congelación a -20°C. Aproximadamente 10 minutos antes de comenzar la inmunofluorescencia, estas placas se descongelaron e hidrataron mediante incubación con PBS a temperatura ambiente.

Para esta técnica se utilizó el AcM 213 B dirigido frente a la proteína S del VDEP. Este monoclonal estaba en forma de sobrenadante de hibridomas mantenidos en cultivo celular. Cada pocillo fue incubado con 40 µl de este sobrenadante durante 30 minutos a 37°.

Tras la incubación las placas se lavaron 4 veces con PBS y se procedió a la tinción fluorescente, empleando el conjugado anti-IgG específico de ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína (Sigma) a la dilución recomendada por el fabricante en PBS. En este paso se utilizó como coloración de contraste Azul de Evans (BioMerieux) a una dilución 1:64.

Se realizó una nueva incubación de 30 minutos a 37°C y tras lavar 4 veces, se procedió a la lectura, utilizando un microscopio invertido Diaphot-TMD con un equipo de epifluorescencia TMD-EF y un filtro B1-A (Nikon).

3.11.2.- ELISA doble *sandwich* de anticuerpos (ELISA-DAS)

Para la detección del virus en las muestras de heces y contenidos intestinales de los animales inoculados se utilizó el ELISA doble *sandwich* de anticuerpos (ELISA-DAS), descrito en 1995 por Carvajal *et al.* (24).

El tapizado de las placas (Costar) se realizó con el anticuerpo monoclonal CVI-66.31 (Lelystad) dirigido frente a la proteína S del VDEP, a una concentración de 250 ng/pocillo. Este anticuerpo se diluyó en tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6 y se incubó durante 16 horas a 4°C.

Tras eliminar los anticuerpos no fijados, cada placa se lavó 3 veces con una solución de Tween 80 al 0,5 % en agua destilada.

Seguidamente se incubaron las muestras. Para aumentar la especificidad de la prueba, en esta etapa se realizó un bloqueo de las suspensiones de heces, incubando cada una con un suero positivo y uno negativo frente al VDEP. Se dispensaron 50 µl por pocillo de las suspensiones de heces, tal como se habían almacenado. Para cada muestra se utilizaron 2 pocillos contiguos, añadiendo después en las columnas pares 50 µl por pocillo de una dilución 1:40 del suero hiperinmune producido en conejo y en las impares 50 µl por pocillo de la misma dilución de un suero de lechón obtenido antes de la toma de calostro.

Las placas fueron sometidas a agitación suave durante 5 minutos e incubadas a 37°C durante 90 minutos, tras lo cual se lavaron 4 veces.

El siguiente paso fue la incubación con el anticuerpo monoclonal CVI-66.49 (Lelystad) marcado con peroxidasa. Se dispensaron 100 µl por pocillo de una dilución 1 :5.000 del anticuerpo monoclonal en PBS 0,5 M NaCl con un 0,5 % de Tween 80 y un 10 % de suero fetal bovino y las placas fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente.

Tras un nuevo ciclo de 4 lavados se realizó el revelado de las placas, utilizando como sustrato cromógeno una solución 1 mM de 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina 6-ácido) sulfónico (ABTS) en ácido cítrico 0,1 M (pH 4,2) más un 0,1 % de H₂O₂ al 30 %. Se dispensaron 100 µl/pocillo de esta solución y se mantuvieron las placas a temperatura ambiente media hora, tras lo cual se frenó la reacción con 50 µl/pocillo de SDS (Merck) al 5 %. La lectura se realizó en un lector Titertek Multiskan , a una longitud de onda de 405 nm.

Una muestra fue considerada positiva cuando el valor de la densidad óptica (DO) en el pocillo incubado con suero positivo era como mínimo el 50 % de la DO del pocillo incubado con suero negativo.

3.12.- TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO INDIRECTO

El estudio de la evolución de los anticuerpos séricos de los animales utilizados en este trabajo se llevó a cabo utilizando diferentes técnicas ELISA.

Para la detección de los anticuerpos totales frente al VDEP se utilizó el ELISA de bloqueo descrito por Carvajal *et al.* (1995) (24). Los sueros positivos detectados mediante esta técnica fueron después procesados por las otras tres técnicas: el ELISA de inmunocaptura (MAC-ELISA), el N-ELISA y el S-ELISA, que permitían la detección de los diferentes tipos de inmunoglobulina porcina (IgA e IgG) frente al virus completo y frente a la proteína N y la proteína S del virus respectivamente. Estas tres técnicas fueron desarrolladas y estandarizadas por nosotros en un estudio previo (38, 39).

3.12.1.- ELISA de bloqueo

Esta técnica, nos permitió la determinación indirecta de los anticuerpos totales presentes en la muestra, ya que se basa en la detección del antígeno vírico no bloqueado tras ser incubado en la placa en presencia del suero problema.

El tapizado de las placas se realizó con el mismo anticuerpo monoclonal y en las mismas condiciones que el DAS-ELISA (3.11.2).

En la siguiente fase se incubaron los sueros problema, realizando también un bloqueo de los mismos con antígeno vírico producido en lechón. Los sueros se utilizaron a una concentración de 1:2,5 y el antígeno a una concentración de 1:20, siendo el volumen final empleado por pocillo de 100 µl. Para realizar las diluciones tanto de los sueros como del antígeno se empleó una solución de PBS-0,5 M de ClNa con un 5 % de Tween 80.

En cada placa se pusieron un testigo positivo y un testigo negativo, reservándose además 6 pocillos que fueron utilizados como blancos, en los que se dispuso PBS en lugar de suero. Las placas fueron incubadas 2 horas a 37°C, tras haberse sometido a agitación suave durante 5 minutos.

Tras lavar 4 veces con la solución de H₂O destilada con un 0,5 % de Tween 80, la detección del antígeno no bloqueado por los sueros problema se realizó utilizando el mismo anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa y en las mismas condiciones que en el DAS-ELISA. El revelado y la lectura se realizó también del modo descrito anteriormente.

Para cada suero se calculó el porcentaje de bloqueo utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de bloqueo} = \frac{\text{DO muestra problema}}{\text{DO media del testigo negativo}} \times 100$$

Fueron considerados positivos los sueros que presentasen un bloqueo mayor o igual al 50 %.

3.12.2.- ELISA de inmunocaptura (MAC-ELISA)

Esta técnica se basa en la captura de un antígeno vírico semipurificado mediante un AcM específico que lo fija selectivamente a la fase sólida. Tras incubar las muestras de suero con el antígeno así capturado, es posible detectar las diferentes clases de inmunoglobulinas dirigidas frente a cualquier epítipo del VDEP, utilizando los AcM específicos de clase descritos anteriormente.

Como fase sólida se emplearon, al igual que en los ELISA anteriormente descritos, placas de poliestireno de 96 pocillos de alta capacidad de fijación de proteínas (Costar). En todos los pasos, se utilizaron volúmenes de 100 μ l/pocillo, lavándose 3 veces las placas con una solución de agua destilada con un 0,5 % de Tween 20 después de cada una de las incubaciones.

Las condiciones del tapizado de las placas fueron las mismas que las del DAS-ELISA y el ELISA de bloqueo, empleándose el AcM CVI-66.31 a una concentración de 250 ng/100 μ l.

A continuación se añadió el antígeno positivo o negativo en filas alternas, tras lo cual las placas se sellaron y se incubaron 4 horas a 37°C. El antígeno se usó diluido 1:25 en PBS-Tween con un 10 % de suero fetal bovino.

Posteriormente se añadieron diluciones dobles seriadas de las muestras a partir de 1:20, realizadas en PBS-Tween 0,5M ClNa (pH 7,8) con un 10 % de suero fetal bovino. Cada dilución se incubó en dos pocillos con antígeno positivo y negativo respectivamente. Las placas se sellaron e incubaron durante 2 horas en un baño de agua a 37°C.

A continuación se dispensó el AcM biotinado específico de clase de inmunoglobulina porcina. La dilución de estos AcM se hizo en la solución antes descrita para las muestras sin el suero fetal bovino, a las concentraciones de 1:5.000 para el AcM 3H7 y 1:20.000 para el 6D11.

Tras un nuevo periodo de incubación de 1 hora a 37°C, en cada pocillo se añadió la solución de estreptavidina conjugada con peroxidasa (KPL) en PBS-Tween a su dilución óptima, dejando a continuación las placas media hora a temperatura ambiente.

Finalmente se procedió al revelado, empleando para ello el mismo sustrato cromógeno y en las condiciones descritas en los anteriores ELISA.

Para cada muestra se determinó el valor ELISA como la diferencia entre las absorbancias obtenidas en los pocillos incubados con antígeno positivo y negativo.

El valor umbral se calculó para cada isotipo como la media más tres veces la desviación estándar de los valores ELISA obtenidos con una población de 45 muestras de suero sin anticuerpos frente al VDEP.

3.12.3.- N-ELISA Y S-ELISA

El protocolo de estas dos pruebas tiene como base el descrito por Knuchel *et al.* (72), que fue modificado por nosotros con el fin de poder detectar por separado las diferentes clases de inmunoglobulinas dirigidas frente a las proteínas N y S del VDEP.

Como fase sólida para esta prueba se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos (Maxisorp, NUNC) de elevada capacidad de fijación de proteínas. Al igual que en el caso anterior, el volumen dispensado en cada pocillo fue siempre de 100 µl y, tras cada paso, las placas se lavaron 3 veces con PBS-Tween.

Los pocillos fueron tapizados con el antígeno soluble, proteína S y proteína N, positivo o negativo en filas alternas, diluido 1:500 en tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6 y las placas selladas fueron incubadas toda la noche a 4°C.

Los lugares de unión de la superficie de las placas que quedaban libres tras el tapizado fueron bloqueados durante una hora a 37°C con una solución de albúmina sérica bovina (Sigma) al 2 % (p/v) en tampón carbonato-bicarbonato. Seguidamente, las placas se lavaron y se añadieron diluciones dobles seriadas de las muestras de suero realizadas en PBS-Tween 0,5 M ClNa con un 10 % de suero fetal bovino. Cada dilución se incubó en 2 pocillos alternos, tapizados con antígeno positivo o negativo, durante 2 horas a 37°C.

Los pasos restantes, de incubación con el AcM biotinado y el conjugado, así como el revelado, frenado y lectura se llevaron a cabo del mismo modo descrito anteriormente para el MAC-ELISA.

También el cálculo de los valores ELISA para cada muestra y del valor umbral de cada ELISA y para cada isotipo se realizaron como se ha descrito para el MAC-ELISA.

3.13.- CODIFICACIÓN DE LOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS Y ANTÍGENO

Con el fin de poder realizar el análisis estadístico de los resultados, los títulos de anticuerpos frente al VDEP fueron codificados. Se asignó el valor 1 a la dilución de trabajo inicial utilizada por cada técnica (generalmente 1 :20 y 1:5 para el ELISA de bloqueo) y los valores de 2, 3, 4... a las sucesivas diluciones dobles seriadas realizadas a partir de ella.

Este mismo sistema de codificación fue utilizado también para calcular el valor del título medio geométrico (TMG) del antígeno eliminado en las heces de los animales, tanto tras la inoculación como tras el desafío.

3.14.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para investigar las diferencias en la eliminación de virus por los distintos grupos de animales, se utilizó el análisis de varianza de un factor, seguido de la prueba *t* de Student para datos apareados para identificar la naturaleza de las diferencias encontradas.

Las diferencias en el número de CS de anticuerpos tanto entre los distintos grupos como entre diferentes días dentro de cada grupo fueron investigadas mediante la prueba de Kruskal-Wallis de análisis de varianza no paramétrico, seguido de comparaciones múltiples mediante el test de Wilcoxon.

Para el análisis de los resultados del ensayo de linfoproliferación se utilizó el índice de estimulación. Tanto para realizar las comparaciones entre grupos, como para establecer las diferencias dentro del mismo grupo, se llevó a cabo un análisis de varianza de un factor, realizando posteriormente la prueba *t* de Student para datos independientes para esclarecer la naturaleza de las diferencias detectadas mediante la prueba anterior. Estas mismas pruebas y en las mismas condiciones se utilizaron para el análisis de los resultados obtenidos con las distintas técnicas de ELISA de isotipos.

Finalmente, para establecer las distintas correlaciones se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman (ρ) en todos los casos, excepto en el caso de la correlación entre los índices de estimulación (del ensayo de proliferación linfocitaria) y la

protección frente al desafío, donde se utilizó el coeficiente de correlación lineal de Pearson (r).

Todas las pruebas del análisis estadístico fueron realizadas mediante el programa SYSTAT para windows, versión 5.03 (SYSTAT,Inc.) y la hoja de cálculo EXCEL, versión 7.0 (Microsoft, Corp.).

APÉNDICE 1: MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES UTILIZADAS

A.- Cultivos celulares.

Medio de crecimiento

MEM con sales de Earle y L-glutamina	87 ml
Extracto de levadura al 2%.....	2 ml
Penicilina	10.000 UI
Estreptomicina	1 mg
Suero fetal bovino inactivado	5 ml
NaCO ₃ H.....	0,22 g

PBS-CMF (10×)

NaCl.....	80,0 g
KCl.....	3,0 g
Na ₂ PO ₄ H × H ₂ O.....	1,8 g
KPO ₄ H ₂	0,2 g
Agua desionizada.....	hasta un litro

Solución de tripsina-EDTA

Solución A

Tripsina 1:250.....	0,5 g
PBS-CMF (1×)	hasta un litro

Solución B

EDTA-Na ₂	0,4 g
PBS-CMF (1×)	hasta un litro

Mezclar a partes iguales ambas soluciones y esterilizar por filtración.

Medio de infección

Medio de crecimiento	100 ml
Tripsina (1mg/ml).....	100 µl

B.- Soluciones para la extracción de las CMN

Anticoagulante

Dextrosa.....	24,5 g
Citrato sódico dihidrato	22 g
Ácido cítrico	6,67 g
Agua desionizada.....	hasta 1 litro
Ajustar el pH a 7,2	

Solución de lavado

RPMI 1640	1000 ml
Gentamicina.....	200 mg
Ampicilina	20 mg
HEPES (1M).....	10 ml

Soluciones para la digestión de los tejidos intestinales

Solución A

HBSS	100 ml
Gentamicina.....	20 mg
Ampicilina	2mg
HEPES 1M	2 ml
EDTA 0,5M.....	1 ml
Ditiotreitol	29 mg
NaHCO ₃ al 4%.....	4 ml

Solución B

RPMI 1640	100 ml
Suero fetal bovino inactivado	8 ml
Gentamicina.....	20 mg
Ampicilina	2mg
HEPES 1M	2 ml
EDTA 0,5M.....	1 ml
Ditiotreitol	29 mg
Colagenasa (tipo II)	40.000 unidades

Soluciones de percoll

Percoll isotónico

HBSS 10×	10 ml
Percoll	90 ml

Percoll al 43%

Percoll isotónico	43 ml
HBSS	57 ml
Ajustar hasta que su índice de refracción a 4°C sea 1,3425	

Percoll al 70%

Percoll isotónico	70 ml
HBSS	30 ml
Ajustar hasta que su índice de refracción a 4°C sea 1,3470	

E-RPMI

RPMI 1640	87 ml
HEPES 1M	2 ml
Gentamicina	10 mg
Ampicilina	1 mg
Suero fetal bovino inactivado	8 ml
L- Glutamina 200mM	1 ml
Aminoácidos no esenciales 10mM	1 ml
Piruvato sódico 100mM	1 ml

Solución de mantenimiento

E-RPMI	100 ml
2-Mercaptoetanol	0,35 µl

C.- Soluciones para la purificación y marcado de los anticuerpos monoclonales

TBS 5×

Tris base	15,1 g
NaCl	43,8 g
Agua desionizada	hasta un litro
Ajustar el pH a 8,0.	

TBS-Tween

Tween 20 1 ml
TBS (1×) hasta un litro

Tampón de elución

Ácido acético glacial 0,560 µl
Agua desionizada 100 ml

Tampón de neutralización

Tris 1,5 g
Agua desionizada 50 ml

Azul Coomasie G250

Azul brillante G250 1 g
Ácido perclórico al 60% 50 ml
Agua desionizada hasta un litro

D.- Soluciones para el ELISPOT

Solución carbonato-bicarbonato, pH 9,6

Na₂CO₃ 1,59 g
NaHCO₃ 2,93 g
Agua desionizada hasta un litro

PBS(10×), pH 7,2

NaCl 80,0 g
KPO₄H₂ 2,0 g
Na₂PO₄H × H₂O 30 g
ClK 2,0 g
Agua desionizada hasta un litro

PBS-Tween

Tween 20 0,5 ml
PBS (1×), pH 7,2 hasta un litro

E.- soluciones para ELISA

Solución carbonato-bicarbonato, pH 9,6

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g
Agua desionizada.....	hasta un litro

Sustrato

ABTS	137 mg
Ácido cítrico×1H ₂ O.....	5,1 g
Agua desionizada.....	hasta 250 ml

Ajustar el pH a 4,2 con NaOH 10 M.

Añadir inmediatamente antes de su utilización 1µl/ml de H₂O₂ al 30 %.

Solución de frenado

SDS.....	50 g
Agua desionizada.....	hasta un litro

Soluciones específicas para ELISA DAS y ELISA de bloqueo

Solución de lavado

Tween 80	0,5 ml
Agua desionizada.....	hasta un litro

Solución para las diluciones de antígeno y sueros

Tween 80	0,5 ml
NaCl.....	2,4 g
PBS (1×)	hasta 100 ml

Solución para la dilución del conjugado

NaCl.....	2,4 g
Tween 80	0,5 ml
Suero fetal bovino	10,0 ml
PBS (1×)	hasta 100 ml

Soluciones específicas para el MAC-ELISA, S- ELISA y N- ELISA

Solución de lavado del ELISA de inmunocaptura

Tween 201 ml
Agua desionizada..... hasta un litro

Solución de lavado de S-ELISA y N-ELISA

Tween 201 ml
PBS (1×) hasta un litro

Solución para la dilución del antígeno del MAC-ELISA

Suero fetal bovino.....10 ml
Tween 20 100 µl
PBS (1×) hasta 100ml
Ajustar el pH a 7,2.

Solución de postapizado para S-ELISA y N-ELISA

Albúmina sérica bovina2 g
Solución carbonato-bicarbonato, pH 9,6100 ml

Solución para la dilución de sueros y anticuerpos monoclonales

Suero fetal bovino.....10 ml
Tween 20 100 µl
NaCl.....2,4 g
PBS (1×) hasta 100 ml
Ajustar el pH a 7,8

Diluyente de la estreptavidina-peroxidasa

Tween 20 100 µl
PBS (1×), pH 7,2 hasta 100 ml

4.- RESULTADOS

4.- RESULTADOS

4.1.- ESTANDARIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE TRABAJO

4.1.1.- ELISPOT

Se probaron dos tipos de placas con antígeno para la realización del ELISPOT, por un lado placas de cultivos celulares infectados con el VDEP y fijadas y por otro, placas en las que se había capturado el mismo virus mediante un anticuerpo monoclonal específico frente a él.

Con las placas de cultivos celulares infectadas y fijadas, la expresión antigénica óptima se obtenía cuando las placas se infectaban con una cantidad de virus de aproximadamente 2.800 UFFF/pocillo. Utilizando esta concentración del inóculo se estableció un tiempo de incubación de 12 a 15 horas, al cabo de las cuales los sincitios típicos del ECP del virus, donde éste se localiza, aparecían confluentes ocupando todo el tapiz celular, que todavía permanecía íntegro.

Con las placas en las que el antígeno era inmunocapturado, los mejores resultados se obtuvieron cuando el antígeno vírico se utilizaba a una concentración de 2,05 µg de proteína por pocillo y se incubaba durante 4 horas a 37°C o bien durante 16 horas a 4°C.

La especificidad del ELISPOT desarrollado sobre las placas de células infectadas y fijadas se probó utilizando en el ensayo CMN procedentes de animales convencionales seronegativos frente al VDEP. Con el mismo objetivo se emplearon también placas testigo negativo, tratadas de la misma manera pero sin infectar, en las que se incubaron CMN tanto procedentes de animales no sensibilizados frente al virus como de los cerdos

hiperinmunizados frente a él. En ninguno de los casos se observó la aparición de los *spots* característicos. De esta manera cada *spot* detectado en un pocillo de las placas infectadas y fijadas fue interpretado como un resultado positivo.

En las placas con el antígeno vírico inmunocapturado, sin embargo, se detectaron algunos *spots* inespecíficos en los pocillos incubados con el antígeno vírico negativo. En este caso, el número de *spots* específicos se calculaba como la diferencia entre el número de *spots* detectados en el pocillo incubado con antígeno vírico positivo y el detectado en el pocillo correspondiente al antígeno negativo.

A pesar de que no se realizaron pruebas estadísticas, el número de CS tanto de IgA como de IgG detectadas fue, por lo general, mayor cuando se utilizaban las placas de células infectadas y fijadas. En el caso de las CS de IgG, la proporción media de los *spots* detectados con estas placas frente a los detectados con las placas del antígeno inmunocapturado fue de 1,7:1.

De esta manera, basándonos en la mayor capacidad de detección, así como en la especificidad demostrada por la técnica realizada sobre las placas de células infectadas y fijadas, decidimos utilizar este tipo de placas como fuente de antígeno para los ensayos de ELISPOT.

4.1.2.- Ensayo *in vitro*

Para la realización de esta técnica fue necesario determinar previamente las condiciones óptimas para la estimulación secundaria *in vitro* de las CMN obtenidas de los animales sacrificados.

Se probaron distintas concentraciones de antígeno semipurificado, así como diversos tiempos de incubación, obteniéndose la mejor estimulación cuando se incubaban durante 5 días con 119,3 ng de antígeno por ml del medio, o lo que es lo mismo, con 238,6 ng del antígeno cada 5×10^6 CMN.

4.1.3.- Ensayo de linfoproliferación

Se valoraron también distintas dosis del antígeno empleado para la estimulación de las células. En este caso, decidimos utilizar dos dosis de antígeno distintas, 12,8 y 25,5 ng por pocillo, ya que se lograba una mejor estimulación de las células procedentes

de los ganglios linfáticos mesentéricos con una dosis de antígeno inferior a la empleada para las células del bazo y la sangre.

4.2.- SIGNOS CLÍNICOS Y ELIMINACIÓN DE VIRUS EN LAS HECES

Los lechones de los diferentes grupos experimentales fueron observados diariamente, tanto después de la inoculación como tras el desafío, para comprobar la aparición de síntomas clínicos de la enfermedad. El estado de sus heces fue valorado y clasificado siguiendo el criterio que se definió en el correspondiente apartado de la sección de material y métodos. Se consideró que un animal tenía diarrea cuando la puntuación asignada era mayor o igual a 2.

Aunque el grupo 1 estaba compuesto por 37 animales, en este apartado no se incluye a 4 de ellos por no estar disponibles sus correspondientes datos de sintomatología y eliminación.

4.2.1.- Sintomatología tras la inoculación

La sintomatología observada en cada grupo tras la inoculación aparece resumida en la tabla 2.

Los animales del grupo 1, inoculados con la cepa CV-777 del VDEP no adaptada al cultivo celular, desarrollaron una sintomatología de leve a moderada, no observándose en ningún caso una afectación marcada del estado general.

La diarrea, el síntoma clínico más característico de la enfermedad, se observó en 10 de los 33 animales del grupo (30 %) y, en la mayoría de los casos fue moderada, excepto en 3 cerdos que presentaron durante un periodo de 1 o 2 días heces de consistencia acuosa. En 7 de los 23 animales restantes se observó un reblandecimiento de las heces durante al menos un día.

El inicio de la diarrea se produjo entre los días 2 y 4 postinoculación y su duración osciló entre 1 y 4 días, siendo la media de 1,7.

Los animales de los grupos 2 y 3, inoculados con dos dosis diferentes de la cepa del virus adaptada al cultivo celular, no desarrollaron ningún síntoma de la enfermedad, detectándose únicamente en uno de los lechones del grupo 2 (inoculado con la dosis baja) una diarrea moderada de un día de duración.

Grupo	Inóculo	Animales con diarrea		Duración media (días) *
		%	afectados/totales	
1	Cepa virulenta	30	10/33	1,7
2	Cepa atenuada (dosis baja)	5	1/20	1
3	Cepa atenuada (dosis alta)	0	0/15	0

* Considerando únicamente los animales con diarrea

Tabla 2.- Sintomatología clínica desarrollada tras la inoculación de lechones con las variantes adaptada y no adaptada al cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP.

4.2.2.- Sintomatología tras el desafío

A los 21 días de la inoculación parte de los animales de cada grupo fueron sometidos a un desafío para comprobar el grado de protección proporcionado por cada uno de los tratamientos. El grupo 4, que no había sido sometido a ningún tratamiento previo, sirvió como testigo negativo.

En la tabla 3 se muestran resumidos los principales datos de la sintomatología observada en este periodo.

Tras el desafío no se observó la aparición de diarrea en ninguno de los animales de los grupos 1 y 2, y sólo en 1 de los 8 lechones del grupo 3. Este último animal tuvo una diarrea moderada entre los días 2 y 4 postdesafío. En el resto de los animales de los tres grupos la consistencia de las heces fue normal, no observándose ni siquiera reblandecimiento en ninguno de ellos.

Sin embargo, en el grupo testigo negativo, 6 de los 13 animales presentaron una diarrea entre moderada y grave tras el desafío. De los 7 lechones restantes, tres de ellos tuvieron heces pastosas durante al menos un día. El comienzo de la diarrea fue entre los días 3 y 4 y tuvo una duración media de 1,6 días.

Grupo	Inóculo	Animales con diarrea		Duración media (días) *
		%	afectados/totales	
1	Cepa virulenta	0	0/11	0
2	Cepa atenuada (dosis baja)	0	0/12	0
3	Cepa atenuada (dosis alta)	12,5	1/8	3
4	Testigo negativo	46	6/13	1,6

* Considerando únicamente los animales con diarrea

Tabla 3.- Sintomatología clínica desarrollada tras el desafío con la cepa de campo de los lechones previamente inoculados con las variantes adaptada y no adaptada al cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP.

4.2.3.- Eliminación de virus tras la inoculación

La proporción de lechones en los que fue detectada la eliminación del VDEP en las heces después de la inoculación fue marcadamente diferente entre los distintos grupos. Así, mientras en el grupo 1 se detectó la presencia del virus en las heces de todos los animales, en los grupos inoculados con la cepa del virus atenuada por pases en cultivo celular, solamente se detectó eliminación del virus en 1 animal del grupo 2 (5 %), y en 4 del grupo 3 (26 %) (Tabla 4).

Grupo	Animales que eliminaron el virus		Duración media (días) *
	%	afectados/totales	
1	100	33/33	5,4
2	5	1/20	1
3	26	4/15	1

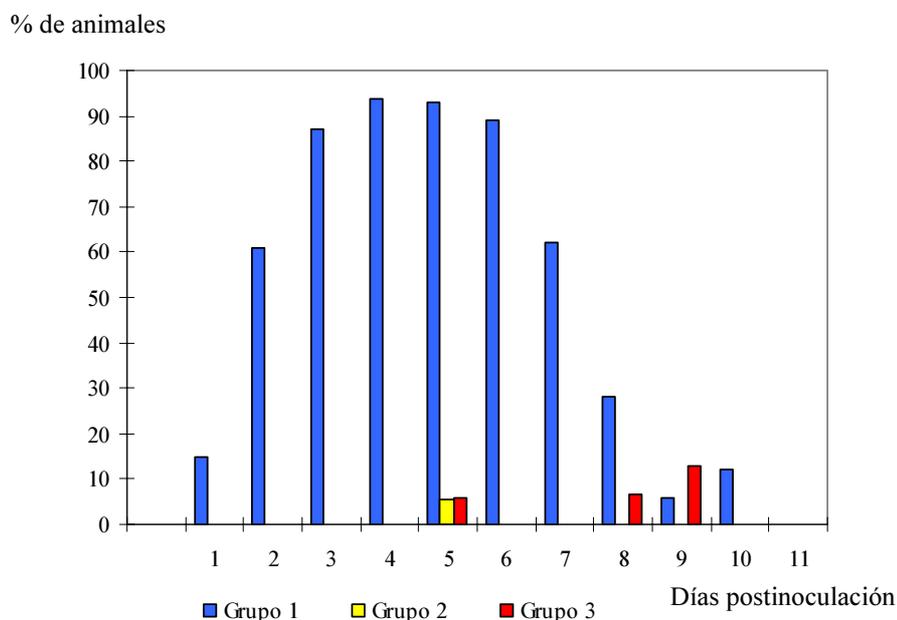
*Considerando únicamente los animales que eliminaron el virus

Tabla 4.- Detección de antígeno vírico mediante DAS-ELISA en las heces de los animales inoculados con las variantes adaptada y no adaptada al cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP.

Entre los animales del grupo 1, la presencia del virus en las heces comenzó a detectarse entre los días 1 y 3 postinoculación, y, como puede observarse en la gráfica 1, entre los días 3 y 6 prácticamente todos los animales del grupo eliminaron el virus en sus heces. Posteriormente, la proporción disminuyó, de forma que en el día 11 no se detectó la presencia de antígeno vírico en ninguna de las muestras de heces recogidas.

La duración media del periodo de eliminación del VDEP en las heces de los animales del grupo 1 fue de 5,4 días.

En los grupos 2 y 3, los animales que eliminaron el virus lo hicieron únicamente durante un día, en concreto el día 5, un lechón del grupo 2, y los días 1, 5 y 9, lechones del grupo 3 (Gráfica 1).

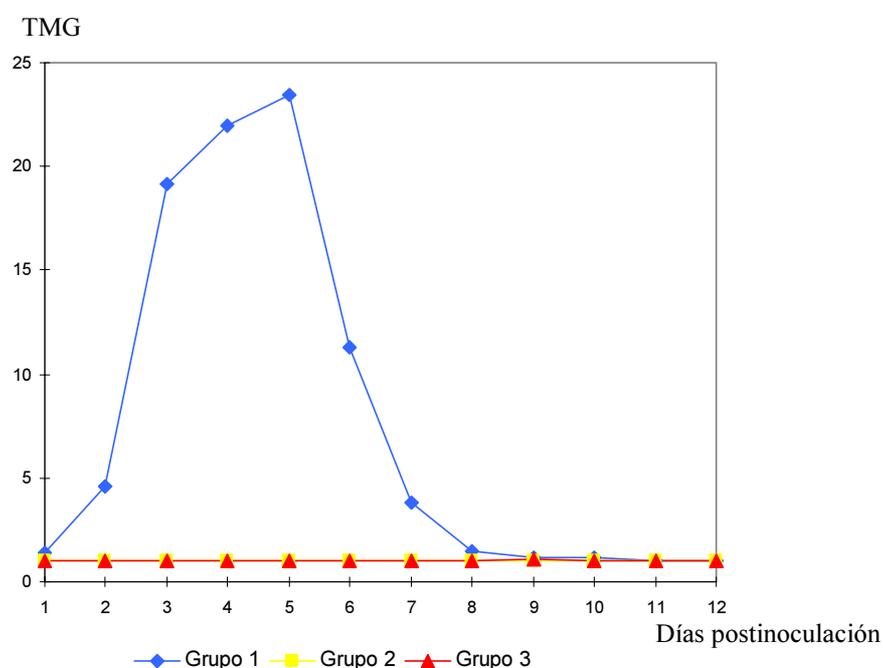


Gráfica 1.- Porcentaje diario de animales que eliminaron antígeno vírico en las heces tras la inoculación con las variantes adaptada y no adaptada al cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP.

Las muestras positivas fueron tituladas ensayando diluciones dobles seriadas de cada una mediante DAS-ELISA y su título se expresó como la dilución máxima con resultado positivo. Para el cálculo del TMG se codificaron los títulos de cada muestra como se describe en el apartado 3.13 de material y métodos. Para facilitar la codificación y el análisis de los datos, así como su posterior representación gráfica, a las

muestras negativas se le asignó un título de 1:1, siendo positivas las muestras con un título mayor o igual a 1:2.

La evolución del TMG del virus eliminado en las heces en cada grupo se muestra en la gráfica 2. Como puede observarse, el TMG correspondiente al grupo 1 presentó un fuerte incremento entre los días 2 y 3, alcanzándose el pico de eliminación el día 5 postinoculación. A partir de ese día se produjo una fuerte disminución hasta alcanzar niveles mínimos los días 7 y 8 y, finalmente, hacerse negativo el día 9. La evolución de los TMG de eliminación del virus en los grupos 2 y 3 fue muy distinta, se mantuvieron en niveles negativos prácticamente todo el tiempo, ya que las pocas muestras positivas detectadas en estos dos grupos presentaron títulos muy bajos, no superiores a 1:2.



Gráfica 2.- TMG de antígeno vírico detectado por DAS-ELISA en las heces de los distintos grupos tras la inoculación con las variantes adaptada y no adaptada al cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP.

Utilizando el análisis de varianza para comparar los TMG entre los distintos grupos y posteriormente la prueba t de Student para datos apareados, se encontraron diferencias significativas entre el grupo inoculado con la cepa virulenta y los grupos inoculados con la cepa atenuada, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa cuando se compararon entre sí estos últimos (Tabla 5).

	t de Student (p)	
	Grupo 1	Grupo 2
Grupo 2	2,57 (p= 0,01)	-1,54 ^{NS}
Grupo 3	2,56 (p= 0,01)	
NS: No significativo		

Tabla 5.- Comparación de los TMG de antígeno vírico detectado por DAS-ELISA en los distintos grupos tras la inoculación con las variantes adaptada y no adaptada al cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP.

4.2.4.- Eliminación de virus tras el desafío

Tras someter a los cuatro grupos experimentales al desafío con la cepa de virus virulenta, el patrón de eliminación mostrado por cada grupo fue distinto. En la tabla 6 se muestran resumidas algunas de las características fundamentales.

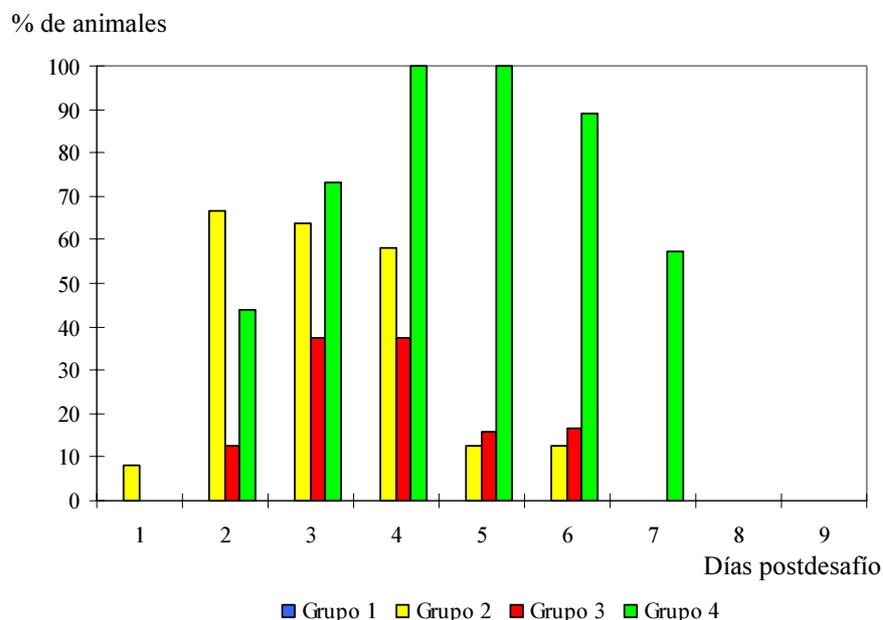
Grupo	Animales que eliminaron el virus		Tasa de protección	Duración media (días) *	TMG máximo
	%	Nº animales/total			
1	0	0/11	100	0	1
2	75	9/12	25	2,6	8,5
3	50	4/8	50	2	3,1
4	100	13/13	0	4,6	23
* Considerando únicamente los animales que eliminaron el virus					

Tabla 6.- Detección de antígeno vírico en las heces mediante DAS-ELISA tras el desafío con la cepa de campo de los lechones previamente inoculados con las variantes adaptada y no adaptada al cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP.

Para calcular la duración media del periodo de eliminación, como se describió anteriormente, no se tuvo en cuenta los animales que aún eliminaban virus en las heces en el momento del sacrificio, por considerarse que su periodo de eliminación no estaba completo.

Ninguno de los animales del grupo 1 eliminó el virus en sus heces durante los días posteriores al desafío. Así pues, el tratamiento previo con una dosis baja del mismo virus proporcionó una tasa de protección del 100 % frente a la nueva infección.

En el grupo 2, 9 de los 12 lechones (75 %) eliminaron el virus en sus heces entre los días 1 y 6 postdesafío. La tasa de protección frente a la infección en este grupo, en el que los animales habían sido inoculados con la dosis baja de la cepa atenuada del virus, fue por tanto del 25 %. La duración media del periodo de eliminación, entre los animales en los que ésta se produjo, fue de 2,6 días. Entre los días 2 y 4 apareció la mayor proporción de lechones que eliminaban el virus.



Gráfica 3.- Eliminación diaria de antígeno vírico en las heces tras el desafío con virus de campo de los animales previamente inoculados con las variantes adaptada y no adaptada al cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP.

Entre los animales del grupo 3, inoculados con la dosis alta de la cepa atenuada del virus, 4 de un total de 8 eliminaron el virus entre los días 2 y 6 postdesafío, siendo la tasa de protección de este grupo del 50 %. La duración media del periodo de eliminación fue de 2 días, detectándose entre los días 3 y 4 el mayor número de animales que eliminaban el virus en sus heces (Gráfica 3).

El grupo testigo negativo, no sometido a ningún tratamiento anterior, tuvo un comportamiento similar al del grupo 1 tras la inoculación. Todos los lechones de este grupo eliminaron el virus en sus heces entre los días 2 y 7 postdesafío, siendo la duración media del periodo de eliminación de 4,6 días. El máximo número de animales que eliminaban el virus se produjo en los días 4 y 5 postdesafío, en los que el antígeno vírico fue detectado en todas la muestras de heces (Gráfica 3).

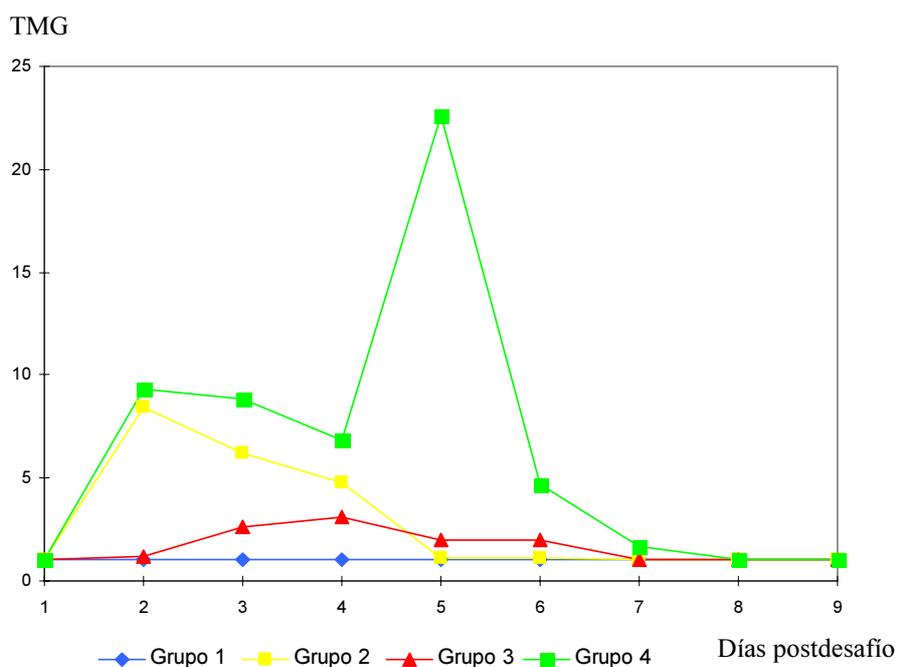
Se comparó la duración media del periodo de eliminación mediante la prueba t de Student para datos independientes. Los resultados se muestran resumidos en la tabla 7. El periodo de eliminación del virus tras el desafío fue significativamente inferior en los dos grupos inoculados con la cepa atenuada del virus cuando se compararon con el del grupo testigo negativo; en cambio, la diferencia observada entre los grupos 2 y 3 no resultó estadísticamente significativa.

	t de Student (p)	
	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 3	0,74 ^{NS}	
Grupo 4	-3,2 (p< 0,01)	-5,8 (p< 0,01)
NS: No significativo		

Tabla 7.- Comparación de la duración media del periodo de eliminación de antígeno vírico tras el desafío con virus de campo de los animales previamente inoculados con las variantes adaptada y no adaptada al cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP.

También tras el desafío se calcularon para cada grupo los TMG del virus eliminado en las heces. En la gráfica 4 puede observarse su evolución en cada grupo.

El TMG correspondiente al grupo 2 alcanzó su máximo valor (8,5) el día 2 postdesafío, para ir disminuyendo en los días posteriores y hacerse negativo el día 5. El título máximo alcanzado por el grupo 3 fue de 3,1 y en el día 4 postdesafío. En este grupo, el TMG se mantuvo en niveles positivos, aunque bajos, durante más tiempo que en el anterior, siendo negativo a partir del día 7.



Gráfica 4.- TMG de antígeno vírico detectado por DAS-ELISA en las heces tras el desafío con la cepa de campo de los animales previamente inoculados con las variantes adaptada y no adaptada al cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP.

La curva correspondiente al grupo 4 fue la que alcanzó valores mayores en todo momento. Pudo observarse un primer pico de eliminación del virus hacia el día 2, aunque la máxima cantidad de antígeno vírico en las heces fue detectada el día 5 postdesafío (TMG de 23), de forma similar a lo que ocurría tras la inoculación del grupo 1. El TMG se hizo negativo a partir del día 8 posdesafío.

En el caso del grupo 1, la curva del TMG se mantuvo durante todo el periodo en niveles negativos.

Mediante el análisis de varianza se comprobó que existían diferencias estadísticamente significativas entre los TMG de los distintos grupos. Estas diferencias fueron estudiadas para cada dos grupos mediante la prueba t de Student para datos apareados; los valores de la t obtenidos para cada caso se exponen en la tabla 8.

	t de student (p)		
	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Grupo 1	-2,03 (0,04)	-2,71 (0,01)	-2,48 (0,02)
Grupo 2		1,36 ^{NS}	-1,54 ^{NS}
Grupo 3			-2,24 (0,03)
NS: No significativo			

Tabla 8.- Comparación de los TMG de antígeno vírico detectado por DAS-ELISA tras el desafío con el virus de campo de los animales previamente inoculados con las variantes adaptada y no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP.

Resultó significativa la diferencia del TMG alcanzado por el grupo testigo negativo respecto al grupo inoculado con la dosis alta de la cepa atenuada. Sin embargo, no lo fue respecto del TMG del grupo inoculado con la dosis baja de la misma cepa atenuada. Tampoco fueron estadísticamente significativas las diferencias en el TMG entre los dos grupos inoculados con la cepa atenuada. Por el contrario, como era de esperar, las diferencias en el TMG del grupo 1 con respecto a todos los demás grupos sí resultaron significativas.

4.3.- CÉLULAS SECRETORAS DE ANTICUERPOS FRENTE AL VDEP TRAS LA INOCULACIÓN

Una de las partes de este trabajo se dedicó al estudio de la aparición y distribución de las poblaciones de LB secretoras de anticuerpos específicos frente al VDEP, en cerdos inoculados con la cepa CV-777 de ese mismo virus, en sus variantes virulenta o atenuada. Para ello, se realizaron sacrificios periódicos de los animales y se extrajeron y purificaron CMN de la lámina propia de dos tramos del intestino delgado (duodeno e íleon), de los ganglios linfáticos mesentéricos, del bazo y de la sangre. Sobre estas células se realizó la prueba de ELISPOT para detectar las CS de IgM, IgA e IgG en cada tejido.

Debido a problemas con la variabilidad individual encontrada en la respuesta de los animales, así como al limitado número de lechones que fue posible utilizar en cada punto del estudio, la capacidad para detectar diferencias estadísticamente significativas

tanto entre grupos como entre distintos días dentro del mismo grupo fue escasa. Sin embargo, consideramos que son claras las tendencias mostradas por cada grupo en cuanto al desarrollo y distribución de las CS de anticuerpos frente al VDEP.

En las tablas 21 a 24 del apéndice 2 se muestran detallados los valores medios de número de CS de anticuerpos y las desviaciones estándar obtenidas para cada grupo y cada tejido.

4.3.1.- Células secretoras de anticuerpos en el grupo 1, inoculado con la cepa virulenta

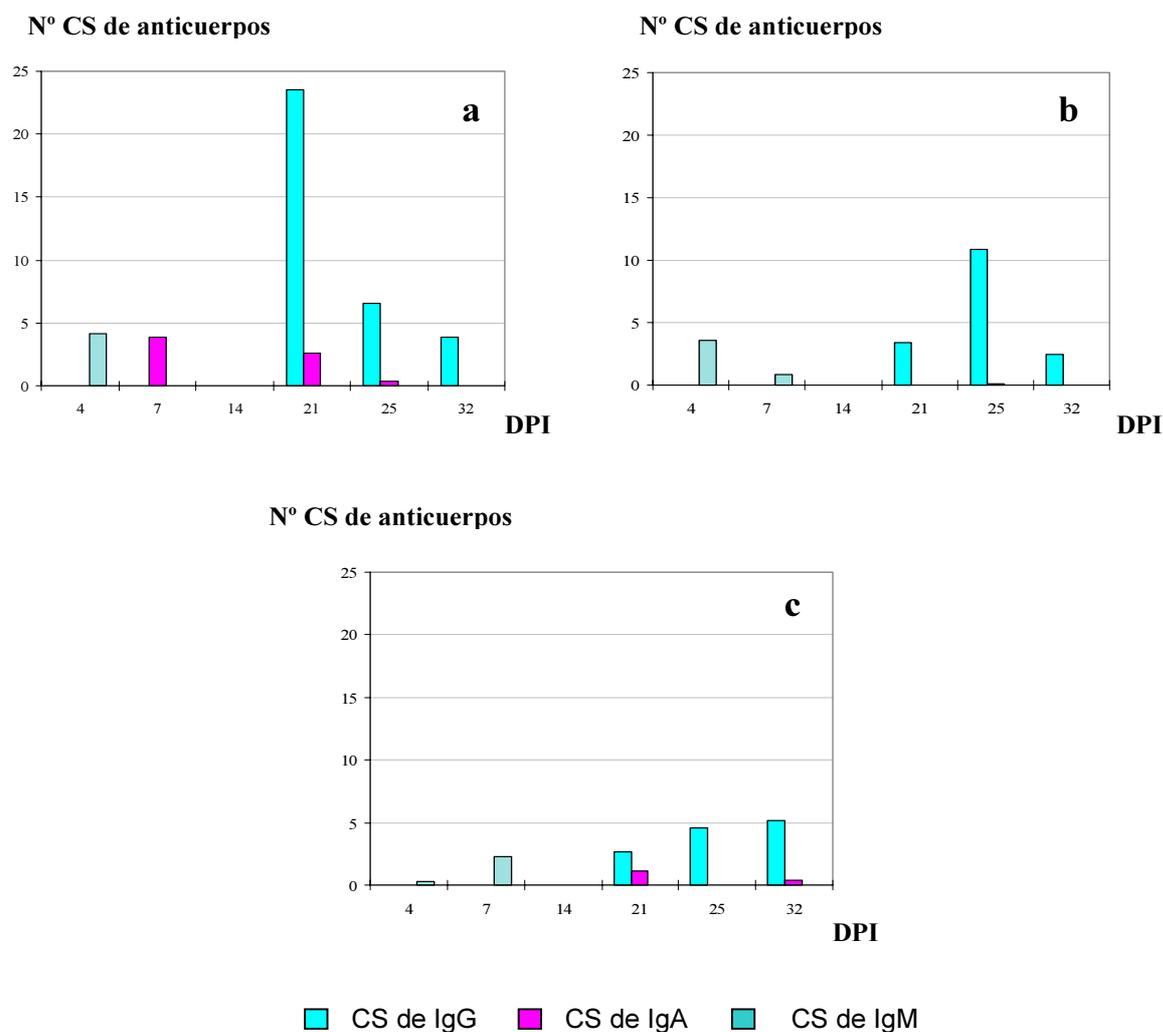
La distribución de las CS de los distintos tipos de inmunoglobulinas frente al VDEP detectadas en el grupo 1, en cada tejido y en los distintos días postinoculación se muestran en la tabla 9 y las gráficas 5 y 6.

	Dudeno			Íleon			GL Mesentéricos			Bazo			Sangre		
	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG
4 DPI	4,2	0	0	3,6	0	0	0,6	0	0	0,6	0	0	0	0	0
7 DPI	0	3,8	0	0,8	0	0	2,3	0	0	0,3	0	0	0,6	0	0
14 DPI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0,3	0,5	0
21 DPI	0	2,6	23,5	0	0	3,4	0	1,1	2,7	0	0	0	0	0,6	0,1
25 DPI	0	0,4	6,6	0	0,1	10,8	0	0	4,6	0	0	2,9	0	0,4	2,2
32 DPI	0	0	3,4	0	0	2,5	0	0,4	5,1	0	0	3,2	0	0,5	1,2
* DPI: Días postinoculación															

Tabla 9.- Distribución de las CS de anticuerpos frente al VDEP en los diferentes tejidos de los lechones inoculados con la variante no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP.

Las primeras CS de IgM específicas frente al virus fueron detectadas en el día 4 postinoculación, en todos los tejidos excepto en la sangre. La mayor respuesta se produjo en el duodeno y el íleon y, en cambio, fue muy débil en los ganglios linfáticos mesentéricos y el bazo (<1 CS de IgM por 5×10^5 CMN). En el día 7 postinoculación

esta respuesta ya no se detectó en el duodeno y fue mucho menor en el íleon, mientras que en los ganglios mesentéricos aumentó considerablemente respecto del día 4, al igual que en la sangre, donde ya fueron detectadas estas células. Precisamente fue la sangre el único tejido en el que en el día 14 postinoculación se detectó todavía respuesta de CS de IgM.



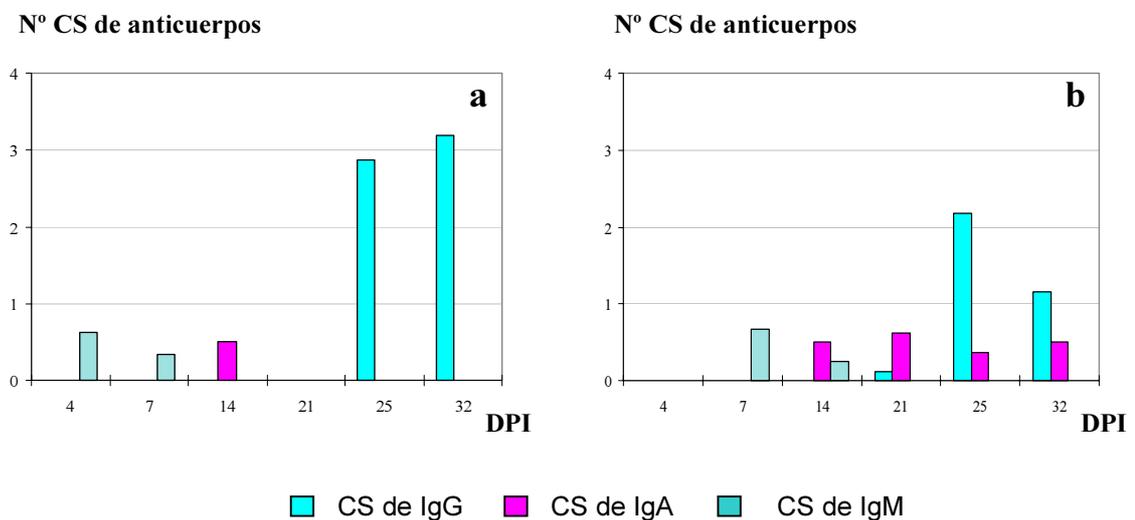
Gráfica 5.- CS de anticuerpos (por 5×10^5 CMN) detectadas en el duodeno (a), el íleon (b) y los ganglios linfáticos mesentéricos (c) de los animales inoculados con la variante no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP. (DPI: días postinoculación).

Las CS de IgG e IgA en el intestino y los ganglios linfáticos mesentéricos, los tejidos relacionados con el sistema inmune de mucosas, comenzaron a detectarse de forma importante el día 21 postinoculación. En los tres tejidos se detectaron CS de IgG, alcanzándose la mayor concentración en el duodeno (7-8 veces más que en el íleon y los

ganglios mesentéricos). En los días posteriores el número de CS de IgG disminuyó considerablemente en el duodeno, aunque no en los otros dos tejidos asociados al intestino, de manera que en el íleon se detectó el mayor número de estas células en el día 25 postinoculación, aunque sin llegar al valor máximo del duodeno, y en los ganglios linfáticos mesentéricos hubo un aumento progresivo hasta el día 32 postinoculación.

La cantidad de CS de IgA detectadas en los tres tejidos mediante esta técnica fue, por lo general, inferior a la de CS de IgG y, a diferencia de éstas, su presencia no fue constante en todos los tejidos a partir del día 21.

La existencia de CS de IgA fue determinada primero en el día 7 y en el duodeno, donde aparecieron junto con CS de IgM, y, a pesar de que no fueron detectadas en el día 14, si aparecieron en los dos días posteriores (21 y 25 postinoculación). Su número fue menor en el íleon, donde sólo se observaron en el día 25 y en baja cantidad (< 1 por 5×10^5 CMN). En los ganglios linfáticos mesentéricos su detección se produjo en los días 21 y 32 postinoculación, siendo considerablemente inferior la cantidad de CS de IgA este último día.



Gráfica 6.- CS de anticuerpos (por 5×10^5 CMN) detectadas en el bazo (a) y la sangre (b) de los animales inoculados con la variante no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP.

En el bazo las CS de IgG fueron detectadas en los días 25 y 32 postinoculación y en cantidades similares. En cambio, entre los linfocitos de la sangre estas células fueron evidenciadas ya en el día 21, aunque su número fue bajo, y se produjo el máximo en el

día 25 postinoculación. Por lo general, en ninguno de estos dos tejidos la cantidad de CS de IgG fue superior a la detectada el mismo día en el intestino o los ganglios linfáticos mesentéricos.

Respecto a las CS de IgA, cabe destacar su aparición en bazo y sangre en el día 14 postinoculación. A partir de ese día, sin embargo, no fueron observadas en el bazo, aunque en la sangre se mantuvo su presencia, en niveles bajos, el resto del experimento.

4.3.2.- Células secretoras de anticuerpos en los grupos inoculados con la cepa atenuada (grupos 2 y 3)

Los grupos 2 y 3 fueron inoculados con dosis diferentes de la cepa del virus adaptada al cultivo celular; el grupo 2 con una dosis baja y el 3 con una casi 20 veces superior. Las características de las poblaciones de CS de inmunoglobulinas frente al VDEP en cada tejido y cada día se muestran resumidas en la tabla 10.

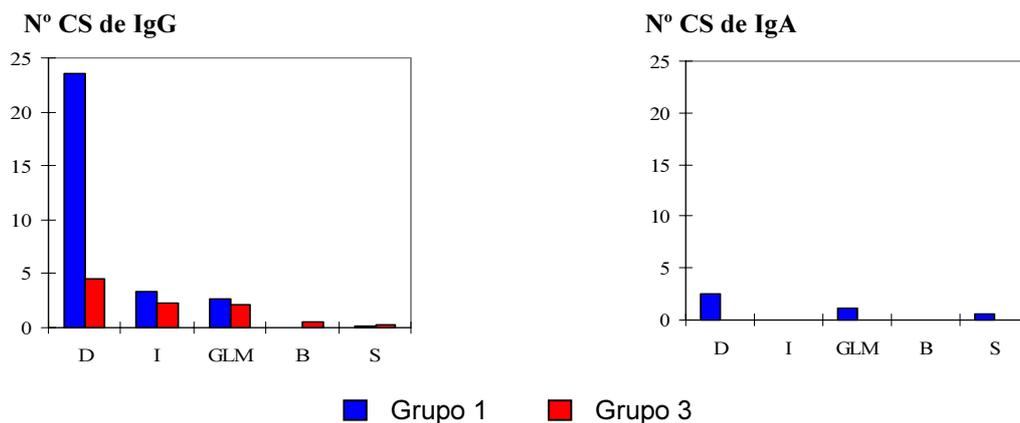
Grupo 2	Duodeno			Íleon			GLM			Bazo			Sangre		
	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG
4 DPI	0	0	0,4	0	0	0,3	0	0	0	7,4	0	0	0	0	0
7 DPI	0	0	0	0	0	0	0,3	0	0,8	1,5	0,3	0	0,3	0,3	0
14 DPI	0	0	0	0	0	0	0	1	1,5	0	0	0	0	0	0,6
21 DPI	0	0	0	0	0	0	0	0,8	0,8	0	0,3	1,8	0	0	0
Grupo 3															
4 DPI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7 DPI	0	0	0,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21 DPI	0	0	4,5	0	0	2,5	0	0	2,5	0	0	0,5	0	0	0,3

Tabla 10.- Distribución de las CS de anticuerpos frente al VDEP en los diferentes tejidos de los lechones inoculados con las dosis baja (grupo 2) y alta (grupo 3) de la variante adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP.

La respuesta encontrada en el grupo 2 en todos los tejidos durante los días 4, 7, 14 y 21 postinoculación fue muy escasa e irregular. Esporádicamente se encontraron algunas CS de anticuerpos frente al VDEP, generalmente en pequeña proporción (<1 por 5×10^5 CMN), en distintos tejidos. Cabe destacar únicamente la leve respuesta de los ganglios linfáticos mesentéricos entre los días 14 y 21 postinoculación con bajos niveles de CS de IgG e IgA y en el bazo la detección inicial de CS de IgM en los días 4 y 7, así como de un número limitado de CS de IgA e IgG en el día 21.

En el grupo 3, de la misma forma, durante los días 4 y 7 apenas se detectó la presencia de CS de anticuerpos frente al VDEP en los tejidos estudiados, únicamente alguna CS de IgG en el duodeno de un animal en el día 7 postinoculación. Sin embargo, en el día 21 se registraron CS de IgG en todos los tejidos, en mayor medida en el duodeno, seguido del íleon y los ganglios linfáticos mesentéricos. El menor valor correspondió a los tejidos vinculados al sistema inmune sistémico, que tuvieron de 4 a 16 veces menos CS de IgG.

En la gráfica 7 se comparan las CS de anticuerpos frente al VDEP encontradas el día 21 postinoculación en los grupos 1 y 3. Como puede observarse, el número de CS de IgG en el grupo inoculado con la dosis alta de la cepa atenuada no superó en ningún caso al medido en el grupo inoculado con la cepa virulenta. Además, en este grupo 3 no se detectó en ningún tejido la presencia de CS de IgA.



Gráfica 7.- CS de anticuerpos (por 5×10^5 CMN) en el duodeno (D), el íleon (I), los ganglios linfáticos mesentéricos (GLM), el bazo (B) y la sangre (S) de los animales de los grupos 1 y 3 en el día 21 postinoculación.

4.3.3.- Correlaciones

Utilizando el coeficiente de correlación de Spearman, tratamos de establecer la posible relación entre la presencia de CS de anticuerpos frente al VDEP en los distintos tejidos en el día del desafío (día 21 postinoculación) y la protección mostrada por cada grupo, cuyo indicador fue la proporción de animales que no eliminaron el virus tras el desafío. Los valores encontrados para el coeficiente de correlación (ρ) se muestran en la tabla 11.

	Coeficiente de Spearman (ρ)	
	IgG	IgA
Duodeno	0,95	0,77
Ileon	0,63	0,77
GL mesentéricos	1,00	0,63
Bazo	-0,10	-0,25
Sangre	0,73	0,77

Tabla 11.- Coeficientes de correlación de Spearman entre el grado de protección y el número de CS de anticuerpos detectadas en los distintos tejidos en el día 21 postinoculación.

Se encontró una correlación fuertemente positiva entre el grado de protección y la presencia de CS, tanto de IgG como de IgA, en todos los tejidos asociados al intestino. Las correlaciones más intensas fueron las encontradas con la concentración de CS de IgG en el duodeno ($\rho= 0,95$) y en los ganglios linfáticos mesentéricos ($\rho= 1$). En cambio, en el caso de las CS de IgA los coeficientes de correlación más elevados se alcanzaron en el duodeno y el íleon ($\rho= 0,77$).

En lo que respecta a los dos tejidos asociados al sistema inmune central, los resultados fueron muy diferentes. En el bazo no se encontró ninguna relación entre la protección frente al desafío y el número de CS de IgG o IgA. Por el contrario, en la sangre se encontró una correlación positiva que puede ser considerada como fuerte, con valores para los coeficientes de correlación de 0,73 para las CS de IgG y de 0,77 para las CS de IgA, valores similares a los obtenidos con los tejidos vinculados al sistema de mucosas.

Mediante este mismo coeficiente, se estudió también la posible relación entre las CS de anticuerpos detectadas en la sangre y las de los tejidos linfoides asociados al intestino en el día del desafío, encontrándose una correlación alta entre el número de CS de IgG en la sangre y el duodeno ($\rho=0,78$), así como con los ganglios linfáticos mesentéricos ($\rho=0,74$). En cuanto a las CS de IgA, la correlación fue incluso mayor, siendo el coeficiente de correlación igual a 1 para el duodeno y el íleon y 0,82 para los ganglios linfáticos mesentéricos.

	Coeficiente de Spearman (ρ)	
	IgG	IgA
Duodeno	0,78	1
Íleon	-0,05	1
GL mesentéricos	0,74	0,82

Tabla 12.- Coeficientes de correlación de Spearman entre el número de CS de anticuerpos detectadas en la sangre y en los tejidos linfoides asociados al intestino en el día 21 postinoculación.

4.4.- CÉLULAS SECRETORAS DE ANTICUERPOS FRENTE AL VDEP TRAS EL DESAFÍO

Tras someter a un desafío con el VDEP virulento a los lechones previamente inoculados, se produjo en todos los grupos y en casi todos los tejidos un incremento en el número de CS de anticuerpos. La respuesta observada presentó, sin embargo, notables diferencias en cuanto a su intensidad y su evolución en el tiempo para cada uno de los grupos.

Grupo 1	Duodeno			Íleon			GL Mesentéricos			Bazo			Sangre		
	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG
4 DPD	0	1,7	34,5	0	0,2	6,6	0	0,5	6,7	0	0	1,7	0	0,7	3,3
7 DPD	1,8	0,2	18,1	2	0,1	7,6	1,1	1	6,5	0,6	0,9	4,2	0,2	1	1,3
12 DPD	0	1	9,3	0	1,3	1,2	0	0,2	1,3	0	0	1,5	0	2,2	0,8
Grupo 2															
4 DPD	0	0	4,3	0	0	0,6	0	1,2	4,9	0	1,7	36,6	0	3,6	19,2
7 DPD	0	0	36,2	0	0	0,6	0	1,9	8,8	0,2	0	2	0	0,9	4
12 DPD	1	42,5	42,3	1,75	0	2,5	0,1	0,1	17,5	2	0,1	0,6	0	0,3	0,9
Grupo 3															
4 DPD	0	0,7	34,2	0	0	0,8	0	1,7	12,4	0	0	6,2	0	1,3	11,1
7 DPD	0	0	0,5	0	0	0	0	0	4,7	0	0,2	3,3	0	0,3	0,7
12 DPD	0	0	24,5	0	0	0,8	0	0,3	10,7	0	0	0,3	0	0	1,3
Grupo 4															
4 DPD	56,2	0	0,2	10,2	0	0,1	8,1	0	0,2	2,4	0	0,1	1,7	0	0
7 DPD	15,6	0	0,3	83	0,2	5,9	31	1,9	0,5	4,2	0	0,8	4,8	0,9	0
12 DPD	0	0,3	3	3,2	0,2	1,2	1,5	0,3	3,2	0,2	0,2	0	0,2	0,3	0

* DPD: Días postdesafío

Tabla 13.- Distribución de las CS de anticuerpos frente al VDEP en los diferentes tejidos tras el desafío con el virus de campo en los animales previamente inoculados con las variantes adaptada y no adaptada al cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP.

4.4.1.- Respuesta en los tejidos linfoides asociados al intestino

Tras el desafío, la respuesta observada mediante el ELISPOT en los tres grupos se caracterizó por el predominio de CS de IgG, como ya había sucedido tras la inoculación con la cepa virulenta del virus.

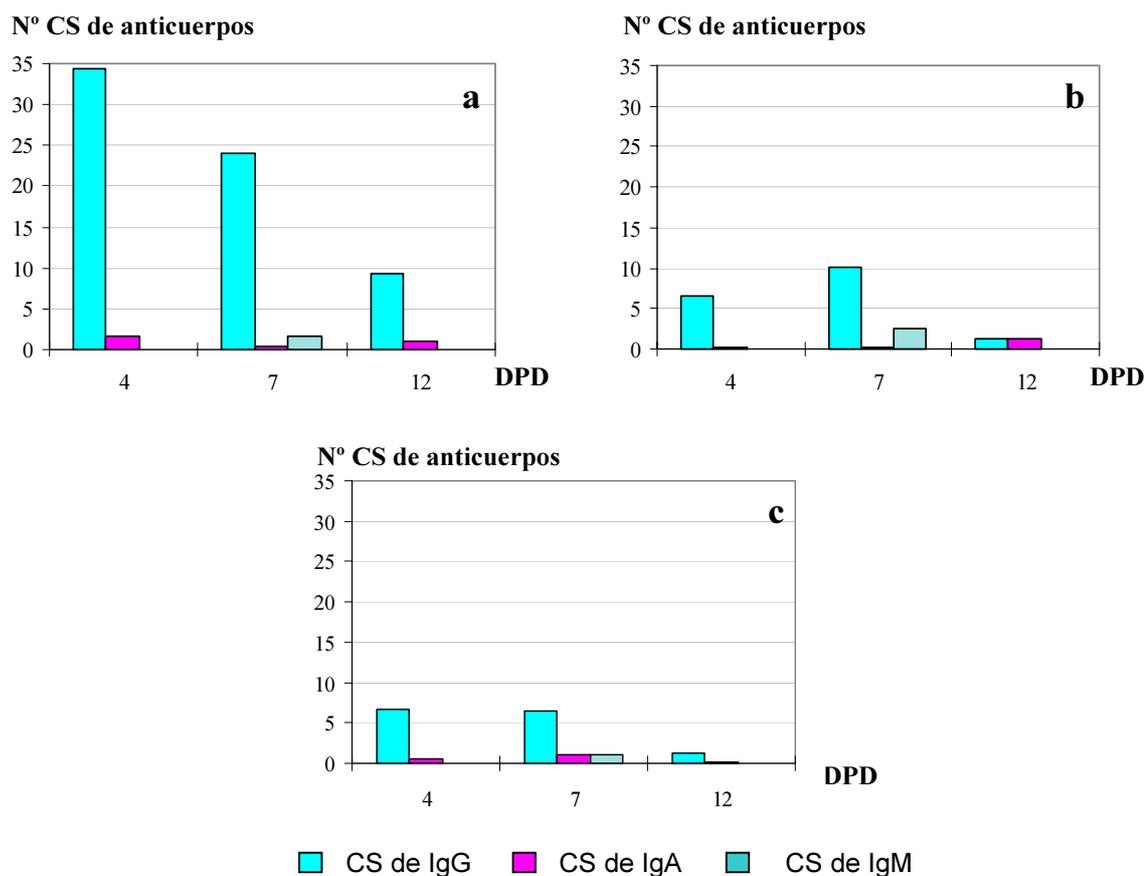
Grupo 1

En el grupo 1, el número de CS de IgG en los tres tejidos y en el día 4 postdesafío aumentó moderadamente respecto al día del desafío (día 21

postinoculación). En los días siguientes, 7 y 12, esta respuesta disminuyó progresivamente en el duodeno. En el íleon y los ganglios linfáticos mesentéricos, en cambio, la detección de CS de IgG se mantuvo más tiempo y su número no disminuyó de forma importante hasta el día 12 postdesafío (Gráfica 8).

La reexposición de los animales del grupo 1 al virus provocó solamente un ligero aumento en el número de CS de IgG en el duodeno y los ganglios linfáticos mesentéricos cuando se comparó con la respuesta medida en los animales del mismo grupo no desafiados. En el caso del íleon, no se produjo esta diferencia.

La respuesta de CS de IgA tras el desafío fue menor que la de IgG, y, aunque no puede afirmarse que aumentase con respecto a la encontrada el día 21 postinoculación, fue detectada en los tres tejidos durante los días siguientes al desafío, lo que no ocurrió de forma constante en los animales del mismo grupo que no fueron desafiados (Gráfica 8).

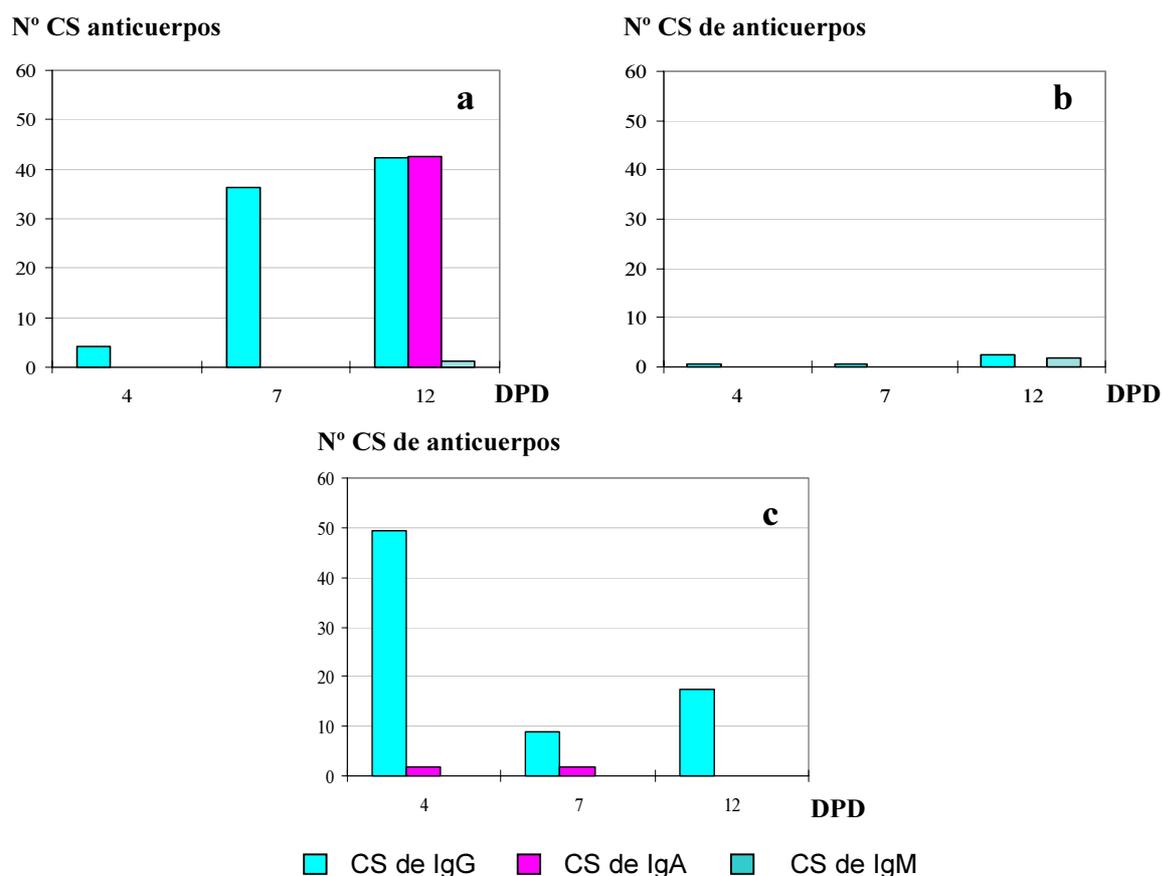


Gráfica 8.- CS de anticuerpos (por 5×10^5 CMN) detectadas en el duodeno (a), el íleon (b) y los ganglios linfáticos mesentéricos (c) de los animales del grupo 1 tras el desafío con la variante no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP. (DPD: días postdesafío)

Grupo 2

El grupo 2, cuya respuesta había sido escasa tras la inoculación, en los días siguientes al desafío mostró una elevación importante en el número de CS de anticuerpos. El valor más alto correspondió a las CS de IgG detectadas en el día 4 postdesafío en los ganglios linfáticos mesentéricos (49 CS de IgG por 5×10^5 CMN), aunque en este tejido esta respuesta fue menor en los días posteriores (Gráfica 9). En el duodeno y el íleon, en cambio, a partir del día 4 el número de CS de IgG aumentó progresivamente, de forma especial en el duodeno, en el que se detectó el máximo en el día 12 (42 CS de IgG por 5×10^5 CMN) (Gráfica 9).

La respuesta de CS de IgA en los animales del grupo 2 sólo fue registrada en los ganglios linfáticos mesentéricos, con una intensidad baja, y en el duodeno en el día 12 postdesafío, aunque en este caso podemos resaltar que el número de CS de IgA encontrado fue similar al de IgG y el mayor medido a lo largo de todo el experimento.



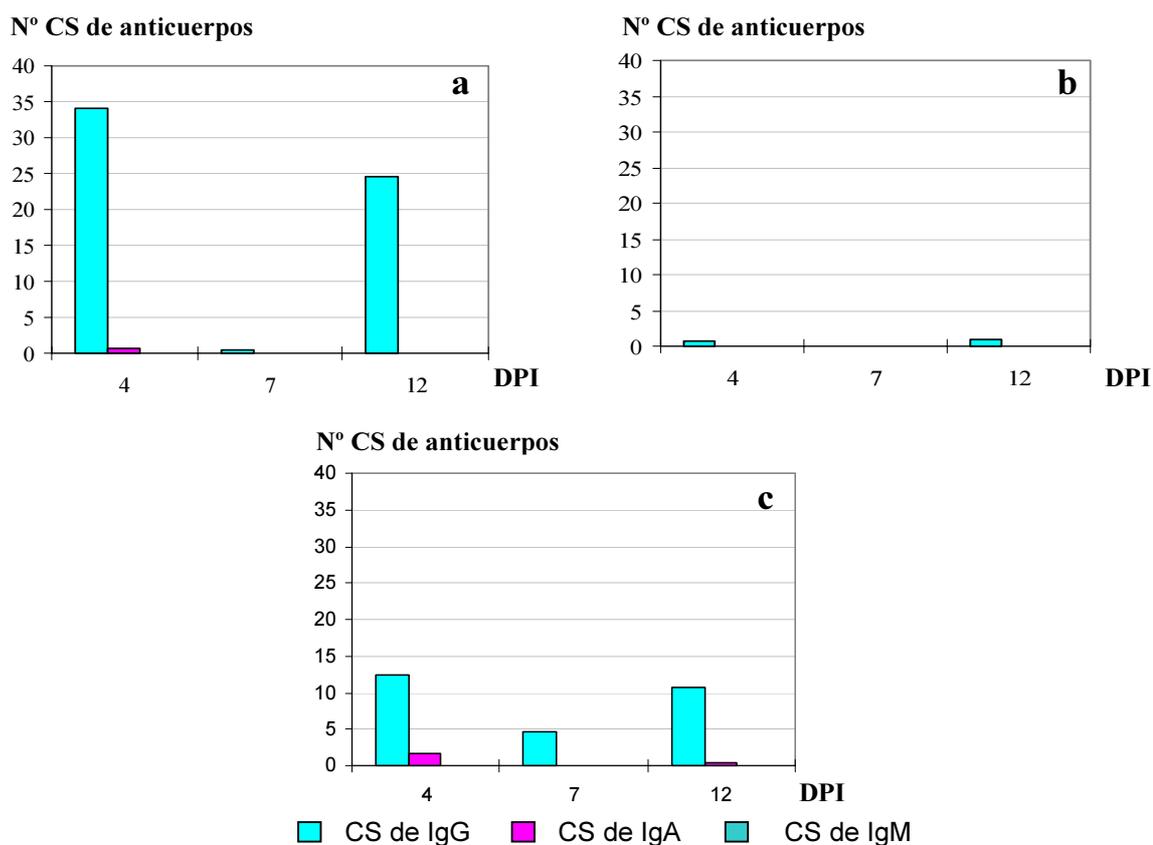
Gráfica 9.- CS de anticuerpos (por 5×10^5 CMN) detectadas en el duodeno (a), el íleon (b) y los ganglios linfáticos mesentéricos (c) de los animales del grupo 2 tras el desafío con la variante no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP.

Grupo 3

En los animales del grupo 3, inmediatamente tras el desafío se produjo un importante aumento en el número de CS de IgG, fundamentalmente en el duodeno y los ganglios linfáticos mesentéricos. En estos dos tejidos el valor máximo fue detectado en el día 4 postdesafío (34 y 12,4 CS de IgG por 5×10^5 CMN, respectivamente) para disminuir en los días siguientes, con la particularidad de que en ambos casos se detectaron menos CS de IgG en el día 7 postdesafío que en el 12 (Gráfica 10).

El número de CS de IgA también aumentó en el duodeno y en los ganglios mesentéricos tras el desafío, ya que la respuesta de este tipo de células se hizo evidente, aunque su número fue bajo.

Como puede observarse en la gráfica 10 y, a diferencia de los dos tejidos anteriores, la respuesta encontrada en el íleon fue de mucha menor intensidad para los dos tipos de CS de inmunoglobulinas.

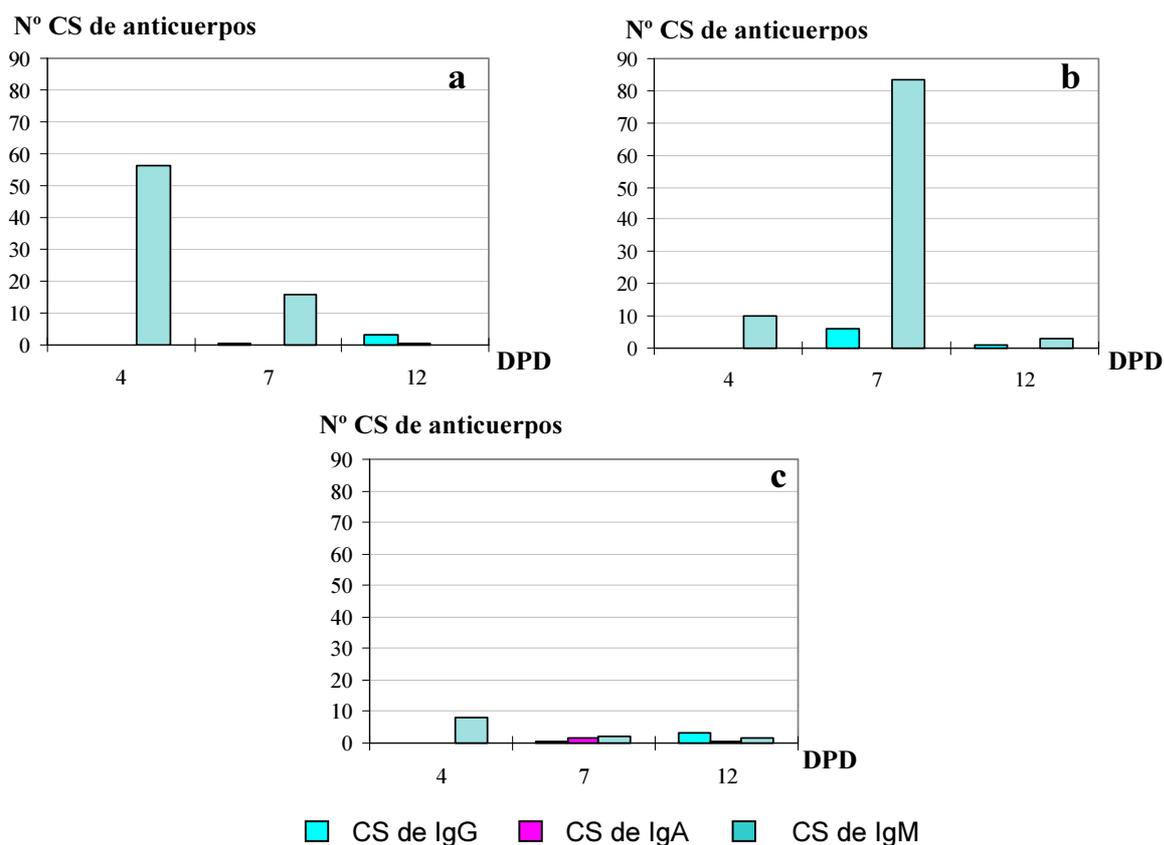


Gráfica 10.- CS de anticuerpos (por 5×10^5 CMN) detectadas en el duodeno (a), el íleon (b) y los ganglios linfáticos mesentéricos (c) de los animales del grupo 3 tras el desafío con la variante no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP.

Grupo 4

En el último grupo, utilizado como testigo y formado por animales comparables a los de los grupos anteriores en edad y condición física, se observó una respuesta similar a la descrita para el grupo 1 tras la inoculación inicial (Gráfica 11).

En los tres tejidos, durante los días 4 y 7 postdesafío, la respuesta dominante fue la de CS de IgM. Tanto en el duodeno como en los ganglios linfáticos mesentéricos, el pico de CS de IgM se alcanzó el primer día, mientras que en el íleon se detectó en el día 7. En el duodeno no se detectaron CS de IgM a partir del día 12, apareciendo en ese momento CS de IgG (3 CS de IgG por 5×10^5 CMN). En el íleon, en cambio, la respuesta de CS de IgG fue detectada en el día 7 postdesafío, conjuntamente con CS de IgM. En estos dos tejidos y a partir del día 7 se encontró una muy débil respuesta de IgA.



Gráfica 11.- CS de anticuerpos (por 5×10^5 CMN) detectadas en el duodeno (a), el íleon (b) y los ganglios linfáticos mesentéricos (c) de los animales del grupo 4 tras el desafío con la variante no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP.

En los ganglios linfáticos mesentéricos el número de CS de IgG aumentó progresivamente desde el día 4 hasta el último día estudiado, el día 12 postdesafío. Así mismo, en los dos últimos días se detectó una moderada respuesta de IgA, que fue mayor en el día 7.

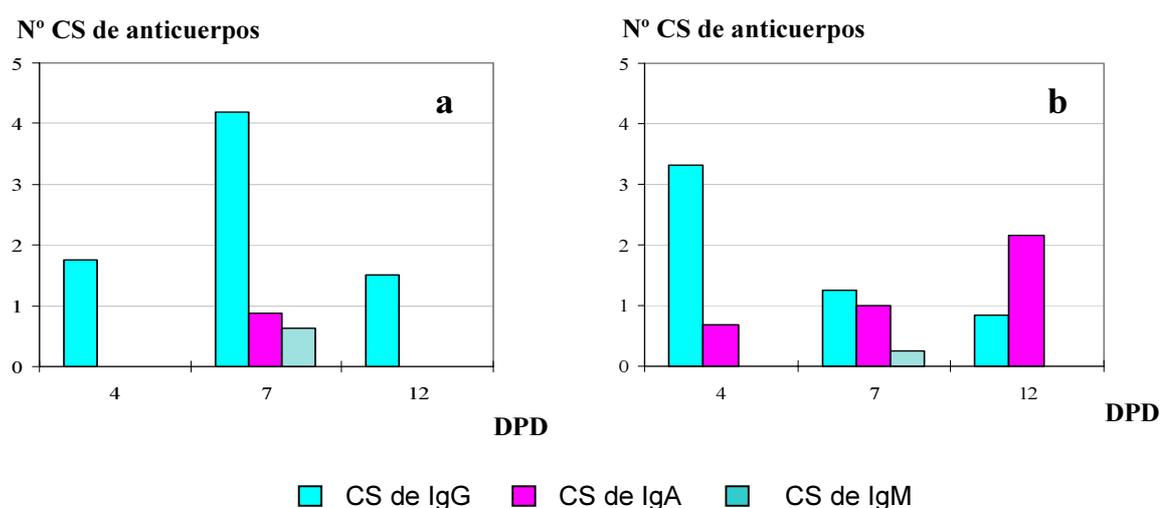
4.4.2.- Respuesta en los tejidos del sistema inmune sistémico

Tras el desafío de los cuatro grupos, la respuesta más intensa se observó en los lechones inoculados previamente con el virus atenuado y fundamentalmente en los tratados con la dosis baja. Estos dos grupos superaron en todo momento el número de CS de anticuerpos encontradas en el grupo inoculado con el virus virulento.

En el grupo testigo, no inoculado previamente, la respuesta se caracterizó por el predominio de CS de IgM, como sucedió con los tejidos asociados al intestino.

Grupo 1

La distribución de las CS de anticuerpos tras el desafío en el bazo y la sangre de los animales del grupo 1 se expone en la gráfica 12. En el bazo, donde tras la inoculación no se había detectado una respuesta apreciable de CS de IgG o IgA, tras la segunda estimulación se produjo un incremento de CS de IgG que fue máximo en el día 7 (4,2 CS de IgG por 5×10^5 CMN). En la sangre, el máximo número de CS de IgG se alcanzó en el día 4 y fue equiparable al del bazo.



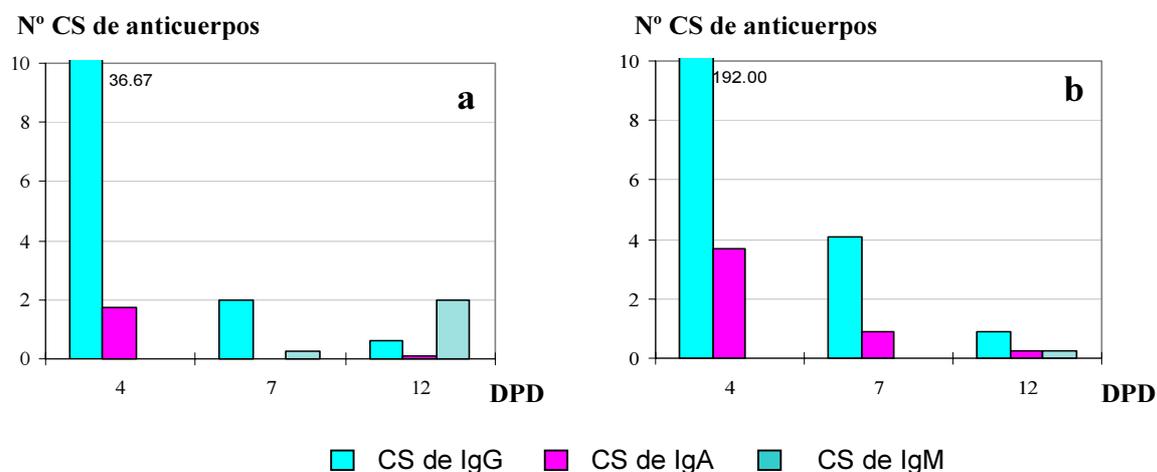
Gráfica 12.- CS de anticuerpos (por 5×10^5 CMN) detectadas en el bazo (a) y la sangre (b) de los animales del grupo 1 tras el desafío con la variante no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP.

En los dos tejidos, pero principalmente en la sangre, tras el desafío se pudo detectar la respuesta de IgA, característica de los tejidos inmunitarios asociados a las mucosas. En el bazo estas células fueron detectadas únicamente el día 7, mientras que en la sangre se pudo apreciar que su número aumentaba de forma gradual durante los días siguientes al desafío, hasta alcanzar el valor más alto en el día 12.

Grupo 2

En el grupo 2 se registró el incremento más importante en el número de CS de IgG tras el desafío, alcanzándose en ambos tejidos el pico en el día 4 postdesafío. El valor alcanzado en la sangre fue muy superior al del bazo en ese mismo día y también al de los ganglios linfáticos mesentéricos. En los días siguientes disminuyó de forma importante en ambos tejidos en número de CS de IgG (Gráfica 13).

También en este grupo fue detectada la respuesta de CS de IgA, principalmente en el día 4 y, de nuevo, de forma más evidente en la sangre, en la que también se detectaron CS de IgA los días 7 y 12 aunque en menor cantidad.

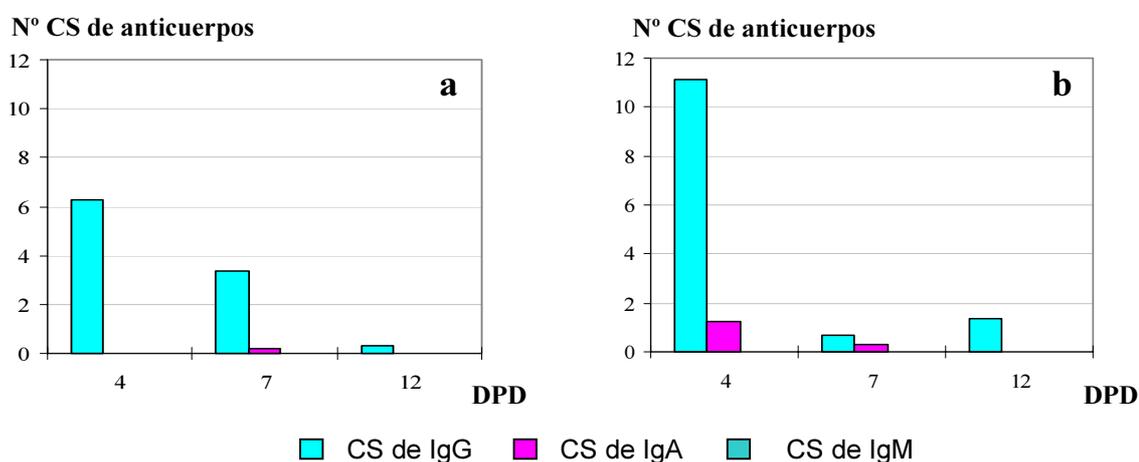


Gráfica 13.- CS de anticuerpos (por 5×10^5 CMN) detectadas en el bazo (a) y la sangre (b) de los animales del grupo 2 tras el desafío con la variante no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP.

Grupo 3

De manera similar, en el grupo 3 también se observó un fuerte incremento en la respuesta de CS de IgG en el día 4 postdesafío en el bazo y la sangre. Sin embargo, a diferencia del grupo anterior, los valores detectados en estos tejidos fueron similares a los de los ganglios linfáticos mesentéricos en ese mismo día. En los días siguientes se produjo una caída rápida en el número de estas células, como ocurría para los dos grupos descritos anteriormente (Gráfica 14).

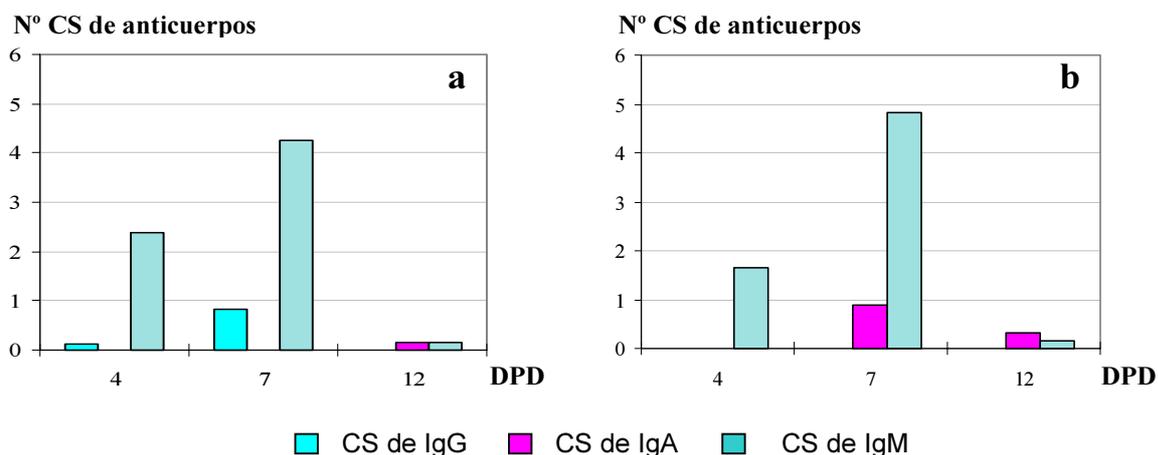
También como en el grupo 2, en este grupo fueron detectadas CS de IgA en los dos tejidos tras el desafío, alcanzándose el valor más alto en el día 4 en la sangre. Este valor fue muy similar al medido en el mismo día en los animales del grupo 2.



Gráfica 14.- CS de anticuerpos (por 5×10^5 CMN) detectadas en el bazo (a) y la sangre (b) de los animales del grupo 3 tras el desafío con la variante no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP.

Grupo 4

En el grupo 4, la respuesta detectada en el bazo y la sangre fue similar a la del grupo 1 tras la inoculación, aunque de mayor intensidad, de forma semejante a lo descrito para los tejidos asociados al intestino. En los dos tejidos se detectaron números similares de CS de IgM en los días 4 y 7 postdesafío. El máximo número de estas células se detectó en el día 7, en el que también fueron detectadas algunas CS de IgG en el bazo y de IgA en la sangre. Posteriormente, en el día 12, el número de CS de IgM cayó de forma importante y sólo se detectó un bajo número de CS de IgA en ambos tejidos (Gráfica 15).



Gráfica 15.- CS de anticuerpos (por 5×10^5 CMN) detectadas en el bazo (a) y la sangre (b) de los animales del grupo 4 tras el desafío con la variante no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP.

4.5.- CÉLULAS SECRETORAS DE ANTICUERPOS TRAS LA ESTIMULACIÓN SECUNDARIA *IN VITRO*

Las CMN extraídas de los lechones inoculados con el virus virulento fueron sometidas a una estimulación secundaria *in vitro* con el antígeno vírico obtenido a partir de cultivos celulares que había sido concentrado y semipurificado. Con esta estimulación secundaria tratamos de estudiar la aparición y distribución por tejidos de las células B de memoria específicas frente al VDEP.

Esta prueba se llevó a cabo únicamente con los animales del grupo 1 y sólo pudo ser realizada sobre las células extraídas de los ganglios linfáticos mesentéricos, el bazo y la sangre, los tejidos obtenidos con mayor grado de asepsia. No fue posible ejecutarla sobre las células del intestino debido a la dificultad de mantener viables estos cultivos durante el tiempo necesario.

Los valores medios del número de CS de anticuerpos y sus desviaciones estándar obtenidos tras la estimulación secundaria *in vitro* de las CMN aisladas de los distintos tejidos se muestran en la tabla 25 del apéndice 2.

4.5.1.- Células secretoras de anticuerpos tras la inoculación

En la tabla 14 se recogen resumidos los resultados más relevantes del número de CS de anticuerpos obtenido en cada tejido tras la estimulación secundaria *in vitro*.

DPI	GL Mesentéricos			Bazo			Sangre		
	IgM (*)	IgA (*)	IgG (*)	IgM (*)	IgA (*)	IgG (*)	IgM (*)	IgA (*)	IgG (*)
4	11 (44)	0,7 (-)	0 (-)	22 (36)	0 (-)	0 (-)	8 (-)	0 (-)	0 (-)
7	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
14	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0,8 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
21	0 (-)	44 (35)	38 (14)	0 (-)	220 (-)	586 (-)	0 (-)	29 (46)	267 (2136)
25	0 (-)	156 (-)	1137 (247)	0 (-)	7 (-)	97 (34)	0 (-)	49 (163)	1038 (478)

* CS tras la estimulación secundaria *in vitro* / CS tras la estimulación primaria *in vivo*

Tabla 14.- Distribución de las CS de anticuerpos frente al VDEP tras la estimulación secundaria *in vitro* en los diferentes tejidos de los lechones inoculados con la variante no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP.

Inmediatamente después de la inoculación, en el día 4, tras la estimulación secundaria sólo se detectaron CS de anticuerpos frente al VDEP del isotipo IgM, como había ocurrido con las células no estimuladas *in vitro*.

Durante los días 7 y 14 postinoculación el número de CS de anticuerpos de todos los isotipos estuvo generalmente por debajo de los límites de detección de la prueba, no siendo superior a 1 CS por 5×10^5 CMN.

La respuesta más importante a la estimulación secundaria se detectó a partir del día 21, al igual que sucedió con las células no estimuladas *in vitro*, y, también como en éstas, la respuesta registrada fue únicamente de CS de IgG e IgA.

Los valores más altos de CS de anticuerpos que respondieron a la estimulación secundaria *in vitro* se produjeron en los ganglios linfáticos mesentéricos y en la sangre el día 25 postinoculación, mientras que en el bazo fue en el día 21. La respuesta de CS de IgG fue mayor en los ganglios mesentéricos y en la sangre que en el bazo.

Cuando comparamos en los tres tejidos la respuesta obtenida para cada tipo de inmunoglobulina, pudo observarse que en los del sistema inmune sistémico el número de CS de IgG fue siempre superior al de IgA, variando la razón entre ambos (IgG/ IgA) entre 2,6 y 21 (Tabla 15). No obstante, en los ganglios linfáticos mesentéricos la respuesta de IgA en el día 21 fue superior a la de IgG, siendo su cociente de 0,8 y, aunque en el día 25 la situación se invirtió, la proporción de IgG/IgA en este tejido fue de 2 a 3 veces inferior a la que se obtuvo en el bazo y la sangre. Además, como puede observarse en la tabla 15, en los ganglios mesentéricos, en el día 21, el incremento en el número de CS tras la estimulación *in vitro* respecto al valor obtenido antes de esta estimulación fue mayor para las CS de IgA (35) que para las CS de IgG (14), contrariamente a lo que ocurrió en la sangre. Esta comparación no pudo ser realizarla con los ganglios mesentéricos en día 25 o con el bazo porque no se detectaron CS de IgA.

DPI	CS IgG/ CS IgA		
	GLM	Bazo	Sangre
21	0,8	2,6	7
25	7,2	14	21

Tabla 15.- Relación entre el número de CS de IgG y CS de IgA tras la estimulación secundaria *in vitro* en los diferentes tejidos de los lechones inoculados con la variante no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP.

4.5.2.- Células secretoras de anticuerpos tras el desafío

En los animales del grupo 1, reinoculados con la cepa virulenta del VDEP, la respuesta de CS que se observó tras la estimulación secundaria *in vitro* de las CMN correspondió a los isotipos IgG e IgA, como ocurrió con las células no estimuladas *in vitro* (Tabla 16).

El número de CS tanto de IgG como de IgA detectadas en los ganglios linfáticos mesentéricos y la sangre en el día 4 postdesafío (día 25 postinoculación) fue inferior al registrado el mismo día en los animales del mismo grupo que no habían sido desafiados.

En el bazo, en cambio, se detectaron más CS de ambos isotipos en los animales que habían sido desafiados.

DPI/DPD	GLM		Bazo		Sangre	
	IgG (*)	IgA (*)	IgG (*)	IgA (*)	IgG (*)	IgA (*)
25/4	11 (2)	7 (14)	312 (178)	103 (-)	237 (72)	12 (18)
28/7	35 (5)	58 (58)	129 (30)	55 (62)	92 (73)	30 (30)
33/12	21 (16)	0 (-)	48 (32)	39 (-)	164 (205)	59 (27)
* CS tras la estimulación secundaria <i>in vitro</i> / CS tras la estimulación primaria <i>in vivo</i>						

Tabla 16.- Distribución de las CS de anticuerpos frente al VDEP tras la estimulación secundaria *in vitro* en los diferentes tejidos de los lechones inoculados y desafiados con la variante no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP.

En los ganglios linfáticos mesentéricos, en el día 7 postdesafío, aumentó tanto el número total de CS detectadas tras la estimulación *in vitro* como su proporción respecto a las registradas antes de la estimulación para ambos tipos de inmunoglobulinas. Sorprendentemente en el día 12 no se detectó ninguna respuesta de CS de IgA.

En el bazo, el número de CS tanto de IgG como de IgA disminuyó progresivamente a partir del día 4 postdesafío. También en la sangre el número de CS de IgG disminuyó desde el día 4, mientras que la cantidad de CS de IgA detectadas fue mayor en los días posteriores.

Cuando comparamos las cantidades relativas de CS de IgG respecto a las de IgA tras la estimulación *in vitro*, la situación fue similar a lo que ocurría tras la inoculación inicial. En los tejidos vinculados al sistema inmune sistémico la respuesta claramente predominante fue la de CS de IgG, siendo su número superior al de CS de IgA entre 1,2 y 3 veces en el bazo y entre 3 y 19 en la sangre. Sin embargo, en los ganglios linfáticos mesentéricos en el día 7 fue mayor la respuesta de IgA y el máximo valor del coeficiente IgG/IgA (1,57) que se produjo en este tejido a lo largo de todo el experimento fue entre 2 y 12 veces inferior al registrado en el bazo y la sangre el mismo día. De la misma manera, en los ganglios mesentéricos, el incremento en el número de CS tras la estimulación *in vitro* respecto al obtenido en las células antes de la estimulación fue

mayor para las CS de IgA que para las de IgG en los días 4 y 7, al contrario de lo que ocurrió en los tejidos sistémicos (salvo en el bazo en el día 7).

DPD	CS IgG/ CS IgA		
	GLM	Bazo	Sangre
4	1,57	3	19
7	0,6	2,3	3
12	-	1,2	3

Tabla 17.- Relación entre el número de CS de IgG y CS de IgA tras la estimulación secundaria *in vitro* en los diferentes tejidos de los lechones inoculados y desafiados con la variante no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP.

4.6.- PROLIFERACIÓN LINFOCITARIA

Esta prueba de proliferación linfocitaria fue realizada con los lechones inoculados con la cepa virulenta y con la dosis baja de la cepa atenuada (grupos 1 y 2), tanto después de la inoculación como tras el desafío, así como para el grupo testigo (grupo 4). Mediante este ensayo se obtenía una medida indirecta de la proliferación de los linfocitos tras una estimulación secundaria *in vitro* con el VDEP.

De la misma manera que ocurría con la prueba anterior, el ensayo de linfoproliferación sólo pudo ser realizado sobre las células extraídas de los ganglios linfáticos mesentéricos, el bazo y la sangre, debido a los problemas de contaminación ya mencionados, que en este caso, además de afectar a la viabilidad de las células originaban problemas de inespecificidad.

En las tablas 26 a 28 del apéndice 2 se reflejan los valores medios de cpm así como las desviaciones estándar obtenidas para cada tejido y cada día, al estimularlos con el antígeno positivo, con el antígeno negativo y con el mitógeno (testigo positivo).

Para corregir los problemas de proliferación individual inespecífica, para cada muestra se calculó el índice de estimulación (IE) como el cociente entre las cpm obtenidas al incubar la muestra con el antígeno vírico y las cpm obtenidas al incubarlo

con el antígeno negativo. Posteriormente se calcularon los IE medios para cada tejido en cada día postinoculación o postdesafío y para cada grupo.

Los valores medios de cpm debidas a la proliferación inespecífica, observados al incubar las muestras con el antígeno negativo, fueron bajos en los ganglios linfáticos mesentéricos y en la sangre, tejidos en los que generalmente no se superaron las 4.000 cpm. En el bazo, sin embargo, estas cpm inespecíficas fueron más altas.

Los valores tanto de las cpm como del IE obtenidos para los animales del grupo 5, que fueron sacrificados sin haber sido tratados previamente con ninguna de las formas del VDEP, fueron utilizados como valores de referencia de lo que correspondería a la respuesta basal, inespecífica, que es la que tendría lugar en el día 0 de cualquiera de los grupos inoculados.

4.6.1.- Respuestas de proliferación linfocitaria específica frente al VDEP tras la inoculación

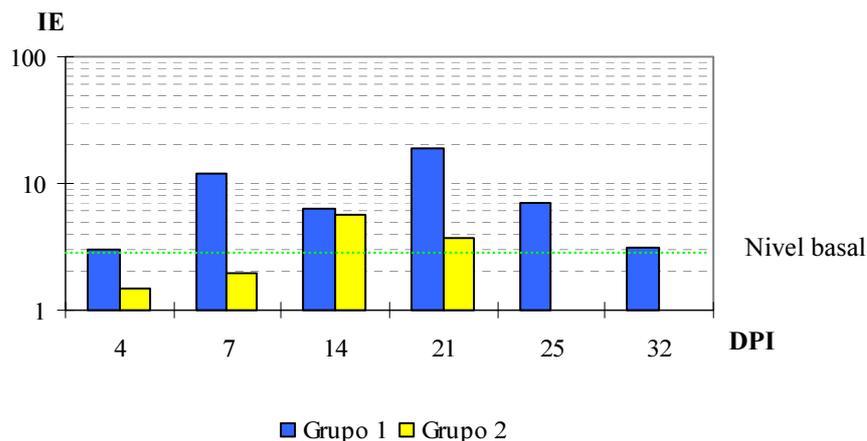
4.6.1.1.- Ganglios linfáticos mesentéricos

Grupo 1

Los animales del grupo 1 mostraron en los ganglios linfáticos mesentéricos una proliferación específica frente al VDEP a partir del día 4 postinoculación. Desde este día y hasta el día 25, el IE obtenido en este tejido fue significativamente superior al del grupo de testigos no inoculados. Como se muestra en la gráfica 16, a partir del día 4 el IE fue aumentando gradualmente, hasta alcanzar el valor máximo (18,82) en el día 21. A partir de ese día el IE disminuyó hasta que, finalmente, en el día 32 postinoculación los valores ya no fueron significativamente superiores a los obtenidos en los animales no inoculados (grupo 5).

Grupo 2

En el grupo 2 también en los ganglios linfáticos mesentéricos el IE se mantuvo en los niveles basales hasta el día 14. Sin embargo, entre los días 7 y 14 se produjo un incremento, alcanzándose el valor máximo del índice para este órgano (5,73) en el día 14. Tanto en este día como en el 21, el IE fue significativamente mayor que el valor basal medido en los animales que no habían contactado con el virus (grupo 5).



Gráfica 16.- Valores del índice de estimulación (IE) obtenidos en los ganglios linfáticos mesentéricos de los animales inoculados con las variantes adaptada y no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP. (DPI: días postinoculación).

Al comparar la evolución entre ambos grupos, el IE del grupo 1, en cualquiera de los días, fue superior al del grupo 2, aunque esta diferencia sólo alcanzó significación estadística en el día 4 postinoculación ($p=0,01$).

4.6.1.2.- Bazo

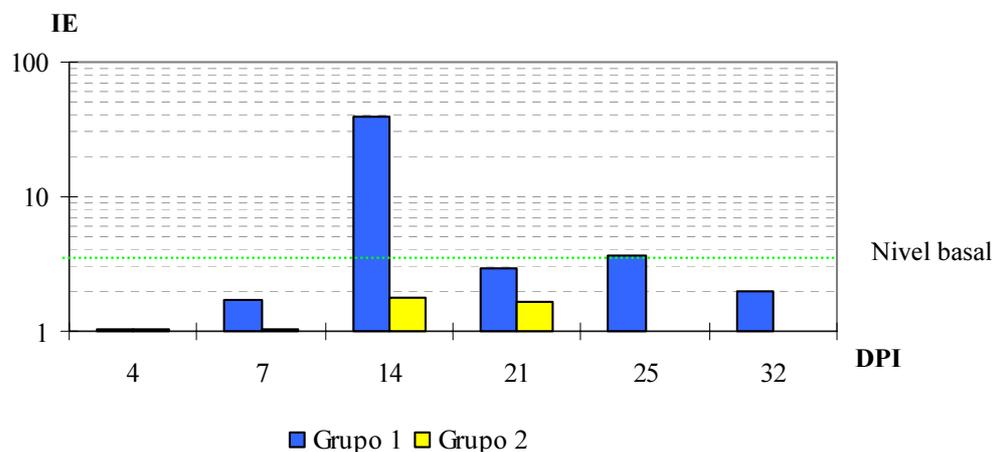
Grupo 1

En el bazo, la respuesta de linfoproliferación mostrada por los lechones del grupo 1 durante los días 4 y 7 fue muy baja, similar a la de los animales no inoculados (Gráfica 17). En el día 14 se produjo un fuerte incremento en esta respuesta alcanzando un valor del IE de 27,24. En los días posteriores este índice disminuyó, aunque siguió siendo superior al de los lechones sin tratar hasta el día 25. Sorprendentemente, éste fue el único día en el que la diferencia encontrada respecto al IE medido en los animales del grupo 5 mostró significación estadística ($p=0,02$).

Grupo 2

En los animales del grupo 2 no se encontró una respuesta de linfoproliferación específica frente al virus, manteniéndose siempre el valor del IE en los niveles correspondientes a una respuesta inespecífica e incluso por debajo del valor basal obtenido para los animales que no habían tenido contacto previo con el VDEP.

Cuando se compararon las respuestas obtenidas en el bazo entre los dos grupos, se encontraron diferencias significativas en los días 4, 7 y 21, aunque no en el 14, día en el que se alcanzó el máximo valor para el IE en el grupo 1.



Gráfica 17.- Valores del índice de estimulación (IE) obtenidos en el bazo de los animales inoculados con las variantes adaptada y no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP.

4.6.1.3.- Sangre

Grupo 1

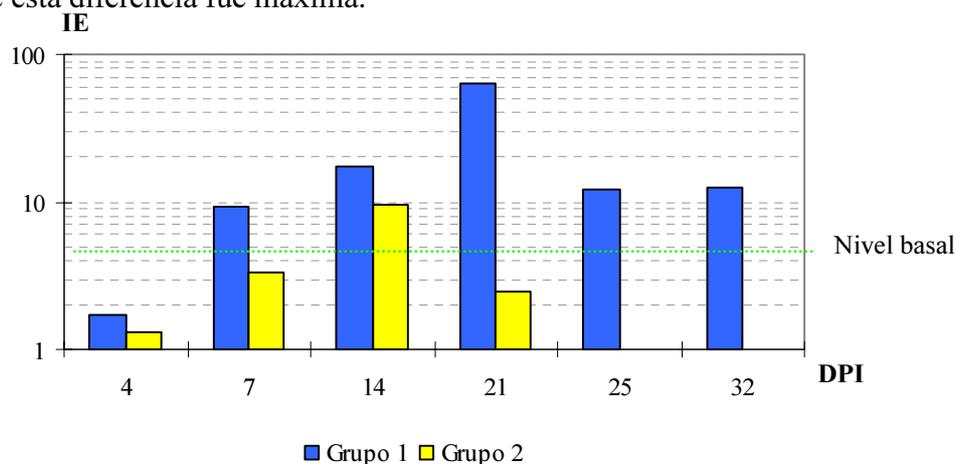
La respuesta de linfoproliferación observada en la sangre en el grupo 1 fue significativamente superior a la obtenida en los animales no tratados a partir del día 14 y hasta el día 25 postinoculación, a pesar de que los IE también fueron considerablemente elevados en los días 7 y 32. En este grupo, el IE experimentó incrementos significativos en los días 4, 7 y 14 para finalmente alcanzar el máximo en el día 21. Entre ese día y el día 25 se produjo una disminución del IE, que se mantuvo en valores similares el día 32.

Grupo 2

En el grupo inoculado con la cepa atenuada sólo se obtuvo una respuesta específica de proliferación linfocitaria el día 14, en el que el IE (9,58) fue significativamente superior al de los animales no inoculados ($p < 0,001$).

Nuevamente, cuando se compararon entre sí las repuestas obtenidas en los dos grupos se observó que el IE del grupo 1 entre los días 7 y 21 fue superior, entre 3 y 23

veces, al del grupo 2, aunque la diferencia sólo fue significativa en el día 21 ($p= 0,01$), día en que esta diferencia fue máxima.



Gráfica 18.- Valores del índice de estimulación (IE) obtenidos en la sangre de los animales inoculados con las variantes adaptada y no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP.

4.6.2.- Respuestas de proliferación linfocitaria específica frente al VDEP tras el desafío

Tras someter a los animales de los grupos 1 y 2, así como al grupo testigo (grupo 4), al desafío con la cepa virulenta del VDEP, se estudiaron, igual que tras la inoculación, las respuestas específicas de proliferación linfocitaria tras la estimulación secundaria *in vitro*.

4.6.2.1.- Ganglios linfáticos mesentéricos

Grupo 1

En el grupo 1, en los ganglios linfáticos mesentéricos se produjo un importante incremento tras el desafío y los valores del IE fueron siempre significativamente superiores a los de los animales no inoculados (grupo 5). El incremento tras el desafío no fue inmediato y en el día 4 el IE fue incluso inferior al del día 21 postinoculación (día del desafío) aunque la diferencia no fue significativa. Sin embargo, a partir de este día 4 se produjo un incremento, alcanzándose en el día 7 el valor máximo del IE en este tejido (29,25) (Gráfica 19), muy superior al máximo alcanzado tras la inoculación (18,82). En el día 12 postdesafío la respuesta encontrada también fue alta y significativamente más elevada que la obtenida en los animales del mismo grupo no sometidos al desafío.

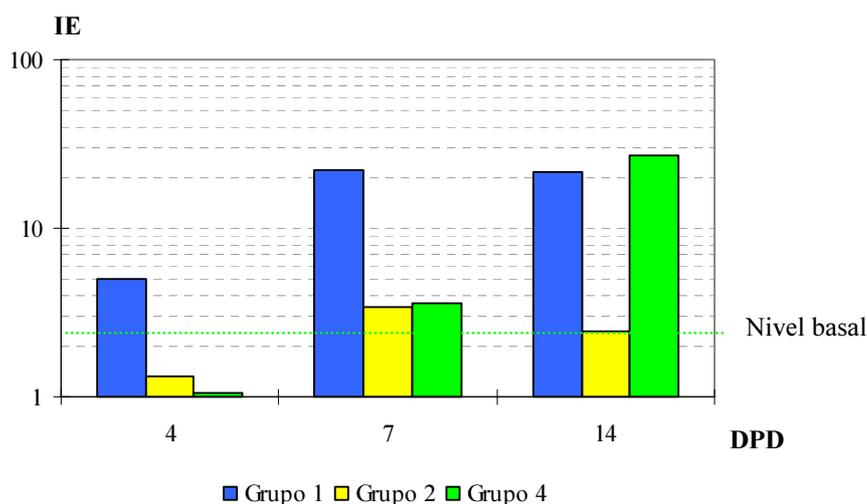
Grupo 2

En el grupo 2 la respuesta de linfoproliferación observada tras el desafío fue bastante baja con un valor máximo del IE de 3,40 en el día 7, único día en el que este índice fue significativamente mayor que el observado en los animales no tratados.

Grupo 4

En el grupo testigo, en el que los animales no fueron inoculados pero si sometidos al desafío en las mismas condiciones que los animales de los grupos 1 y 2, la evolución de la respuesta de linfoproliferación fue similar a la descrita tras la inoculación del grupo 1 pero de mayor magnitud. Esta respuesta fue significativamente superior a la de los animales sin tratar en los días 7 y 12, siendo en este último día cuando se alcanzó el máximo valor para ese índice.

Cuando se compararon estadísticamente los valores de los IE obtenidos cada día en los ganglios linfáticos mesentéricos, se observó que en el día 4 postdesafío el valor medido en el grupo 1 fue significativamente superior a los de los otros dos grupos. En cambio no fueron significativas las diferencias entre los grupos 2 y 4. En el día 7 postdesafío ninguna de las diferencias observadas tuvo significación estadística mientras que en el día 12 los IE de los grupos 1 y 4 fueron significativamente superiores al del grupo inoculado con la cepa atenuada.



Gráfica 19.- Valores del índice de estimulación (IE) obtenidos en los ganglios linfáticos mesentéricos tras el desafío con la variante no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP de los animales de los diferentes grupos.

4.6.2.2.- Bazo

Grupo 1

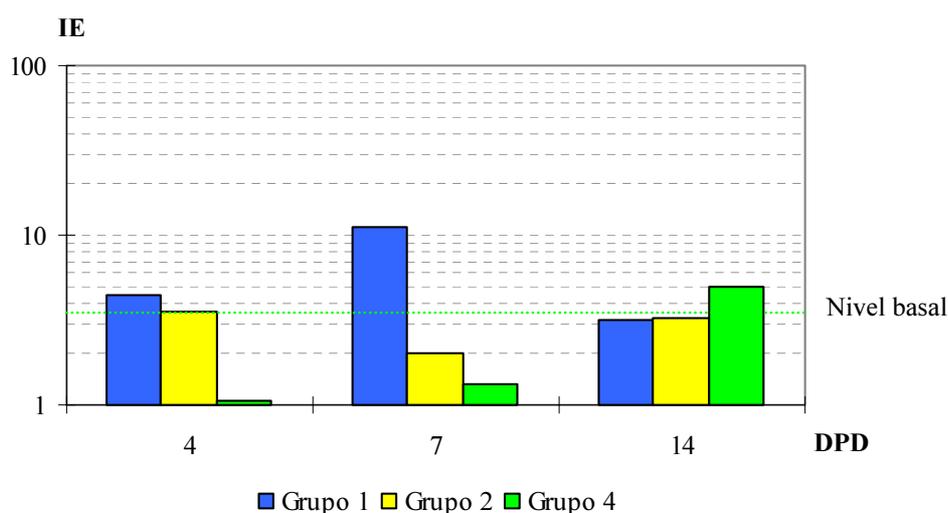
La respuesta de linfoproliferación detectada en el bazo tras el desafío en el grupo 1 mostró un fuerte incremento entre los días 4 y 7, alcanzando su máximo valor en el día 7, de forma semejante a lo descrito en los ganglios linfáticos mesentéricos. Posteriormente el valor del IE disminuyó, llegando a los valores de base en el día 12. No fueron significativas las diferencias entre las respuestas de estos animales y las detectadas los mismos días en los animales de este grupo que no habían sido sometidos al desafío.

Grupo 2

En este tejido, en el grupo 2 se observó la máxima respuesta de linfoproliferación específica frente al VDEP en el día 4 postdesafío, con un valor medio del IE de 4,60, significativamente superior al de los animales sin tratar ($p= 0,001$). Sin embargo, los días restantes el valor de este índice disminuyó, siendo incluso en el día 7 inferior a los valores considerados como base.

Grupo 4

En el grupo 4 sólo se detectó proliferación linfocitaria específica frente al VDEP en el día 12.



Gráfica 20.- Valores del índice de estimulación (IE) obtenidos en el bazo tras el desafío con la variante no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP de los animales de los diferentes grupos.

Cuando se compararon estadísticamente los valores de los IE obtenidos para el bazo en cada uno de los grupos tras el desafío no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los días 4 y 7.

4.6.2.3.- Sangre

Grupo 1

En la sangre, tras el desafío la respuesta de proliferación linfocitaria detectada en el grupo 1 fue baja en el día 4 y, como sucedió en los ganglios linfáticos mesentéricos, el IE fue inferior al medido en los animales del mismo grupo no sometidos al desafío. Sin embargo, esta respuesta experimentó un fuerte incremento entre los días 4 y 7 y un segundo aumento más intenso entre los días 7 y 12, alcanzándose un valor máximo del IE de 54,09. A pesar de que el valor del IE fue superior al considerado como valor basal, esa diferencia sólo tuvo significación estadística en el día 12. Además, en ese día el IE fue también significativamente mayor que el que se obtuvo en el día 32 postinoculación en los animales de este mismo grupo no sometidos al desafío.

Grupo 2

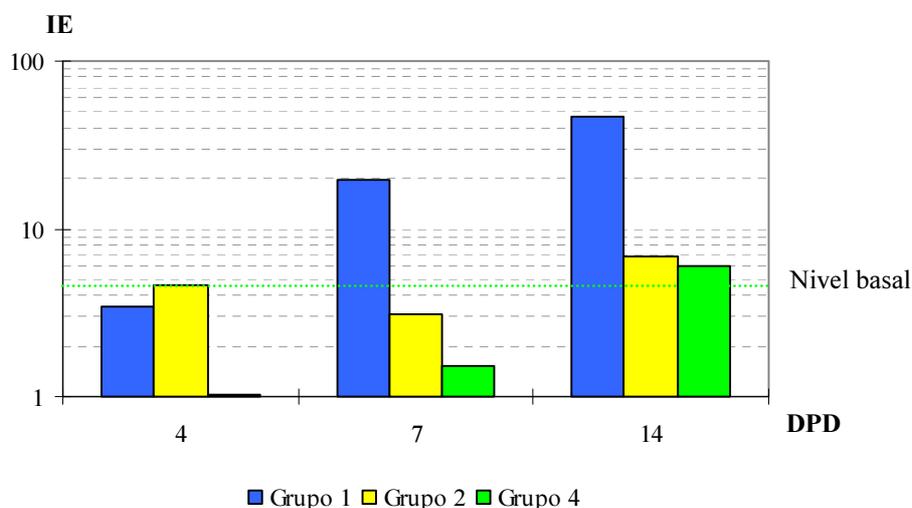
En el grupo 2 la respuesta detectada en la sangre tras el desafío fue moderadamente baja, alcanzándose el máximo valor del IE en el día 12, único día en el que este valor fue significativamente superior al valor medio obtenido en los animales no tratados ($p=0,01$).

Grupo 4

En el grupo 4 la proliferación celular específica frente al VDEP fue muy baja durante los días 4 y 7 y similar a la obtenida en los animales sin inocular. El IE aumentó en el día 12, aunque el valor alcanzado no fue significativamente superior al considerado como basal.

Cuando se compararon los valores del IE entre los tres grupos, se observó que tras el desafío la mayor respuesta correspondió al grupo 1, aunque sólo fue significativamente más elevada respecto a los grupos 2 y 4 en el día 12 ($p<0,001$ y $p=0,004$ respectivamente). Entre los grupos 2 y 4, en los que el IE más alto

correspondió siempre al grupo 2, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

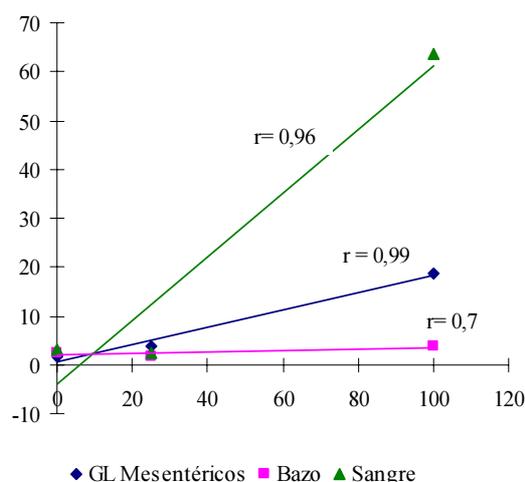


Gráfica 21.- Valores del índice de estimulación (IE) obtenidos en la sangre tras el desafío con la variante no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP de los animales de los diferentes grupos.

4.6.3.- Correlaciones

Utilizando el coeficiente de correlación lineal de Pearson tratamos de establecer la posible relación entre el grado de protección de cada grupo frente al desafío con el virus virulento y la respuesta de linfoproliferación detectada en el día del desafío en cada uno de los tejidos. El grado de protección fue representado por la tasa de protección frente a la infección, o lo que es lo mismo como el porcentaje de animales que no eliminó virus en las heces después del desafío. Como medida de la respuesta de linfoproliferación se utilizó el IE.

La magnitud de la respuesta de linfoproliferación mostró una correlación positiva con el grado de protección frente al desafío en todos los tejidos, si bien en ninguno de los casos mostró significación estadística. La correlación más alta se obtuvo con la respuesta de linfoproliferación mostrada por los ganglios linfáticos mesentéricos ($r=0,99$). Esta relación fue también la que presentó un mayor nivel de significación estadística ($p=0,08$).



Gráfica 22.- Correlaciones entre las respuestas de linfoproliferación obtenidas en los diferentes tejidos de animales inoculados con las variantes adaptada y no adaptada al cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP y la protección desarrollada frente al desafío con el virus de campo.

4.7.- ANTICUERPOS FRENTE AL VDEP EN EL SUERO SANGÜÍNEO

4.7.1.- ELISA de bloqueo

Mediante el ELISA de bloqueo se comprobó la aparición de anticuerpos específicos frente al VDEP en los distintos grupos, tanto después de la inoculación como tras el desafío. Este ELISA determina la existencia de anticuerpos frente al virus independientemente de su isotipo, lo que permite detectar la seroconversión de los animales antes que con cualquiera de las otras técnicas inmunoenzimáticas utilizadas.

En la tabla 18 se muestran resumidos los porcentajes de seroconversión en los diferentes grupos tras la inoculación con las distintas cepas del VDEP.

En el grupo inoculado con la cepa virulenta, en el día 4 postinoculación ya se detectaron anticuerpos frente al VDEP en el 52,3 % de los animales. Esta proporción aumentó hasta el 95 % en el día 7 hasta que finalmente en el día 12 todos los animales del grupo habían seroconvertido.

En los lechones inoculados con el virus atenuado, al igual que en los anteriores, se produjo la seroconversión de todos los animales. En el grupo 2, inoculado con la

dosis baja, en los días 4 y 7 se detectaron anticuerpos en el 40 y 46 % respectivamente de los animales y en el día 12 en el 100 %. En el tercer grupo, inoculado con la dosis alta del mismo inóculo vírico, en el día 4 no se detectaron anticuerpos, pero en el día 7, el 77,7 % de los lechones había seroconvertido y en el día 14 eran positivos el 100 % (no se tomaron muestras de sangre en el día 12).

Grupo	Inóculo	% de animales con anticuerpos frente al VDEP		
		4 DPI	7 DPI	12/14 DPI
1	Cepa virulenta	52,3	95	100
2	Cepa atenuada (D. baja)	40	46	100
3	Cepa atenuada (D. alta)	0	77	100

Tabla 18.- Seroconversión frente al VDEP medida por ELISA de bloqueo tras la inoculación con las variantes adaptada y no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP.

4.7.2.- ELISA de isotipos para anticuerpos frente al VDEP

Sobre las muestras de suero en las que se había detectado la presencia de anticuerpos frente al VDEP se realizaron distintas pruebas ELISA para la detección por separado de los dos isotipos principales de inmunoglobulinas, IgG e IgA. Se emplearon tres pruebas que, basadas en diferentes antígenos para el tapizado de las placas, permitían detectar anticuerpos dirigidos frente a cualquiera de las proteínas estructurales del virus (MAC- ELISA) o preferentemente frente a las proteínas S (S-ELISA) o N (N-ELISA) del VDEP.

Las muestras fueron tituladas realizando diluciones dobles seriadas y el título se expresó como el inverso de la dilución máxima con resultado positivo. Para el cálculo del TMG los títulos fueron codificados como se describe en el correspondiente apartado del material y métodos (3.13) y para facilitar tanto el análisis de los datos como su representación gráfica, se asignó a las muestras negativas el título de 1:10 (título codificado como 0).

4.7.2.1.- MAC ELISA

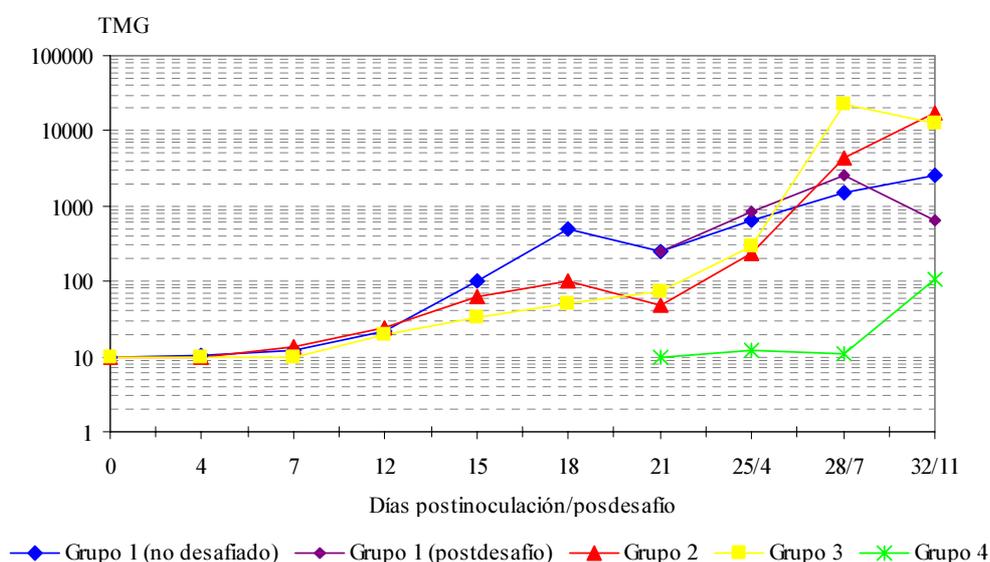
Este ELISA fue utilizado para la detección de anticuerpos, de las clases IgG e IgA, frente a cualquiera de los determinantes antigénicos del VDEP, ya que utiliza como antígeno el virus completo.

Anticuerpos de la clase IgG

La evolución de los TMG de IgG en los distintos grupos se muestra en la gráfica 23. En el grupo 1 comenzó a elevarse significativamente a partir del día 12 postinoculación, alcanzándose el valor máximo en el 32, último día medido en los animales de este grupo que no fueron sometidos al desafío.

En el grupo 2 el TMG de IgG se elevó significativamente a partir del día 4 y hasta el 18, en que se detectó el valor máximo (100,8).

En el grupo 3 no se detectaron IgG frente al VDEP mediante esta técnica hasta el día 12, aunque a partir de ese día el TMG aumentó hasta alcanzar el valor máximo en el día 21 (74,1).



Gráfica 23.- TMG de IgG sérica medidos mediante MAC-ELISA en los diferentes grupos de animales inoculados con las variantes adaptada y no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP y desafiados con el virus de campo en el día 21 postinoculación.

Cuando comparamos los valores máximos alcanzados en cada grupo entre los días 0 y 21, se comprobó que el valor alcanzado por el grupo 1 en el día 18 fue

significativamente mayor que los de los grupos 2 ($p=0,001$) y 3 ($p=0,002$). No se encontró significativa sin embargo, la diferencia entre los máximos TMG alcanzados por los dos grupos inoculados con la cepa del virus atenuada (grupos 2 y 3).

Tras el desafío de los animales del grupo 1 la evolución seguida por el TMG de IgG fue prácticamente igual a la descrita para los animales no desafiados de este mismo grupo. Los valores máximos fueron muy similares en ambos casos (2.650 y 2.560) y no existieron diferencias significativas en los TMG ninguno de los días.

En los grupos 2 y 3, en cambio, tras el desafío se detectó un marcado incremento, con significación estadística, en el TMG. Los títulos máximos se alcanzaron en los días 12 postdesafío para el grupo 2 (17.221) y en el 7 para el grupo 3 (22.988).

En el grupo no inoculado pero sometido al desafío no se produjo una elevación significativa en el TMG hasta el último día del estudio, el día 12, en que alcanzó un valor de 105,6.

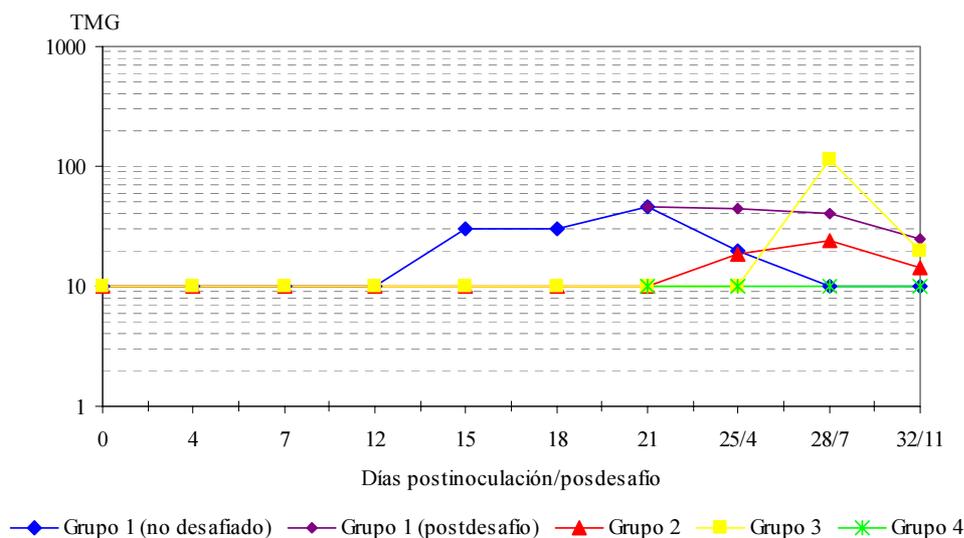
Cuando comparamos estos valores se pudo comprobar que los TMG máximos alcanzados tras el desafío por los grupos inoculados inicialmente con la cepa atenuada eran significativamente mayores que los obtenidos tanto en el grupo 1 como en el grupo 4. Sin embargo, no fue significativa la diferencia existente entre los grupos 2 y 3. También fue significativamente mayor el título máximo alcanzado por el grupo 1 respecto al del grupo 4.

Anticuerpos de la clase IgA

La evolución de los TMG de los distintos grupos se muestra en la gráfica 24.

En el grupo 1 los anticuerpos de la clase IgA se detectaron por primera vez, con esta técnica, en el día 15 postinoculación. El valor más alto del TMG de IgA fue de 45,9 y se alcanzó en el día 21.

En los grupos 2 y 3 durante los 21 días siguientes a la inoculación el nivel de IgA sérica se mantuvo por debajo del límite de detección de la técnica, no encontrándose muestras positivas en ninguno de los animales.



Gráfica 24.- TMG de IgA sérica medidos mediante MAC-ELISA en los diferentes grupos de animales inoculados con las variantes adaptada y no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP y desafiados con el virus de campo en el día 21 postinoculación.

Tras el desafío, el TMG de IgA en el grupo 1 se mantuvo en niveles similares al máximo valor alcanzado tras la inoculación, aunque disminuyó en el día 11.

En los animales del grupo 2 tras el desafío el TMG de IgA aumentó desde niveles negativos hasta alcanzar el máximo valor (23,8) en el día 7.

La evolución del TMG del grupo 3 tras el desafío estuvo marcada por una fuerte subida entre los días 4 y 7, alcanzándose en ese día el título más alto (113,1).

En el grupo 4, los niveles de IgA se mantuvieron por debajo de los límites de detección durante el tiempo que duró el experimento tras el desafío. Esta situación fue idéntica a lo ocurrido en el grupo 1 tras la inoculación, en el que se detectaron anticuerpos de la clase IgA por primera vez en el día 14 postinoculación.

Cuando se compararon los máximos valores de los TMG de IgA de cada grupo se comprobó que el valor alcanzado por el grupo 3 fue significativamente más alto que los de los grupos 1 y 2 ($p=0,05$ y $p=0,004$ respectivamente). Entre los grupos 1 y 2, en cambio, no existieron diferencias significativas. El TMG del grupo de los testigos, como cabía esperar, fue significativamente menor que el de los otros tres grupos.

4.7.2.2.- S-ELISA

Esta técnica fue utilizada para detectar separadamente los anticuerpos de las clases IgA e IgG dirigidos frente a la proteína S del VDEP.

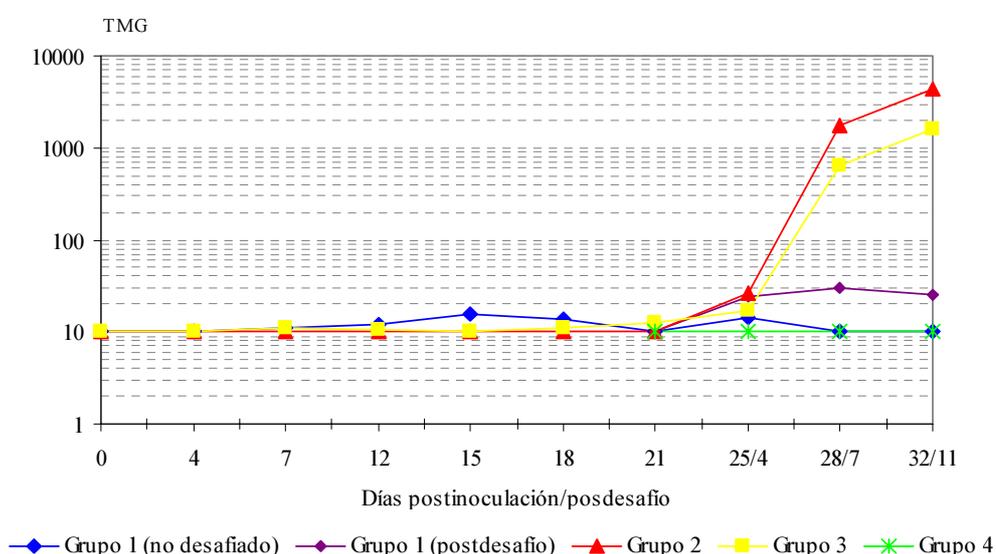
Los TMG de IgG e IgA en los diferentes grupos, tanto tras la inoculación como después del desafío se muestran en las gráficas 25 y 26.

Anticuerpos de la clase IgG específicos frente a la proteína S del VDEP

En el grupo inoculado con el virus virulento se detectó por primera vez la aparición de IgG frente a la proteína S en el día 7. En los días posteriores, el TMG siguió aumentando hasta alcanzar el máximo en el día 15 (15,5). A partir de ese día se produjeron oscilaciones en el TMG hasta que finalmente se hizo negativo en el día 32.

En el grupo 2, durante el periodo siguiente a la inoculación, el nivel de IgG sérica frente a la proteína S se mantuvo por debajo de los límites de detección de la técnica, no encontrándose ninguna muestra positiva.

En cuanto al grupo 3 se detectaron muestras positivas en los días 15 y 21, alcanzándose el valor más alto del TMG en este día 21 (12,3).



Gráfica 25.- TMG de IgG sérica medidos mediante S-ELISA en los diferentes grupos de animales inoculados con las variantes adaptada y no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP y desafiados con el virus de campo en el día 21 postinoculación.

Tras el desafío de los animales en el día 21 el TMG de IgG frente a la proteína S en el grupo 1 aumentó ligeramente, siendo el valor más alto el del día 7 (30,3).

La evolución del TMG de IgG en los dos grupos inoculados con la cepa atenuada fue similar entre sí, pero completamente distinta a la descrita para el grupo 1. A partir del día 4 postdesafío se produjo una subida muy intensa del TMG, detectándose los mayores valores en el último día del estudio (4.305 en el grupo 2 y 1.612 en el grupo 3). Ambos valores fueron significativamente más elevados que el máximo alcanzado por el grupo 1 ($p < 0,001$ y $p = 0,003$), aunque la diferencia entre ellos no fue significativa.

En el grupo de los testigos no se detectaron IgG frente a la proteína S en los 12 días siguientes al desafío.

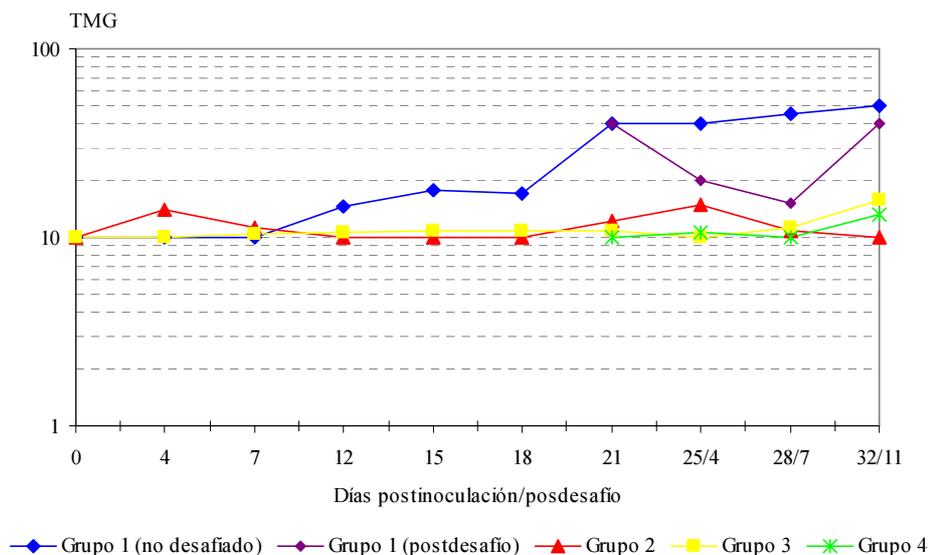
Anticuerpos de la clase IgA específicos frente a la proteína S del VDEP

Tras la inoculación, en el grupo 1 comenzó a detectarse este tipo de anticuerpos en el día 12 y a partir de ese momento el TMG aumentó hasta alcanzar el máximo en el 32 (50,4).

En el grupo 2 se produjo una subida inicial del TMG de IgA en el día 4 postinoculación, aunque posteriormente bajó hasta niveles negativos que se mantuvieron entre los días 12 y 18 para subir nuevamente en el día 21.

El TMG en el grupo 3 se mantuvo bajo durante todo el periodo siguiente a la inoculación, aunque siempre con valores positivos.

El valor máximo alcanzado por el grupo inoculado con la cepa virulenta en los primeros 21 días después de la inoculación fue significativamente superior al de los dos grupos inoculados con el virus atenuado. La diferencia entre los valores de estos dos grupos, en cambio, no tuvo significación estadística.



Gráfica 26.- TMG de IgA sérica medidos mediante S-ELISA en los diferentes grupos de animales inoculados con las variantes adaptada y no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP y desafiados con el virus de campo en el día 21 postinoculación.

Después del desafío el TMG de IgA frente a la proteína S en el grupo 1 disminuyó inicialmente, aunque aumentó nuevamente en el día 12. Sin embargo, el valor alcanzado en ese día fue un poco menor, aunque no significativamente, que el correspondiente al mismo día en los animales de este grupo que no fueron sometidos al desafío.

En los dos grupos inoculados con el virus atenuado no se produjo en ningún caso un incremento fuerte y significativo del TMG de IgA frente a la proteína S tras el desafío. Los valores máximos se produjeron en el día 4 para el grupo 2 y en el día 12 para el grupo 3 y estos valores fueron de 15 y 15,8 respectivamente. La diferencia entre los máximos de estos dos grupos no fue significativa, como tampoco lo fue la diferencia entre el valor máximo del TMG del grupo 1 y el del grupo 3. Por el contrario, fue significativamente más alto el valor máximo del grupo 1 respecto al del grupo 2.

En el grupo de los testigos se detectó por primera vez la existencia de IgA frente a la proteína S del VDEP en el día 12 postdesafío, con un TMG de 13,2. Este valor fue significativamente inferior al máximo del grupo 1 tras el desafío, pero no al de los grupos 2 y 3.

4.7.2.3.- N-ELISA

Para detectar los anticuerpos de las clases IgA e IgG frente a la proteína de la nucleocápside del VDEP se utilizó otra técnica de ELISA, que sólo se diferencia de la anterior en el antígeno de tapizado. Los TMG tanto de IgG como de IgA detectados frente a esta proteína se muestran en las gráficas 27 y 28.

Anticuerpos de la clase IgG frente a la proteína N del VDEP.

En el grupo inoculado con la cepa virulenta, la detección de IgG frente a la proteína N comenzó el día 15 postinoculación. El nivel de estos anticuerpos continuó aumentando hasta alcanzar el pico en el día 26, con un TMG de 320.

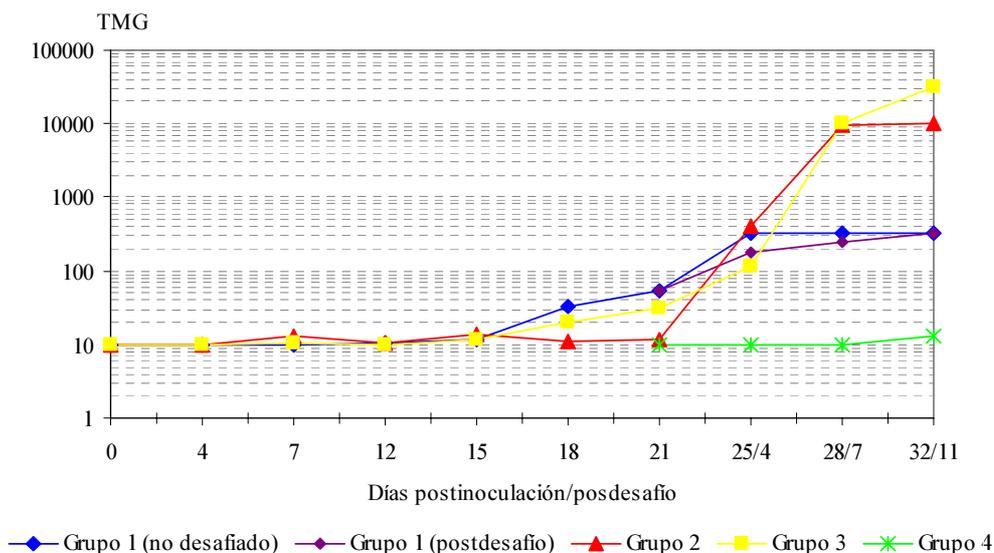
En el grupo 2 la presencia de IgG fue irregular durante el periodo postinoculación, manteniéndose en niveles muy bajos hasta después del desafío.

La IgG frente a la proteína N se detectó en el grupo 3 a partir del día 15 postinoculación y el TMG fue aumentando progresivamente, hasta alcanzar el máximo (30,3) en el día 21.

El valor máximo del TMG del grupo 1 en los días posteriores a la inoculación fue significativamente más alto que el del grupo 2, aunque no lo fue respecto al del grupo 3. Cuando se compararon los dos grupos inoculados con la cepa atenuada entre sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas, siendo superior el valor en el grupo 3.

Tras el desafío con el virus virulento en los animales del grupo 1 se produjo un aumento en el TMG, aunque fue equiparable al que se observó en los lechones de este mismo grupo no sometidos al desafío.

Esta situación fue diferente para los grupos inoculados con el virus atenuado, ya que se produjeron fuertes incrementos en el TMG tras el desafío, alcanzándose los títulos más elevados en el día 12 postdesafío, 10.240 y 32.510 respectivamente para el grupo 2 y 3. Ambos valores fueron significativamente superiores al máximo del grupo 1 aunque no se encontró una diferencia significativa entre ellos.



Gráfica 27.- TMG de IgG sérica medidos mediante N-ELISA en los diferentes grupos de animales inoculados con las variantes adaptada y no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP y desafiados con el virus de campo en el día 21 postinoculación.

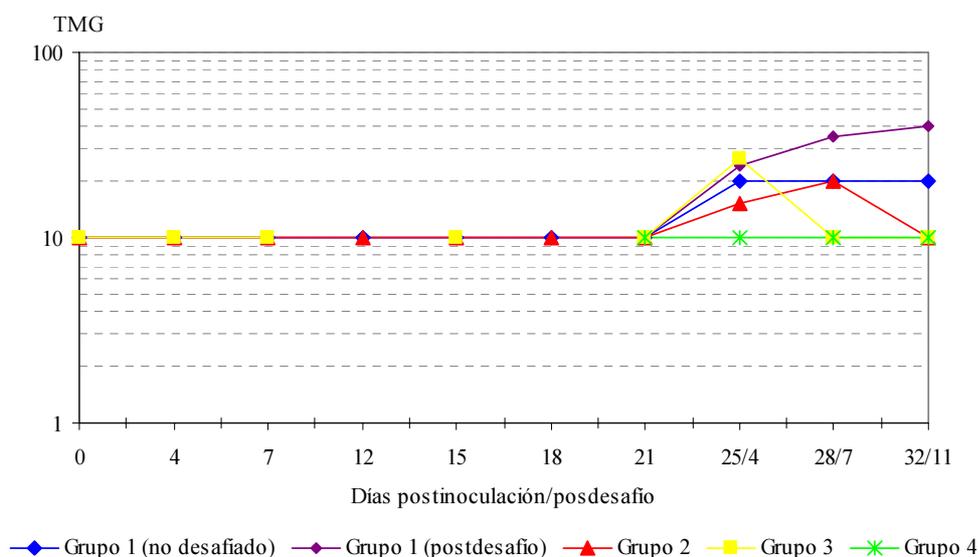
En el grupo de los testigos sólo se detectaron IgG frente a la proteína N en el día 12 siendo el TMG ese día significativamente inferior al de los otros tres grupos.

Anticuerpos de la clase IgA frente a la proteína N del VDEP

Tras la inoculación de los distintos grupos de animales, los niveles de IgA en los tres grupos frente a la proteína N estuvieron por debajo de los límites de detección de la técnica hasta el día 21 y sólo se detectó un aumento en el TMG de este tipo de anticuerpos en los días 25 y 32 en el grupo 1.

En los animales de este grupo tras el desafío el TMG aumentó progresivamente, alcanzando el valor máximo (40) en el último día del experimento, siendo superior al TMG detectado en ese mismo día en los animales sin desafiar del mismo grupo.

En los grupos 2 y 3, se produjo una subida en el TMG en los días inmediatamente posteriores al desafío, siendo más pronunciada en el grupo 3. En este grupo se alcanzó el TMG máximo en el día 4 con un valor de 26,4. En el grupo 2, en cambio, el valor máximo (20) fue alcanzado en el día 12. Posteriormente los TMG de ambos grupos descendieron hasta niveles de negatividad.



Gráfica 28.- TMG de IgA sérica medidos mediante N-ELISA en los diferentes grupos de animales inoculados con las variantes adaptada y no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP y desafiados con el virus de campo en el día 21 postinoculación.

En ninguno de los casos fueron significativas las diferencias encontradas entre los máximos TMG de los tres grupos.

En el grupo de los testigos los niveles de IgA frente a la proteína N fueron inferiores a los límites de detección de esta técnica, como ocurrió tras la inoculación del grupo 1.

4.7.3.- Correlaciones

Mediante el coeficiente de correlación de Spearman tratamos de establecer las posibles relaciones entre los TMG de cada tipo de anticuerpos frente al VDEP que cada grupo presentó en el día del desafío y el grado de protección.

	Protección	
	IgG	IgA
MAC-ELISA	1,0	0,77
S-ELISA	0,2	0,8
N-ELISA	1,0	-

Tabla 19.- Coeficientes de correlación de Spearman entre el grado de protección y el TMG de anticuerpos frente al VDEP medido por las diferentes técnicas de ELISA de isotipos.

Se encontró una fuerte correlación positiva entre el grado de protección frente a la infección por el VDEP y la presencia en la sangre de anticuerpos de la clase IgG, tanto frente al virus completo como frente a la proteína N, aunque no frente a la proteína S. También fue alta la correlación encontrada entre la protección y la presencia de IgA dirigidas frente a la proteína S o frente al virus completo. Sin embargo, no existió correlación con las IgA detectadas frente a la proteína N.

De la misma manera, estudiamos la posible relación entre los TMG de anticuerpos frente al virus y el número de CS de anticuerpos específicos detectadas en la sangre en el mismo día. Los coeficientes de correlación encontrados en ambos casos aparecen reflejados en la tabla 20.

	CS de anticuerpos	
	IgG	IgA
MAC-ELISA	0,86	0,77
S-ELISA	0,0	0,82
N-ELISA	0,89	0,25

Tabla 20.- Coeficientes de correlación de Spearman entre el número de CS de anticuerpos detectadas en la sangre en el día 21 postinoculación y el TMG de anticuerpos frente al VDEP medido por las diferentes técnicas de ELISA de isotipos en ese mismo día.

La correlación entre los TMG y el número de CS de anticuerpos frente al VDEP en la sangre fue alta tanto para las IgG como para las IgA cuando se empleó el MAC-ELISA. Cuando se utilizaron las técnicas específicas para cada proteína sólo se detectó correlación entre las CS de IgA y el TMG de IgA por S-ELISA y las CS de IgG y el TMG de IgG por N-ELISA.

APÉNDICE 2

DPI	Duodeno						Íleon						GL Mesentéricos						
	IgM		IgA		IgG		IgM		IgA		IgG		IgM		IgA		IgG		
	CS	SD	CS	SD	CS	SD	CS	SD	CS	SD	CS	SD	CS	SD	CS	SD	CS	SD	
GRUPO 1																			
4	4,2	4,2	0	0	0	0	3,6	3,3	0	0	0	0	0,25	0,4	0	0	0	0	
7	0	0	3,8	5,4	0	0	0,8	1,1	0	0	0	0	2,3	3,3	0	0	0	0	
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
21	0	0	2,6	2,6	23,5	19,3	0	0	0	0	3,4	3,5	0	0	1,1	1,4	2,7	1,9	
25	0	0	0,4	0,6	6,6	1,9	0	0	0,1	0,2	10,8	5,5	0	0	0	0	4,6	3,3	
32	0	0	0	0	3,4	2,2	0	0	0	0	2,5	2,1	0	0	0,4	0,4	5,1	4,3	
GRUPO 2																			
4	0	0	0	0	0,4	0,4	0	0	0	0	0,2	0,2	0	0	0	0	0	0	
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0,25	0	0	0,75	0,75	
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1,5	0,5	
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,75	0,75	0,5	0,5	
GRUPO 3																			
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
7	0	0	0	0	0,3	0,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
21	0	0	0	0	4,5	0,5	0	0	0	0	2,2	1,2	0	0	0	0	2,1	1,1	

Tabla 21.- Número medio de CS de anticuerpos (por 5×10^5 CMN) y desviaciones estándar (SD) detectadas en los tejidos linfoides asociados al tracto gastrointestinal en los animales de los diferentes grupos inoculados con las variantes adaptada y no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP.

DPI	Bazo						Sangre						
	IgM		IgA		IgG		IgM		IgA		IgG		
	CS	SD	CS	SD	CS	SD	CS	SD	CS	SD	CS	SD	
GRUPO 1													
4	0,6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0,3	0,4	0	0	0	0	0,6	0,9	0	0	0	0	0
14	0	0	0,5	0,5	0	0	0,2	0,2	0,5	0,5	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0,6	0,5	0,1	0	0
25	0	0	0	0	2,9	2,9	0	0	0,4	0,6	2,2	2,3	0
32	0	0	0	0	3,2	2	0	0	0,5	0,8	1,2	1,3	0
GRUPO 2													
4	7,3	7,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	1,5	1	0,25	0,25	0	0	0,2	0,2	0,2	0,2	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2	0,2	0,5	0	0
21	0	0	0	0	8,1	7,3	0	0	0	0	0	0	0
GRUPO 3													
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0,3	0	0

Tabla 22.- Número medio de CS de anticuerpos (por 5×10^5 CMN) y desviaciones estándar (SD) detectadas en los tejidos linfoides sistémicos de los animales de los diferentes grupos inoculados con las variantes adaptada y no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP.

Resultados

DPD	Duodeno						Íleon						GL Mesentéricos						
	IgM		IgA		IgG		IgM		IgA		IgG		IgM		IgA		IgG		
	CS	SD	CS	SD	CS	SD	CS	SD	CS	SD	CS	SD	CS	SD	CS	SD	CS	SD	
GRUPO 1																			
4	0	0	1,7	3	34,5	15,6	0	0	0,2	0,2	6,6	2,9	0	0	0,5	0,6	6,7	3	
7	1,8	2	0,2	0,4	18,1	18,4	2	3,1	0,1	0,2	7,6	8,3	1,1	1,2	1	1,2	6,5	5,8	
12	0	0	1	1,4	9,3	4	0	0	1,3	1	1,2	0,9	0	0	0,2	0,2	1,3	1,8	
GRUPO 2																			
4	0	0	0	0	4,3	5,8	0	0	0	0	0,6	0,6	0	0	1,2	2,2	49	67,4	
7	0	0	0	0	36,2	49	0	0	0	0	0,6	0,4	0	0	1,9	2,7	8,8	10,4	
12	1	1,8	42,5	73,6	42,5	69	1,7	3	0	0	2,5	1,6	0,1	0,2	0,1	0,2	17,5	28,8	
GRUPO 3																			
4	0	0	0,7	0,7	34,2	30	0	0	0	0	0,8	0,7	0	0	1,7	1,7	12,4	10,9	
7	0	0	0	0	0,5	0,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4,7	3,3	
12	0	0	0	0	24,5	12,2	0	0	0	0	0,8	1,1	0	0	0,3	0,4	10,7	8,2	
GRUPO 4																			
4	56,2	71,5	0	0	0,2	0,2	12,2	11,5	0	0	0,1	0,2	8,1	6,7	0	0	0,2	0,4	
7	15,6	9,4	0	0	0,3	0,4	83	131	0,2	0,4	5,9	8,2	31	41,4	1,9	1,8	0,5	0,9	
12	0	0	0,3	0,3	3	3,8	3,2	1,5	0,2	0,2	1,2	0,9	1,5	1,4	1,3	0,4	3,2	1,5	

Tabla 23.- Número medio de CS de anticuerpos (por 5×10^5 CMN) y desviaciones estándar (SD) detectadas en los tejidos linfoides asociados al tracto gastrointestinal de los animales de los distintos grupos tras el desafío con la variante no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP

DPD	Bazo				Sangre								
	IgM		IgA		IgG		IgM		IgA		IgG		
	CS	SD	CS	SD	CS	SD	CS	SD	CS	SD	CS	SD	
GRUPO 1													
4	0	0	0	0	1,7	1,7	0	0	0,7	1,2	3,3	5,7	
7	0,6	1	0,9	0,9	4,2	3	0,2	0,4	1	1	1,3	0,9	
12	0	0	0	0	1,5	2,1	0	0	2,2	1,2	0,8	1,2	
GRUPO 2													
4	0	0	1,7	2,7	36,6	31	0	0	3,6	4,4	192	71,8	
7	0,2	0,4	0	0	2	1,5	0	0	0,9	1,2	4	5,9	
12	2	3,4	0,1	0,2	0,6	0,6	0	0	0,3	0,4	0,9	1,1	
GRUPO 3													
4	0	0	0	0	6,2	5,7	0	0	1,3	1,2	11,1	4,6	
7	0	0	0,2	0,2	3,3	4,7	0	0	0,3	0,5	0,7	0,5	
12	0	0	0	0	0,3	0,4	0	0	0	0	1,3	1,8	
GRUPO 4													
4	2,4	1,5	0	0	0,1	0,2	1,7	1,2	0	0	0	0	
7	4,2	1,7	0	0	0,8	1,1	4,8	5,8	0,9	0,5	0	0	
12	0,2	0,2	0,2	0,2	0	0	0,2	0,2	0,3	0,4	0	0	

Tabla 24.- Número medio de CS de anticuerpos (por 5×10^5 CMN) y desviaciones estándar (SD) detectadas en los tejidos linfoides sistémicos de los animales de los distintos grupos tras el desafío con la variante no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP

	GL Mesentéricos						Bazo						Sangre						
	IgM		IgA		IgG		IgM		IgA		IgG		IgM		IgA		IgG		
	CS	SD	CS	SD	CS	SD	CS	SD	CS	SD	CS	SD	CS	SD	CS	SD	CS	SD	
DPI																			
4	11	18,9	0,7	1,2	0	0	22	34,4	0	0	0	0	8	13,4	0	0	0	0	
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,8	0,8	0	0	0	0	0	0	
21	0	0	44	45,5	38	53	0	0	220	237	586	528	0	0	29	18,2	267	266	
25	0	0	156	84,3	1137	1273	0	0	7	6,1	97	133	0	0	49	35,7	1038	1038	
DPD																			
4	0	0	7	6	11	2,5	0	0	103	160	312	219	0	0	12	0	237	0	
7	0	0	58	92,9	35	55,6	0	0	55	33,2	129	36,1	0	0	30	37	92	112	
12	0	0	0	0	21	5,8	0	0	39	24,9	48	22,6	0	0	59	12,2	164	0	

Tabla 25.- Número medio de CS de anticuerpos (por 5×10^5 CMN) y desviaciones estándar obtenidas tras la estimulación secundaria *in vitro* con el VDEP en los diferentes tejidos de los lechones inoculados y desafiados con la variante no adaptada a cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP.

	GL MESENTÉRICOS			BAZO			SANGRE		
	PHA	Antígeno +	Antígeno -	PHA	Antígeno +	Antígeno -	PHA	Antígeno +	Antígeno -
DPI	TRAS LA INOCULACIÓN								
4	296.327	9.894	3.516	220.207	5.582	5.798	176.217	2.698	3.365
	41.879	6.985	3.430	27.168	3.615	2.943	146.876	2.147	5.306
7	183.273	8.894	870	72.395	5.103	3.147	111.903	11.223	3.221
	102.142	10.292	744	85.721	4.249	2.846	89.783	10.171	4.570
14	276.632	4.604	798	225.240	29.262	6.192	177.598	30.399	1.209
	40.815	5.275	466	40.027	10.014	4.223	78.909	30.554	1.151
21	253.626	17.031	685	420.930	47.401	15.065	207.769	40.785	1.987
	82.205	26.315	412	670.303	14.215	6.197	78.627	14.088	2.744
25	303.186	6.316	801	187.903	53.570	13.691	286.708	22.918	4.589
	71.798	6.642	759	62.314	53.190	12.491	73.540	5.094	3.735
32	213.086	2.829	1.018	112.771	8.720	4.196	83.008	2.932	720
	61.344	2.240	528	50.256	4.897	1.616	59.436	6.034	415
DPD	TRAS EL DESAFÍO								
4	254.528	5.216	1.769	144.666	19.265	8.761	169.954	2.232	613
	122.450	4.137	2.065	66.653	10.545	6.496	116.665	1.218	227
7	235.396	19.088	2.331	111.489	49.502	12.213	97.342	21.894	1.214
	57.134	28.615	5.009	122.765	65.581	8.931	81.113	48.892	1.049
12	227.316	90.627	14.805	181.428	45.797	15.428	247.312	80.924	2.819
	166.708	118.239	18.424	50.016	28.752	7.221	37.035	29.353	2.235

Tabla 26.- Valores medios y desviaciones estándar (SD) de las cuentas por minuto (cpm) obtenidas en los animales inoculados y desafiados con la variante no adaptada al cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP (grupo 1), en cada día y cada tejido estimulado con el mitógeno (PHA) y con el antígeno vírico positivo o negativo.

		GL MESENTÉRICOS			BAZO			SANGRE		
		PHA	Antígeno +	Antígeno -	PHA	Antígeno +	Antígeno -	PHA	Antígeno +	Antígeno -
		TRAS LA INOCULACIÓN								
DPI	cpm	180.910	2.355	1.815	190.566	6.388	14.993	151.293	1.085	1.104
	SD	13.572	818	719	33.606	2.428	5.116	23.812	269	714
7	cpm	205.216	78.578	37.650	72.043	15.072	19.840	104.448	5.694	3.140
	SD	28.792	46.364	7.361	55.646	7.665	7.025	109.607	6.211	5.023
14	cpm	69.212	19.339	7.749	33.507	12.534	6.472	231.848	10.162	1.169
	SD	15.801	2.479	6.212	11.743	7.479	1.958	84.963	1.719	478
21	cpm	218.616	8.396	2.718	132.831	38.779	22.027	39.591	2.054	1.024
	SD	53.430	1.112	1.015	86.796	28.081	11.851	8.938	461	641
		TRAS EL DESAFÍO								
DPD	cpm	208.609	3.937	1.736	157.631	32.887	10.112	161.803	3.195	905
	SD	32.096	3.931	836	56.189	20.129	2.428	54.129	2.133	508
7	cpm	168.587	9.071	5.449	90.156	9.500	5.868	190.509	3.576	1.243
	SD	125.377	12.346	8.558	100.169	10.007	6.822	201.207	3.626	1.184
12	cpm	161.064	3.225	1.262	152.781	20.088	6.359	195.160	4.974	1.060
	SD	73.553	2.351	854	54.902	9.759	3.132	65.823	1.989	866

Tabla 27.- Valores medios y desviaciones estándar (SD) de las cuentas por minuto (cpm) obtenidas en los animales inoculados con la dosis baja de la variante no adaptada al cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP (grupo 2) y desafiados con la variante no adaptada al cultivo celular, en cada día y cada tejido estimulado con el mitógeno (PHA) y con el antígeno vírico positivo o negativo.

	GL MESENTÉRICOS			BAZO			SANGRE		
	PHA	Antígeno +	Antígeno -	PHA	Antígeno +	Antígeno -	PHA	Antígeno +	Antígeno -
DPD	GRUPO 4								
4	146.209	1.838	3.172	102.547	1.772	3.995	111.207	2.248	4.016
	75.416	1.233	2.956	58.162	1.151	1.862	20.815	1.057	4.333
7	200.475	3.482	853	202.441	12.474	8.661	246.291	1.788	3.426
	237.592	3.433	494	117.123	10.208	3.216	61.526	271	6.222
12	154.756	2.533	633	174.091	12.752	6.285	245.638	2.149	450
	46.384	2.345	430	62.468	11.773	2.387	118.582	1.531	309
DPI	GRUPO 5								
0	183.232	25.995	14.851	284.154	11.805	3.642	324.184	1.966	772
	61.111	20.849	10.670	82.662	17.049	5.244	136.760	633	563

Tabla 28.- Valores medios y desviaciones estándar (SD) de las cuentas por minuto (cpm) obtenidas en los animales no inoculados pero desafiados con la variante no adaptada al cultivo celular de la cepa CV-777 del VDEP (grupo 4) y de los animales que no tuvieron contacto con el virus (grupo 5), en cada día y cada tejido estimulado con el mitógeno (PHA) y con el antígeno vírico positivo o negativo.

5.- DISCUSIÓN

5.- DISCUSIÓN

En este trabajo hemos realizado una caracterización de la respuesta inmune inducida por el VDEP, para lo cual hemos tratado de reproducir lo que ocurre en condiciones naturales realizando una infección experimental de lechones convencionales con una cepa virulenta. También investigamos la respuesta inducida por dos dosis diferentes de una cepa del virus atenuada mediante pases en cultivos celulares, comparando los resultados obtenidos en ambos casos con la observada para la cepa salvaje.

Las dos dosis probadas de la cepa del virus atenuada fueron seleccionadas de forma que existiera una diferencia considerable entre ambas. Para la dosis alta utilizamos la mayor cantidad del virus que fue posible, teniendo en cuenta por una parte, el rendimiento que se obtiene en el cultivo de este virus, que no es muy elevado, y por otra, el volumen que se podía administrar a los lechones.

Para evaluar la inmunidad proporcionada por las diferentes cepas y dosis, comparamos el grado de protección mostrado por los lechones inoculados con ellas sometidos a un desafío con la cepa virulenta del virus. En esta parte del trabajo utilizamos como testigo negativo un grupo de animales que no habían tenido previamente ningún contacto con el VDEP, pero con las mismas características de edad y condición corporal que los animales inoculados.

Para llevar a cabo este estudio empleamos la cepa belga del VDEP, CV-777, ya que es la cepa de referencia del virus y las diferentes cepas aisladas hasta el momento han mostrado una homología muy alta con ella.

Durante el trabajo se emplearon lechones convencionales de 12 días de edad. Desde el punto de vista de la madurez del sistema inmunitario, hubiese sido deseable la utilización de animales de mayor edad pero, debido al elevado ritmo de crecimiento de esta especie, resultaría muy dificultoso el manejo y el alojamiento del alto número de lechones que fue necesario durante un estudio relativamente largo. En cualquier caso, y a pesar de tener un sistema inmunitario no completamente maduro, los lechones son inmunocompetentes desde el momento de su nacimiento y, a la edad de los animales empleados por nosotros, son perfectamente capaces de elaborar una respuesta inmune completa, aunque la eficacia de esta respuesta probablemente aumente con la edad del animal.

5.1.- SIGNOS CLÍNICOS Y ELIMINACIÓN DE ANTÍGENO VÍRICO EN LAS HECES

Lechones inoculados con el virus virulento

La inoculación de lechones con la cepa virulenta del VDEP indujo una diarrea entre moderada y grave en un 30 % de los lechones infectados. Esta incidencia fue inferior a la descrita por otros autores (26, 43, 44), quienes, en infecciones realizadas tanto con animales gnotobióticos como con lechones convencionales, señalan que la práctica totalidad de ellos desarrollaron diarrea con una duración media de 7-10 días. En nuestro caso, sólo una tercera parte de los lechones manifestó este síntoma y la duración media fue sensiblemente inferior (1,7 días).

El periodo de incubación coincidió con el descrito por Carvajal *et al.* (26) oscilando entre 48 y 96 horas y fue ligeramente superior al encontrado por otros autores (43, 44).

La menor gravedad de la infección realizada por nosotros podría deberse a que la dosis de virus empleada fuese inferior a la utilizada en otras infecciones experimentales. En nuestro caso cada lechón fue inoculado con una dosis de virus, determinada en ensayos previos, que garantizase la infección pero que no llegase a producir una afectación muy intensa de los animales ocasionando su muerte o un debilitamiento excesivo de su estado general que interfiriese con el desarrollo de la respuesta inmune. Sin embargo, no nos es posible comparar estas dosis ya que, debido a las características del virus, no disponemos de ninguna técnica que nos permita titular el inóculo del virus

en su forma virulenta. Únicamente podría realizarse mediante el cálculo de la DIC_{50} , que no fue llevado a cabo a causa del elevado número de animales necesario.

También en este sentido, consideramos muy importante el hecho de que los lechones utilizados en este trabajo fueran animales convencionales de casi dos semanas de edad, mantenidos en todo momento en muy buenas condiciones higiénico-sanitarias, minimizándose el riesgo de infecciones secundarias. La utilización de este tipo de lechones hacía las condiciones experimentales más similares a las de la infección natural que el empleo de animales gnotobióticos y era más útil para alcanzar los objetivos propuestos.

La presencia del VDEP fue detectada en las heces de todos los animales de este grupo, a pesar de la ausencia de diarrea en muchos de ellos. La eliminación del virus comenzó en todos los lechones entre los días 1 y 3 postinoculación y se detectaron muestras de heces positivas hasta el día 10, siendo la duración media del periodo de eliminación de 5,4 días. Esta eliminación coincide con la detectada por Carvajal *et al.* (22, 26) utilizando la misma técnica de diagnóstico empleada por nosotros y en condiciones experimentales similares.

Lechones inoculados con el virus atenuado

La inoculación de lechones con la cepa atenuada del virus no causó diarrea en ningún animal. Aunque este síntoma fue observado en un lechón y en un único día, pensamos que no debe atribuirse al VDEP ya que no pudo demostrarse la presencia de antígeno vírico en sus heces.

Este resultado coincide con lo señalado por Bernasconi *et al.* (6) y Kweon *et al.* (77), quienes al inocular lechones de menos de una semana de edad, tanto gnotobióticos como convencionales, con cepas atenuadas del VDEP, observaron que la capacidad de estas cepas para producir diarrea estaba muy disminuida con respecto a los correspondientes aislados virulentos.

En nuestro caso, a la ausencia de diarrea se sumó una escasa detección del antígeno vírico en las heces de los animales inoculados con el virus adaptado al cultivo celular, independientemente de la dosis utilizada, ya que encontramos un número limitado de muestras positivas y todas ellas con un título muy bajo.

Teniendo en cuenta la elevada sensibilidad de la técnica empleada para el diagnóstico (24, 56), la escasa presencia de antígeno vírico en las heces sólo puede ser atribuida a que la replicación del virus en el epitelio intestinal de los lechones haya sido nula o de muy baja intensidad, lo que también explicaría la ausencia de diarrea.

En contraste con nuestro trabajo, Bernasconi *et al.* (6) utilizando la misma cepa atenuada que nosotros demostraron la replicación del virus en el intestino de los animales inoculados, independientemente de la dosis utilizada, aunque comenzaba más tarde y era de menor intensidad que tras la infección con la cepa virulenta.

Las diferencias observadas con respecto a nuestra infección experimental con la cepa atenuada podrían explicarse como consecuencia de la utilización de animales convencionales en lugar de gnotobióticos. Hemos de tener en cuenta que la fisiología digestiva de ambos tipos de animales es muy diferente. Tampoco podemos descartar la idea de que la replicación del virus adaptado al crecimiento en cultivos celulares en el intestino de los lechones pudiese verse interferida por la flora intestinal, de manera que la replicación estaría dificultada en los lechones convencionales pero no en los animales gnotobióticos, donde la flora no supondría ninguna competencia para el virus.

5.2.- PROTECCIÓN FRENTE AL DESAFÍO

Los lechones que habían sufrido una infección inicial con la cepa virulenta del VDEP, similar a la infección natural que ocurre en condiciones de campo, estaban protegidos frente a la reinfección tres semanas más tarde con una dosis mayor del mismo virus.

Este resultado coincide con lo descrito para otros virus gastroentéricos como el VGET y los rotavirus. Van Cott *et al.* (42) en un estudio realizado con el VGET encontraron que, entre los lechones inoculados con una cepa virulenta, sólo el 8 % eliminaban el virus en sus heces tras ser reinoculados con una dosis mucho mayor del mismo virus. Igualmente, Yuan *et al.* (154) tras realizar un desafío con una cepa virulenta de rotavirus a lechones que habían sido inoculados tres semanas antes con esa misma cepa, no detectaron eliminación del virus en ninguno de los animales.

A pesar de demostrar la existencia de una protección total frente a la infección por el VDEP en lechones previamente inoculados con el virus virulento, no podemos

determinar si esta situación se mantiene durante un periodo prolongado, ya que nuestro estudio ha sido realizado a corto plazo (tres semanas). Aunque Debouck *et al.* (42) consiguieron reproducir la infección con el VDEP cinco meses después de una primera inoculación empleando una elevada dosis de virus, los trabajos realizados por otros autores (106) señalan que en los brotes enzoóticos de esta enfermedad no están afectados aquellos cerdos que han sufrido previamente la infección, manteniéndose el virus en la población gracias a la entrada continua de animales receptivos.

Mediante el desafío de los lechones inoculados previamente con el virus atenuado comprobamos que, a diferencia de la cepa de virus salvaje, la cepa de virus adaptada al cultivo celular, proporcionó únicamente una protección parcial frente a la infección con el virus virulento que dependía de la dosis empleada. No se detectó la eliminación del virus después del desafío en el 25 % de los animales inoculados con la dosis baja del virus atenuado, mientras que esa proporción aumentó hasta el 50 % cuando se utilizó una dosis del virus 20 veces superior.

En estos dos grupos de lechones, en los casos en los que se produjo eliminación del virus en las heces, se observó una notable disminución, tanto de la duración del periodo de eliminación como de la cantidad de antígeno vírico eliminado, cuando los comparamos con el grupo testigo de animales sin exposición previa. Al contrario de lo que ocurría con la tasa de protección, no se apreciaron diferencias importantes en la duración y la cantidad de virus eliminado entre los dos grupos inoculados con distintas dosis del virus atenuado.

Nuestros resultados coinciden con trabajos realizados para otros virus gastroentéricos, en los que se ha comprobado que con la utilización de cepas de virus adaptadas al cultivo celular y administradas por vía oral u oronasal, se consigue un cierto grado de protección frente al virus virulento, aunque siempre menor que el descrito cuando los animales eran inoculados inicialmente con ese virus (17,115, 117, 119, 142, 154).

Frente al VGET se han utilizado, con resultados similares a los obtenidos por nosotros, cepas atenuadas tanto del mismo virus como de su variante respiratoria, el coronavirus respiratorio porcino (17, 142). Con las cepas atenuadas de rotavirus, sin embargo, el grado de protección encontrado fue inferior al obtenido por nosotros para el VDEP (153, 154, 120). Tras el desafío de los animales inoculados inicialmente con el

virus atenuado, Yuan *et al.* detectaron rotavirus en las heces de casi todos los lechones (80-100 %), produciéndose diarrea en más de la mitad de los casos (56-62 %).

Para explicar las diferencias observadas en cuanto a los distintos grados de protección generados por la inoculación con diferentes cepas y dosis, diversos autores defienden la hipótesis de que la protección aportada por cada virus depende su grado de replicación en el intestino del animal (114, 118, 119,143, 153). En nuestro caso, esta teoría permitiría explicar las diferencias encontradas entre las cepas virulenta y atenuada. Sin embargo, no consideramos que sea válida para explicar los distintos resultados obtenidos con las dos dosis del virus atenuado ya que no se ha podido demostrar la replicación vírica con ninguna de las dosis y las limitadas diferencias encontradas en la eliminación de antígeno vírico en las heces tras la inoculación, no podrían justificar la marcada diferencia en la tasa de protección.

En este sentido, pensamos que estas diferencias podrían explicarse, más que por la replicación vírica en sí, por una mayor presencia de antígeno vírico en el intestino, que estaría disponible para su captación e interacción con las células inmunocompetentes. La replicación del virus en el intestino asegura la amplificación del antígeno inicial, de manera que esté presente en abundancia en la luz intestinal. Sin embargo, posiblemente una administración del antígeno, sin que se produzca replicación, podría ser igualmente eficaz si se suministra en cantidad suficiente o se realiza de manera que sea elevada su captación en los lugares oportunos, como en las células M del epitelio intestinal.

Entre los lechones del grupo testigo, que no habían sido inoculados previamente, se observó la aparición de diarrea en un 40 % de los desafiados, proporción similar a la detectada tras la inoculación con la cepa virulenta de los lechones con 12 días de edad (30 %). También la duración de la diarrea y de la eliminación de antígeno vírico en las heces fue similar en ambos casos. Estos resultados confirman que la receptividad a la infección por el VDEP es muy similar en animales convencionales de diferentes edades.

5.3.- CÉLULAS SECRETORAS DE ANTICUERPOS FRENTE AL VDEP TRAS LA INOCULACIÓN

Lechones inoculados con el virus virulento

Tras la inoculación de los lechones con la cepa salvaje del VDEP la respuesta inicial, correspondiente a CS de IgM, fue detectada entre los días 4 y 7 en todos los tejidos. Esta respuesta, por lo general, fue de mayor intensidad y apareció más rápido el duodeno y el íleon que en el resto de los tejidos, incluidos los ganglios linfáticos mesentéricos.

Teniendo en cuenta el mecanismo de inducción de la respuesta inmune en el tracto gastrointestinal, podríamos atribuir la diferencia observada entre los ganglios linfáticos mesentéricos y la lámina propia del intestino a su proximidad anatómica al lugar de entrada y replicación del VDEP (34, 65, 74, 93). La presentación del virus por las CPA ocurre fundamentalmente en los tejidos inmunocompetentes más cercanos, en nuestro caso en los sitios inductores de la lámina propia intestinal como las placas de Peyer, siendo menor y un poco más tardía la difusión del antígeno por vía linfática para ser presentado en los ganglios linfáticos mesentéricos.

Tras esta respuesta inicial, en los tejidos linfoides asociados al intestino no se detectaron más CS de anticuerpos específicas frente al VDEP de forma importante hasta el día 21 postinoculación, momento en el que comenzó a hacerse evidente la respuesta de CS de IgG y de IgA tanto en el duodeno y el íleon como en los ganglios linfáticos mesentéricos.

Consideramos que la tardía detección de estas células respecto a lo descrito para otros virus gastroentéricos como el VGET y los rotavirus (31, 143, 154) podría deberse fundamentalmente a las limitaciones de la técnica empleada. Pensamos que la sensibilidad del ELISPOT desarrollado por nosotros podría no ser lo suficientemente alta como para permitirnos detectar niveles bajos de CS de IgG e IgA, células que, sin duda, existieron en los días anteriores como lo demuestra la detección de algunas CS de IgA en el duodeno en el día 7, así como de IgG e IgA en la sangre entre los días 12 y 15 mediante el MAC-ELISA.

La concentración más elevada de CS de anticuerpos frente al VDEP se alcanzó en diferentes días en los tres tejidos, primero en el duodeno (día 21 postinoculación), seguido del íleon (día 25) y de los ganglios linfáticos mesentéricos (día 32). En trabajos realizados inoculando lechones con cepas virulentas del VGET y de rotavirus, la detección máxima de CS de anticuerpos tuvo lugar entre los días 12 y 24 en el caso del VGET y alrededor del día 21 en los rotavirus (142, 143, 153, 154). Sin embargo, en ambos casos los valores máximos detectados fueron sensiblemente superiores a los encontrados por nosotros.

Esta diferencia, en el caso de los estudios realizados en rotavirus (30, 153, 154), podría tener su origen en el tipo de animales utilizados ya que se trataba de lechones gnotobióticos, en los que existe una menor exposición a cualquier otro antígeno, lo que hace que la proporción de linfocitos que reaccionan específicamente respecto al total de las CMN aisladas sea mayor que la de un lechón convencional en idénticas condiciones. En cambio, en el caso del VGET, los animales y condiciones de trabajo fueron similares a las utilizadas por nosotros (142, 143) y no podemos descartar que el mayor número de CS de anticuerpos específicas frente al VGET esté relacionado con una mayor capacidad de replicación intestinal y antigenicidad de este virus o con una menor sensibilidad de nuestra técnica.

De los tres tejidos linfoides asociados al intestino, la mayor concentración de CS tanto de IgG como de IgA, correspondió al duodeno. En este sentido hay que tener en cuenta que las células extraídas de la lámina propia del duodeno, pertenecientes al tejido linfoide difuso con función efectora, son en su mayoría células linfoides activadas (74, 105). Sin embargo, tanto en los ganglios linfáticos mesentéricos como en el íleon, al no ser eliminadas las placas de Peyer, existe también una elevada proporción de células linfoides inmaduras o en distintos grados de diferenciación (57, 92, 105) y por ello, el número de CS de anticuerpos específicas frente al VDEP será proporcionalmente menor en estos tejidos.

En los tejidos linfoides sistémicos y fundamentalmente entre los linfocitos de la sangre periférica, la respuesta de CS de IgA tras la inoculación con la cepa virulenta del VDEP se detectó antes que en los tejidos linfoides asociados al intestino, concretamente a partir del día 14. Este hecho coincidiría con el desarrollo normal de una respuesta inmune de mucosas y puede explicarse como consecuencia del proceso de anidamiento,

mediante el que las CS de anticuerpos se dirigen por la sangre hacia los órganos efectores, en este caso el intestino, desde los tejidos en los que tiene lugar el proceso de maduración (34, 67, 69, 122).

Lechones inoculados con el virus atenuado

Teniendo en cuenta lo anterior y en coincidencia con la hipótesis formulada por distintos autores para otros virus gastroentéricos en el cerdo (133, 154), pensamos que tras la infección con el VDEP y en determinados momentos, las CS de anticuerpos específicos frente al virus detectadas en la sangre podrían ser consideradas como un reflejo de las poblaciones linfocitarias de los órganos aferentes, como el intestino y los ganglios linfáticos mesentéricos. Esta hipótesis se ve reforzada por las elevadas correlaciones encontradas en el día 21 postinoculación entre el número de CS de IgG y de IgA detectadas en la sangre y en el duodeno (0,78 para las CS de IgG y 1 para las de IgA) así como entre las detectadas en la sangre y en los ganglios linfáticos mesentéricos (0,74 para las CS de IgG y 0,82 para las de IgA).

La cepa del virus adaptada al cultivo celular mostró, como cabría esperar, una menor capacidad que el virus virulento para inducir la aparición de CS de anticuerpos específicos en todos los tejidos.

No se detectó la respuesta inicial de CS de IgM con ninguna de las dos dosis utilizadas y las CS de IgA fueron detectadas sólo de forma esporádica y en pequeño número en los ganglios linfáticos mesentéricos del grupo inoculado con la dosis baja (≤ 1 CS por 5×10^5 CMN). La única respuesta importante fue la mostrada por los lechones inoculados con la dosis alta del virus atenuado que en el día 21 presentaron CS de IgG en todos los tejidos investigados, aunque su número fue menor que el medido en el mismo día en los lechones inoculados con la cepa virulenta, correspondiendo la mayor diferencia al duodeno.

Esta menor aptitud de las cepas atenuadas del VDEP para inducir una respuesta de CS de anticuerpos específicos coincide con los resultados obtenidos por otros autores al utilizar cepas atenuadas de rotavirus o del VGET para inocular a lechones por vía oral (118, 119, 142, 143, 154). En coincidencia con nuestros resultados, Van Cott *et al.* (143) señalan que el número de CS de anticuerpos frente al VGET está relacionado con la dosis de virus utilizada, aumentando significativamente en los ganglios linfáticos

mesentéricos cuando se emplea una dosis del virus atenuado superior en dos unidades logarítmicas.

Existió una fuerte correlación entre el número de CS tanto de IgG como de IgA específicas frente al VDEP detectado en los tejidos linfoides asociados al intestino en el día 21 postinoculación y la tasa de protección frente al desafío con el virus virulento.

Nuevamente, nuestros resultados están en concordancia con lo descrito por otros autores (143, 153, 154) que relacionan la protección frente a las infecciones por virus gastroentéricos con la presencia en la lámina propia intestinal de CS de IgA frente a ellos. Aunque no se puede olvidar la contribución de las IgG en la defensa del tracto gastrointestinal (41, 58, 97, 147), el papel fundamental en la protección inmunológica de las mucosas es desempeñado por las IgA. En nuestro estudio, en algunos casos la correlación entre la protección y la concentración de CS de IgG llegó a ser más elevada que la correspondiente a las CS de IgA, pero hemos de tener en cuenta que casi siempre que se detectaron CS de IgA fue conjuntamente con CS de IgG.

Estas mismas correlaciones fueron también investigadas para los tejidos vinculados al sistema inmune sistémico, con resultados muy diferentes en ambos casos. Mientras que la correlación entre la protección y el número de CS de anticuerpos detectadas en el bazo fue muy débil (entre $-0,25$ y $-0,10$), se encontró una correlación positiva fuerte entre la protección y la cantidad de CS de IgA (0,77) y de IgG (0,73) presentes en la sangre en el día del desafío, lo que reforzaría la teoría de que, al menos en determinados momentos después de la infección del tracto gastrointestinal por un virus de tropismo exclusivamente entérico, las CS de anticuerpos de la sangre pueden servir como indicadores del grado de inmunidad local.

5.4.- CÉLULAS SECRETORAS DE ANTICUERPOS FRENTE AL VDEP TRAS EL DESAFÍO

Los lechones inoculados inicialmente con la cepa virulenta del VDEP no mostraron un aumento importante en el número de CS de anticuerpos respecto a los animales del mismo grupo que no fueron desafiados y así, a pesar de que estuvieron completamente protegidos frente a la reinfección, no se puede decir que existiera una

respuesta anamnésica tras un segundo contacto con el virus. En este sentido, nuestros resultados coinciden con los observados con cerdos inoculados y desafiados con una misma cepa virulenta de rotavirus (117, 133, 143, 154). En estos animales tras el desafío no se producía un incremento significativo en el número de CS de anticuerpos o en el título de anticuerpos intestinales frente a rotavirus, a pesar de que existía una protección total frente a la reinfección.

Una posible explicación a este hecho sería que la neutralización del virus por los anticuerpos liberados a la luz intestinal tuviera lugar de manera tan eficaz que el virus apenas llegaría a contactar con el sistema inmunitario y no se produciría una estimulación suficiente como para desencadenar la respuesta secundaria de anticuerpos.

Los dos grupos inoculados inicialmente con las dosis alta y baja de la cepa atenuada del VDEP reaccionaron ante el desafío con la cepa virulenta con un fuerte incremento en el número de CS de IgG y, en menor medida, de CS de IgA, tanto en los tejidos linfoides asociados al intestino como en los sistémicos. Este hecho, al que hemos de añadir la ausencia de una respuesta de IgM, demuestra que tras el desafío se produjo una respuesta anamnésica frente al VDEP tanto en los animales inoculados con la dosis alta, en los que ya se habían detectado CS de IgG, como en los inoculados con la dosis baja, en los que la detección de CS de anticuerpos frente al VDEP tras la inoculación había sido mucho menor.

Mediante la inoculación de los lechones con la cepa atenuada del VDEP sólo se logró una protección parcial frente a la infección por el VDEP virulento que varió en función de la dosis. No obstante esta primera inoculación consiguió una primera sensibilización del sistema inmunitario de los lechones frente al virus, de forma que, ante un segundo contacto con el antígeno, se produjo un aumento rápido del número de CS de anticuerpos contra él. Además, esta sensibilización resultó independiente de la dosis utilizada en la inoculación inicial, ya que la cantidad de CS de anticuerpos detectadas tras el desafío fue muy similar en ambos grupos. Sorprendentemente, en los tejidos asociados a la inmunidad sistémica se observó una respuesta mayor tras el desafío en los animales del grupo inoculado con la dosis baja.

Tras el desafío, la respuesta observada en el grupo testigo negativo coincidió con el patrón de respuesta inmune primaria descrita al inocular con la cepa virulenta al primer grupo experimental de este trabajo. Sin embargo, por lo general este grupo

testigo reaccionó de forma más intensa, como lo prueban tanto la mayor respuesta de CS de IgM como la rápida respuesta de CS de IgG e IgA, que fueron detectadas en los tejidos asociados al intestino desde los momentos iniciales y especialmente en el día 12 postdesafío. Este desarrollo de la respuesta inmune frente al VDEP del grupo testigo, más rápido e intenso, debe ser atribuido a una mayor madurez del sistema inmunitario de los animales utilizados, ya que estos lechones fueron desafiados cuando contaban con 4,5 semanas de edad, tres semanas más que los que se emplearon para la inoculación inicial con las diferentes cepas del virus (110).

A pesar de que en el tejido linfoide intestinal las CS de anticuerpos más comunes son las de la clase IgA (34, 74, 105), tras la inoculación con distintas cepas del VDEP y el desafío con virus virulento, hemos observado que la respuesta detectada de CS de IgG fue, en la mayoría de los casos, superior a la de CS de IgA. Este predominio fue más acentuado en los animales inoculados con la cepa atenuada en los que antes del desafío apenas se había detectado respuesta de CS de IgA, aunque sí de CS de IgG.

Esta misma relación entre el número de CS de IgG y de IgA fue descrita por Van Cott *et al.* (143) en los ganglios linfáticos mesentéricos de lechones inoculados tanto con una cepa virulenta del VGET como con una cepa atenuada del mismo virus o del coronavirus respiratorio porcino. También Yuan *et al.* (153, 154) describen una situación idéntica en los ganglios linfáticos mesentéricos y en el intestino de lechones inoculados con cepas virulentas y atenuadas de rotavirus. Al igual que en nuestro experimento, en ambos casos la diferencia fue más acentuada en los animales inoculados con las cepas atenuadas.

No parece existir una explicación clara a este hecho, aunque en trabajos realizados con el VGET y los rotavirus se ha sugerido que podría estar relacionado con una posible estimulación antigénica extraintestinal (142, 154). En nuestro caso, sin embargo, esta hipótesis nos parece poco probable ya que nunca ha podido ser demostrada la presencia del VDEP fuera del tejido intestinal y los ganglios linfáticos mesentéricos (44, 102).

5.5.- RESPUESTA DE CS DE ANTICUERPOS FRENTE AL VDEP TRAS LA ESTIMULACIÓN SECUNDARIA *IN VITRO*

En una respuesta inmune secundaria, los linfocitos B de memoria desempeñan un papel fundamental en la eficacia y rapidez con la que el sistema inmunitario actúa contra un agente patógeno al que se enfrenta por segunda vez (55). La magnitud de la respuesta de células B de memoria frente al VDEP, fundamentalmente a nivel local, es un indicativo de la protección potencial frente a una reinfección posterior (142, 143, 153).

Como cabría esperar y en coincidencia con trabajos realizados por otros autores (7, 143, 153), no encontramos resultados positivos cuando sometimos a la estimulación antigénica *in vitro* a las CMN obtenidas de lechones que no habían tenido un contacto previo con el VDEP *in vivo*. Sólo las células previamente estimuladas parecen estar capacitadas para responder en este ensayo.

Tras la inoculación con la cepa virulenta, las primeras células B de memoria fueron detectadas a partir del día 21 en los tres tejidos en los que se realizó esta prueba. De forma similar, Van Cott *et al.* y Yuan *et al.* (142, 143, 153) describen la existencia de células B de memoria en el día 21 postinoculación en animales inoculados oralmente con el VGET o con cepas atenuadas de rotavirus. En el caso del VGET, las primeras células de memoria se detectaban en el día 12 postinoculación, igual que sucedía con las CS de anticuerpos detectadas *in vivo*, que también aparecían más tempranamente que en nuestro caso.

El número de células de memoria detectadas tras el desafío no aumentó, como hubiera podido esperarse, tras la segunda estimulación antigénica de los lechones, sino que en el día 4 postdesafío este número fue considerablemente menor que el encontrado en el mismo día, el día 25 postinoculación, en los lechones no desafiados. Este hecho afianza nuestra teoría de que no se produjo una respuesta de anticuerpos anamnésica tras la segunda exposición al virus en los lechones inoculados inicialmente con la cepa virulenta. Sin embargo, no podemos explicar porqué existió una diferencia tan marcada en la respuesta medida en el día 25 en los ganglios linfáticos mesentéricos entre los lechones desafiados y los no desafiados.

En el bazo y en la sangre, la respuesta predominante de células B de memoria fue la de CS de IgG, cuya proporción respecto a las CS de IgA varió entre 1,2 y 21. En cambio, en los ganglios linfáticos mesentéricos, a diferencia de lo que ocurría con las células estimuladas *in vivo* (sin estimulación secundaria), el número de CS de IgG no superó en todos los casos al de CS de IgA. Tanto en el día del desafío como en el día 7 postdesafío, el número de células de memoria secretoras de IgA fue mayor que el de IgG, como correspondería a los tejidos linfoides asociados a las mucosas (34, 65, 4). Además, cuando se produjo la situación inversa y el número de CS de IgG fue mayor que el de IgA (días 25 postinoculación y 4 postdesafío), la proporción entre ambos tipos de células fue mucho menor que la encontrada el mismo día para los tejidos vinculados a la inmunidad sistémica.

A este respecto, los resultados obtenidos por otros autores han sido variables. En la mayoría de los trabajos realizados previamente con animales inoculados y desafiados con VGET virulento, se describe un predominio de las CS de IgG en los ganglios linfáticos mesentéricos tras la estimulación secundaria *in vitro*, con valores entre 3 y 15 veces superiores al número de CS de IgA (7, 142). Nuestros resultados, en cambio, muestran una mayor concordancia con los obtenidos por Van Cott *et al.* (143) que detectaban un mayor número de CS de IgA que de IgG tras la estimulación secundaria *in vitro* de las CMN de la lámina propia intestinal en animales que habían sido expuestos a VGET virulento.

5.6.- RESPUESTAS DE PROLIFERACIÓN LINFOCITARIA

A pesar de que en las infecciones por virus gastroentéricos en el cerdo y concretamente en la infección por el VDEP, la función efectora más importante está relacionada con el componente humoral de la respuesta inmune y en menor medida con la respuesta celular, es indudable la importancia de ésta última tanto en la protección como en la recuperación de la enfermedad, además de la función reguladora de los LT en la producción de anticuerpos (34, 74, 87, 117, 138).

En el hombre se han descrito infecciones por rotavirus en las que, a pesar de no haber una deficiencia de LB, no se detectaba ni respuesta de anticuerpos ni de LT específicos, resultando de ello una infección persistente con eliminación del virus en las heces durante 15 meses (137). En el mismo sentido, un trabajo realizado por Welch *et*

al. (148) en cerdos inoculados con VGET estableció la existencia de una relación entre la máxima respuesta de linfoproliferación y el cese de la eliminación de virus en las heces y el inicio de la recuperación de la enfermedad.

En este trabajo hemos utilizado un ensayo de linfoproliferación como método de estimación de la respuesta inmune celular frente al VDEP, teniendo en cuenta que la proliferación en cultivos celulares inducida por la estimulación con antígeno vírico es una propiedad característica de las células T (16, 20). Aunque en esta prueba no es posible distinguir los fenotipos de las poblaciones de células T en las que se ha producido la proliferación, es de esperar que la respuesta de proliferación linfocitaria inducida por el VDEP corresponda en su mayor parte a LT cooperantes, como ha sido demostrado que ocurre con la proliferación *in vitro* inducida por la estimulación con otros virus entéricos como los rotavirus (18, 94,146).

En los ganglios linfáticos mesentéricos de los lechones inoculados con la cepa virulenta del VDEP se detectó rápidamente una respuesta específica de linfoproliferación, que se mantuvo desde el día 4 hasta el 24 postinoculación. Los valores máximos se alcanzaron en torno al día 21, coincidiendo con el momento en que tanto en este tejido como en el duodeno y en el íleon comenzó a detectarse una importante respuesta de CS de anticuerpos frente al virus.

En los lechones inoculados con la cepa atenuada la detección de linfoproliferación específica en los ganglios linfáticos mesentéricos se produjo por primera vez en el día 14, siendo la respuesta en todo momento de menor intensidad que la de los lechones inoculados con el virus virulento. El menor desarrollo de la respuesta inmune celular en este grupo coincide con la baja respuesta de CS de anticuerpos detectada.

Nuestros resultados sugieren que la aparición de una respuesta de anticuerpos frente al VDEP en los tejidos linfoides asociados al intestino estaría vinculada a la existencia previa de una fuerte respuesta de inmunidad celular específica, lo que resulta lógico si tenemos en cuenta la importancia de los LT cooperantes tipo 2 como mediadores en el desarrollo de la respuesta inmune humoral (34).

En los tejidos del sistema inmune sistémico de los lechones inoculados con virus virulento, la proliferación específica frente al VDEP fue detectada más tarde que en los

ganglios mesentéricos (en el día 14 postinoculación frente al día 4). Los LT detectados en estas localizaciones son células que migran desde los tejidos linfoides donde se origina la respuesta frente al VDEP hacia otros tejidos del sistema inmune de mucosas y de ahí el retardo en su detección respecto a los ganglios linfáticos mesentéricos, que en este caso son órganos inductores (34, 67, 69, 122).

También la respuesta obtenida en los tejidos sistémicos de los animales inoculados con la cepa atenuada fue mucho menor que la detectada en los inoculados con el virus virulento, fundamentalmente en el bazo, tejido en el que no se registró respuesta de proliferación específica tras la inoculación.

Ward *et al.* y Brim *et al.* (16, 17, 147), en trabajos similares realizados con cepas virulentas y atenuadas de rotavirus y del VGET, describen también que las cepas atenuadas inducen respuestas de proliferación linfocitaria significativamente menores que las correspondientes cepas virulentas.

Las respuestas de linfoproliferación inducidas por cada cepa en los distintos tejidos tuvieron correlaciones elevadas con la protección frente a la reinfección por el VDEP, siendo la respuesta de los ganglios linfáticos mesentéricos la que presentó una correlación más intensa. De nuevo, este resultado sugiere que la respuesta de células T contribuye de forma importante al desarrollo de una respuesta inmune protectora frente al VDEP.

A partir del día 25 dejó de detectarse una respuesta específica de proliferación linfocitaria en los tres tejidos (ganglios linfáticos mesentéricos, bazo y sangre) de los animales inoculados con el virus virulento. De forma similar, en lechones inoculados con el VGET, Brim *et al.* (16) detectaban respuestas de linfoproliferación mucho menores a partir del día 24 y para Welch *et al.* (148) la respuesta en ese día ya no era detectable.

Tras el desafío con la cepa virulenta del VDEP, los lechones que previamente habían sido inoculados con ese mismo virus mostraron un incremento en las respuestas de linfoproliferación en los tres tejidos estudiados, aunque este aumento solo fue significativamente superior al de los animales del mismo grupo no desafiados en el último día. Curiosamente, esta reacción ante el desafío no tuvo su reflejo ni en un incremento del número de CS de anticuerpos, como ya se ha señalado, ni en una

elevación de los títulos de anticuerpos detectados en la sangre. En un trabajo realizado por Ward *et al.* (146) con lechones inoculados y desafiados con una cepa virulenta de rotavirus también se produjo una situación similar, con respuestas de linfoproliferación iguales o ligeramente superiores tras el desafío que, sin embargo, no estuvieron asociadas a elevaciones del título de anticuerpos séricos o del número de CS de anticuerpos (154).

No podemos descartar la idea de que la pequeña estimulación del sistema inmune que se produciría por el segundo contacto con el virus pudiera hacer aumentar ciertas poblaciones de LT, aunque no lo suficientemente como para desencadenar una respuesta inmune humoral de memoria. También existe la posibilidad de que esta proliferación esté relacionada con funciones de control de la respuesta inmune en la que podrían estar implicados otros clones de células, como los LT supresores.

En el grupo de lechones inoculados con la cepa del virus atenuada, las respuestas de linfoproliferación tras el desafío no mostraron un incremento tan elevado como era de esperar atendiendo a la fuerte respuesta de memoria observada en las CS de anticuerpos sin que podamos aportar ninguna explicación para este hecho.

5.7.- RESPUESTA DE ANTICUERPOS SÉRICOS

Independientemente de la respuesta de CS de anticuerpos detectada tanto en la sangre como en el resto de los tejidos, en todos los lechones se detectaron, mediante el ELISA de bloqueo, anticuerpos frente al VDEP en los días siguientes a la inoculación.

La evolución de los títulos de IgG e IgA séricos tras la inoculación mostró correlación con la respuesta de CS de anticuerpos medida para cada grupo. En los tres grupos inoculados inicialmente se demostró mediante MAC-ELISA la existencia de IgG sérica frente al VDEP, aunque en los lechones inoculados con el virus virulento el título alcanzado fue significativamente mayor que en los de los grupos inoculados con la cepa atenuada.

Sin embargo, tal y como ocurría con las CS, la situación fue muy diferente para los anticuerpos de la clase IgA que sólo fueron demostrados en los lechones inoculados con la cepa virulenta y no en los otros dos grupos, inoculados con el virus atenuado. Este resultado confirma la menor capacidad de las cepas atenuadas del VDEP para

inducir la síntesis de anticuerpos de la clase IgA, como ya se había visto mediante ELISPOT y de forma semejante a lo propuesto por otros autores para otros virus gastroentéricos como los rotavirus y el VGET (119, 133, 143, 154).

Los títulos de IgG frente a la proteína S medidos por el S-ELISA tras la inoculación fueron muy bajos en todos los grupos, aunque, como ocurrió con las IgG detectadas mediante MAC-ELISA, fueron incluso menores en los lechones inoculados con la cepa atenuada, en los que en el grupo tratado con la dosis baja ni siquiera se detectaron. Por el contrario, los títulos de IgA frente a esta proteína fueron más elevados y, siguiendo la tendencia general mostrada a lo largo del experimento, los títulos más altos correspondieron a los animales inoculados con el virus virulento.

Respecto a los anticuerpos séricos detectados frente a la proteína N, la situación observada fue la inversa, detectándose casi exclusivamente IgG y no IgA.

Teniendo en cuenta estos resultados, parece que la proteína S del VDEP induce principalmente la producción de anticuerpos de la clase IgA, mientras que la proteína N es mejor inductora de anticuerpos del isotipo IgG. Esta idea coincide con lo señalado para otros coronavirus como el VGET por autores como De Diego *et al.* (40), que defienden que los determinantes antigénicos más importantes en la inducción de la síntesis de anticuerpos de la clase IgA se encuentran en la proteína S de este virus.

Al examinar la relación entre los títulos de cada tipo de anticuerpos y el número de CS de IgG e IgA presentes en la sangre, encontramos una correlación fuerte y positiva para ambas clases de inmunoglobulinas cuando empleamos el MAC-ELISA.

Con las técnicas específicas para las proteínas S y N del VDEP, sólo se demostró una buena correlación para los anticuerpos de la clase IgA dirigidos frente a la proteína S y para las IgG frente a la N. En concordancia con la idea anterior, estas diferencias podrían tener su origen en el hecho de que la mayoría de las CS de anticuerpos presentes en la sangre y sensibilizadas frente a la proteína S del VDEP pudieran ser productoras de IgA, mientras que las sensibilizadas frente a la proteína N corresponderían fundamentalmente a productoras de IgG.

Tras el desafío con la cepa virulenta, los resultados obtenidos mediante las tres técnicas ELISA confirmaron la ausencia de una respuesta inmune humoral de memoria en el grupo inoculado inicialmente con la cepa virulenta. De igual manera, se detectó

una fuerte respuesta anamnésica en los lechones a los que se había administrado el virus atenuado, siendo por lo general más intensa en el grupo inoculado con la dosis alta.

Al relacionar los títulos de IgG e IgA medidos por las diferentes técnicas en el día 21 postinoculación con el grado de protección frente al desafío en cada grupo, encontramos resultados similares. La protección frente a la reinfección por el VDEP mostró una correlación fuerte con los títulos de IgG e IgA detectados por el MAC-ELISA, con los títulos de IgA específicos frente a la proteína S medidos por S-ELISA y con los títulos de IgG frente a la proteína N obtenidos en el N-ELISA.

En este sentido, To *et al.* (133) señalan que la protección frente a la infección por rotavirus está fuertemente correlacionada con la presencia de IgA tanto en la sangre como en el contenido intestinal, pero no con los niveles de IgG sérica. En nuestro estudio, y a pesar de los resultados obtenidos, no podemos concluir que los niveles de IgG sérica tengan una importancia elevada en la protección frente al VDEP, ya que la cinética de este tipo de anticuerpos estuvo muy relacionada con la de las IgA. De esta manera, las correlaciones encontradas podrían deberse tanto a una verdadera influencia de las IgG en la defensa frente a la infección por el VDEP como a un paralelismo entre la evolución de los dos tipos de inmunoglobulinas séricas.

6.- CONCLUSIONES

6.- CONCLUSIONES

PRIMERA.- La inoculación de lechones convencionales con la variante no atenuada de la cepa CV-777 del VDEP, que originó diarrea en el 30 % de los animales y eliminación de antígeno vírico en las heces en el 100 %, proporcionó una protección total contra una infección de desafío realizada tres semanas más tarde con una dosis superior del mismo virus.

SEGUNDA.- La inoculación de lechones convencionales de las mismas características con la misma cepa del virus atenuada por pases en cultivo celular no originó diarrea en los animales inoculados y la eliminación de antígeno vírico en sus heces fue muy escasa. Esta inoculación confirió a los lechones una protección parcial contra la infección de desafío realizada tres semanas más tarde con la cepa de campo del virus y el grado de protección tuvo una relación directa con la dosis de virus atenuado empleada en la inoculación.

TERCERA.- La inoculación de lechones con la cepa CV-777 indujo una respuesta específica de células secretoras de IgM, IgG e IgA en todos los tejidos estudiados que fue más elevada en los tejidos asociados al tracto gastrointestinal que en los vinculados al sistema inmune sistémico. La misma cepa atenuada por pases en cultivo indujo una respuesta mucho menor cuya intensidad guardó una relación directa con la dosis de virus empleada en la inoculación.

CUARTA.- Las poblaciones de células secretoras de anticuerpos detectadas en la sangre 21 días después de la inoculación oral de lechones con el VDEP muestran una correlación muy elevada con las detectadas en los tejidos linfoides asociados al tracto gastrointestinal y, por tanto, podrían ser tomadas como un reflejo de éstas.

QUINTA.- La estimulación secundaria *in vitro* de las células mononucleares purificadas de los ganglios linfáticos mesentéricos, el bazo y la sangre de los animales inoculados con la cepa CV-777 del VDEP permitió detectar una respuesta específica de células B de memoria a partir del día 21 postinoculación en los tres tejidos.

SEXTA.- La respuesta inmune de tipo celular, medida por la proliferación linfocitaria, se detectó tempranamente en los ganglios linfáticos mesentéricos de los animales inoculados con la variante no atenuada del VDEP y alcanzó su valor máximo en el día 21 postinoculación, coincidiendo con el inicio de una fuerte respuesta de células secretoras de IgG e IgA en los tejidos linfoides asociados al tracto gastrointestinal. La misma cepa atenuada indujo una respuesta de menor intensidad en todos los tejidos, como también había sido menor la respuesta de células secretoras de anticuerpos.

SÉPTIMA.- La cepa CV-777 del VDEP atenuada mostró menor capacidad para la inducción de anticuerpos séricos del isotipo IgA que la misma cepa no atenuada. En la inoculación con ambos virus los anticuerpos séricos dirigidos frente a la proteína S fueron predominantemente del isotipo IgA mientras que los dirigidos frente a la proteína N fueron de la clase IgG.

OCTAVA.- La protección frente a la infección experimental de desafío con la cepa no atenuada del VDEP mostró una fuerte correlación con el número de células secretoras de anticuerpos detectadas en el día del desafío en los tejidos linfoides asociados al tracto gastrointestinal y la sangre, así como con la respuesta de linfoproliferación medida en los ganglios mesentéricos, bazo y sangre. También existió una correlación similar con el título medio geométrico de anticuerpos séricos frente al virus completo y de IgG frente a la proteína N e IgA frente a la proteína S.

7.- RESUMEN

7.- RESUMEN

En este trabajo hemos realizado una caracterización de la respuesta inmune inducida por el virus de la diarrea epidémica porcina (VDEP), comparando los resultados obtenidos con la cepa de campo CV-777 de este virus con los de dos dosis diferentes de esta misma cepa adaptada a cultivo celular y atenuada por un elevado número de pases. Así mismo, se evaluó el grado de protección conferido por el tratamiento con cada uno de los inóculos realizando un desafío con la cepa de campo 21 días después de la inoculación. Para ello, empleamos lechones convencionales de 12 días de edad con el fin de reproducir lo que ocurriría en condiciones naturales.

Para el estudio de la respuesta inmune humoral se emplearon tres técnicas diferentes. En primer lugar, se empleó un ELISPOT para la detección de células secretoras de anticuerpos específicas frente al virus en diferentes localizaciones del sistema inmune de mucosas (lámina propia del duodeno y el íleon y ganglios linfáticos mesentéricos) y del compartimento sistémico (bazo y sangre). Las células B de memoria generadas por el virus fueron demostradas mediante un ensayo basado en la estimulación secundaria *in vitro* de las células mononucleares aisladas de las diferentes localizaciones. Además, se realizó un seguimiento de la evolución de los títulos séricos de los distintos isotipos de anticuerpos dirigidos frente al virus y frente a dos de sus proteínas estructurales mediante distintas técnicas ELISA.

La respuesta inmune celular se investigó mediante una técnica de linfoproliferación que medía la proliferación celular en los diferentes tejidos tras la estimulación secundaria *in vitro* con antígeno vírico.

Los lechones inoculados inicialmente con la cepa de virus salvaje desarrollaron la infección por el VDEP, detectándose eliminación de antígeno vírico en las heces de todos ellos durante un periodo variable. En estos animales se demostró una respuesta de células secretoras en todos los tejidos, inicialmente del isotipo IgM y posteriormente de IgG e IgA, que fue más intensa en los tejidos linfoides asociados al intestino que en los sistémicos. Así mismo, se detectó una fuerte respuesta humoral de memoria a partir del día 21 postinoculación. La respuesta inmune celular apareció en los primeros días, coincidiendo su máxima intensidad con el inicio de la detección constante de células secretoras de IgG e IgA en los tejidos linfoides asociados al intestino.

Por el contrario, los animales inoculados con las dos dosis de la cepa atenuada no desarrollaron la enfermedad y mostraron una escasa eliminación de virus en las heces. Tanto la respuesta de células secretoras de anticuerpos como la de linfoproliferación fueron mucho menores, aunque al menos la primera estuvo directamente relacionada con la dosis de inóculo empleado.

A pesar de las diferencias mostradas en cuanto al cuadro clínico, la eliminación y la respuesta tanto de células secretoras de anticuerpos como de linfoproliferación, todos los grupos inoculados seroconvirtieron en las dos primeras semanas. El título de IgG sérica fue más elevado en los animales tratados con la cepa virulenta que en los inoculados con las dos dosis de la cepa atenuada mientras que la IgA sérica únicamente pudo ser demostrada en los primeros. Respecto a los anticuerpos específicos frente a las proteínas S y N del VDEP, cabe destacar que fueron predominantemente del isotipo IgA para la proteína S y IgG para la N.

Cuando los distintos grupos de animales fueron desafiados tres semanas más tarde con virus de campo para evaluar la protección proporcionada por cada inóculo, se comprobó que ésta era total en el caso del virus salvaje y sólo parcial y directamente relacionada con la dosis en el caso de la cepa atenuada. El grado de protección estuvo relacionado con los niveles de células secretoras de IgG e IgA medidos en el día del desafío en los tejidos linfoides asociados al intestino y en la sangre, así como con la respuesta de linfoproliferación en los ganglios linfáticos mesentéricos, la sangre y el bazo.

La respuesta inmune tras el desafío varió entre los distintos grupos. En los animales inoculados con el virus salvaje no se detectó una respuesta anamnésica de inmunidad humoral, aunque sí hubo un cierto incremento en la respuesta de linfoproliferación. En cambio, en los grupos de animales inoculados con el virus atenuado se registró una importante respuesta secundaria, fundamentalmente de tipo humoral.

8.- BIBLIOGRAFÍA

8.- BIBLIOGRAFÍA

1. ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. & POBER, J.S.; 1997. *Cellular and molecular immunology*. W.B. Saunders Company (eds.), Philadelphia, EEUU.
2. ABREU-MARTIN, M.T. & TARGAN, S.; 1996. Regulation of immune responses of the intestinal mucosa. *Critical Rev. in Immunol.*, 16: 277-309.
3. ACKERMANN, M.; TOBLER, K.; SINGH, M.; UTIGER, A.; GUSCETTI, F.; BERNASCONI, C. & POSPISCHIL, A.; 1994. Comparison of wild type and cell culture adapted porcine epidemic diarrhoea virus. 6th *Int. Corona and Related Viruses Congr.*, Quebec, Canadá.
4. ARIAS, M. & SÁNCHEZ, C.; 1991. Los anticuerpos. *Porci*, 2: 37-49.
5. BEIER, R. & GEBERT, A. 1998. Kinetics of particle uptake in the domes of Peyer's patches. *Am. J. Physiol.*, 271: G130-G137.
6. BERNASCONI, C.; GUSCETTI, F.; UTIGER, A.; VAN REETH, K.; ACKERMANN, M. & POSPISCHIL, A.; 1994. Experimental infection of gnotobiotic piglets with a cell culture adapted porcine epidemic diarrhoea virus: clinical, histopathological and immunohistochemical findings. En: M. Schwyzer *et al.* (eds.), *Immunobiology of viral infections. Proc. 3rd Congress Europ. Soc. Vet. Virol.*, pp: 542-546.
7. BERTHON, P.; BERNARD, S.; SALMON, H. & BINNS, R.M.; 1990. Kinetics of the in vitro antibody response to transmissible gastroenteritis (TGE) virus from pig mesenteric lymph node cells, using the ELISASPOT and ELISA tests. *J. Immunol. Methods*, 131: 173-182.
8. BIANCHI, A.T.J. & VAN DER HEIJDEN, P.J.; 1994. Antigen presenting cells and B-cells in the pig. *Vet. Immunol. and Immunopathol.*, 43: 63-68.
9. BINNS, R.M.; 1994. Lymphoid tissue structure and lymphocyte trafficking in the pig. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 43: 79 -88.
10. BINNS, R.M.; 1994. The null/ $\gamma\delta$ TCR+ T cell family in the pig. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 43: 69-77
11. BLAND, P.W. & WARREN, L.G.; 1986. Antigen presentation by epithelial cells of the rat small intestine. I. Kinetics, antigen specificity and blocking by anti-Ia antisera. *Immunology*, 58: 1-7.
12. BLAND, P.W. & WARREN, L.G.; 1986. Antigen presentation by epithelial cells of the rat small intestine. II. Selective induction of suppressor T cells. *Immunology*, 58: 9-14.

13. BLIKSLAGER, A.T. & ROBERTS, M.C.; 1997. Mechanisms of intestinal mucosal repair. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 211: 1.437-1.441.
14. BRIDGEN, A.; KOCHERHANS, R.; TOBLER, K.; CARVAJAL, A. & ACKERMANN, M.; 1998. Further analysis of the genome of porcine epidemic diarrhoea virus. En: Enjuanes *et al.* (eds.), *Coronaviruses and Arteriviruses*. Plenum Press Publishers, New York. EEUU, pp. 781-786.
15. BRIDGEN, A.; TOBLER, K. & ACKERMANN, M.; 1993. Polymerase chain reaction amplification of coronaviral cDNA using degenerated primers with sequences derived from conserved regions of coronaviral genomes. *Proc. Symp. on viruses and virus-like agents in disease*. Basel, Suiza.
16. BRIM, T.A.; VAN COTT, J.L.; LUNNEY, J.K. & SAIF, L.J.; 1994. Lymphocyte proliferation responses of transmissible gastroenteritis virus or porcine respiratory coronavirus. *Am. J. Vet. Res.*, 55: 494-501.
17. BRIM, T.A.; VAN COTT, J.L.; LUNNEY, J.K. & SAIF, L.J.; 1995. Cellular immune responses of pigs after primary inoculation with porcine respiratory coronavirus or transmissible gastroenteritis virus and challenge with transmissible gastroenteritis virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 48: 35-54.
18. BRUCE, M.G.; CAMPBELL, I.; XIONG, Y.; REDMOND, M. & SNODGRASS, D.R.; 1994. Recognition of rotavirus antigens by mouse L3T4-positive T helper cells. *J. Gen. Virol.*, 75: 1.859-1.866.
19. CALLEBAUT, P.; DEBOUCK, P. & PENZAERT, M.; 1982. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of the coronavirus-like agent and its antibodies in pigs with porcine epidemic diarrhoea. *Vet. Microbiol.*, 7: 295-306
20. CANALS, A.; ALONSO, F. & TOMILLO, J.; 1992. Analysis of T lymphocyte subsets proliferating in response to infective and UV-inactivated African swine fever viruses. *Vet. Microbiol.*, 33: 117-127.
21. CARVAJAL, A., DE ARRIBA, M.L.; POZO, J. & RUBIO, P.; 1999. Diarrea epidémica porcina e infecciones por rotavirus en el cerdo. En: Consejo General de Colegios Veterinarios de España (eds.), *Enteritis de los lechones. Enfermedades entéricas contagiosas del cerdo. Ciencias Veterinarias*. Vol. XXI, pp: 69-109.
22. CARVAJAL, A.; DIEGO, R.; LANZA, I.; RUBIO, P. & CÁRMENES, P.; 1994. Evaluation of an ELISA for the detection of porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) in feces of naturally infected pigs. En: M. Schwyzer, *et al.* (eds.), *Immunobiology of viral infections. Proc. 3rd Congress Europ. Soc. Vet. Virol.*, pp: 517-519.
23. CARVAJAL, A.; LANZA, I.; DE ARRIBA, M.L.; RUBIO, P.; DEL POZO, M.; ACKERMANN, M. & CÁRMENES, P.; 1995. Caracterización preliminar de una cepa española del coronavirus de la diarrea epidémica porcina. *IV Congreso Nacional de Virología*, Madrid, Septiembre 1995.
24. CARVAJAL, A.; LANZA, I.; DIEGO, R.; RUBIO, P. & CÁRMENES, P.; 1995. Evaluation of a blocking ELISA using monoclonal antibodies for the detection of porcine epidemic diarrhoea virus and its antibodies. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 7: 60-64.
25. CARVAJAL, A.; LANZA, I.; DIEGO, R.; RUBIO, P. & CÁRMENES, P.; 1995. Seroprevalence of porcine epidemic diarrhoea virus infection among different types of breeding swine farms in Spain. *Prev. Vet. Med.*, 23: 33-40.
26. CARVAJAL, A.; 1994. *Epidemiología y diagnóstico de la infección por el coronavirus de la diarrea epidémica porcina*. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de León. España.
27. CASTRO, J.M. Procesos gastroentéricos de origen vírico: gastroenteritis transmisible y otras enterovirosis porcinas. *Anaporc*, 59-69.

28. CAVANAGH, D.; BRIAN, D.A.; ENJUANES, L.; HOLMES, K.V.; HORZINEK, M.C.; LAI, M.M.C.; LAUDE, H.; PLAGEMANN, P.G.W.; SIDDELL, S.G.; SPAAN, W.; TAGUCHI, F. & TALBOT, P.J.; 1994. Revision of the taxonomy of the Coronavirus, Torovirus and Arterivirus genera. *Arch. Virol.*, 135: 227-237.
29. CAVANAGH, D.; BRIAN, D.A.; ENJUANES, L.; HOLMES, K.V.; LAI, M.M.C.; LAUDE, H.; SIDDELL, S.G.; SPAAN, W.; TAGUCHI, F. & TALBOT, P.J. 1990. Recommendations of the coronavirus study group for the nomenclature of the structural proteins, mRNAs and genes of coronaviruses. *Virology*, 176: 306-307.
30. COLIGAN, J.E.; KRUISBEEK, A.M.; MARGULIES, D.H.; SHEVACH, E.M. & STROBER, W.; 1991. Proliferative assays for T cell function. En: J.E Coligan, *et al.* (eds.), *Current protocols in immunology*, 3.12: 1-14.
31. CONE, R. A.; 1999. Mucus. En P.L.Ogra *et. Al.* (eds.), *Mucosal Immunology*. Academic Press, San Diego, EEUU, pp: 43-64.
32. CORTHESEY, B. & KRAEHENBUHL, J.P.; 1999. Antibody-mediated protection of mucosal surfaces. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 236: 93-111.
33. COUSSEMENT, W; DUCATELLE, R.; DEBOUCK, P. & HOORENS, J.; 1982. Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets. I. Histological and histochemical study. *Vet. Pathol.*, 19: 46-56.
34. CUBERO, M.J.; LEON, L.; CONTRERAS, A.; ASTORGA, R.; LANZA, I. & GARCIA, A.; 1993. Transmissible gastroenteritis in pigs in south east Spain: prevalence and factors associated with infection. *Vet. Rec.*, 132: 238-241.
35. CZERKINSKY, C.C.; NILSSON L.A.; OUCHTERLONY, O. & TARKOWSKI, A.; 1983. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J. Immunol. Methods*, 65: 109-121.
36. CHASEY, D. & CARTWRIGHT, S.F.; 1978. Virus-like particles associated with porcine epidemic diarrhoea. *Res. Vet. Sci.*, 25: 255-256.
37. CHEN, W.K.; CAMPBELL, T.; VAN COTT, J. & SAIF, L.J.; 1995. Enumeration of isotype-specific antibody-secreting cells derived from gnotobiotic piglets inoculated with porcine rotaviruses. *Vet Immunol. Immunopathol.*, 45: 265-284.
38. DE ARRIBA, M.L.; 1995. *Inmunidad maternal en la infección natural por el virus de la diarrea epidémica porcina*. Tesina de Licenciatura. Facultad de Veterinaria. Universidad de León. España.
39. DE ARRIBA, M.L.; CARVAJAL, A.; LANZA, I.; RUBIO, P. & CÁRMENES, P.; 1994. Development of an ELISA for the detection of antibody isotypes to porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in sow's milk. En: M. Schwyzer, *et al.* (eds.), *Immunobiology of viral infections. Proc. 3rd Congress Europ. Soc. Vet. Virol.*, pp: 22-225.
40. DE DIEGO, M.; RODRÍGUEZ, F.; ALCARAZ, C.; GÓMEZ, N.; ALONSO, C. & ESCRIBANO, J.M.; 1994. Characterization of the IgA and subclass IgG responses to neutralizing epitopes after infection of pregnant sows with the transmissible gastroenteritis virus of the antigenically related porcine respiratory coronavirus. *J. Gen. Virol.*, 75: 2585-2593.
41. DE DIEGO, M.; RODRÍGUEZ, F.; ALCARAZ, C.; GÓMEZ, N.; ALONSO, C. & ESCRIBANO, J.M.; (1992). Epitope specificity of protective lactogenic immunity against swine transmissible gastroenteritis virus. *J. Virol.*, 66: 6502-6508.

42. DEBOUCK, P. & PENSAERT, M.; 1980. Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV-777. *Am. J. Vet. Res.*, 41: 219-223.
43. DEBOUCK, P. & PENSAERT, M.; 1984. Porcine epidemic diarrhea: Kinetics of actively and passively acquired serum antibodies and the effect of reinfection. *Proc. 8th Int Pig. Vet. Soc Congr.* Ghent, Bélgica, p. 53
44. DEBOUCK, P.; PENSAERT, M. & COUSSEMENT, W.; 1981. The pathogenesis of an enteric infection in pigs, experimentally induced by the coronavirus like agent, CV-777. *Vet. Microbiol.*, 6: 157-165.
45. DELMAS, B.; GELFI, J.; L'HARIDON, R.; VOGEL, L.K.; SJÖSTRÖM, H.; NOREN, O. & LAUDE, H.; 1992. Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature*, 357: 417-420.
46. DUARTE, M. & LAUDE, H.; 1994. Sequence of the spike protein of the porcine epidemic diarrhoea virus. *J. Gen. Virol.* 75: 1.195-1.200.
47. DUARTE, M.; GELFI, J.; LAMBERT, P.; RASSCHAERT, D.; ACKERMANN, M. & LAUDE, H.; 1993. Genome organization of porcine epidemic diarrhea virus. En: H. Laude & J.F. Vautherot (eds.), *Coronaviruses*. Plenum Press Publishers, New York. EEUU, pp.55-60.
48. DUARTE, M.; TOBLER, K.; BRIDGEN, A.; RASSCHAERT, D.; ACKERMANN, M. & LAUDE, H.; 1994. Sequence analysis of the porcine epidemic diarrhea virus genome between the nucleocapsid and spike protein genes reveals a polymorphic ORF. *Virology*, 198: 466-476.
49. DUCATELLE, R.; COUSSEMENT, W.; DEBOUCK, P. & HOORENS, J.; 1982. Pathology of experimental CV-777 coronavirus enteritis in piglets. II. Electron microscopic study. *Vet. Pathol.*, 19: 57-66.
50. EGBERINK, H.F.; EDERVEEN, J.; CALLEBAUT, P. & HORZINEK, M.C.; 1980. Characterization of the structural proteins of porcine epidemic diarrhea virus, strain CV777. *Am. J. Vet. Res.*, 49: 1320-1324.
51. FOSS, D.L. & MURTAUGH M.P.; 1988. Role of macrophage cytokines in mucosal adjuvanticity. *Adv. Vet. Med.*, 41: 83-104.
52. FUJIHASHI, K.; TAGUCHI, T.; AICHER, W.K.; MCGHEE, J.R.; BLUESTONE, J.A.; ELDRIDGE, J.H. & KIYONO, H.; 1992. Immunoregulatory functions for murine intraepithelial lymphocytes: gamma/delta T cell receptor-positive (TCR+) T cells abrogate oral tolerance, while alpha/beta TCR+ T cells provide B cell help. *J Exp. Med.*, 175: 695-707.
53. GERMAIN, R.H. & MARGULIES, D.M.; 1993. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Ann. Rev. Immunol.*, 11: 403-450.
54. GODET, M.; L'HARIDON, R.; VAUTHEROT, J.F. & LAUDE, H.; 1992. TGEV coronavirus ORF4 encodes a membrane protein that is incorporated into virions. *Virology*, 188: 666-675.
55. GUAN, S. & QI, A.; 1995. Contributions of memory B cells to secondary immune response. *Bull. Math. Biol.*, 57: 713-731.
56. GUSCETTI, F.; BERNASCONI, C.; TOBLER, K.; VAN REETH, K.; POSPISCHIL, A. & ACKERMANN, M.; 1998. Immunohistochemical Detection of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Compared to Other Methods. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 5: 412-414.
57. HEEL, A.K.; MCKAULEY, R.D.; PAPADIMITRIOU, J.M. & HALL, J.C.; 1997. Review: Peyer's Patches. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 12: 122-136.

58. HODGINS, C.D.; KANG, S.Y.; DE ARRIBA, M.L.; PARREÑO, V.; WARD, L.A.; YUAN, L.; TÔ, T.L. & SAIF, L.J.; 1999. Effects of maternal antibodies on protection and development of antibody responses to human rotavirus in gnotobiotic pigs. *J. Virol.*, 73: 186-197.
59. HOFMANN, M. & WYLER, R.; 1988. Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture. *J. Clin. Microbio.*, 26: 2.235-2.239.
60. HOFMANN, M. & WYLER, R.; 1989. Quantitation, biological and physicochemical properties of cell culture-adapted porcine epidemic diarrhea coronavirus (PEDV). *Vet. Microbiol.*, 20: 131-142.
61. HOFMANN, M. & WYLER, R.; 1990. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of porcine epidemic diarrhea coronavirus antibodies in swine sera. *Vet. Microbiol.*, 21: 263-273.
62. HOLMES, K. V.; TRESNAN, D.B. & ZELUS, B.D.; 1997. Virus-receptor interactions in the enteric tract. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 412: 125-133.
63. HOLMES, K.V.; DVEKSLER, G.; GAGNETEN, S.; YEAGER, C., LIN, S.H.; BEAUCHEMIN, N.; LOOK, A.T.; ASHMUN, R. & DIEFFENBACH, C.; 1994. Coronavirus receptor specificity. En: H. Laude & J.F. Vautherot (eds.), *Coronaviruses*. Plenum Press Publishers, New York. EEUU, pp: 261-265.
64. ISHIKAWA, K.; SEKIGUCHI, H.; OGINO, T. & SUZUKI, S.; 1997. Direct and rapid detection of porcine epidemic diarrhea virus by RT-PCR. *J. Virol. Methods.*, 69: 191-195.
65. JAMES, S. P.; 1993. The gastrointestinal mucosal immune system. *Dig. Dis.*, 11: 146-156.
66. JOLLÉS, P.; 1996. Lysocyme: Model enzyme in biochemistry and biology. Birkehäuser Verlag. Basel.
67. KAGNOFF, M.F; 1996. Mucosal immunology: new frontiers. *Trends Immunology Today*, 17:57-59.
68. KAISERLIAN, D.; VIDAL, K & REVEILLARD, J.P.; 1989. Murine enterocytes can present soluble antigens to specific class II-restricted CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.*, 19: 1.513-1.516.
69. KANTELE, A.; KANTELE, J.M.; SAVILAHTI, E.; WESTERHOLM, M.; ARVILOMMI, H.; LAZAROVITS, A.; BUTCHER, E.C. & MÄKELÄ, P.H.; 1997. Homing potentials of circulating lymphocytes in humans depend on the site of activation. *J. Immunol.*, 158:574-579.
70. KELSAL, B. & STROBER, W.;1999. En P.L.Ogra *et. al.* (eds.): *Mucosal Immunology*. Academic Press, San Diego, EEUU, pp: 293-318.
71. KLOBASA, F.; WERHAHN, E. & BUTLER, J.E.; 1980. Regulation of humoral immunity in the piglet by immunoglobulins of maternal origin. *Res. Vet. Sci.*, 31:195-206.
72. KNUCHEL, M.; ACKERMANN, M.; MÜLLER, H.K. & KIHM, U.; 1992. An ELISA for the detection of antibodies against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) based on the specific solubility of the viral surface glycoprotein. *Vet. Microbiol.*, 32: 116-134.
73. KOLB, A.F.; HEGYI, A.; MAILE, J.; HEISTER, A.; HAGEMANN, M. & SIDDELL, S.G.; 1998. Molecular analysis of the coronavirus-receptor function of aminopeptidase N. En: Enjuanes *et al.* (eds.), *Coronaviruses and Arteriviruses*. Plenum Press Publishers, New York. EEUU, pp. 61-67.
74. KRAEHEBUHL, J.P. & NEUTRA, M.R.; 1992. Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol. Rev.*, 72: 853-879.

75. KUSANAGI, K.; KUWAHARA, H.; KATOH, T.; TUNOVA, T.; ISHIKAWA, Y. ; SAMEJIMA, T. & TAJIMA, M.; 1992. Isolation and serial propagation of porcine epidemic diarrhea virus in cell cultures and partial characterization of the isolate. *J. Vet. Med. Sci.*, 54: 313-318.
76. KWEON, C.H.; KWON, B.J.; KANG, Y.B. & AN, S.H.; 1994. Cell adaptation and serological survey on porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) infection in Korea. *Kor. J. Vet. Res.*, 34: 321-326.
77. KWEON, C.H.; KWON, B.J.; LEE, J.G.; KWON, G.O. & KANG, Y.B.; 1999. Derivation of attenuated porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) as vaccine candidate. *Vaccine*, 17: 2.546-2.553.
78. KWEON, C.H.; LEE, J.G.; HAN, M.G. & KANG, Y.B.; 1997. Rapid diagnosis of porcine epidemic diarrhea virus infection by polimerasa chain reaction. *J. Vet. Med. Sci.*, 59: 231-232.
79. LANZA, I.; 1991. *Epidemiología de las infecciones por el virus de la gastroenteritis transmisible y el coronavirus respiratorio porcino. Diagnóstico diferencial*. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de León. España.
80. LANZA, I.; RUBIO, P.; FERNÁNDEZ, M.; MUÑOZ, M. & CARMENES, P.; 1993. Seroprevalence of porcine respiratory coronavirus infection in Spanish breeding sows. *Prev. Vet. Med.*, 17: 263-269.
81. LEFRANÇOIS, L.; 1999. Basic aspects of intraepithelial lymphocyte immunobiology . En P.L.Ogra *et al.* (eds): *Mucosal Immunology*. Academic Press, San Diego, EEUU, pp: 413-428.
82. LEVY, O.; 1996. Antibiotic proteins of polymorphonuclear leukocytes. *Eur. J. Haematol.*, 56: 263-277.
83. MARTIN, M.; CASAL, J., LANZA, I.; RUBIO, P. & CARMENES, P.; 1994. Porcine respiratory coronavirus spread in Catalunya, Spain, a previous infection-free area. *Prev. Vet. Med.*, 21: 65-74.
84. MARTÍNEZ ESCRIBANO, J.A.; 1991. Inmunidad de mucosas. *Porci 2*: 56-72.
85. MAYER, L. & BLUMBERG, R.S.; 1999. Antigen presenting cells: Epithelial cells. En P.L.Ogra *et al.* (eds): *Mucosal Immunology*. Academic Press, San Diego, EEUU, pp: 365-380.
86. MCADARAGH, J.P.; BERGELAND, M.E.; MEYER, R.C.; JONHSHOHOY, M.W.; STOTZ, I.J.; BENFIELD, D.A. & HAMMER, R., 1980. Pathogenesis of rotaviral enteritis in gnotobiotic pigs: a microscopy study. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 173: 544-547.
87. McGHEE, J.R.; MESTECKY, J.; DERTZBAUGH, M.T. & ELDRIDGE, J.H.; 1992. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine.*, 10: 75-88.
88. MOON, H.W.; 1978. Mechanisms in the pathogenesis of diarrhea: a review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 172: 443-448.
89. MOXLEY R.A. & OLSON, L.D.; 1989. Clinical evaluation of transmissible gastroenteritis virus vaccines and vaccination procedures for inducing lactogenic immunity in sows. *Am. J. Vet. Res.*, 50: 111-118.
90. MURPHY, F.A.; GIBBS, E.P.J.; HORZINEK, M.C. & STUDDERT, M.J.; 1999. Viral taxonomy and nomenclature. En: F.A. Murphy *et al.* (eds). *Veterinary Virology*. Academic Press, San Diego, EEUU, pp: 23-42.
91. NEUTRA, M.R. & KRAHENBUHL J.P.; 1999. Cellular and molecular basis for antigen transport across epithelial barriers. En P.L .Ogra *et al.* (eds): *Mucosal Immunology*. Academic Press, San Diego, EEUU, pp: 101-114.

92. NEUTRA, M.R.; FREY, A. & KRAHENBUHL J.P.; 1996. Epithelial M cells: Gateways for mucosal infection and immunization. *Cell.*, 86: 345-348.
93. NEUTRA, M.R.; PRINGAULT, E. & KRAHENBUHL J.P.; 1996. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 14: 275-300.
94. OFFIT, P.A.; OFFENBERG, E.S.; PIA, P.A.; PANACKAL & HILL, N.L.; 1992. Rotavirus-specific helper T cell responses in newborns, infants, children and adults. *J. Infect. Dis.*, 165: 1.107-1.111.
95. OLDHAM, J.; 1972. *Pig farming*, Oct.suppl:72-73.
96. PARK, S.; SESTAK, K.; HODGINS, D.C.; SHOUP, D.I.; WARD, L.A.; JACKWOOD, D.J. & SAIF, L.J.; 1998. Immune response of sows vaccinated with attenuated transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and recombinant TGEV spike protein vaccines and protection of their suckling pigs against virulent TGEV challenge exposure. *Am. J. Vet. Res.*, 59: 1.002-1.008.
97. PARREÑO, V.; HODGINS, C.D.; DE ARRIBA, M.L.; KANG, S.Y.; YUAN, L.; WARD, L.A.; TÔ, T.L. & SAIF, L.J.; 1999. Serum and intestinal isotype antibody responses to Wa human rotavirus in gnotobiotic pigs are modulated by maternal antibodies. *J. Gen. Virol.*, 80: 1.417-1.428.
98. PATTON, J.T.; 1994. Rotavirus replication. *Curr. Top. in Microbiol. and Immunol.*, 185: 107-127.
99. PAUL, P.S.; MENGELING, W.L.; MALSTROM, C.E. & VAN DEUSEN, R.A.; 1989. Production and characterization of monoclonal antibodies to porcine immunoglobulin gamma, alpha and light chains. *Am.J. Vet. Res.*, 50: 471-479.
100. PENSAERT, M.B. & DEBOUCK, P.; 1978. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch. Virol.*, 58: 243:247.
101. PENSAERT, M.B.; 1989. Transmissible gastroenteritis virus (respiratory variant). En : M.B. Pensaert (eds.), *Virus infections of porcines*. Elseviers Science Publishers B.V., Amsterdam, Holanda, pp.154-165.
102. PENSAERT, M.B.; 1999. Porcine Epidemic Diarrhea. En: B.E. Straw, *et al.* (eds). *Diseases of swine*. Iowa State University Press, Iowa, EEUU, pp 179-185.
103. PENSAERT, M.B.; CALLEBOUT, P. & DEBOUCK, P.; 1982. Porcine epidemic diarrhea (PED) caused by a coronavirus: present knowledge. *Proc. 6th Int. Pig Vet. Soc. Congr.*, Mexico, Mexico, p.52.
104. PENSAERT, M.B.; HAELTERMAN, E.O. & BURNSTEIN, T.; 1968. Diagnosis of transmissible gastroenteritis in pigs by means of immunofluorescence. *Can. J. Comp. Med.*, 32: 555-561.
105. PESCOVITZ, M.D.; 1999. Immunology of the pig. En: Pastoret *et al.* (eds). *Handbook of vertebrate immunology*. Academic Press, San Diego, EEUU, pp: 373-419.
106. PIJPERS, A.; VAN NIEWSTADT, A.P.; TERPSTRA, C. & VERHEIJDEN, J.H.M.; 1993. Porcine epidemic diarrhoea viruses cause of persistent diarrhoea in a herd of breeding and finishing pigs. *Vet. Rec.*, 132: 129-131.
107. POZO, J.; CARVAJAL, A.; DE ARRIBA, M.L.; LANZA, I. & RUBIO, P.; 1998. Presence of *Lawsonia intracellularis* as an aethiological agent in enteric disorders in Spanish swine herds. *Proc. 15th Int Pig. Vet. Soc. Congr.* Birmingham, England, p. 416.
108. PRUITT, K.M. ; RAHEMTULLA, B.; RAHEMTULLA, F. & RUSSEL M.W.; 1999. Innate humoral factors. En P.L.Ogra *et. Al.* (eds): *Mucosal Immunology*. Academic Press, San Diego, EEUU, pp:65-88.

109. REED, L. & MUENCH, H.; 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, 27: 493.
110. ROTH, J.A.; 1999. The immune system. En: B.E. Straw *et al.* (eds). *Diseases of swine*, Iowa State University Press, Iowa, EEUU, pp: 799-820.
111. RUEDL, C.& HUBELE, S.; 1997. Maturation of Peyer's patch dendritic cells in vitro upon stimulation via cytokines or CD40 triggering. *Eur. J. Immunol.*, 27: 1.325-1.330.
112. SAIF, L.J. & FERNÁNDEZ, F.M.; 1996. Group A rotavirus veterinary vaccines. *Vaccine*, 174: S98-S106.
113. SAIF, L.J.& WESLEY, R.D.; 1999. Transmissible gastroenteritis and porcine respiratory coronavirus. En: B.E. Straw, *et al.* (eds). *Diseases of swine*. Iowa State University Press, Iowa, EEUU, pp: 295-325.
114. SAIF, L.J.; 1993. Coronavirus immunogens. *Vet Microbiol.*, 37: 285-297.
115. SAIF, L.J.; 1996. Mucosal immunity: an overview and studies of enteric and respiratory coronavirus infections in a swine model of enteric disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 54: 163-169.
116. SAIF, L.J.; 1998. Enteric Viral infections of swine. *Proc. 15th Int Pig. Vet. Soc. Congr.* Birmingham, England, pp. 57-61.
117. SAIF, L.J.; 1999. Enteric viral infections of pigs and strategies for induction of mucosal immunity. *Adv. Vet. Med.*, 41: 429-445.
118. SAIF, L.J.; VAN COTT, J.L. & BRIM, T.A.; 1994. Immunity to transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus infections in swine. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 43: 89-97.
119. SAIF, L.J.; YUAN, L; WARD, L.A. & TO, T.L.; 1997. Comparative studies of the pathogenesis, antibody immune responses, and homologous protection to porcine and human rotaviruses in gnotobiotic piglets. En: Paul *et al.* (eds) *Mecanismos in the patogenesis of enteric diseases*. Plenum Press, New York, EEUU, pp: 397-403.
120. SAIF, L.J.; YUAN, L; WARD, L.A.; ROSEN, B.I. & TO, T.L.; 1996. The gnotobiotic piglet as a model for studies of disease pathogenesis and immunity to human rotaviruses. *Arch. Virol.*, 12: 153-161.
121. SALMI, M.& JALKANEN, S.; 1997. How do lymphocytes know where to go: Current concepts and enigmas of lymphocyte homing. *Adv. Immunol.*, 64: 139-218.
122. SALLUSTO, F. & LANZAVECCHIA, A.; 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.*, 173: 1345-1356.
123. SANDERSON, I.R. & WALKER, W.A.; 1999. Mucosal barrier: An overview. En P.L.Ogra *et al.* (eds.): *Mucosal Immunology*. Academic Press, San Diego, EEUU, pp: 5-18.
124. SAVAGE, D.C.; 1999. Mucosal microbiota. En P.L.Ogra *et al.* (eds.): *Mucosal Immunology*, Academic Press, San Diego, EEUU, pp: 5-18.
125. SCHMITZ, A., TOBLER, K.; SUTER, M. & ACKERMANN, M.; 1998. Prokaryotic expression of porcine epidemic diarrhoea ORF3. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 440: 775-780.
126. SEDGWICK, J.D. & HOLT, P.G.; 1983. A solid phase immunoenzymatic technique for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J. Immunol. Methods*, 57: 301-309.

127. SIDDELL, S.G.; WEGE, H. & TER MEULEN, V.; 1983. The structure and replication of coronaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 99: 131-163.
128. STUMBLES, P.A.; MC WILLIAM, A.S. & HOLT, P.G.; 1999. Dendritic cells and mucosal macrophages. En: P.L.Ogra *et al.* (eds): *Mucosal Immunology*. Academic Press, San Diego, EEUU, pp: 397-412.
129. SUEYOSHI, M.; TSUDA, T.; YAMAZAKI, K.; YOSHIDA, K.; NAKAZAWA, M.; SATO, K.; MINAMI, T.; IWASHITA, K.; WATANABE, M.; SUZUKI, Y & MORI, M.; 1995. An Immunohistochemical investigation of porcine epidemic diarrhoea. *J. Comp. Pathol.*, 113: 59-67.
130. SVENNERHOLM, A.M.; HOLMGREN, J; HANSON, L.A.; LINDBLAD, B.S.; QUERESHI, F. & RAHIMTOOLA, R.J.; 1977. Boosting of secretory IgA antibody responses in man by parenteral cholera vaccination. *Scan. J. Immunol.*, 6: 1.345-1.349.
131. TAKAHASHI, I. & KIYONO, H.; 1998. $\gamma\delta$ T cells: bodyguards and/ or sleepers in the gut. *Chem. Immunol.*, 71:77- 87.
132. TIZARD, I.; 1995. Inmunidad en el feto y en el recién nacido. En: *Inmunología veterinaria*. Interamericana, McGraw-Hill (eds.), México, D.F. (México) pp: 280-293
133. TÔ, T.L.; WARD L.A.; YUAN, L. & SAIF, L.J.; 1998. Serum and intestinal isotype antibody responses and correlates of protective immunity to human rotavirus in a gnotobiotic pig model of disease. *J. Gen. Virol.*, 79: 2661-2672.
134. TOBLER, K.; 1996. Partial characterisation of the genome of porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV). Inaugural – Dissertation. Universidad de Zurich, Suiza.
135. TOBLER, K.; KOCHERHANS, R. & ACKERMANN, M.; 1995. Detection of porcine epidemic diarrhoea coronavirus by RT-PCR. En: Y. Becker & G. Daray (eds.), *PCR: protocols for diagnosis of human and animal virus diseases*. Springer- Verlag, Berlin, Germany, pp: 483-490.
136. TOBLER, K; BRIDGEN, A. & ACKERMANN, M.; 1994. Sequence analysis of the nucleocapsid protein gene of porcine epidemic diarrhoea virus. En: H. Laude & J.F. Vautherot (eds.), *Coronaviruses*. Plenum Press Publishers, New York. EEUU, pp. 49-54.
137. TOTTERDELL, B.M., BANATVALA, J.E.; CHRYSTIE, I.L., BALL, G. & CUBITT, W.D.; 1988. Systemic lymphoproliferative responses to rotavirus. *J. Med. Virol.*, 25: 37-44.
138. UNDERDOWN, B.J. & SCHIFF, J.M.; 1986. Immunoglobulin A: Strategic defense initiative at the mucosal surface. *Ann. Rev. Immunol.*, 4: 389-417.
139. UTIGER, A.; ROSSKOPF, M.; GUSCETTI, F. & ACKERMANN, M; 1994. Preliminary characterization of a monoclonal antibody specific for a viral 27 kD glycoprotein family synthesized in porcine epidemic diarrhoea virus infected cells. En: H. Laude & J.F. Vautherot (eds.), *Coronaviruses*. Plenum Press Publishers, New York. EEUU, pp. 197-202.
140. UTIGER, A.; TOBLER, K.; BRIDGEN, A. & ACKERMANN, M; 1995. Identification of the membrane protein of porcine epidemic diarrhoea virus. *Virus Genes*, 10: 137-148.
141. UTIGER, A.; TOBLER, K.; BRIDGEN, A.; SUTER, M.; SINGH, M. & ACKERMANN, M; 1995. Identification of proteins specified by porcine epidemic diarrhoea virus. En: P.J. Talbot & G. A. Levi (eds.), *Corona- and Related Viruses*. Plenum Press Publishers, New York. EEUU, pp. 287-290.
142. VAN COTT, J.L.; BRIM,T.A.; LUNNEY, J.K. & SAIF, L.J.; 1994. Contribution of antibody-secreting cells induced in mucosal lymphoid tissues of pigs inoculated with respiratory or enteric

- strains of coronavirus to immunity against enteric coronavirus challenge. *J.Immunol.*, 152: 3.980-3.990.
143. VAN COTT, J.L.; BRIM,T.A.; SIMKINS, R.A. & SAIF, L.J.; 1993. Isotype-specific antibody-secreting cells to transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus in gut- and bronchus-associated lymphoid tissues of suckling pigs. *J. Immunol.*, 155: 3.990-4.000.
144. VAN NIEWSTADT, A.P. & ZETSTRA, T.; 1991. Use of two enzyme-linked immunosorbent assays to monitor antibody responses in swine with experimentally induced infection with porcine epidemic diarrhea virus. *Am. J. Vet. Res.*, 7: 1.044-1.050.
145. VAN REETH, K. & PENZAERT, M.; 1994. Prevalence of infections with enzootic respiratory and enteric viruses in feeder pigs entering fattening herds. *Vet. Rec.*, 135: 594-597.
146. WARD L.A.; YUAN, L.; ROSEN, B.I.; TÔ, T.L. & SAIF, L.J.; 1996. Development of mucosal and systemic lymphoproliferative responses and protective immunity to human Group A rotavirus in a gnotobiotic pig model. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 3: 332-350.
147. WARD, L.A.; RICH, E.D. & BESSER, T.E.; 1996. Role of maternally derived circulating antibodies in protection of neonatal swine against porcine Group A rotavirus. *J. Infect. Dis.*, 174: 276-282.
148. WELCH, S.K.W.; SAIF, L.J. & RAM, S; 1988. Cell-mediated immune responses of suckling pigs inoculated with attenuated or virulent transmissible gastroenteritis virus. *Am. J. Vet. Res.*, 49: 1.228-1.234.
149. WELTER, M.W.; HORSTMAN, M.P.; WELTER, C.J. & WELTER, L.M.; 1993. Anvreview of successful TGEV vaccination strategies and discussion on the interrelationship between TGEV and PRCV. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 342: 463-468.
150. WITTE, K.H.; PRAGER, D.; ERNST, H. & NEUHOFF, H.; 1981. Die Epizootische Virusdiarrhoe (EDV). *Tierärztl. Umsch.*, 36: 235-250.
151. WOOD, E.N.; 1977. An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhoea. *Vet. Rec.*, 100: 243-244.
152. YEAGER, C.L.; ASHMUN, R.A., WILLIAMS, R.K.; CARDELLICHIO, C.B., SHAPIRO, L.H.; LOOK, A.T. & HOLMES, K.V.; 1992. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature*, 357: 420-422.
153. YUAN, L; KANG, S.Y.; WARD, L.A.; TO, T.L. & SAIF, L.J.; 1998. Antibody-secreting cell responses and protective immunity assessed in gnotobiotic pigs inoculated orally or intramuscularly with inactivated human rotavirus. *J. Virol.*, 72: 330-338.
154. YUAN, L; WARD, L.A.; ROSEN, B.I.; TO, T.L. & SAIF, L.J.; 1996. Systemic and intestinal antibody-secreting cell responses and correlates of protective immunity to human rotavirus in a gnotobiotic pig model of disease. *J. Virol.*, 70: 3.075-3.083.