



BIENVENIDOS

Lapisa®



Pre-Congreso

Lapisa®

Agenda

14:30-14:40	Presentación	Alfredo Franco
14:40-15:40	Influenza Porcina Actualizaciones sobre el control de casos clínicos y diagnostico	Dr. Matt Ackerman
15:40-16:40	Actualizaciones en el Diagnostico e inmunidad frente al virus de DEP	Dr. Luis Giménez Lirola
16:40-17:10	Avances sobre la actualización de una vacuna experimental frente al virus de DEP	MV. Juan M. Hernández
17:10-17:30	Sesión de preguntas y respuestas	Alfredo Franco

Influenza Porcina. Actualizaciones en el control de casos clínicos y diagnóstico



Matt Ackerman

- Doctorado en la Universidad de Illinois
- Responsable de 100 mil Vientres en 5 estados de USA
- Fundador del “Swine Veterinarian Service” Greensburg- Indiana



asociación mexicana de veterinarios
especialistas en cerdos, a.c.

Influenza A Virus (IAV) – Update on Clinical Case Control & Diagnostics (US Experience)

Supported by Lapisa Salud Animal

Matt Ackerman, DVM

Pork Veterinary Solutions

July 20, 2016

Pork Veterinary Solutions

Matt Ackerman & Alex Hintz





Pork Veterinary Solutions New Palestine, Indiana USA

Matt Ackerman, DVM

- Served on [Newsham] Choice Genetics advisory board
since 1997
- Served as Coordinating Veterinarian for Signature Farms
2001- 2014
- Served on Alpharma Animal Health advisory board
2005-2011
- Served on Bayer Animal Health advisory board
since 2011
- Served on Pharmgate Animal Health advisory board
since 2013

In 45 minutes – Managing Influenza:

1. What we know
 - a. Introduction
 - b. History
 - c. Economics
2. What we do
 - a. Prevention
 - b. Treatment
 - c. Diagnostics
3. How it works
 - a. Analysis
 - b. Control



asociación mexicana de veterinarios
especialistas en cerdos, a.c.

Influenza A Virus (IAV) – What We Know

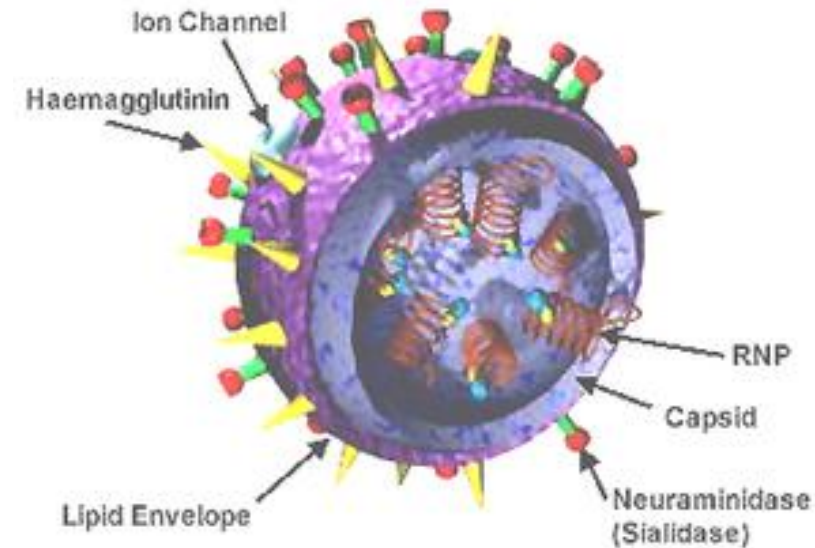
Matt Ackerman, DVM

Pork Veterinary Solutions

July 20, 2016

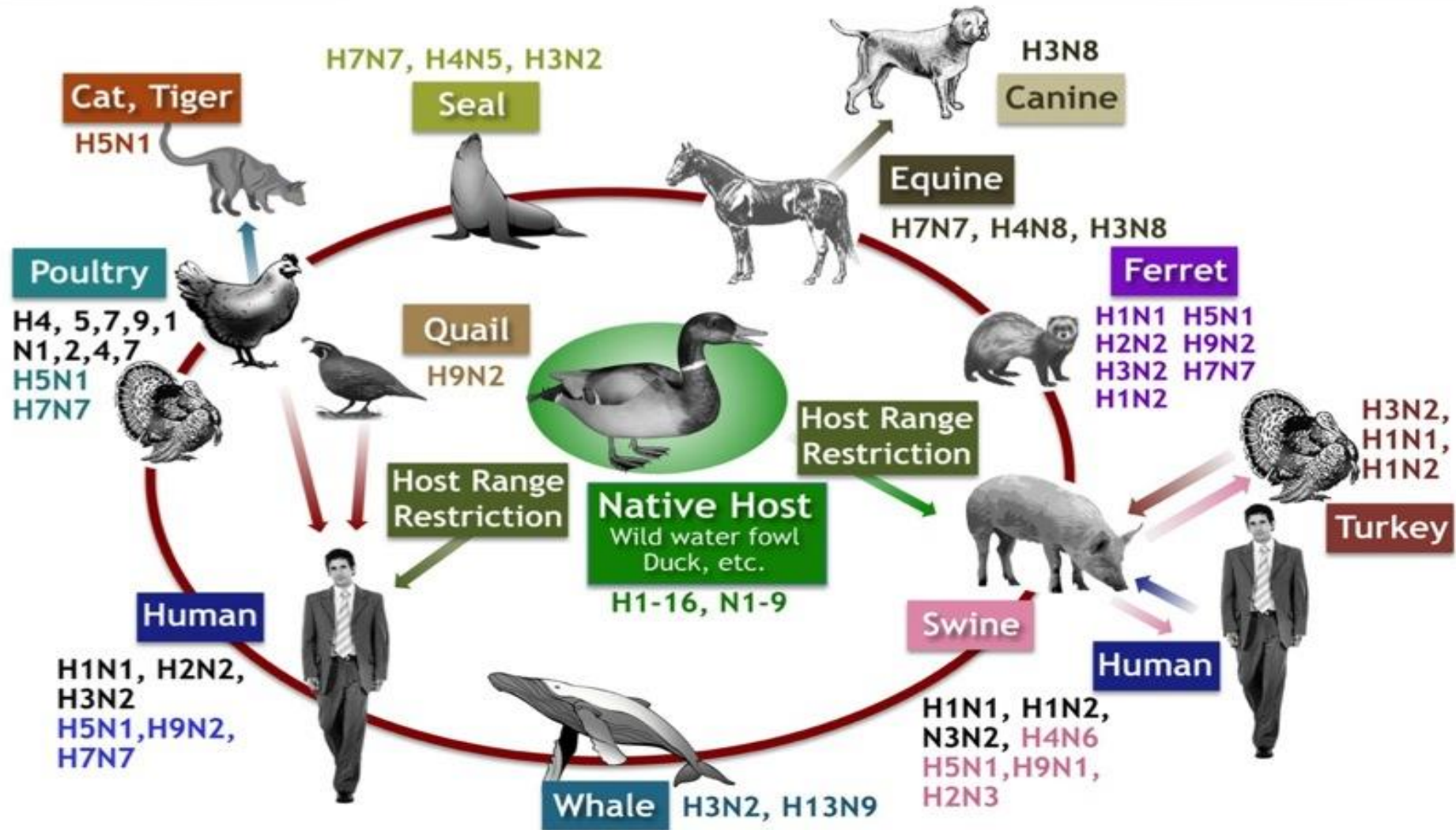
Introduction

- Flu infected herds represent a challenge:
 - Difficult to control infections
 - Source of virus to other herds
 - Cost to producers
 - USD \$3-10 (55-185 Pesos) /pig
 - Risk to public health



Courtesy Dr. Montse Torremorell – University of Minnesota

Influenza – A shard Disease



Influenza A Virus - Swine

- SIV – Swine Influenza Virus
 - 2009 - US and Mexico
 - Media called it “Swine Flu” and caused much economic hardship
 - misconception of food safety issues
 - losses estimated at over 18 billion pesos (over \$1 billion US)
- **IAV – Influenza A Virus**
 - IAV-S – Influenza A Virus - Swine
 - Flu

Transmission of IAV

- Pig to pig (contact)
- Pig movement
- Aerosol
- Humans to pigs (and pigs to humans)
- Birds
- Fomites (clothing, equipment, materials, etc)
- *Not transmitted by semen*
- *Not transmitted in utero*

History - IAV – Influenza A Virus

- Influenza in the US in pigs and people since 1918
 - infected an estimated 500 million people worldwide
 - about 1/3 of the planet's population at the time
 - killed an estimated 20 to 50 million victims
 - more than 25% of the US population became sick
 - some 675,000 Americans died during the pandemic
- In Swine
 - From 1960-1997 – just H1N1
 - Then H3N2 in 1998
 - Then H1N2 in 2000
 - Then all kinds of virus strains and mutations!

Emergence and Evolution of Influenza in Swine

Current Topics in Microbiology and Immunology 2012

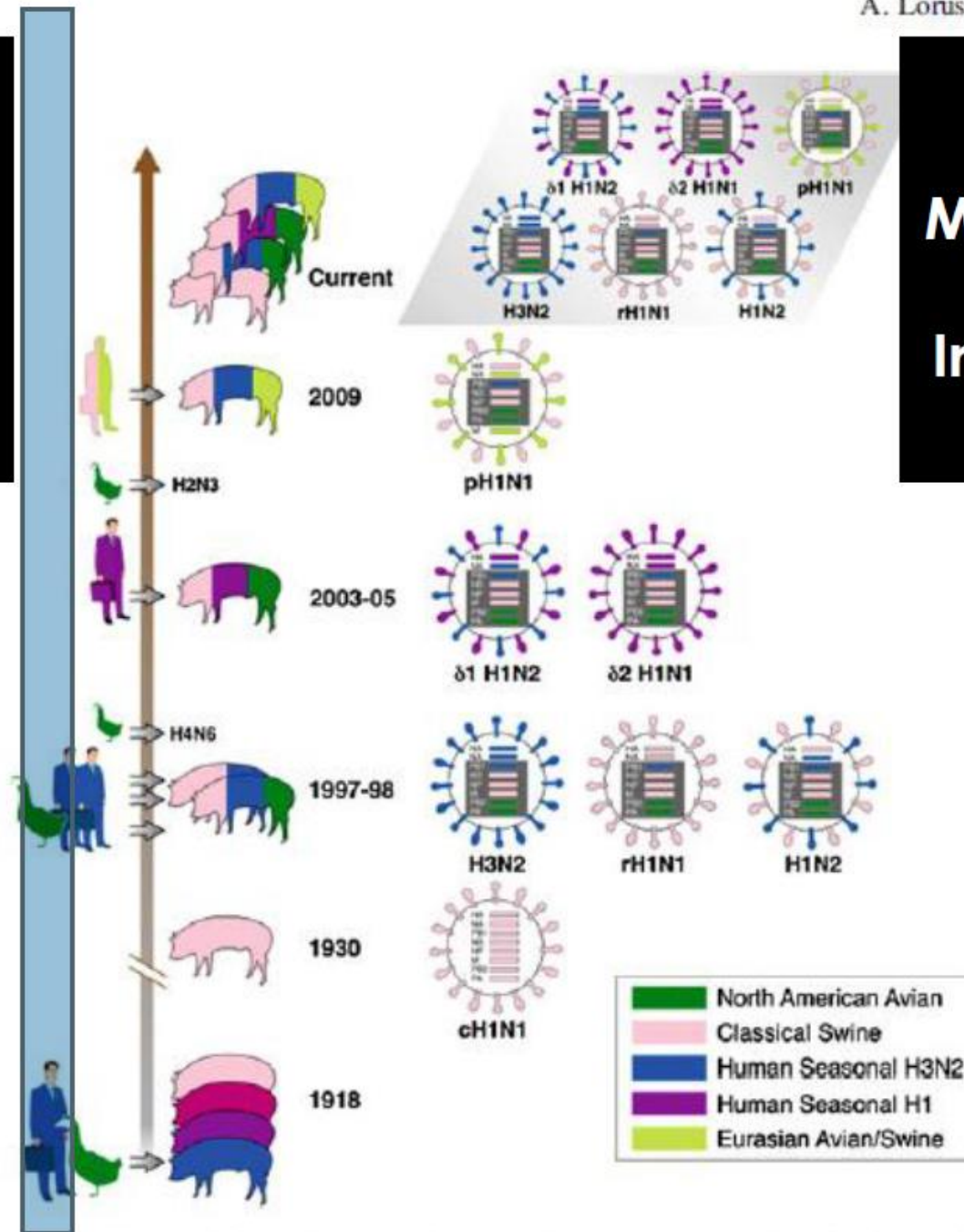
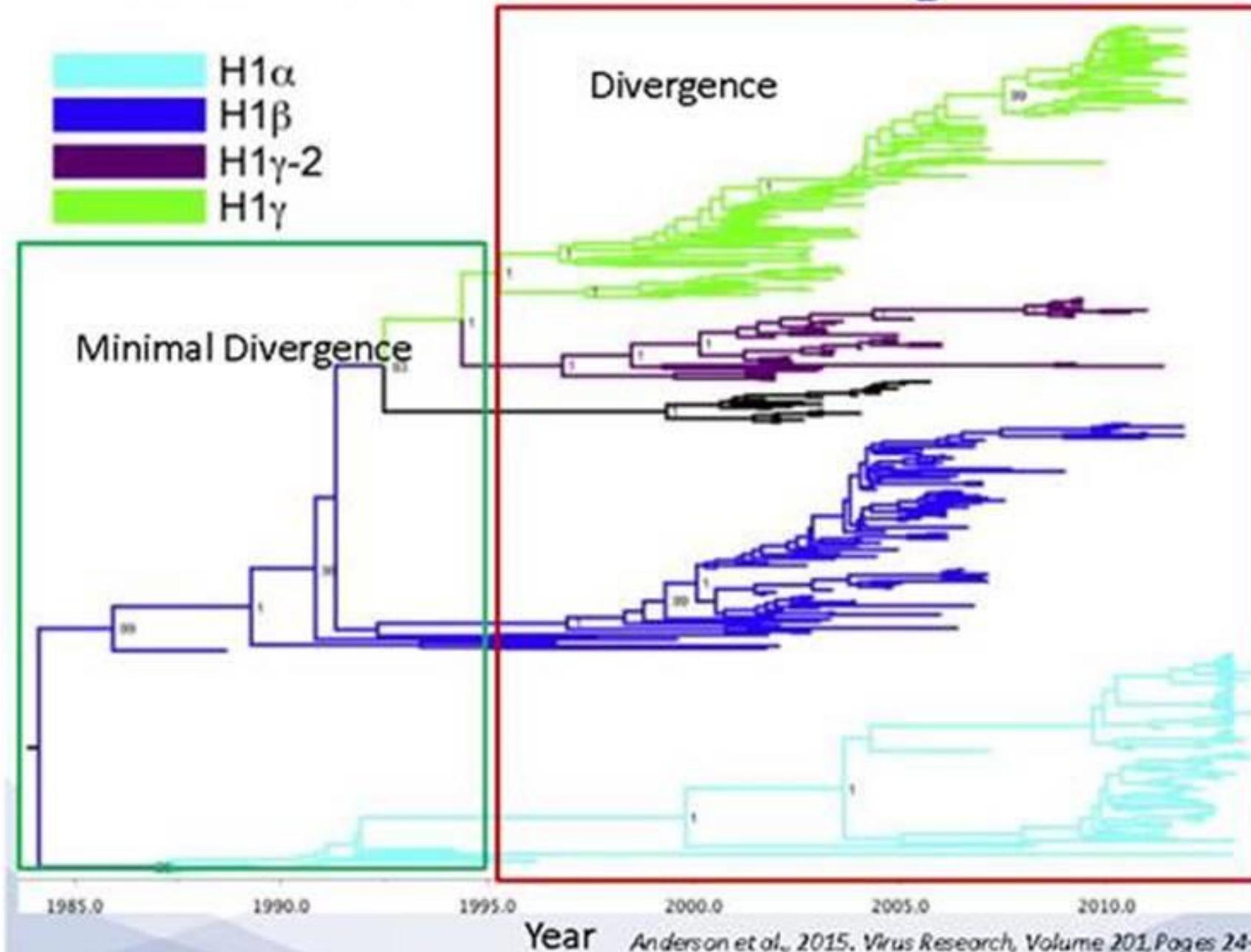


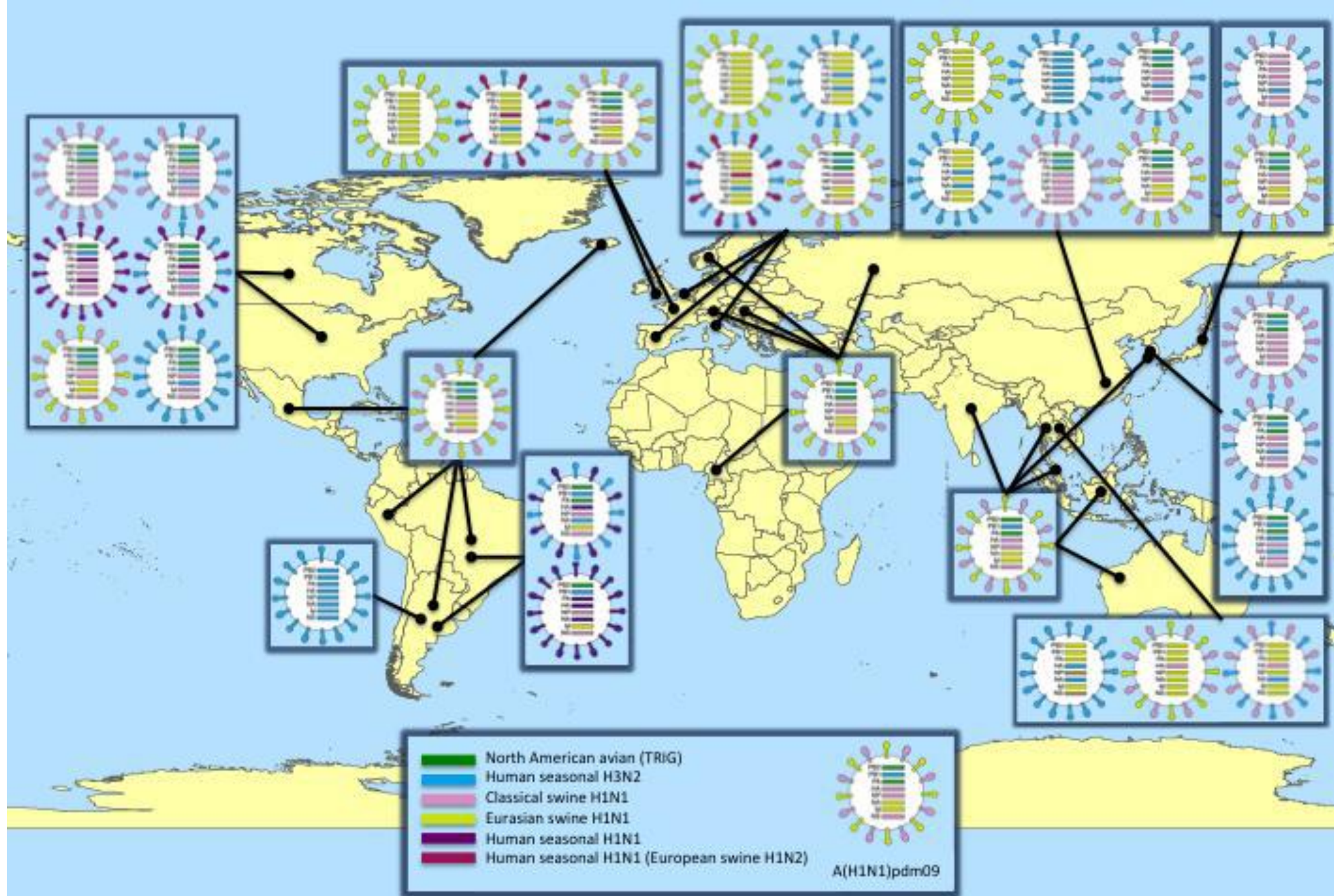
Fig. 1 Epidemiology and genetic composition of influenza viruses from U.S. and Canadian pigs.

Influenza A Virus Divergence is Increasing



- There was low strain divergence from 1985 – 1995
- From 1995 on, diversity has been increasing - even within subclusters
- Novel isolate H1 γ -2
- Quasi/subdominant species go undetected

**Dr. Marie
Culhane -
March
2014 -
AASV**



Assessing production parameters and **economic impact** of swine influenza, PRRS and *Mycoplasma hyopneumoniae* on finishing pigs in a large production system

Cara Dykhuis Haden¹, BS; Tom Painter³, DVM; Thomas Fangman², DVM, MS, DABVP;
Derald Holtkamp¹, DVM, MS

¹Iowa State University, Ames, Iowa; ²Boehringer Ingelheim Vetmedica, St. Joseph, Missouri; ³Cargill Pork, Wichita, Kansas

Economics of SIV, PRRS & Myco

2012 AASV Annual Meeting: Integrating Science, Welfare, and Economics in Practice

Table 1: Productivity and economic impact of SIV, PRRS, and *M hyopneumoniae*

Pathogen/combination	Difference from baseline in %MCT	Difference from baseline in ADG	Difference from baseline in loss per head placed
M hyo	2.15%	0.04	\$0.63
PRRS	1.68%	-0.11	\$5.57
SIV	1.87%	-0.04	\$3.23
PRRS and M hyo	5.43%**M**P	-0.14*M*P	\$9.69
PRRS and SIV	4.34%**S**P	-0.16**S	\$10.41
SIV and M hyo	3.46%**M*S	-0.18**S	\$10.12

** M,P,S = combinations vs. M/P/S; $P < 0.05$

*20M,P,S = combinations vs. M/P/S; $P < 0.1$

Economics of SIV, PRRS & Myco - Pesos

Pathogen / combination	Difference from baseline in %MCT	Difference from baseline in ADG	Difference from baseline in loss per head placed	Pesos
Myco	2.15%	0.04	\$0.63	12
PRRS	1.68%	-0.11	\$5.57	103
SIV	1.87%	-0.04	\$3.23	60
Myco & PRRS	5.43%**M**P	-0.14*M*P	\$9.69	180
PRRS & SIV	4.34%**S**P	-0.16**S	\$10.41	193
Myco & SIV	3.46%**M*S	-0.18**S	\$10.12	188

Exchange rate - Pesos 18.57 to 1 USD



asociación mexicana de veterinarios
especialistas en cerdos, a.c.

Influenza A Virus (IAV) – What We Do

Matt Ackerman, DVM

Pork Veterinary Solutions

July 20, 2016

Influenza A Virus

- Prevention
- Diagnosis
- Treatment

Vaccinate incoming Gilts

- Porcimine Influenza –
 - On arrival and
 - 3 weeks later
- Objective –
 - Have the gilts protected in isolation prior to entering the breeding herd
 - Killed vaccine needs 2 doses
 - Priming dose
 - Booster dose

Vaccinate Sow Herds

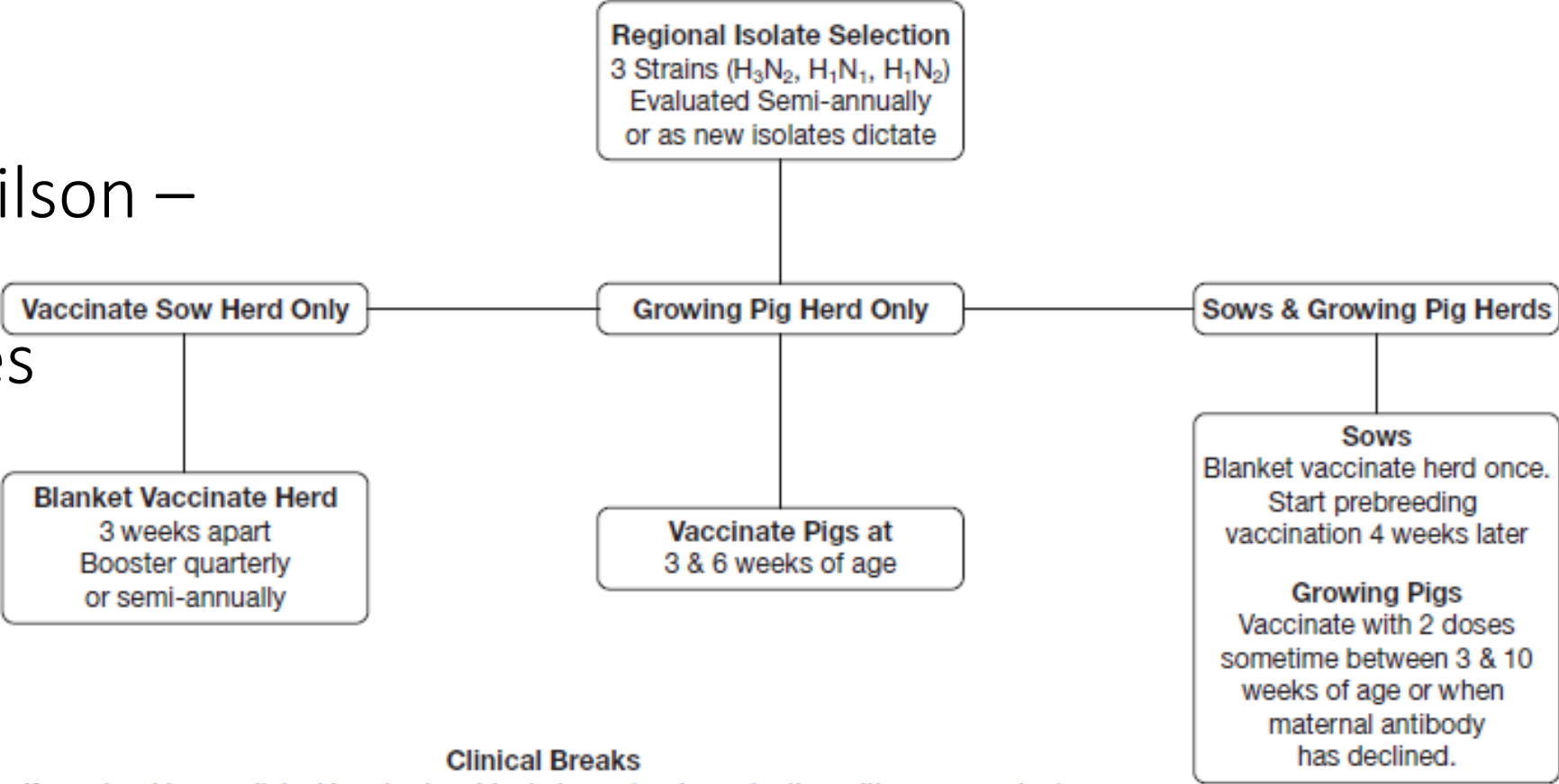
- Vaccinate 3 to 6 weeks pre-farrowing
- Objective –
 - Keep the sows protected in the breeding herd
 - Boost the maternal antibodies passed to the offspring
 - Protect pigs 6 to 8 weeks of age into the nursery

Vaccinate Pigs?

- Generally don't because of cost
- However:
 - Continuous flow sites
 - Genetic Multiplication
 - Large sites
 - Problem flows
 - Seasonal issues
- Constant Economic Evaluation
 - IAV is costing you 60 to 193 pesos

Swine Influenza Virus (SIV)
Vaccination Strategy

Dr. Keith Wilson –
Newport
Laboratories



Clinical Breaks

If sow herd has a clinical break, do a blanket sow herd vaccination with a monovalent vaccine and booster 3 weeks later.

Replacement Gilts

In all scenarios, replacement gilts should receive 2 doses sometime prior to breeding.



Monitor for Clinical Signs

- If pigs get sick, send in diagnostic samples to the lab
 - Tissue samples (lungs)
 - Nasal swabs
 - Oral fluids
 - Serology (Monitoring of [maternal] antibodies)

Video

[Combined - Thump - EU - Post Respiratory.mp4](#)

IAV Pictures

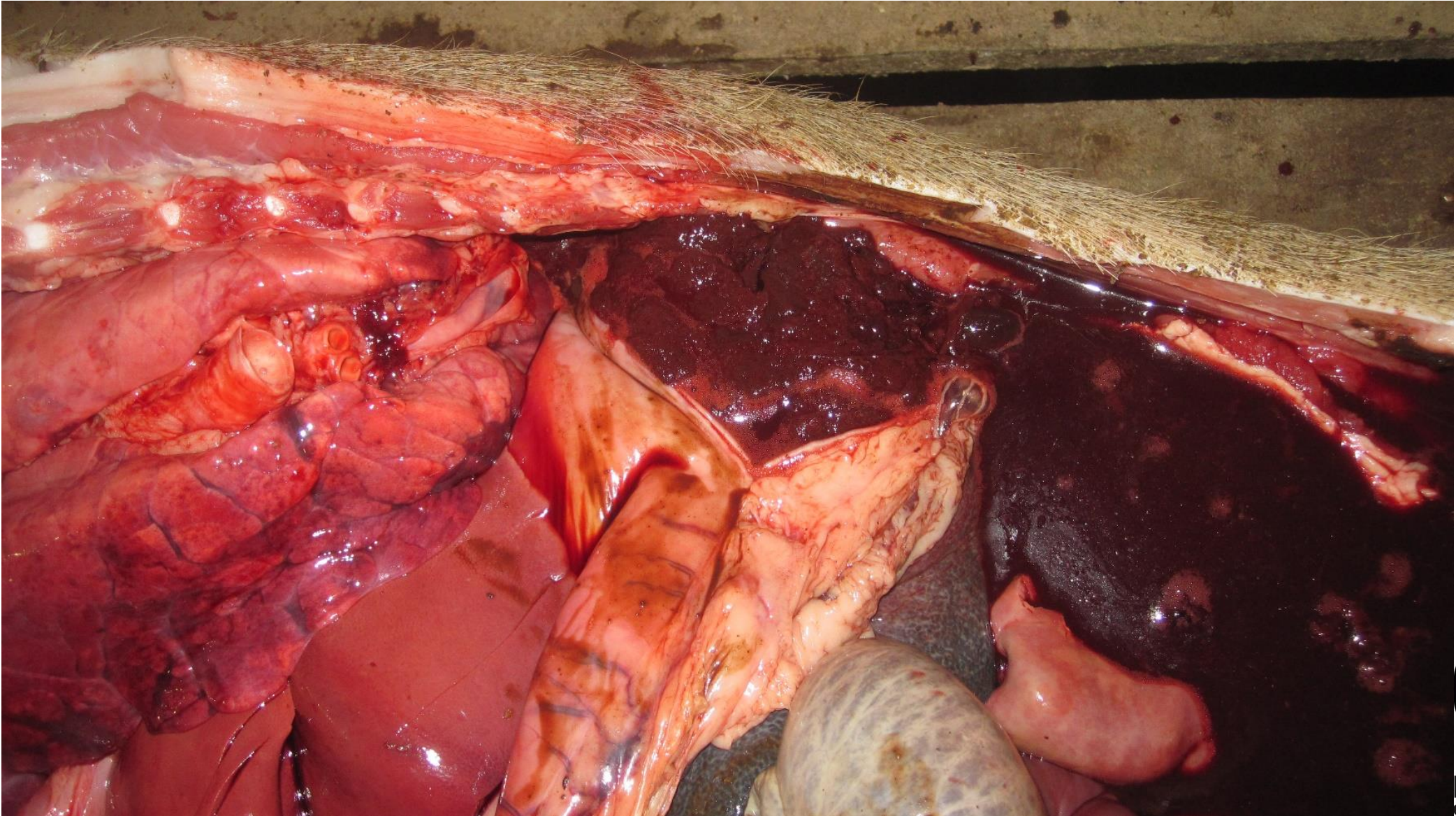
Courtesy of
Dr. Alejandro
Ramirez -
Iowa State
University



Blanched out



Gastric Ulcers



Wet heavy lung



Treatment – Influenza Virus A

- Medicate – as advised by your Veterinarian
- Aspirin in water
- Antibiotics as appropriate for secondary bacterial infections
 - Strep suis
 - Haemophilus parasuis - HPS
 - A suis
 - Mycoplasma
 - APP
 - Ileitis

Diagnostic Tests

- PCR
- Virus Isolation
- Histopathology
- Subtype to determine the H & N fraction
 - H (H1, H3)
 - N (N1, N2 and N3)
- Sequencing of the hemagglutinin
- Immunohistochemistry
- Serology



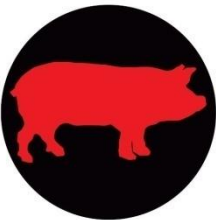
asociación mexicana de veterinarios
especialistas en cerdos, a.c.

Influenza A Virus (IAV) – How it Works

Matt Ackerman, DVM

Pork Veterinary Solutions

July 20, 2016

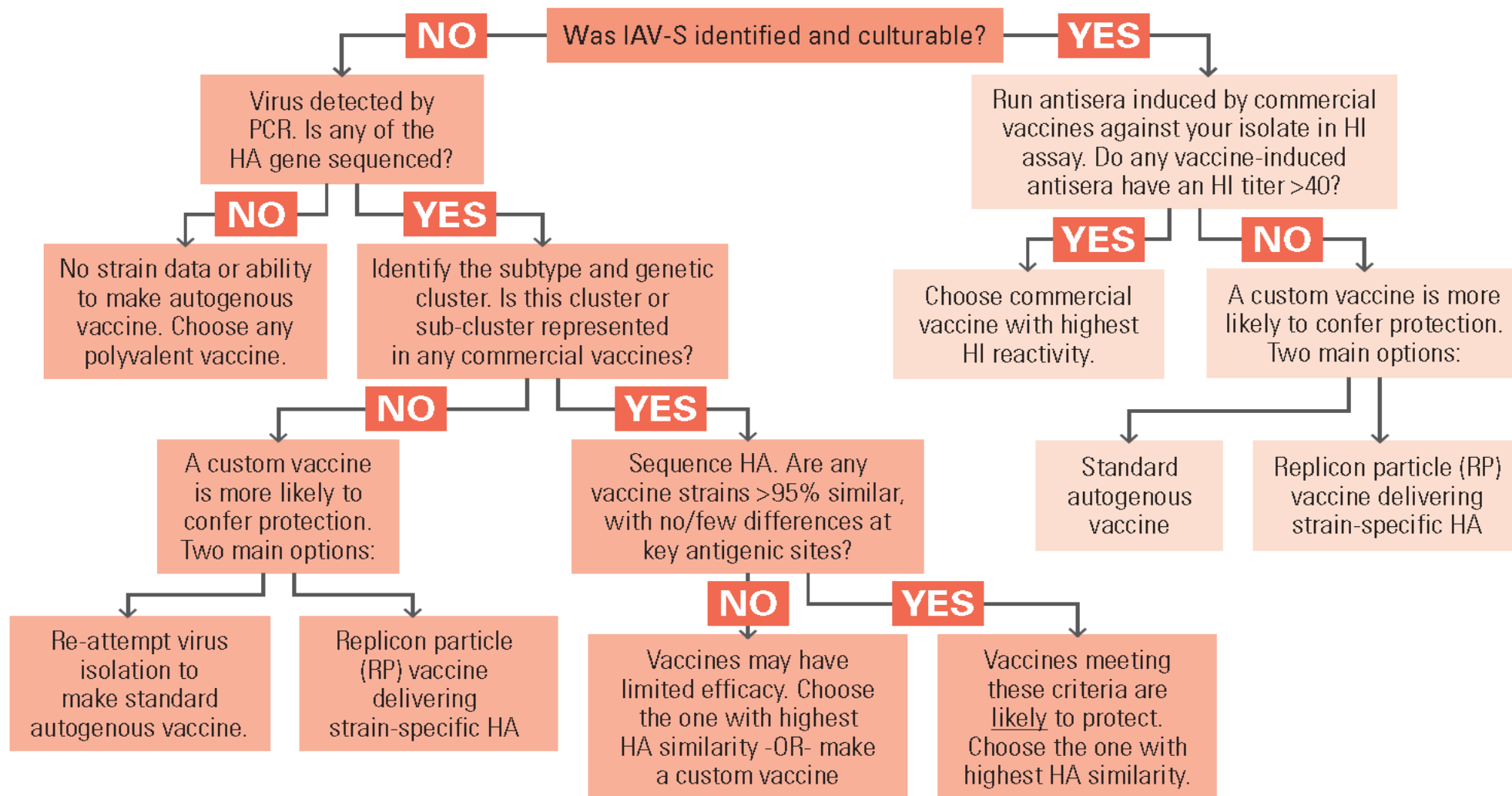


PORK VET
SOLUTIONS

Influenza A Virus (IAV) – How it Works

- Analysis
- Control

FIGURE 1. DECISION TREE FOR SELECTION OF IAV-S VACCINE STRATEGY TO CONTROL A SPECIFIC HERD ISOLATE.



Porcimune Influenza - Label

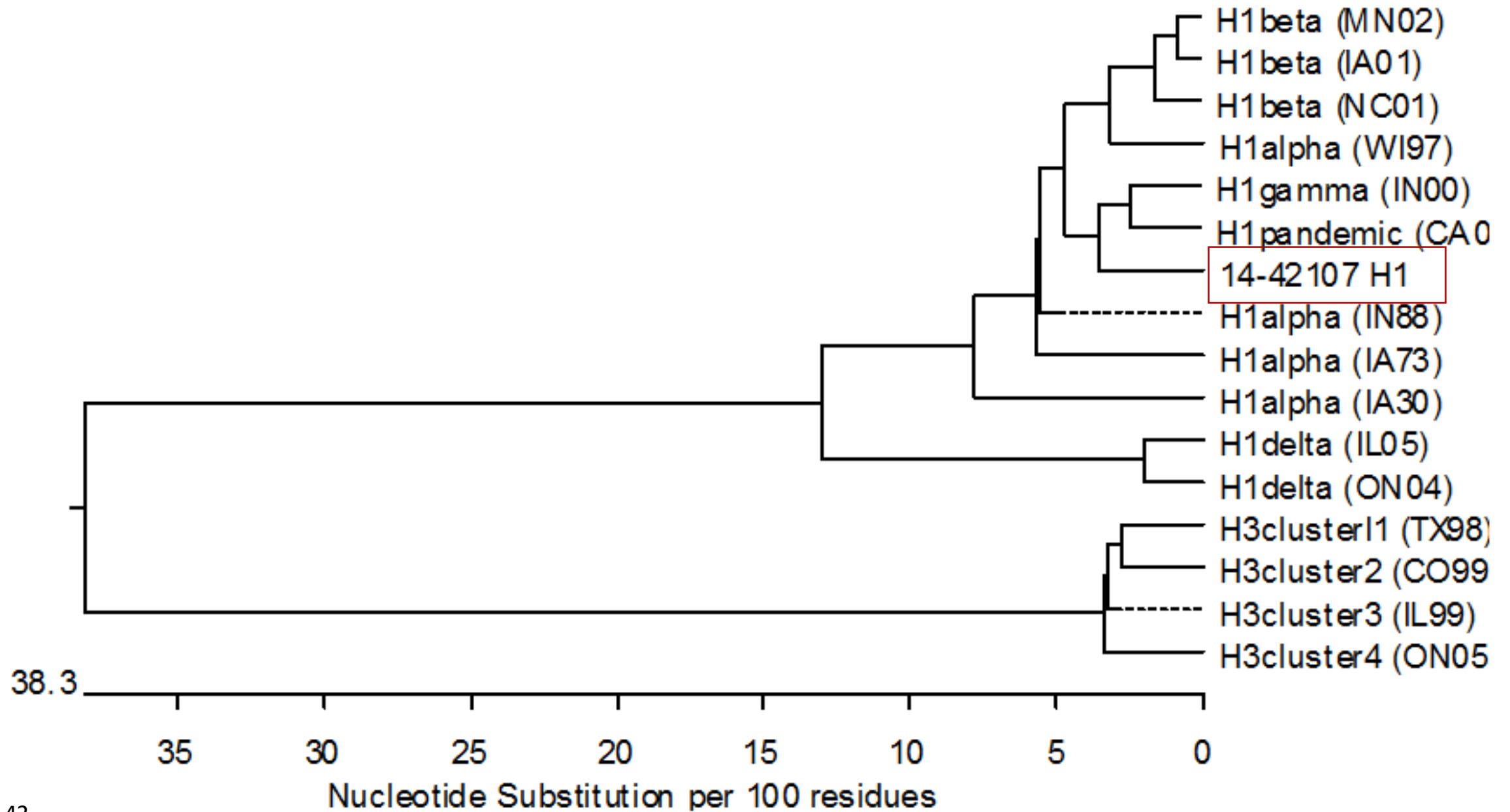
- give to healthy pigs after 2 weeks old (piglets),
- gilts in adaptation (twice) and
- sows pre-farrow
- 2 mL per dose

If you are still having problems:

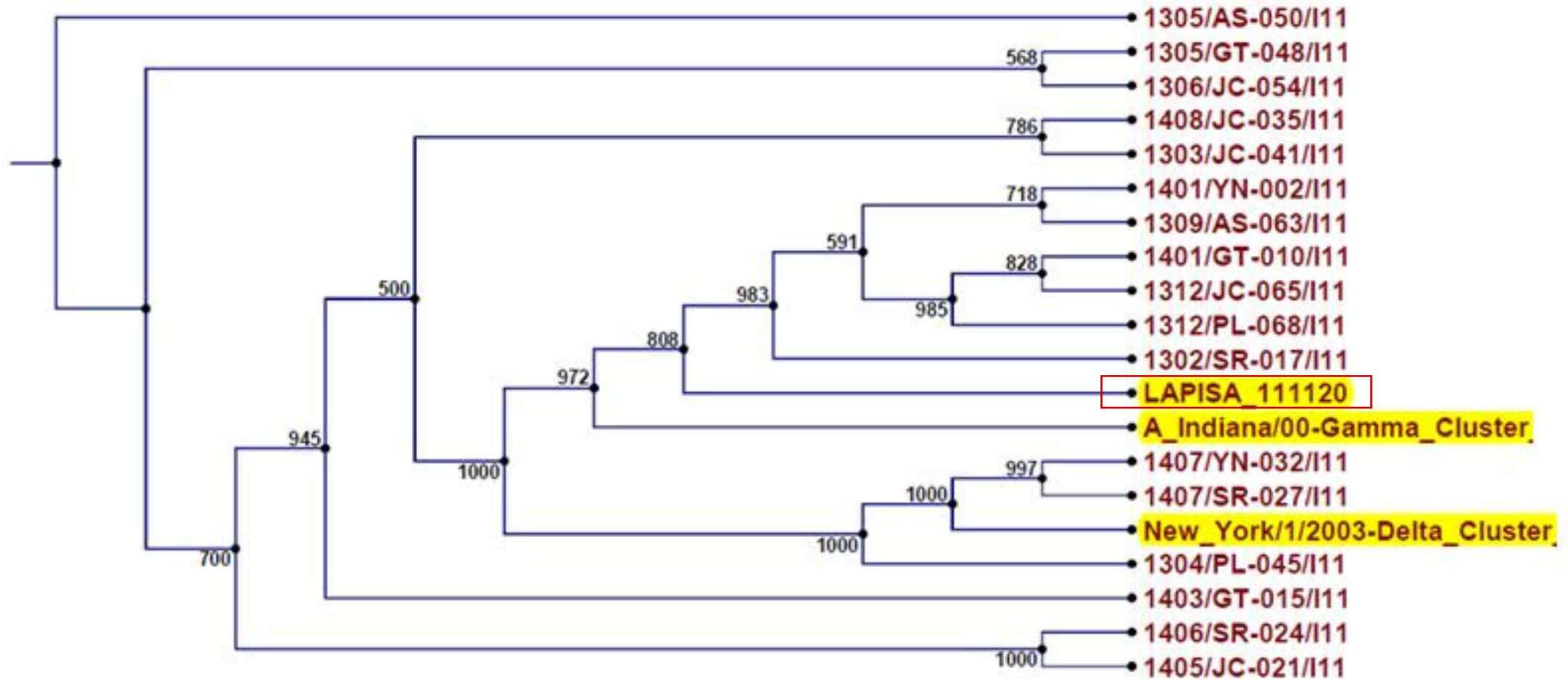
- Do more diagnostics
 - Is it still Flu?
 - Is it just Flu?
 - Is it a different strain of flu?
- Take you diagnostics to the next level

Sequence the Virus

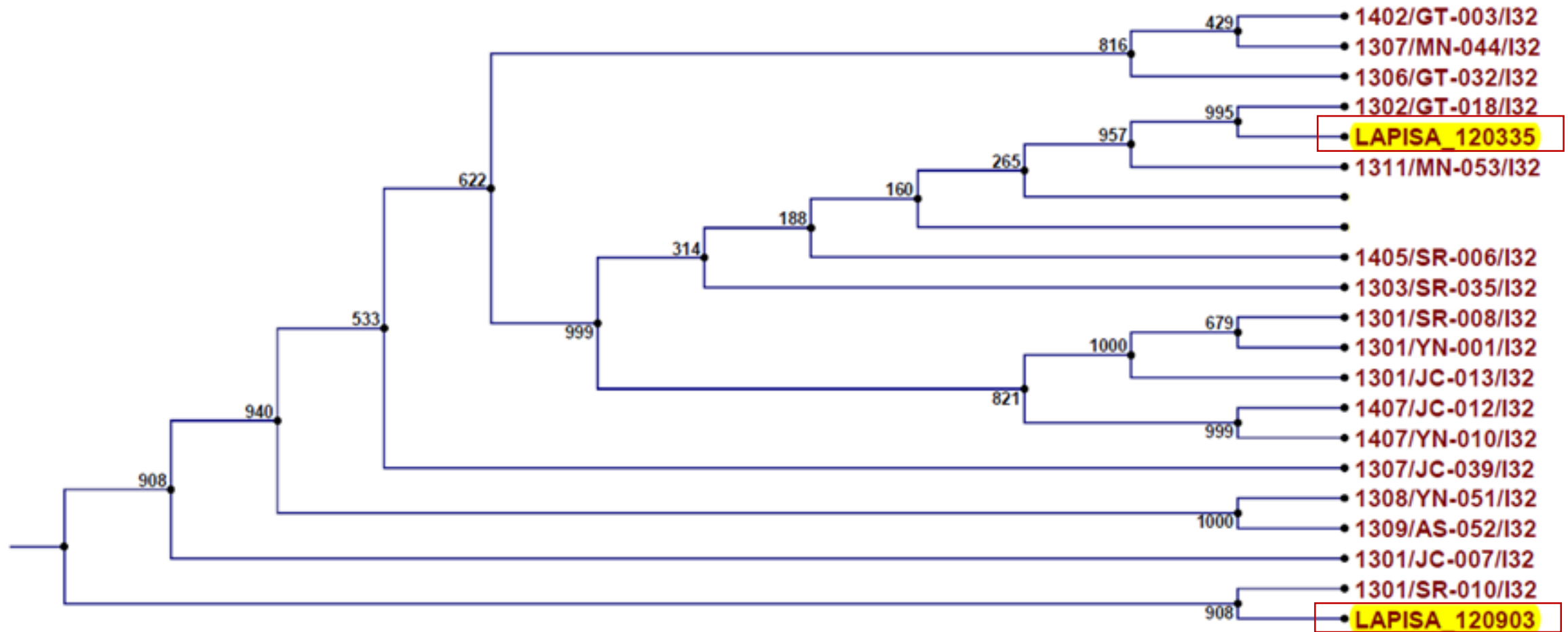
ATGAAGGCAATACTAGTAGTCCTGCTATATACATTTACAACCGCAAATGCCGACACATTATGTATAGGTTATCATGCAAA
CAACTCAACTGACACCGTAGACACAGTACTAGAAAAGAATGTAACAGTAACACACTCTGTCAACCTTCTAGAAAACAGGC
ATAATGGGAACTATGCAAATAAGAGGGGTAGCTCCATTGCATTTGGGTAAATGTAACATTGCTGGCTGGCTTCTGGGA
AATCCAGAGTGTGAATCACTCTCCACAGCAAGCTCATGGTCCTACATTGTGGAAACATCTAATTCAGATAATGGGACGTG
TTACCCAGGAGATTTTCATCAATTATGAGGAACTAAGAGAGCAATTGAGCTCAGTGTGCATCATTTGAAAGATTTGAGATAT
TCCCCAAGACAAGTTCATGGCCCAATCATGACACGAACAGAGGTGTGACGGCAGCATGTCCCCATGTTGGGACAAACAGC
TTCTACAGAAATTTAATATGGCTAGTAAAAAAGGGAAATTCATACCCAAAAATCAACATATCCTACATTAACAATAAAGA
GAAGGAAGTTCTCGTGCTATGGGCCATTACCATCCATCTACAGTGCCGACCAACAAAGTCTCTACCAAAATGCAGATG
CCTATGTGTTTGTAGGGTCATCAAGATACAGCAGGAAGTTCGAGCCAGAAATAGCAACAAGACCTAAGGTGAGAGACCAA
GCAGGGAGAATGAACATACTGACACTAGTAGAGCCTGGAGACAAGATAACATTCGAAGCAACTGGAAATCTAGTGGC
ACCGAGATATGCCTTCGCATTGAAAAGAAATTCTGGATCTGGTATTATCATTTTCAGATACAACAGTCCACGATTGTGACA
CGACTTGTGAGACACCCAATGGTGCTATAAACACCAGCCTCCCATTTCAAATATACATCCAGTCACAATTGGAGAATGT
CCAAAATATGTAAAAAGTACTAACTGAGAATGGCCACAGGTTTAAGAAATATCCCGTCTATTCAATCTAGAGGCCTGTT
TGGTGCCATTGCTGGCTTTATCGAAGGGGGTTGGACAGGAATGATAGATGGATGGTACGGTTATCACCATCAAAATGAAC
AGGGATCAGGATATGCAGCCGACCTGAAAAGCACACAGAATGCCATTGACGGGATCACTAACAAGGTAAACTCTGTTATT
GAAAAGATGAACACACAATTCACGGCAGTAGGTAAAGAGTTGAGCCACTTGGAAGAAGAATAGAGAATTTAAACAAAAA
GGTTGATGATGGTTTTCTAGATATTTGGACTTACAATGCCGAAGTGTGATTCTATTGGAAAATGAAAGAACTTTGGATT
ACCACGACTCAAATGTAAAAAAGTATATGAAAAAGTAAGAAGCCAACTAAAAACAATGCCAAGGAAATTGGAAATGGC
TGCTTTGAATTTTACCACAAATGTGATGACATGTGCATGGAAAGCGTCAAAAATGGAAGTATGATTATCCTAGATACTC
AGAGGAAGCAAACTAAACAGAGAGGAAATAGATGGGGTAAAGTTGGAATCAACAAGAATTTACCAAATTTTGGCGATCT
ATTCAACGGCCGCCAGTTCATTGGTACTGGTAGTCTCCCTGGGGGCAATCAGTTTCTGGATGTGCTCTAATGGGTCGCTA CAGTGCAGAATATGTATTAA



Lapisa H1N1

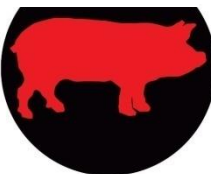


Lapisa H3N2



Sequence Distances of Vaccine and Reference Strains

	A/Sw/IA/30- Classic H1N1	A-Sw-IA- 1973-Classic H1N1	A/Sw/IN/88- Classic H1N1	A/Sw/WI/97- Classic H1N1	A/Sw/IN/00- H1N2	A-SW-NC- 2001- Variant H1	A/Sw/MN/0 2- Reassortant H1N1	A/Sw/Ontari o/55383/04 H1N2	A/Sw/USA/0 0619/05 H1N1	A/Sw/Queb ec/91 H1N1	classicH1 N1.seq
A/Sw/IA/30-Classic H1N1	***	97.5	86.7	85.4	84.3	83.5	83.4	82.1	78.9	87.1	85.8
A-Sw-IA-1973-Classic H1N1	2.4	***	85.3	83.8	83.7	82.7	82.3	77.6	78.6	85.6	85.2
A/Sw/IN/88-Classic H1N1	15.1	16.7	***	95.9	94.7	94.0	93.3	77.6	73.7	95.6	98.1
A/Sw/WI/97-Classic H1N1	16.9	18.7	4.2	***	93.4	94.5	93.5	76.9	73.3	93.0	97.1
A/Sw/IN/00-H1N2	18.2	18.9	5.5	7.0	***	92.7	92.5	76.0	72.6	92.1	95.5
A-SW-NC-2001-Variant H1	19.4	20.4	6.3	5.8	7.8	***	96.5	72.9	73.9	91.6	95.3
A/Sw/MN/02-Reassortant H1N1	19.5	20.8	7.1	6.9	8.0	3.6	***	72.2	73.1	90.8	94.6
A/Sw/Ontario/55383/04 H1N2	21.1	27.7	27.7	28.8	30.2	35.8	36.4	***	95.9	74.7	77.3
A/Sw/USA/00619/05 H1N1	25.6	25.9	33.8	34.5	35.5	33.8	34.8	4.2	***	75.1	73.9
A/Sw/Quebec/91 H1N1	14.5	16.3	4.5	7.5	8.4	9.1	10.0	32.5	31.8	***	94.1
A/CA/4/2009 H1N1	20.6	21.7	8.7	9.9	4.9	10.3	9.5	30.1	34.8	11.4	7.7
13-35257 (ISU).seq	23.2	29.6	28.1	28.8	30.5	34.2	35.7	5.3	8.5	31.6	28.5
	A/Sw/IA/30- Classic H1N1	A-Sw-IA- 1973-Classic H1N1	A/Sw/IN/88- Classic H1N1	A/Sw/WI/97- Classic H1N1	A/Sw/IN/00- H1N2	A-SW-NC- 2001- Variant H1	A/Sw/MN/0 2- Reassortant H1N1	A/Sw/Ontari o/55383/04 H1N2	A/Sw/USA/0 0619/05 H1N1	A/Sw/Queb ec/91 H1N1	classicH1 N1.seq



Lapisa - Sequence Identity Matrix H1N1 Alignment

1. Metadata: H1N1 Sw Hn - H1N1H1N1 ***																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

When doesn't the vaccine work

- Greater than 97% homology – should protect
- Less than 95% similarity between strain(s), might not cross protect
- then can manufacture an autogenous vaccine

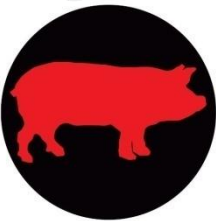
In 45 minutes – Managing Influenza:

1. What we know
 - a. Introduction
 - b. History
 - c. Economics
2. What we do
 - a. Prevention
 - b. Treatment
 - c. Diagnostics
3. How it works
 - a. Analysis
 - b. Control

Special Thanks!

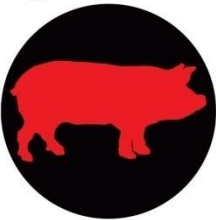
- Lapisa
- Dr. Alejandro Ramirez
- Dr. Amy Vincent
- Dr. Marie Gramer
- Dr. Montse Torremorell
- Dr. Keith Wilson

Gracias por
su tiempo!



PORK VET
SOLUTIONS

Thanks for
Your time!



PORK VET
SOLUTIONS



Pre-Congreso

Lapisa®

Actualizaciones en el diagnóstico e Inmunidad frente al DEP



Luis **Giménez**

- Investigador del Laboratorio del Departamento de Veterinaria de IOWA Estate
- Referencia Mundial en el vDEP

Actualizaciones Diagnosticas PEDV

Luis G. Giménez-Lirola, PhD

Iowa State University

luisggl@iastate.edu

JB Kraft, K Woodard, D Baum, J Zimmerman, R Main

Coronavirus porcinos

- **TGEV:** Transmissible Gastroenteritis Virus
- **PRCV:** Porcine Respiratory Coronavirus
 - ✓ Rol en respiratory disease complex (PRDC)
 - ✓ Exhacerbada por coinfecciones (virus, LPS)
- **PEDV:** Porcine Endemic Diarrhea Virus
 - ✓ PEDV original > patogenica
 - ✓ PEDV Variante < patogenica

Alpha

- **PDCoV:** Porcine Deltacoronavirus
 - ✓ Circulando USA desde inicios 2014
 - ✓ Reportes campo: patogeno? < transiente/severa
 - ✓ Postulados Koch's probados

Delta

Diagnostico diferencial

- Rol PEDV & vairantes emergentes vs otras causas de diarrea era complicado

- Exacerbado por confluencia de otros coronavirus antigenicamente relacionados: TGEV & PDCoV

Virales

- PPA
- PPC
- **TGEV**
- HE
- Rotavirus
- PCMV and pseudorabies
- PRRS
- Enterovirus porcino
- Calicivirus porcino

Bacterianas

- *Clostridium* spp.
- Colibacilosis (*E. coli*)
- Salmonelosis
- Disenteria porcina (*Brachyspira*)
- *Lawsonia ileitis*
- *Campylobacter*
- *Cryptosporidium*

En que situacion debo testar...?

- Apoyo diagnostico clinico
 - Ag presente en granja → casos clinicos “esporadicos”
- Screening manada
 - Estatus manada → casos clinicos presentes / o no...
- Erradicacion
 - Eliminacion de agentes de la granja
- Monitorero
 - Control estado libre de enfermedad
- Control vacunacion
 - Efectividad vacunacion

Diagnosis PED (verano 2013...)

■ Evaluacion clinica (in situ - granja)

Observacion diarrea acuosa – mejor parametro clinico

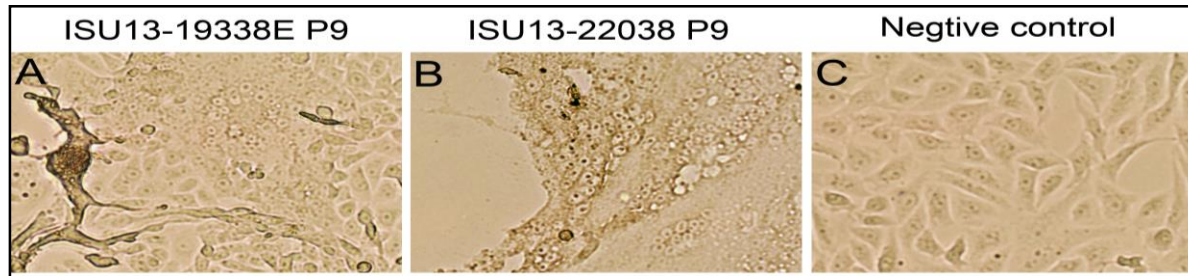
- NO DEFINITIVO → Signos clinicos identicos TGEV
- Freq. coincide con recientes movimiento animales
- Todas las edades → si animales naïve
- Brote tipico → granjas parideras naïve

■ Diagnostico laboratorio

- Histopatologia enteritis viral
- PCR/test deteccion Ag – confirmar presencia PEDV

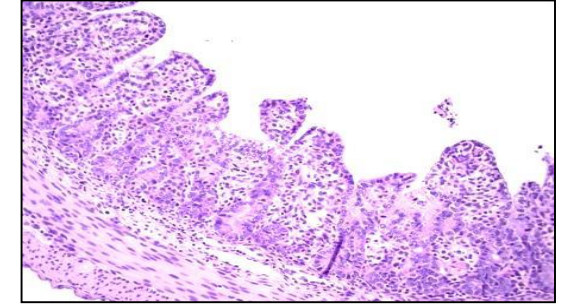
PEDV, TGEV, PDCoV diagnosis

- Immunohistoquímica (IHC)
 - Util (*in situ*) pero < sensible que PCR
 - Detección varia con “tiempo” infección
- Aislamiento viral (AV)
 - Difícil, laborioso, requiere tiempo
 - Muy bajo ratio éxito

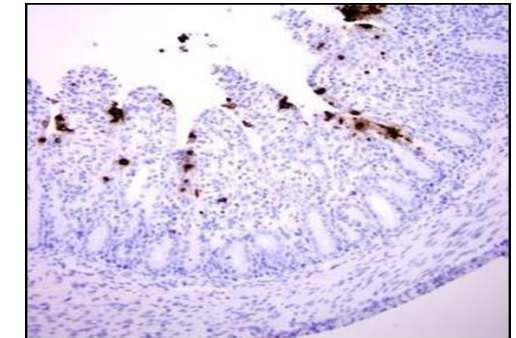


(Source: Schwartz, Madson, Magstad et al.)

(Source: Dr. Jianqiang Zhang, ISU-VDL)



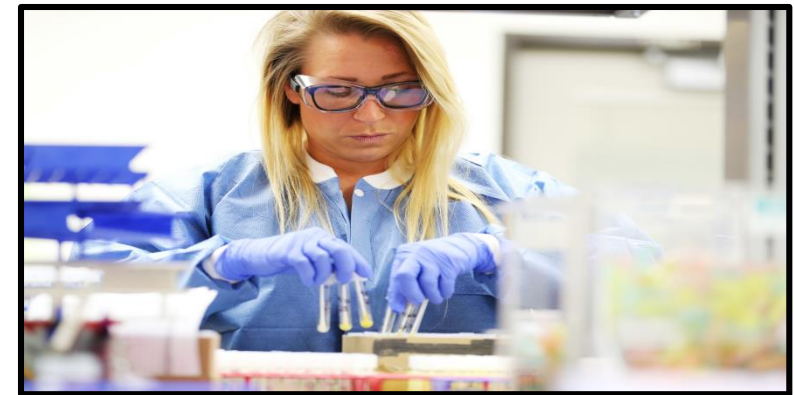
Late PEDv infection (~36 hrs PI):
Severe villus atrophy & loss of absorptive epithelium



Late PEDv infection (~36 hrs PI): Few infected cells remain (brown stain) & absorptive cells destroyed

PEDV RT-PCR – Mayo 2013

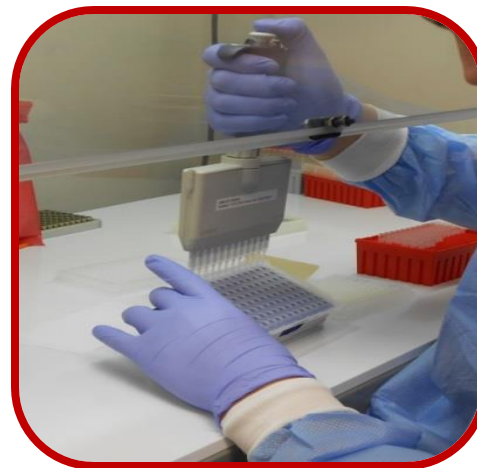
- Primer/sondas diseñadas y secuenciadas de acuerdo a la cepa a detectar
 - PEDV diferencial RT-PCR frente al gen S
 - PEDV RT-PCR frente al gen N (conservado)
- Especímenes a testar:
 - Heces
 - Escobillón fecal
 - Fluidos orales



PorCoV: Diagnostico Molecular

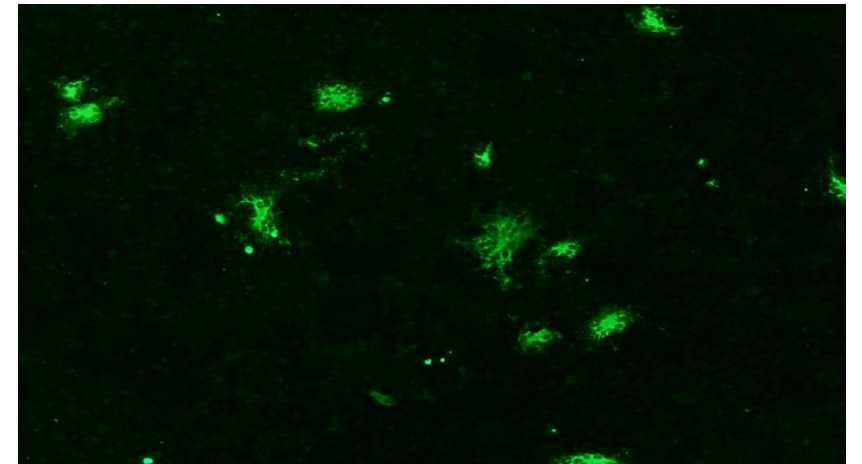
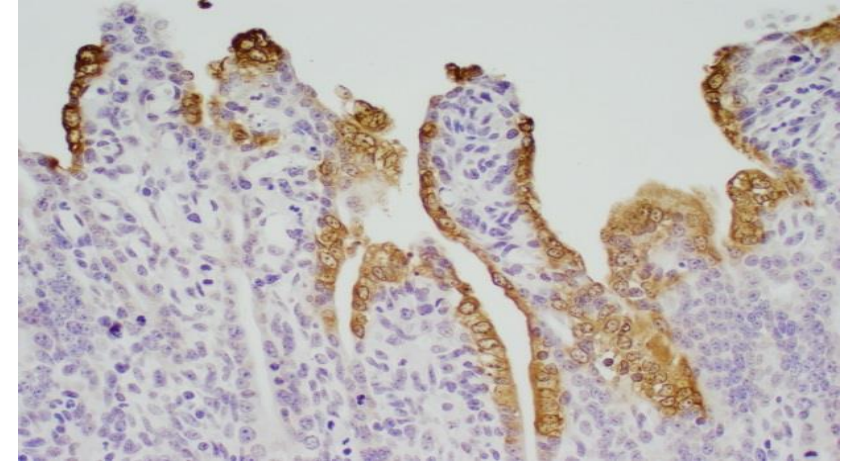
- TGE – PCR
- PEDV – PCR
- PEDV PCR diferencial
 - Cepa original USA vs. variantes identificadas posteriormente
- PDCoV – PCR
- Pan-Corona – PCR
- PEDV Sequenciacion
 - Gen S1 (Rutina)
 - Genoma completo (Investig.)
- PDCoV Secuenciacion

↑ Sensible, Semi-quantitativa, Test mismo-dia-day, Usada Extensivamente



PEDV diagnosis disponible

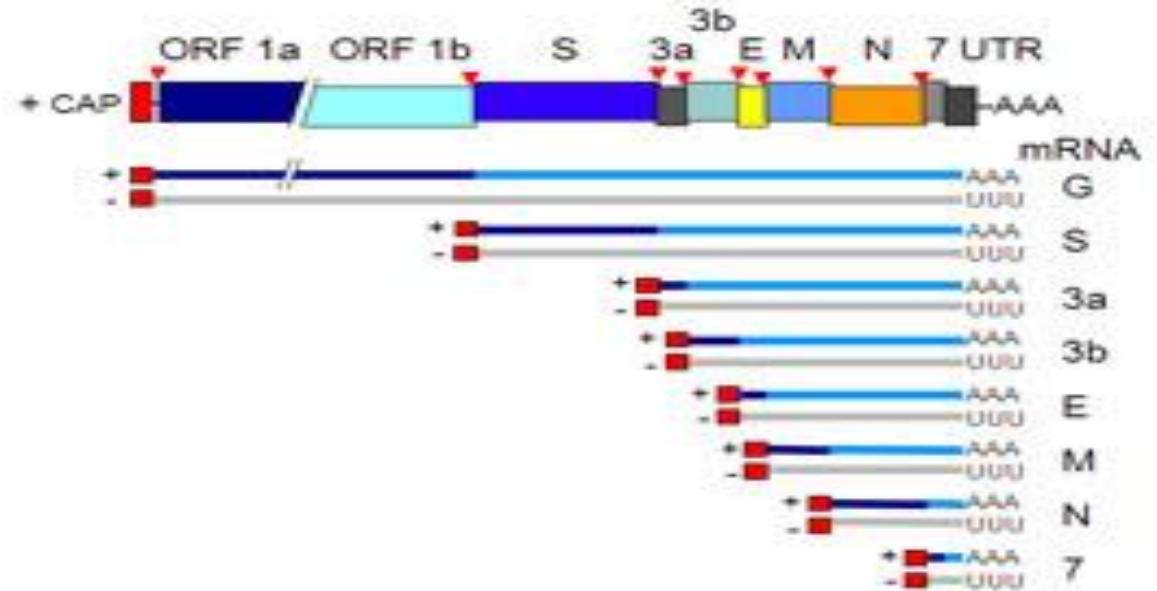
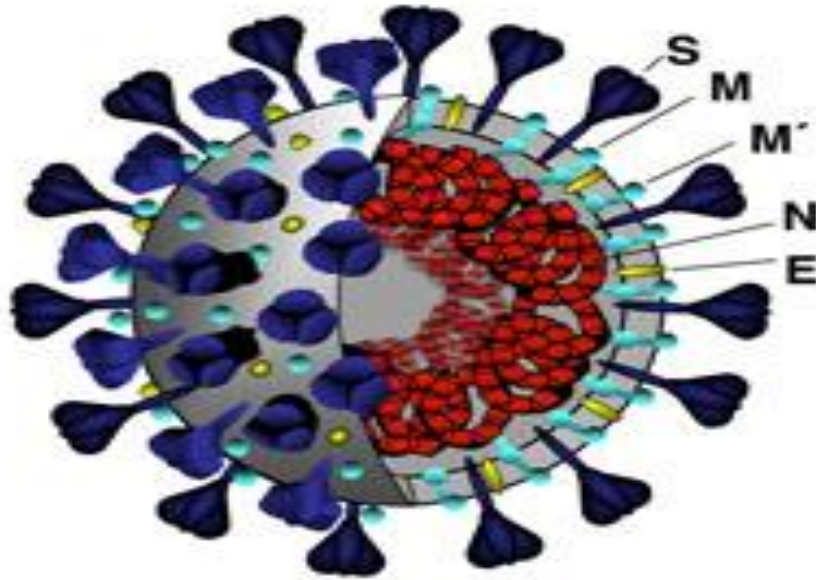
- **Tests disponibles ISU-VDL**
 - PCR, IHC
 - Serologia (IFA, ELISA, FFN, SN)
 - ME, aislamiento viral
 - Secuenciacion
- **Especimenes**
 - Heces & escobillon fecal
 - Intestino
 - **Fluido oral**
 - Suero (Anticuerpos)
 - Ambientales y alimento animal



Porque deteccion anticuerpos?

- Para trazar la historia epidemia/brote a traves de los Ab: determinar si un animal ha sido previamente expuesto o infectado
- Para establecer mejores programas de vigilancia y control
- Para establecer el estado immune manada frente a PEDV
- Asistir en el diagnostico
- Evaluar programas de vacunacion
- Determinar asociacion anticuerpos maternos-grado proteccion de los neonatos frente a PEDV
 - Establecer nivel/isotipo de Ab relacionado con proteccion frente enf. Clinica
 - Determinar perfil serologico materno asociado con inmunidad protectiva en lechones

CORONAVIRUS STRUCTURE AND GENE EXPRESSION



- Superficie viral cubierta de multiples epitopos
- Virus completo –no tratado con detergentes- buena alternativa como antígeno para detección Ab específicos PEDV – 1er contacto Sistema inmune hospedador

PEDV “serologia” disponible (actual)

- **PEDV-ELISA**

- UMN-ELISA rutina (Nucleocapsid) – SUERO (IgG)
- ISU-ELISA rutina (virus completo) – SUERO (IgG)
- BIOVET (Nucleocapside – SDSU) – SUERO (IgG)
- ISU-ELISA (particulas virales)
 - CALOSTRO/LECHE (IgG / IgA)
 - FLUIDOS ORALES (IgG / IgA)

- **PEDV – Virus neutralization**

- ISU-FFN SUERO/CALOSTRO/LECHE
- SDSU-FFN SUERO/CALOSTRO/LECHE

Estudio de campo sobre la cinética de anticuerpos y excreción del virus de la diarrea epidémica porcina

Objetivos

Uso MUESTRAS DE CAMPO para ...

1. Descripción excreción & detección PEDV en escobillón fecal, heces de corral, fluido oral de corral
2. Descripción respuesta IgG e IgA frente PEDV “virus completo” (WV) en suero y fluido oral
3. Establecer puntos de corte y estimación del desempeño de la pruebas de ELISA para PEDV WV IgA e IgG
 - Granja 1 - PEDV positiva
 - Granja 2 - PEDV negativa

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) detection and antibody response in commercial growing pigs

Jordan Björnsdóttir-Kraft¹, Katie Woodard¹, Luis Giménez-Lirola¹, Marisa Rotolo¹, Chong Wang^{1,2}, Yaxuan Sun², Peter Lasley³, Jianqiang Zhang¹, David Baum¹, Phillip Gauger¹, Rodger Main¹ and Jeffrey Zimmerman^{1*} 

Abstract

Background: Longitudinal samples from two production sites were used to (1) describe the pattern of PEDV shedding (rRT-PCR) in individual rectal swabs, pen fecal samples, and pen oral fluids (OF); (2) describe the kinetics of PEDV antibody by ELISA (IgA, IgG) testing of pig serum and pen oral fluid samples; and (3) establish cutoffs and performance estimates for PEDV WW ELISAs (IgA, IgG). Site One was PEDV positive; Site Two was PEDV negative. On Site One, pen samples (feces and oral fluids) and pig samples (rectal swabs and sera) were collected both before and after the population was exposed to PEDV.

Results: On Site Two, pen oral fluid samples and individual pig serum samples were negative for both PEDV antibody and nucleic acid. On Site One, PEDV was detected by rRT-PCR at 6 days post exposure (DPE) in all sample types. The last rRT-PCR positives were detected in rectal swabs and oral fluids on 69 DPE. IgG and IgA were detected in oral fluids and serum samples by 13 DPE. Analysis of the PEDV serum IgG WW ELISA data showed that a sample-to-positive (S/P) cutoff of ≥ 0.80 provided a diagnostic sensitivity of 0.87 (95 % CI: 0.82, 0.91) and specificity of 0.99 (95 % CI: 0.98, 1.00). Serum IgG results declined slowly over the monitoring period, with 60 % of serum samples positive (S/P ≥ 0.80) at the final sampling on 111 DPE. Analysis of the PEDV oral fluid IgA WW ELISA found that a cutoff of S/P ≥ 0.80 provided a diagnostic sensitivity of 1.00 (95 % CI: 0.92, 1.00) and a diagnostic specificity of 1.00 (95 % CI: 0.99, 1.00). The oral fluid IgA response increased through 96 DPE and began to decline at the last sampling on 111 DPE.

Conclusions: This study showed that oral fluid-based testing could provide an easy and "animal-friendly" approach to sample collection for nucleic acid and/or antibody-based surveillance of PEDV in swine populations.

Keywords: PEDV, Virus shedding, Antibody kinetics, Oral fluids, Surveillance, IgG, IgA

“Lidiando” con PEDV

- Como monitorear PEDV?...especimen?
- Como manejar reemplazo de primíparas?
 - Introducir in primíparas “naïve”?
 - Introducir primíparas aclimatadas?
 - Si se opta por aclimatación, cuanto hemos de esperar (“cool down”) antes de que ingresen en una granja previamente positiva?

Granja 1 (PEDV-positiva)

- Galpón WTF de 52-corrales ~800cabezas
 - Cerdos dispuestos a ~3 semanas de edad
- Muestreo cada ~2 semanas x 27 semanas
 - Cada muestreo: 6 corrales + 5 cerdos/corral
 - Muestras de corral (n=6): fluido oral/heces
 - Muestras indiv.(n=30): suero/escobillón fecal
- Cerdos infectados PEDV a 13 semanas de edad

Granja 1 (PEDV-positiva)

- Primiparas aclimatadas granja paridera.
- Esperabamos lechones naturalmente expuestos e infectados por PEDV.
- Infeccion natural nunca ocurrio...Decision?
- Exposicion intencionada a las 13 semanas de edad.

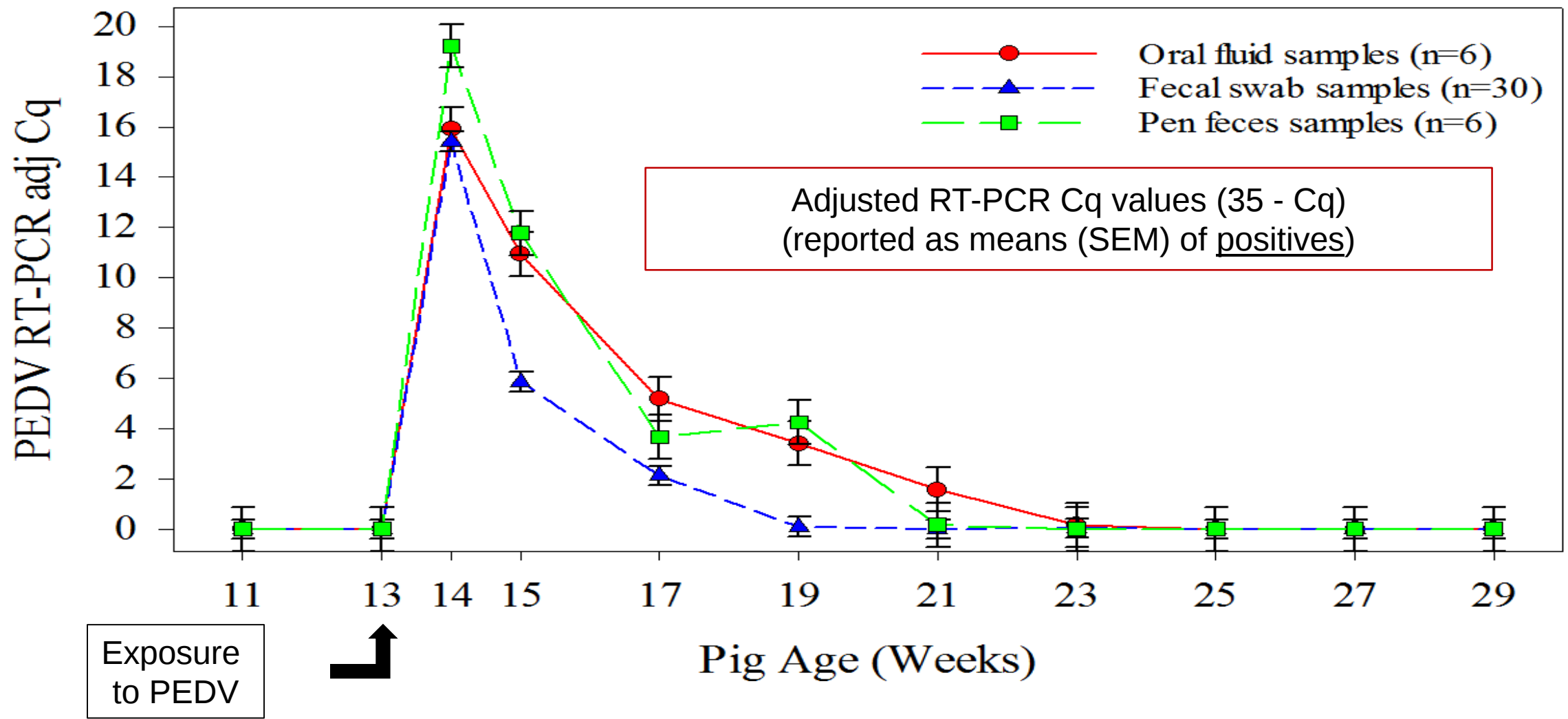
Granja 2 (PEDV-negativa)

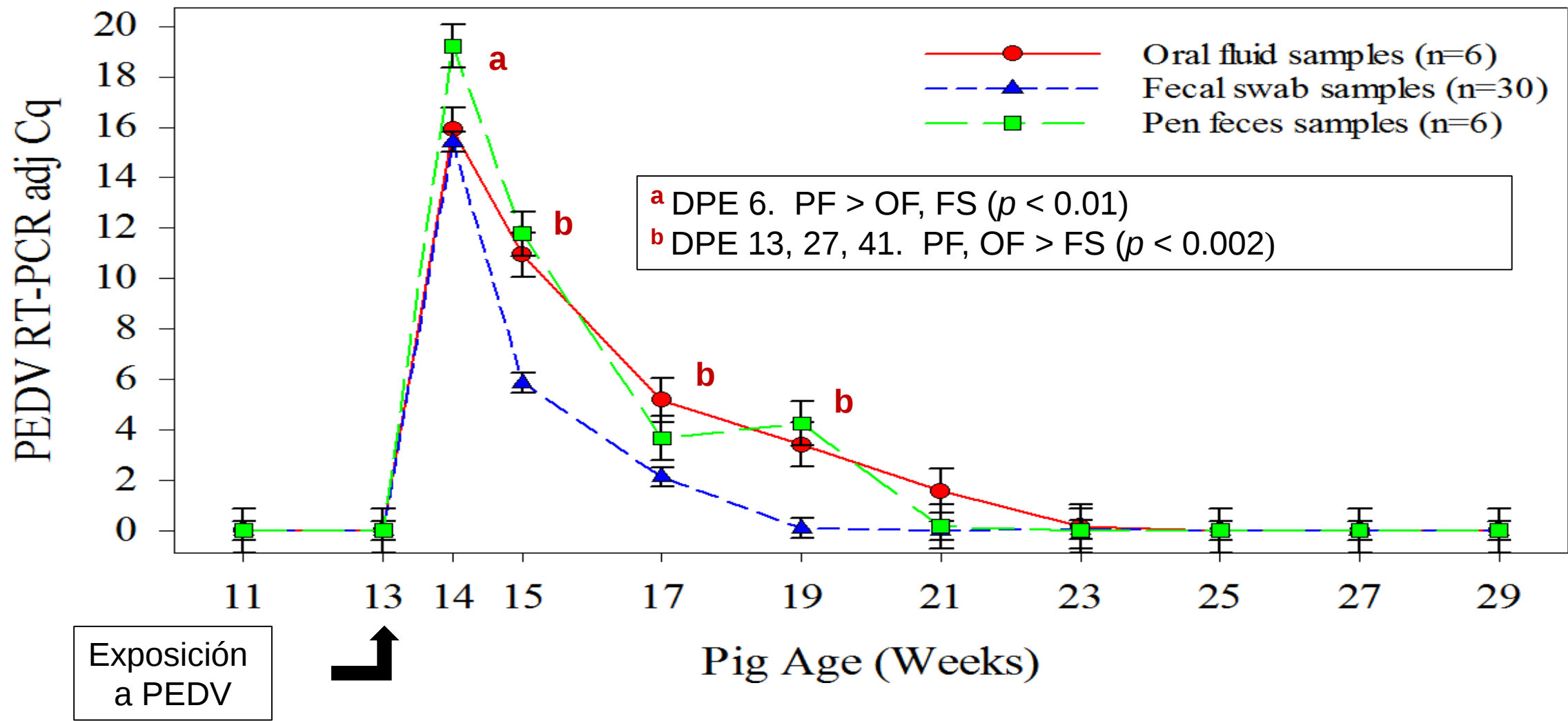
- 3 galpones WTF de 40 corrales ~900cabezas
 - Cerdos dispuestos a ~3 semanas de edad
- Muestreo semanal x 8 (9 muestreos total)
 - Fluido oral (n=36 x corral, 108 x semana)
 - Suero (n=20 x corral, 60 x semana)
 - 10 cerdos x 2 corrales x 3 galpones
- Todos los FO fueron PEDV(-) por RT-PCR

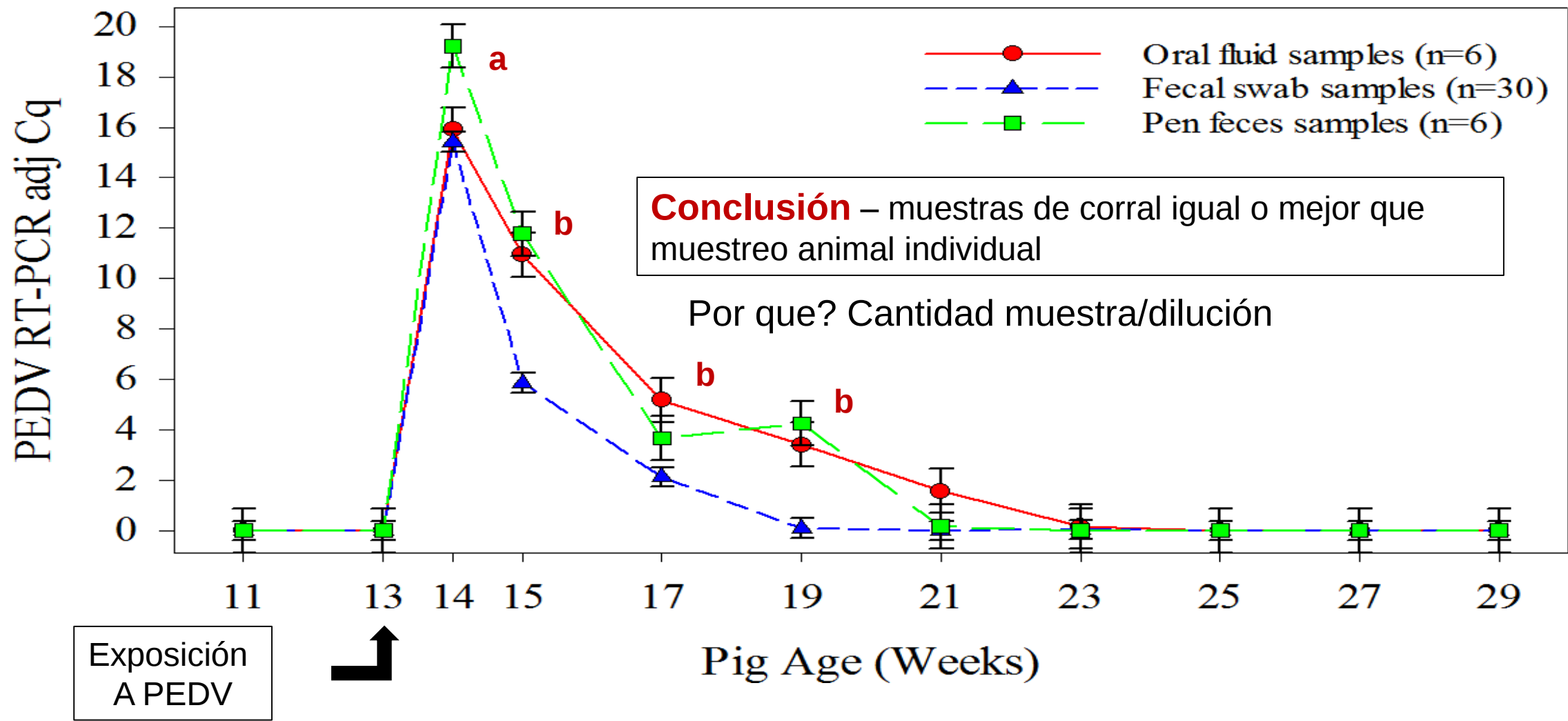
PEDV test

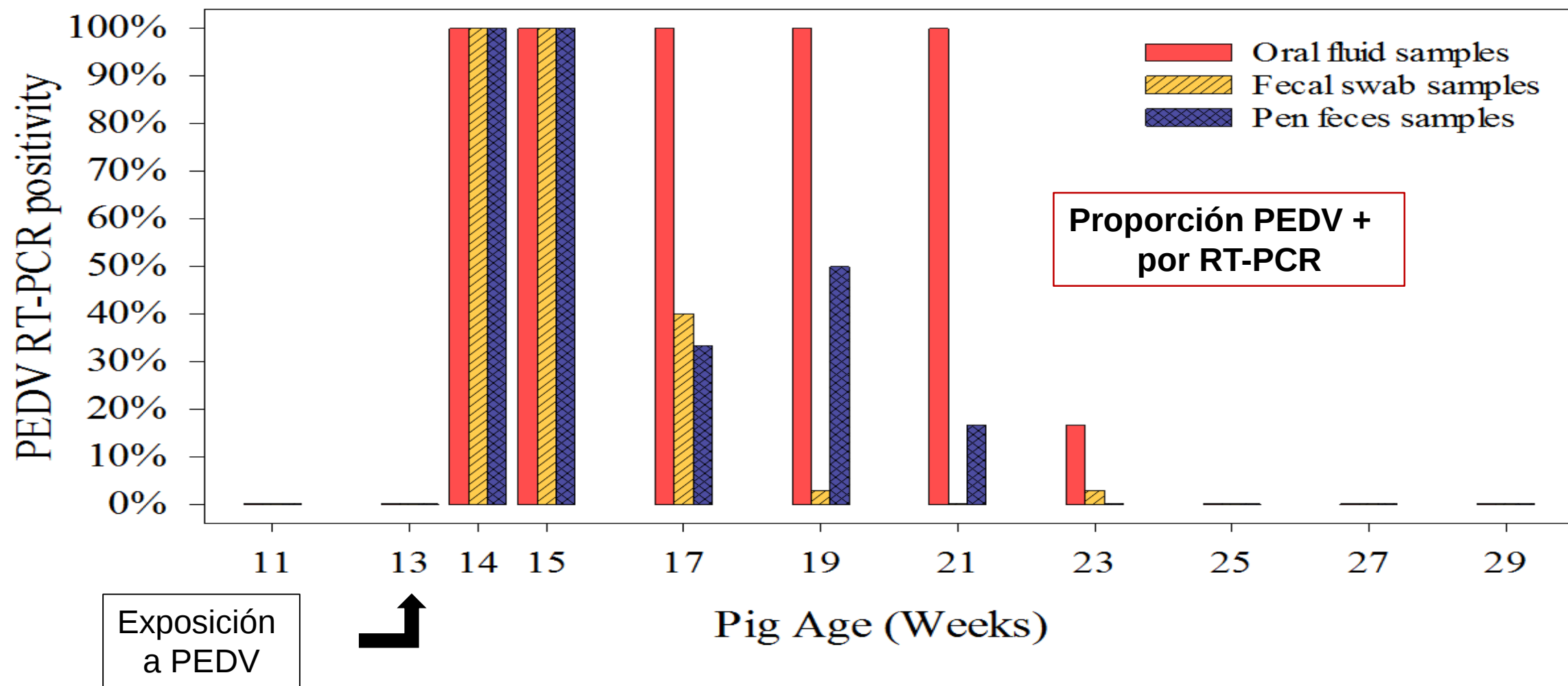
- Test moleculares específicos de PEDV
 - RT-PCR
- Test de detección de anticuerpos
 - ELISA “virus completo” (WV) (IgG o IgA)
 - IFA (IgG en suero)
 - FFN (IgG en suero)

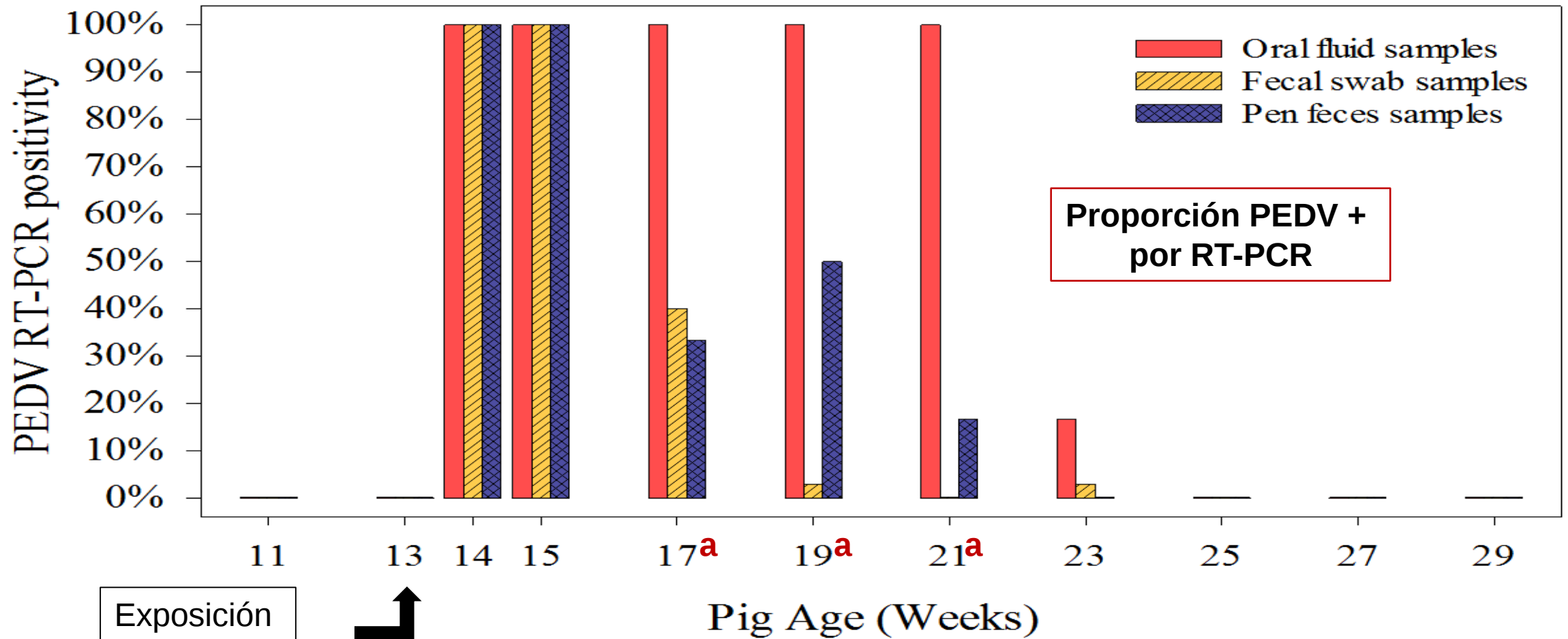


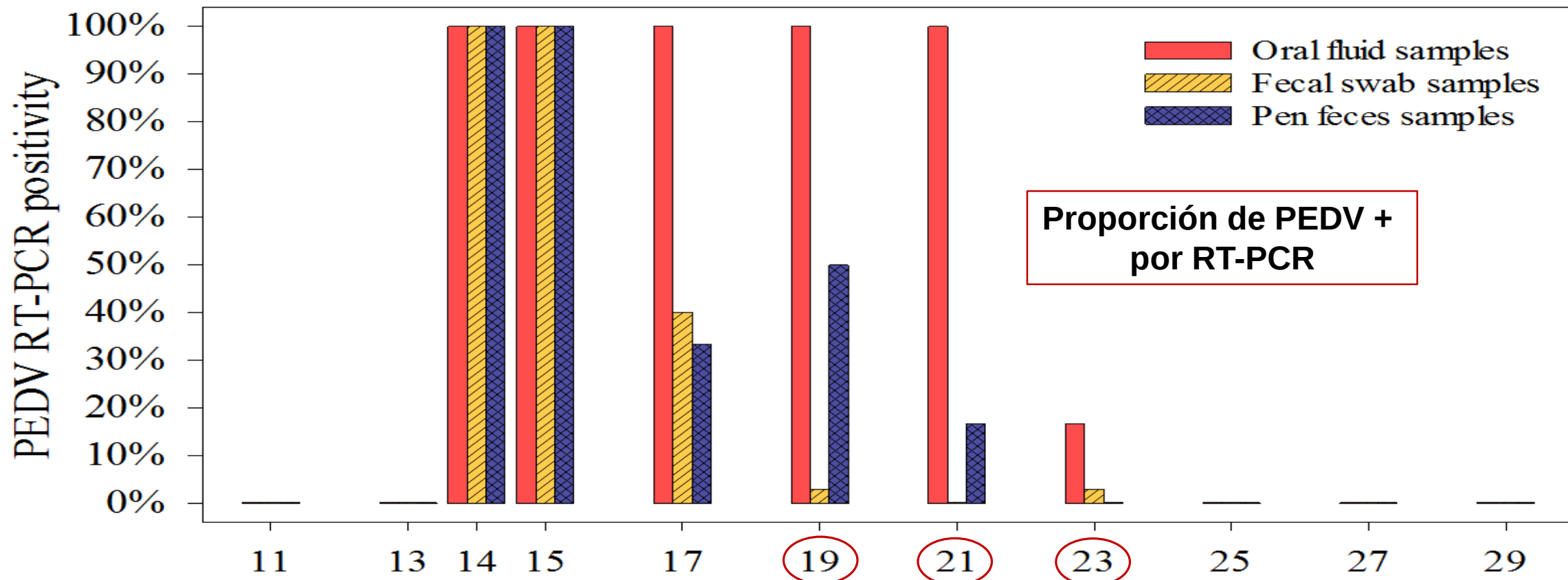








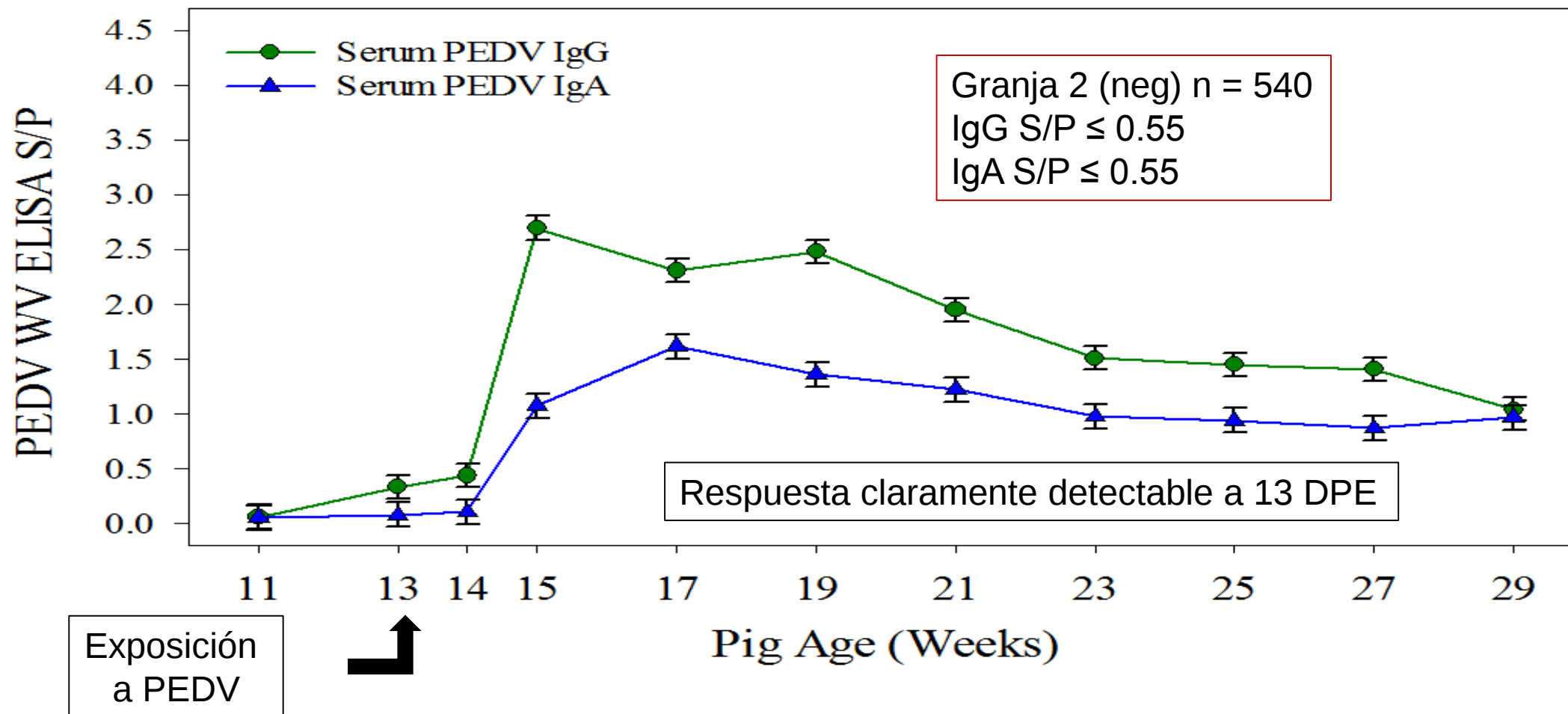




Exposición
a PEDV



Conclusión – Parámetros de detección varían según tipo de muestra.
Fluido oral (corral): sistemat. detectado hasta 69 DPE
Heces (corral): sistemat. detectado hasta 55 DPE
Escobillón fecal: sistemat. detectado hasta 41 DPE



Establecer puntos de corte

- Interpretacion
 - Tecnica → muestras experimentales
 - Diagnostica → muestras de campo

Podrian ser diferentes!

- Lineas base
 - Animales naturalmente infectados
 - Animales vacunados

- **Sensibilidad diagnostica:** la proporción de muestras verdadera-positivas correctamente identificadas por el test.
- **Especificidad diagnostica:** la proporción de muestras verdadera-negativas correctamente identificadas por el test.

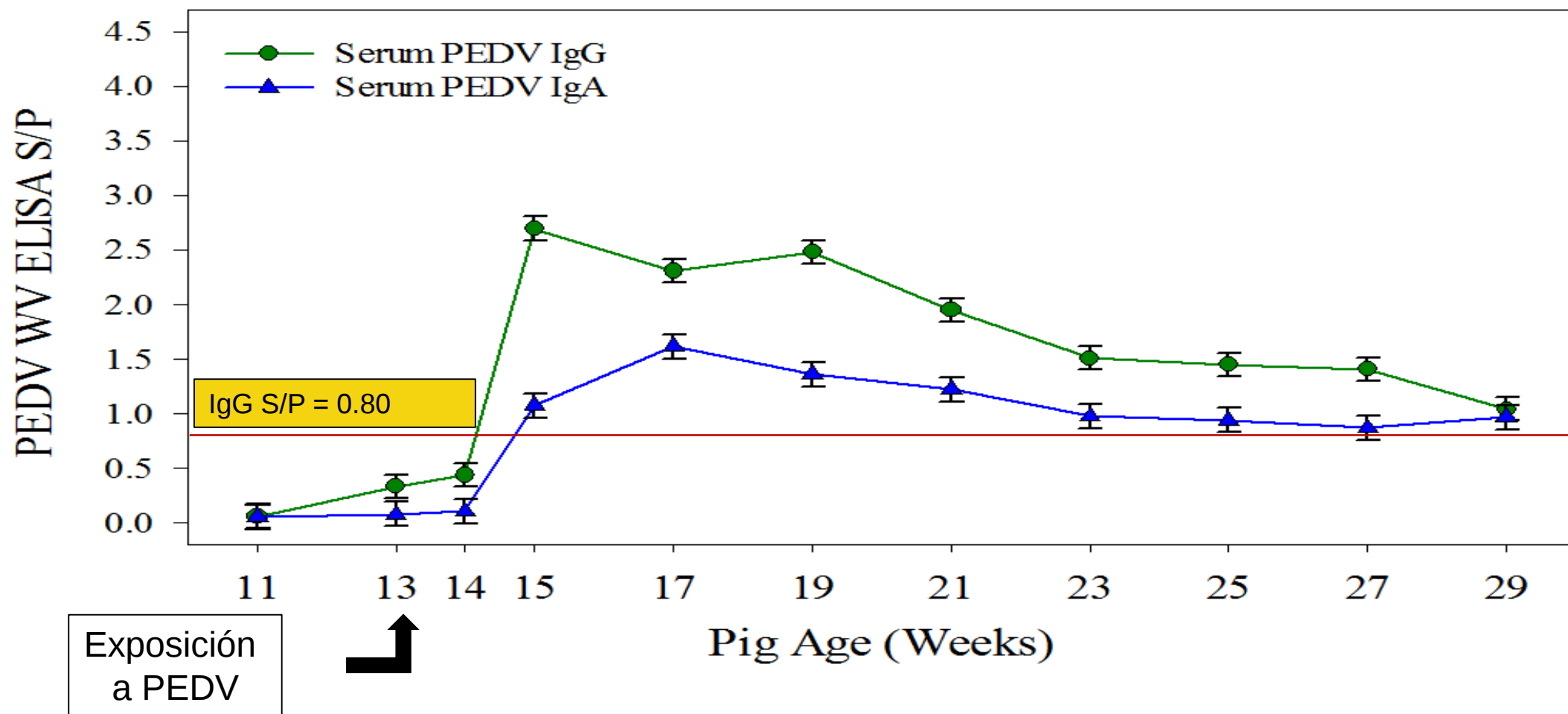
- **Sensibilidad diagnostica (Se)**

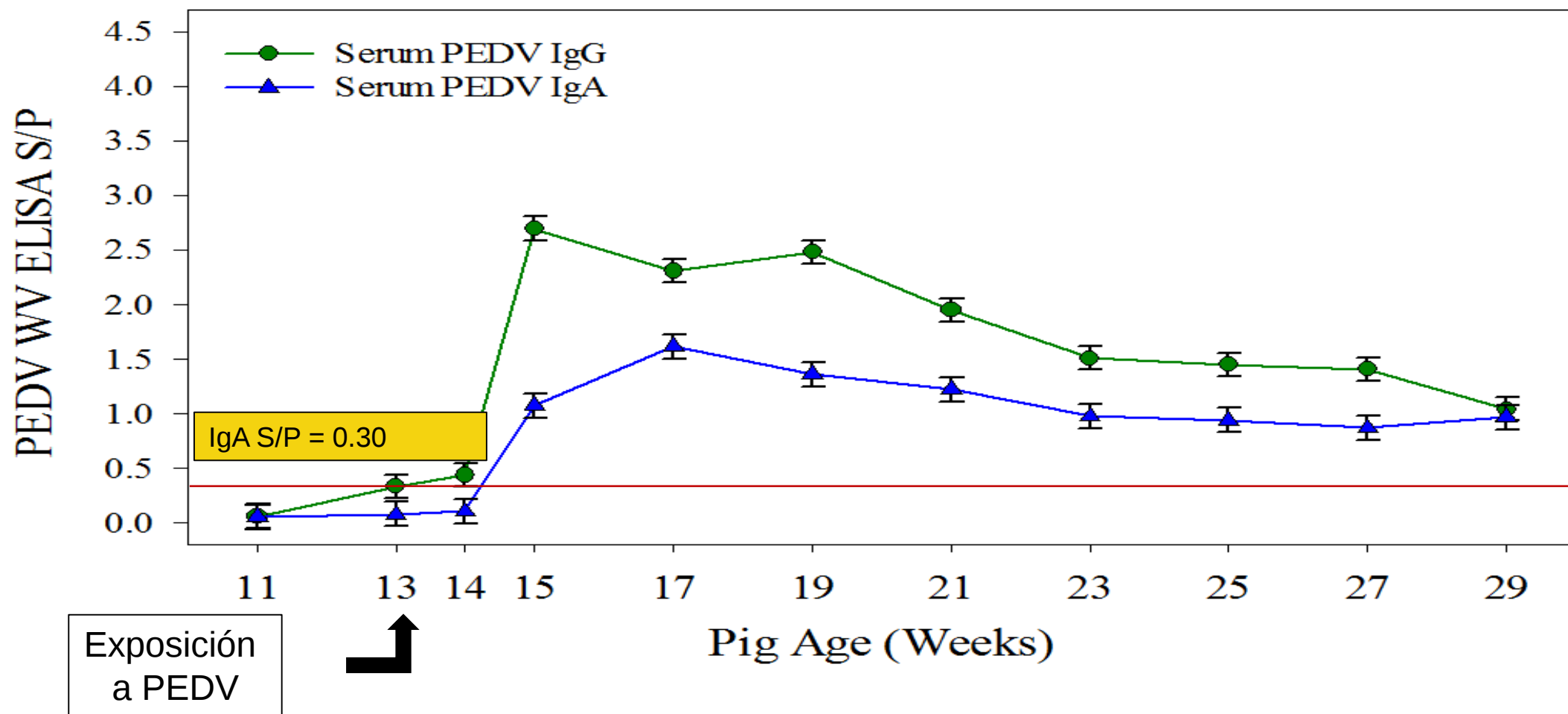
$$\%Se = A/(A + C)$$

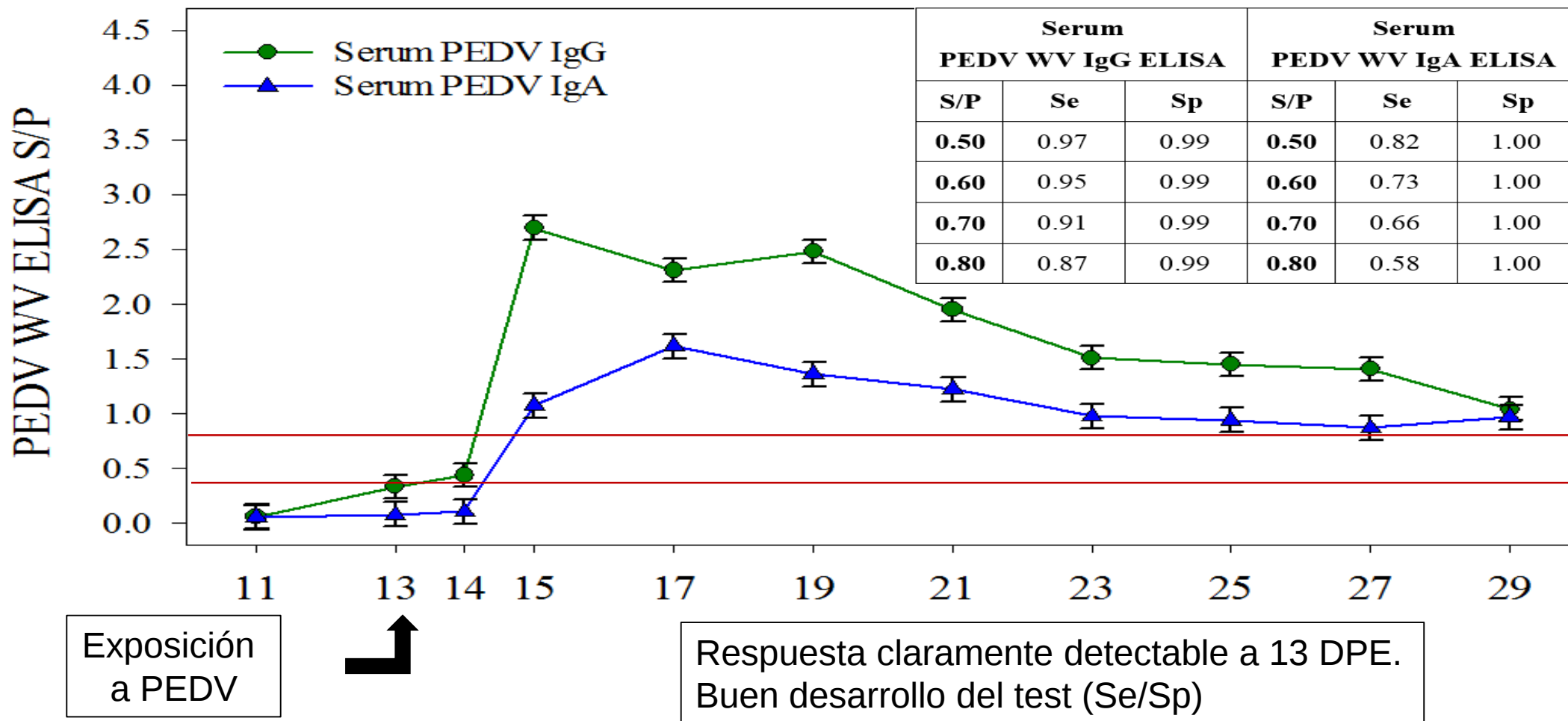
- **Especificidad diagnostica (Sp)**

$$\%Sp = D/(B + D)$$

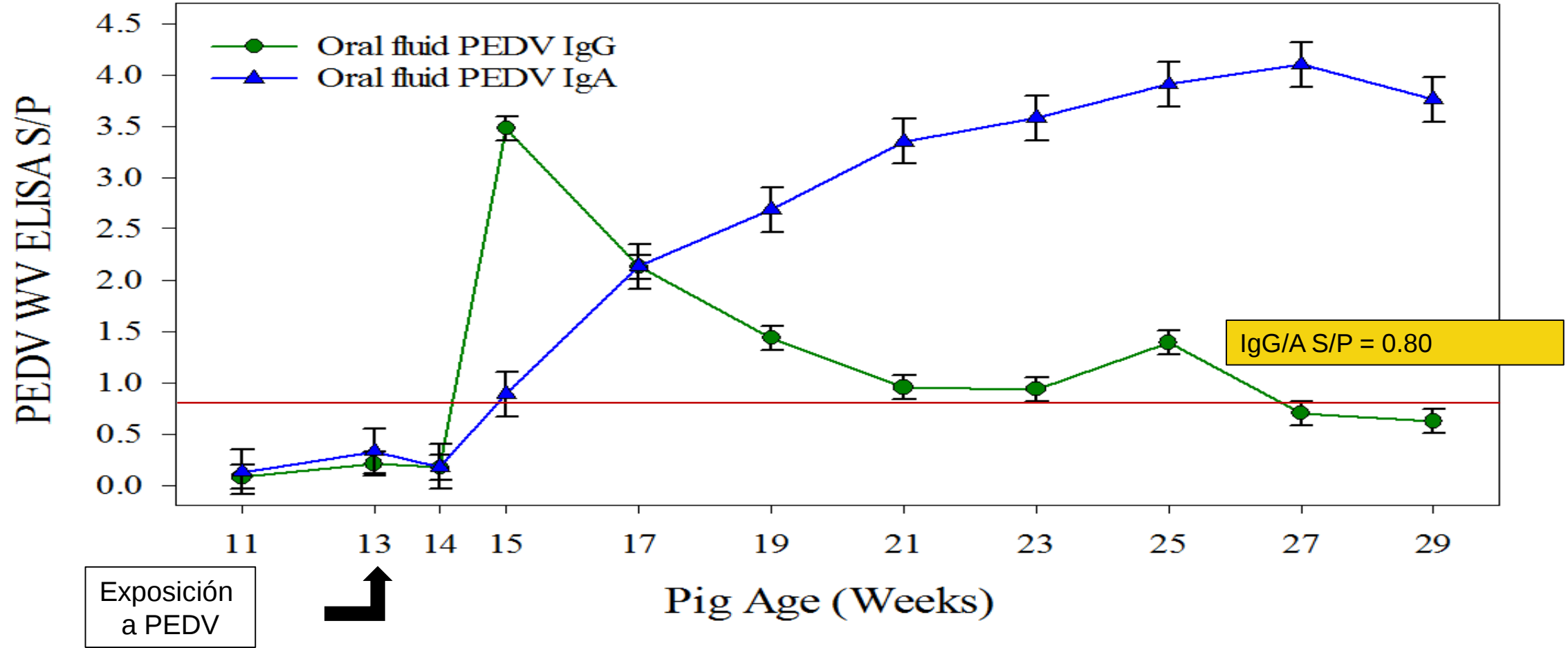
		Disease Status	
		(+)	(-)
Test	(+)	A True Positives	B False Positives
	(-)	C False Negatives	D True Negatives



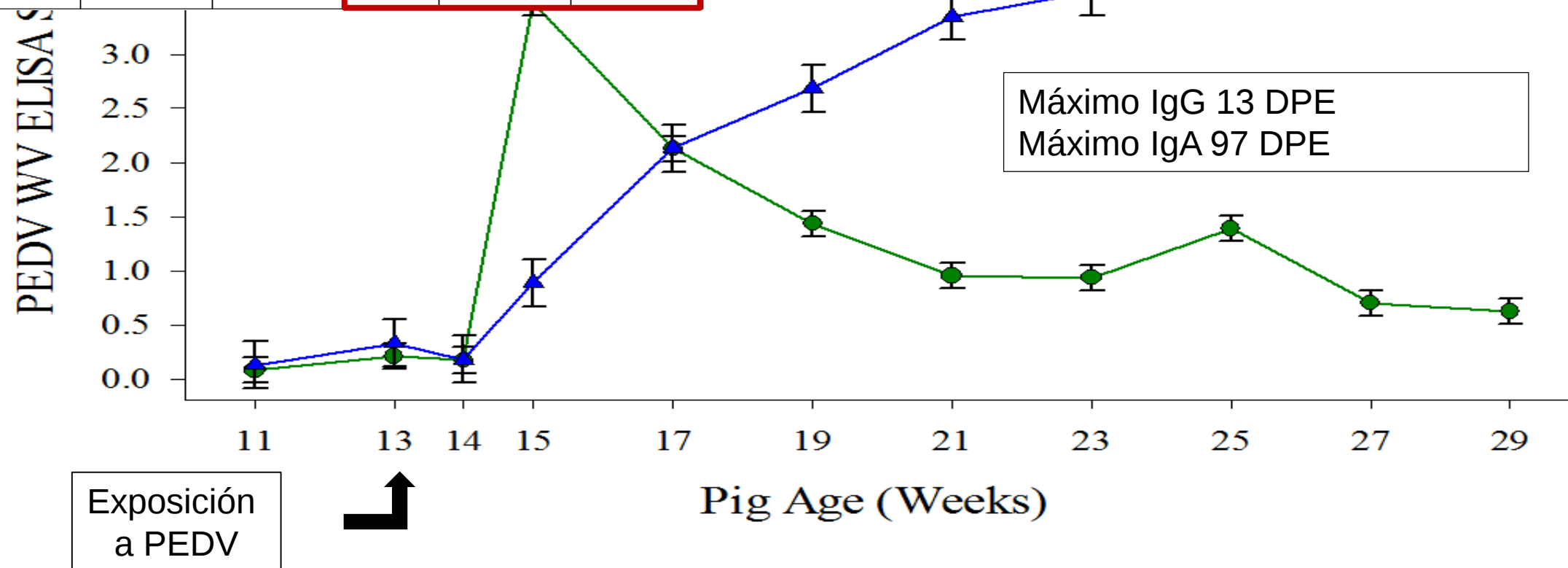


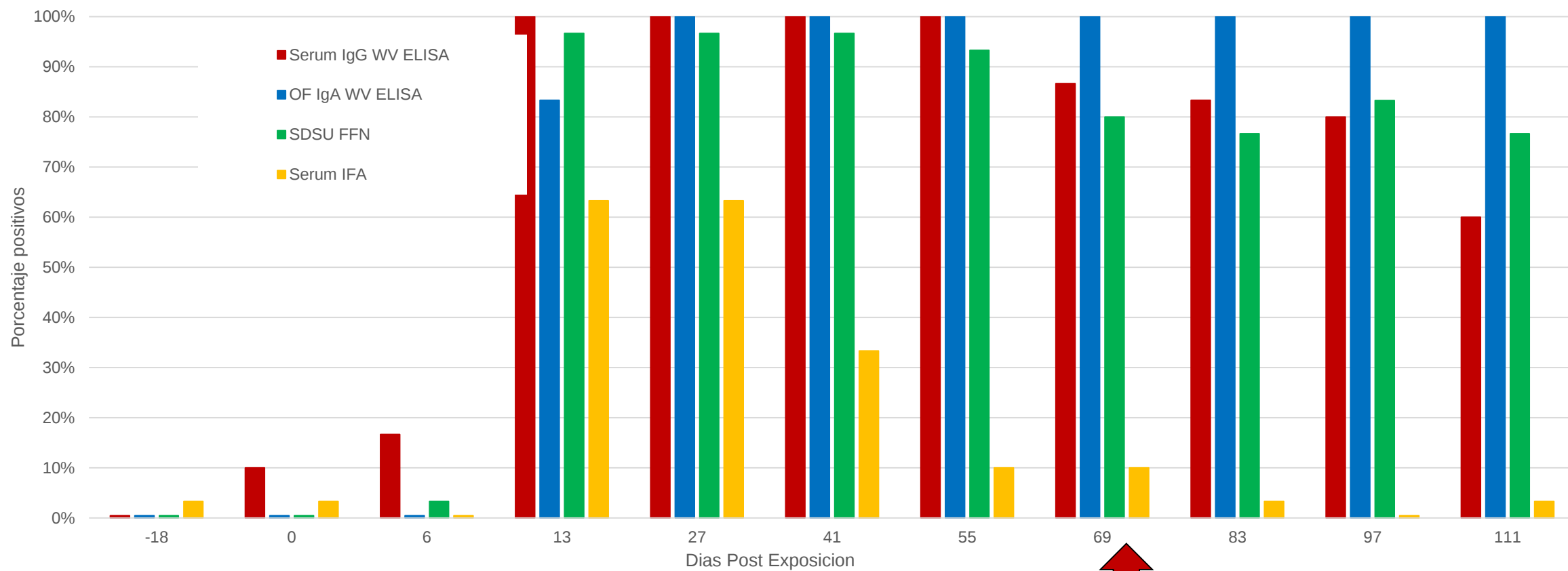


Granja 2 (neg) n = 972
IgG S/P ≤ 0.76
IgA S/P ≤ 0.76

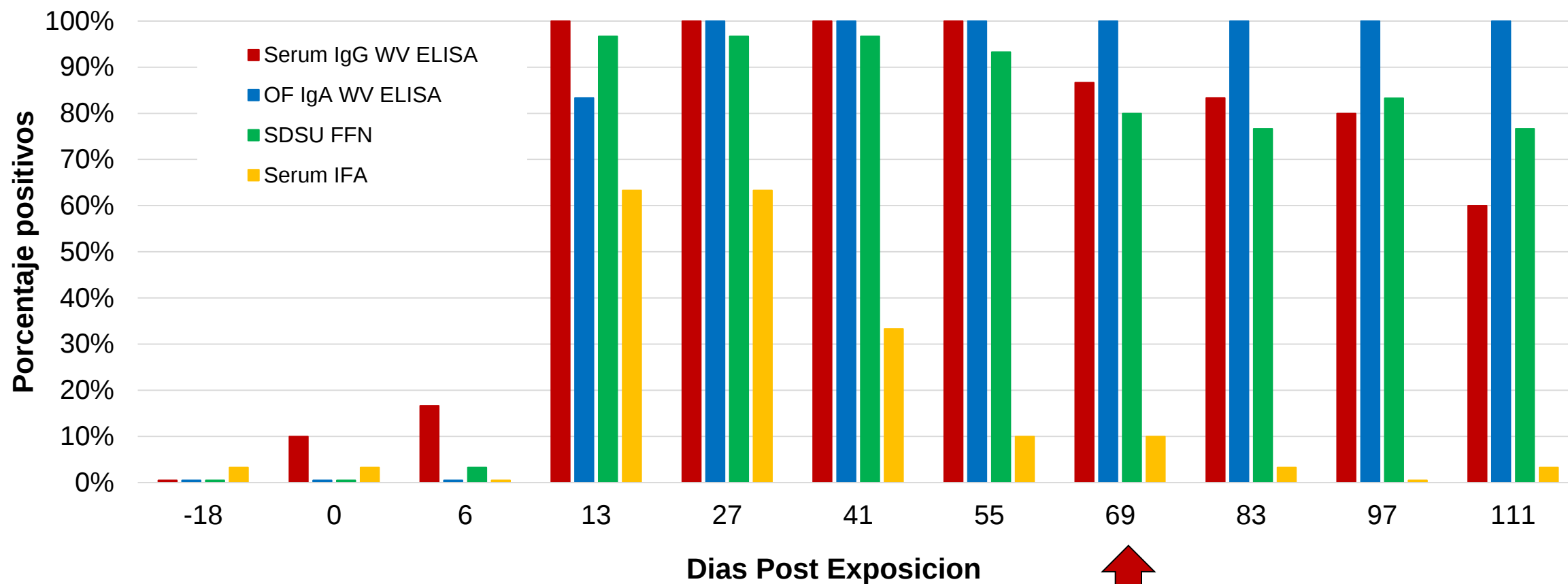


Oral fluid PEDV WV IgG ELISA			Oral fluid PEDV WV IgA ELISA		
S/P	Se	Sp	S/P	Se	Sp
0.50	0.98	0.93	0.50	1.00	0.98
0.60	0.88	0.95	0.60	1.00	0.99
0.70	0.71	0.96	0.70	1.00	1.00
0.80	0.69	0.97	0.80	1.00	1.00





Últimos PCR positivos detectados



Es necesario entender las prestaciones de cada test así como el coste de los mismos

Últimos PCR positivos detectados

Estimación prestaciones test y puntos de corte

- ISU-VDL ofrece ELISA IgG en suero y IgA en FO
 - Excelente especificidad
 - Buena-a-excelente sensibilidad
- ISU-VDL usa cut-off 0.80
- Lista de prestaciones por S/P permite al cliente evaluar resultados caso-a-caso

Serum		
PEDV WV IgG ELISA		
S/P	Se	Sp
0.30	1.00	0.95
0.40	0.99	0.98
0.50	0.97	0.99
0.60	0.95	0.99
0.70	0.91	0.99
0.80	0.87	0.99

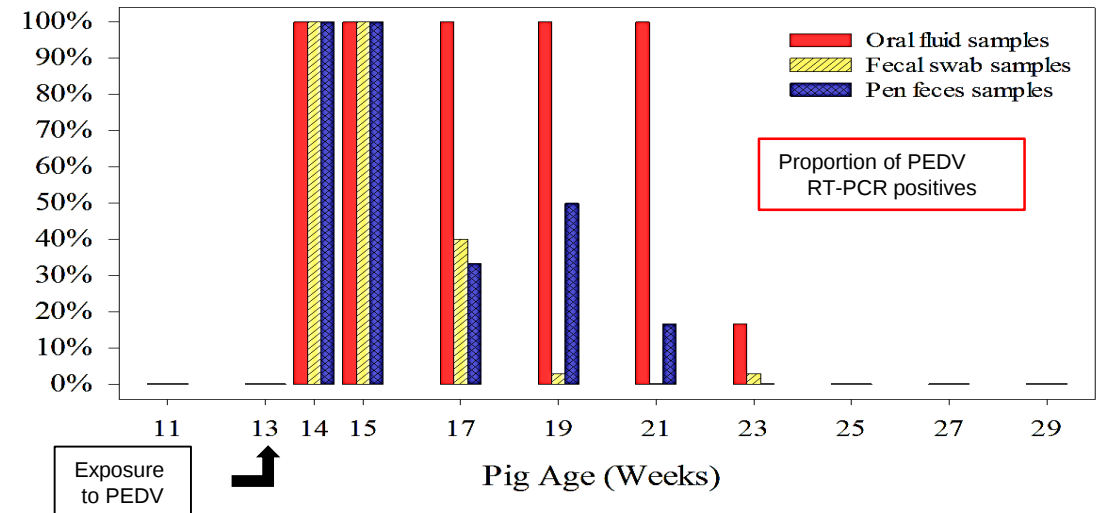
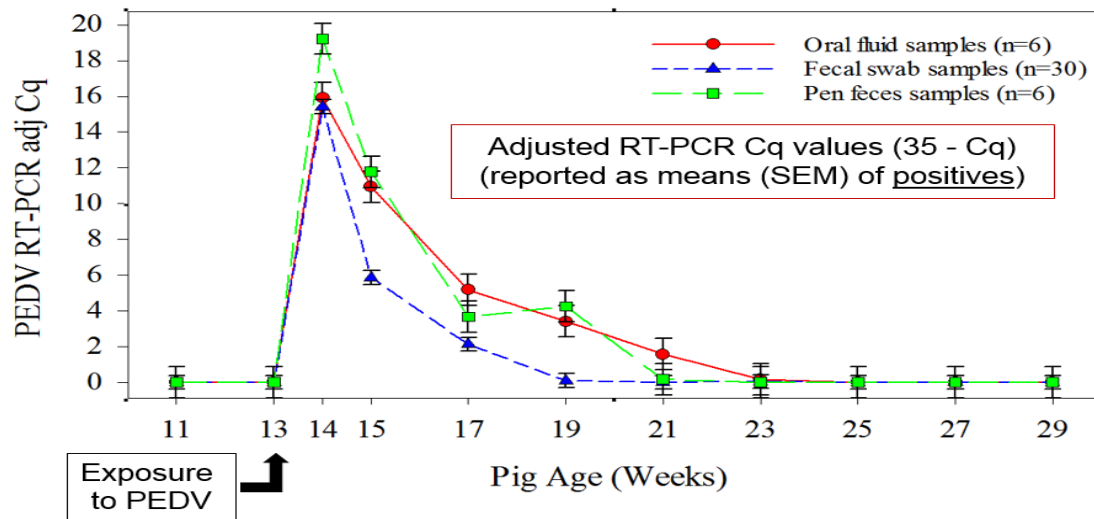
Oral fluid		
PEDV WV IgA ELISA		
S/P	Se	Sp
0.30	1.00	0.88
0.40	1.00	0.96
0.50	1.00	0.98
0.60	1.00	0.99
0.70	1.00	1.00
0.80	1.00	1.00

Para llevar a casa ... Aclimatación

- Animales excretan niveles detectables de PEDV por 69 DPE (dependiendo del tipo de muestra).
 - Excreción es de fácil monitoreo en fluido oral
- Respuesta inmune humoral fácilmente monitoreada usando FFN o ELISA WV
 - Suero, fluidos orales
- Se desconocen los niveles de anticuerpos asociados con protección materna.

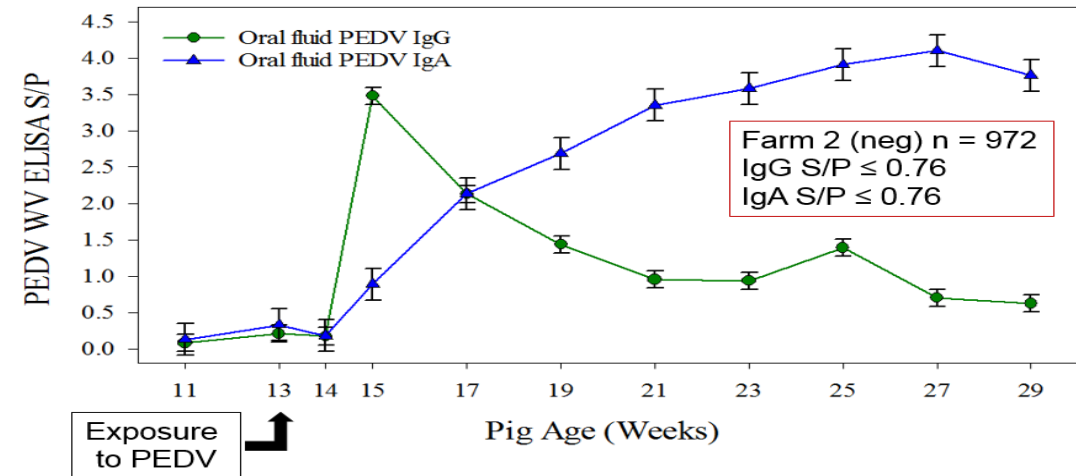
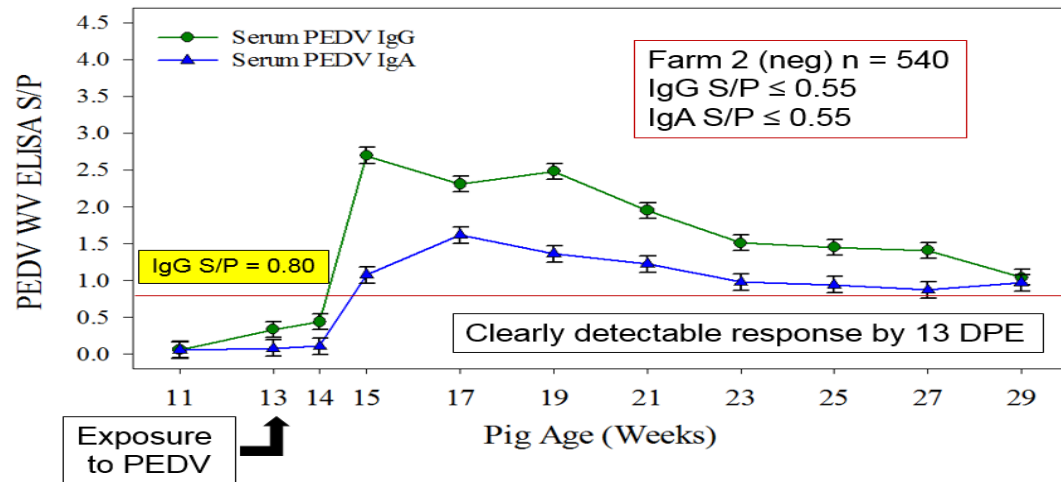
Muestra a testar por RT-PCR ...

- PEDV RT-PCR funciona para todo tipo de muestra (fluido oral, heces, escobillón fecal), pero es mas sensible en fluido oral



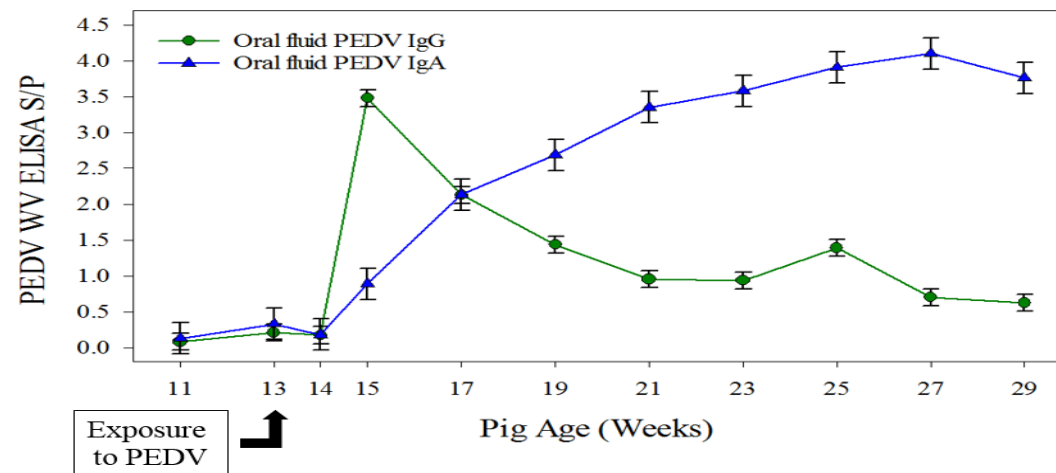
Muestra a testar por ELISA ...

- Anticuerpos IgG (suero) y IgA (fluido oral) detectados a 10-14 DPE.
- Buena sensibilidad y especificidad diagnostica



Valor respuesta IgA en fluido oral ...

- IgA fluido oral - excelente herramienta monitoreo/confirmación estatus manada (PEDV neg, pos)
- Investigar profundidad respuesta IgA-fluido oral
 - Predictiva de transferencia inmunidad materna?



Coste/valor comparativo por test ...

- IgA ELISA WV fluid oral
 - \$5.50 por test
 - Excelente Sensib./Especif.
 - Resultados mismo día
- IgG ELISA WV suero
 - \$5.50 por test
 - Buena Sensib./Especif.
 - Resultados mismo día
- FFN
 - \$15.00 por test
 - < repetitividad que ELISA (?)
- IFA
 - \$5.50 por test
 - Anticuerpos desaparecen rapido

Inmunidad maternal frente a PEDV

Luis G. Giménez-Lirola, PhD
Iowa State University
luisggl@iastate.edu

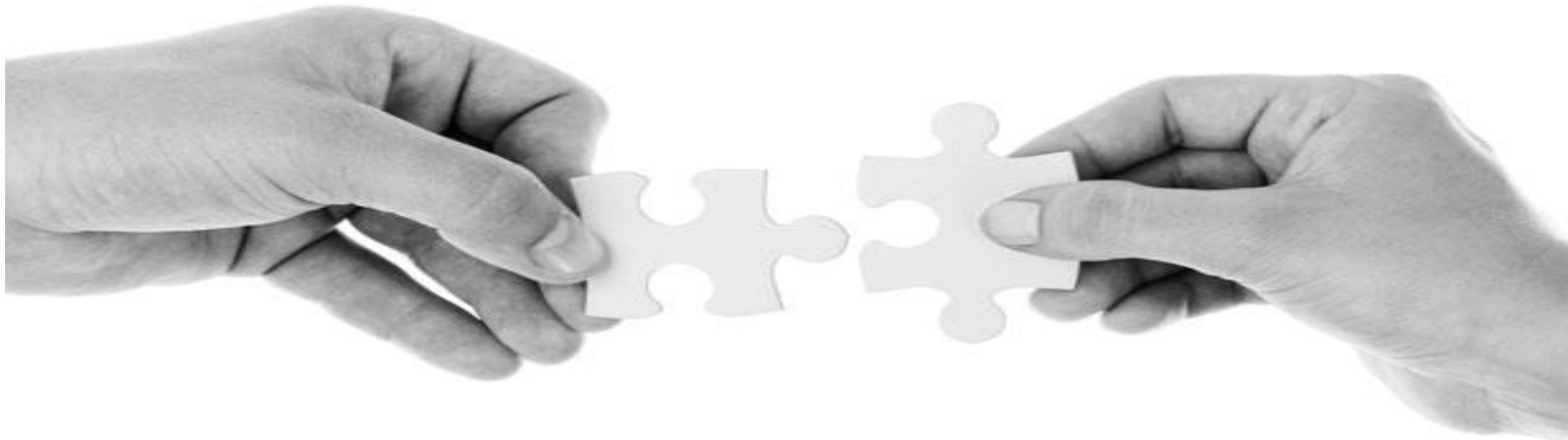
K Poonsuk, J Zimmerman

Inmunidad-TGEV: lecciones aprendidas

- Inmunidad lactogenica (SIgA leche) es central:
 - Limitando replicacion TGEV en tracto intestinal y protegiendo lechones frente enfermedad (clinica) ([Pensaert, 1999](#); [Saif, 2015](#)).
 - IgA en leche depende del desarrollo the “gut-mammary gland-sIgA axis”, i.e., explosion/inmunizacion en tracto gastrointestinal.
 - Altos niveles SIgA leche - protege lechones vs clinical TGE ([Bohl, 1972](#) [Bohl & Saif, 1972](#); [Saif, 2010](#)).
- Fundacion para estrategias de prevencion y control de TGEV durante ultimos 50 anos ([Doyle, 1958](#)).

Proteccion frente PEDV?

- Inmunidad maternal importante en proteccion
- Cual es el papel de Ab circulantes en la proteccion de lechones frente PEDV?



Objetivos

- **Estudio 1:** Evaluar proteccion frente PEDV en lechones naïve administrados con niveles especificos de anticuerpos anti-PEDV.
- **Estudio 2:** Evaluar proteccion frente PEDV en lechones de madres inmunizadas (inmunidad maternal).

- **Estudio 1:** Evaluar proteccion frente PEDV en lechones naïve administrados con niveles especificos de anticuerpos anti-PEDV.
 - Modelo experimental basado en Ab pasivamente administrados (via parenteral).
 - Papel de Ab sistemicos (circulantes) en proteccion frente PEDV.

RESEARCH ARTICLE

Does Circulating Antibody Play a Role in the Protection of Piglets against Porcine Epidemic Diarrhea Virus?

Korakrit Poonsuk¹, Luis Gabriel Giménez-Lirola^{1*}, Jianqiang Zhang¹, Paolo Arruda¹, Qi Chen¹, Lucas Correa da Silva Carrion¹, Ronaldo Magtoto¹, Pablo Pineyro¹, Luciana Sarmento¹, Chong Wang^{1,2}, Yaxuan Sun^{1,2}, Darin Madson¹, John Johnson¹, Kyoung-Jin Yoon¹, Jeffrey Zimmerman¹, Rodger Main¹

1 Department of Veterinary Diagnostic and Production Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames, Iowa, 50011, United States of America, **2** Department of Statistics, College of Liberal Arts and Sciences, Iowa State University, Ames, Iowa, 50011, United States of America

* luisggl@iastate.edu



CrossMark
click for updates

Outline

- 1. Objetivos del estudio**
2. Materiales y metodos
3. Resultados
4. Sumario



Objetivo del estudio

- **Determinar efecto Ab sistemicos PEDV-especificos sobre:**
 - Resultados Clinicos:
 - Ganancia peso
 - Temperatura corporal
 - Supervivencia
 - Excreccion viral (heces)
 - Respuesta immune humoral



Outline

1. Objetivos del estudio
- 2. Materiales y metodos**
3. Resultados
4. Sumario



Diseno experimental

1. Preparacion de “anticuerpos pasivos”
 2. Dilucion solucion concentrada de Ab – 6x trat.
 3. Administracion pasiva (IP) de los 6 tratamientos
 4. Inoculacion PEDV 24h tras tratamiento
 5. Coleccion muestras y registro resultados clinicos
- **Previamente:** *Rol de Ab maternos en la modulacion de la respuesta immune frente rotavirus* (Parreno et al., 1999; Hodgings et al., 1999; Nguyen et al., 2005 & 2006).

Diseno experimental

1. Preparacion de “anticuerpos pasivos”
 2. Dilucion solucion concentrada de Ab – 6x trat.
 3. Administracion pasiva (IP) de los 6 tratamientos
 4. Inoculacion PEDV 24h tras tratamiento
 5. Coleccion muestras y registro resultados clinicos
- **Previamente:** *Rol de Ab maternos en la modulacion de la respuesta immune frente rotavirus* (Parreno et al., 1999; Hodgings et al., 1999; Nguyen et al., 2005 & 2006).

Preparacion de Anticuerpos "pasivos"

Eutanasia



Sangre -> Suero



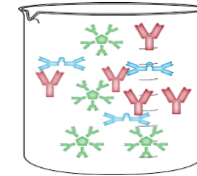
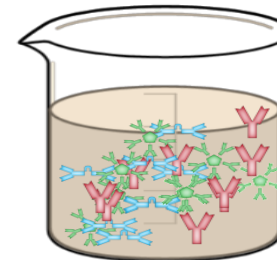
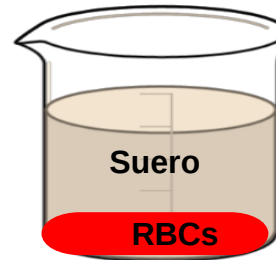
Purificacion+concentration Ab

(Hebert et al., 1973; Grodzki & Berenstein, 2010)



Cerdas inmunizadas frente
PEDV
(n = 2)

Exposicion natural ("feed-
back")



<u>TRATAMIENTO</u>	<u>TITULO</u>
Treatment 1	0
Treatment 2	1:80
Treatment 3	1:160
Treatment 4	1:320
Treatment 5	1:640
Treatment 6	1:1280

Estudio animal

Cerdas neg PEDV Ab
(n = 6)



(~100 días gestacion)

WV IgG ELISA:
S/P < 0.6
IFA titer < 8

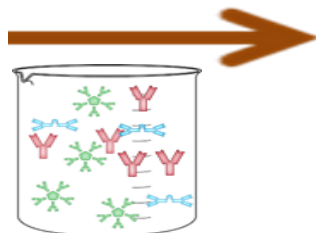
DATOS

- Resultados clinicos
- Excreccion PEDV heces
- Perfil Ab en suero/leche

6 grupos de
Tratamiento

IFA titers 0
1:80
1:160
1:320
1:640
1:1280

Intraperitoneal
-1 DPI

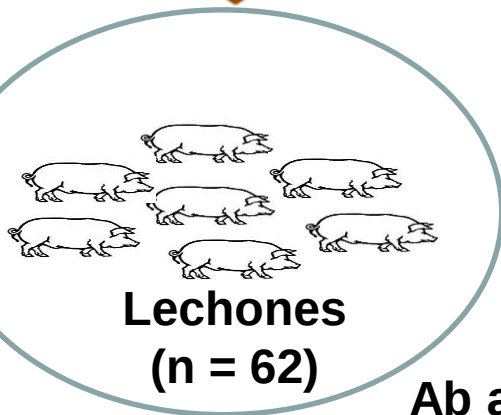


Ab anti-PEDV purificados
y concentrados

Inoculacion
0 DPI



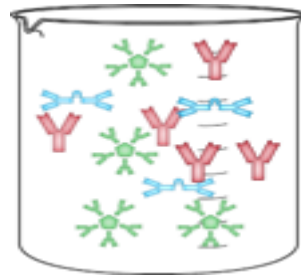
PEDV INOCULAC
1x 10³ TCID₅₀/ml



Lechones
(n = 62)

Tratamientos

- Tratamiento randomizando lechones x cerda
 - Cada camada recibe todos los tratamientos
- Randomized block design (R 3.2.0, R foundation©)



<u>TRATAMIENTO</u>	<u>TITULO IFA</u>
Treatment 1	0
Treatment 2	1:80
Treatment 3	1:160
Treatment 4	1:320
Treatment 5	1:640
Treatment 6	1:1280

Tratamiento

- Tratamientos randomizando lechones por cerda
 - Todas camadas recibieron cada tratamientos

Litter	No. lechones	Tratamientos (no. lechones por tratamiento)						Edad lechones (dias) al tiempo del tratamiento
		1	2	3	4	5	6	
1	13	2	3	2	2	2	2	5
2	11	2	1	2	2	2	2	4
3	9	1	2	1	2	2	1	4
4	10	2	1	2	1	1	3	4
5	10	2	2	1	2	2	1	4
6	9	2	2	2	1	1	1	4
Σ	62	12	12	13	13	12	12	

PEDV inoculo

- PEDV USA/IN/2013/19338E propagado en Vero cells
 - Pase virus No 7th
- Inoculacion
 - 1×10^3 TCID₅₀ por ml
 - Mezcla con milk replacer (1:4)
 - 5 ml oral



Toma diaria datos clinicos

- Supervivencia
- Peso corporal
- Temp. corporal



Coleccion de muestras

- Sueros (-4, 0, 14 dias post-inoculacion)
- Leche (diario)
 - centrifugacion a 13,000 x g, 15 min, 4 °C
- Muestras fecales (diario)
 - 1 g + 1 ml PBS (1X)



Testado

- Perfil de anticuerpos: Leche (cerdas) y suero (lechones y cerdas)
 - PEDV FFN
 - PEDV (partículas virales) IgG ELISA
 - PEDV (partículas virales) IgA ELISA
- Excrección PEDV: muestras fecales individuales (lechones)
 - PEDV real time RT-PCR (diana: N)

Analisis de datos

- Linear mixed models:
 - Analizar respuestas cuantitativas:
 - Peso corporal
 - Temperatura corporal
 - Excreccion viral en heces (PEDV rRT-PCR Cq)
- Kruskal-Wallis test:
 - Comparar ratio de supervivencia entre litters
- Wilcoxon rank test:
 - Analizar respuesta Ab (ELISA PV IgA, IgG)

Analisis datos

- **Analisis considerando tratamiento...:**
 - Definido como 6 grupos independientes:
 - 5 niveles de Ab PEDV (trat. 2 a 6)
 - 1 grupo control negativo (trat. 1)
 - Definido como 2 grupos:
 - Grupo 1: Ab-positivos (trat. 2+3+4+5+6)
 - Grupo 2: Ab-negativos o control (trat. 1)

Outline

1. Objetivos del estudio
2. Materiales y metodos
- 3. Resultados**
4. Sumario

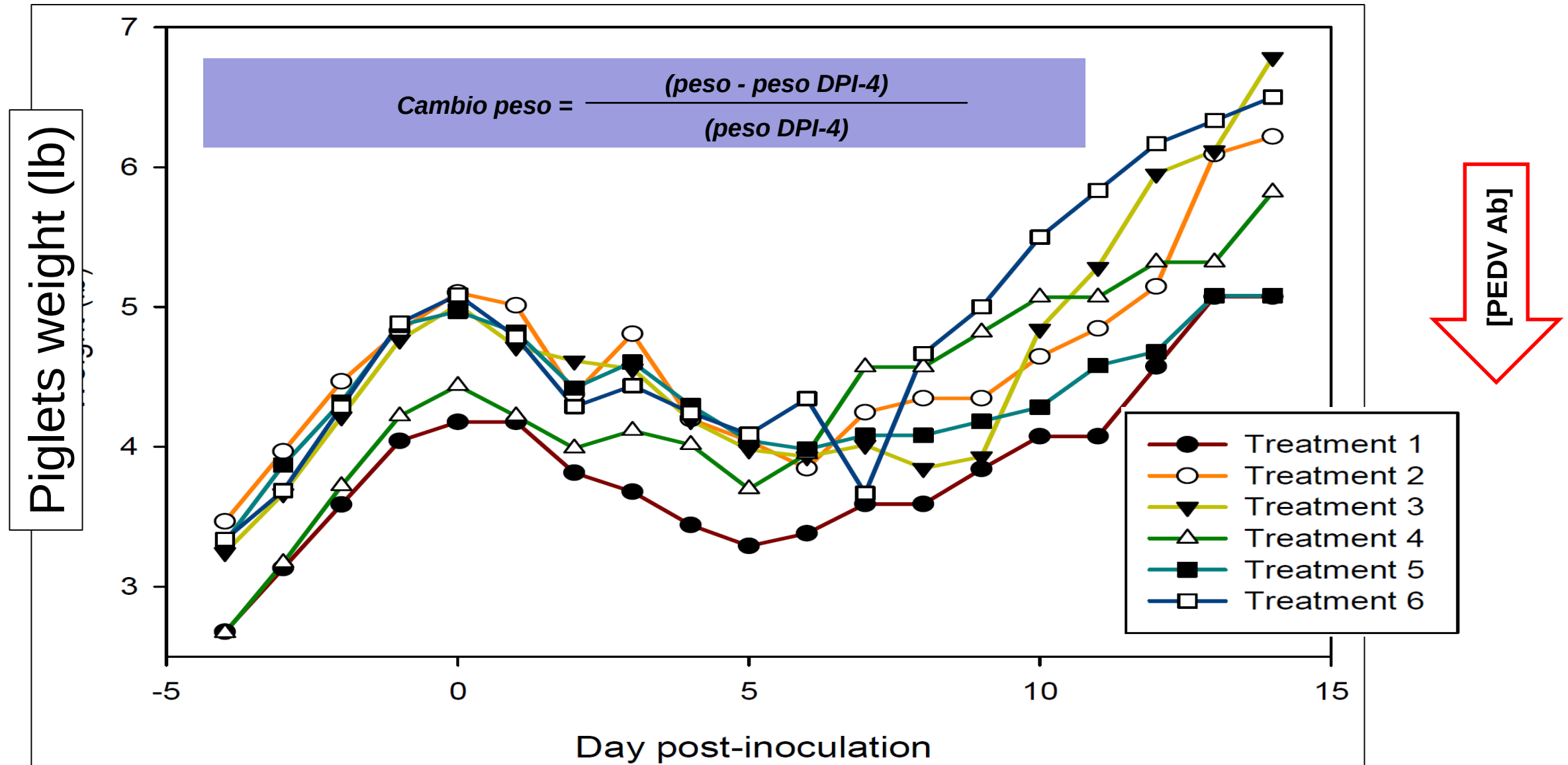


Efecto Ab pasivos anti-PEDV

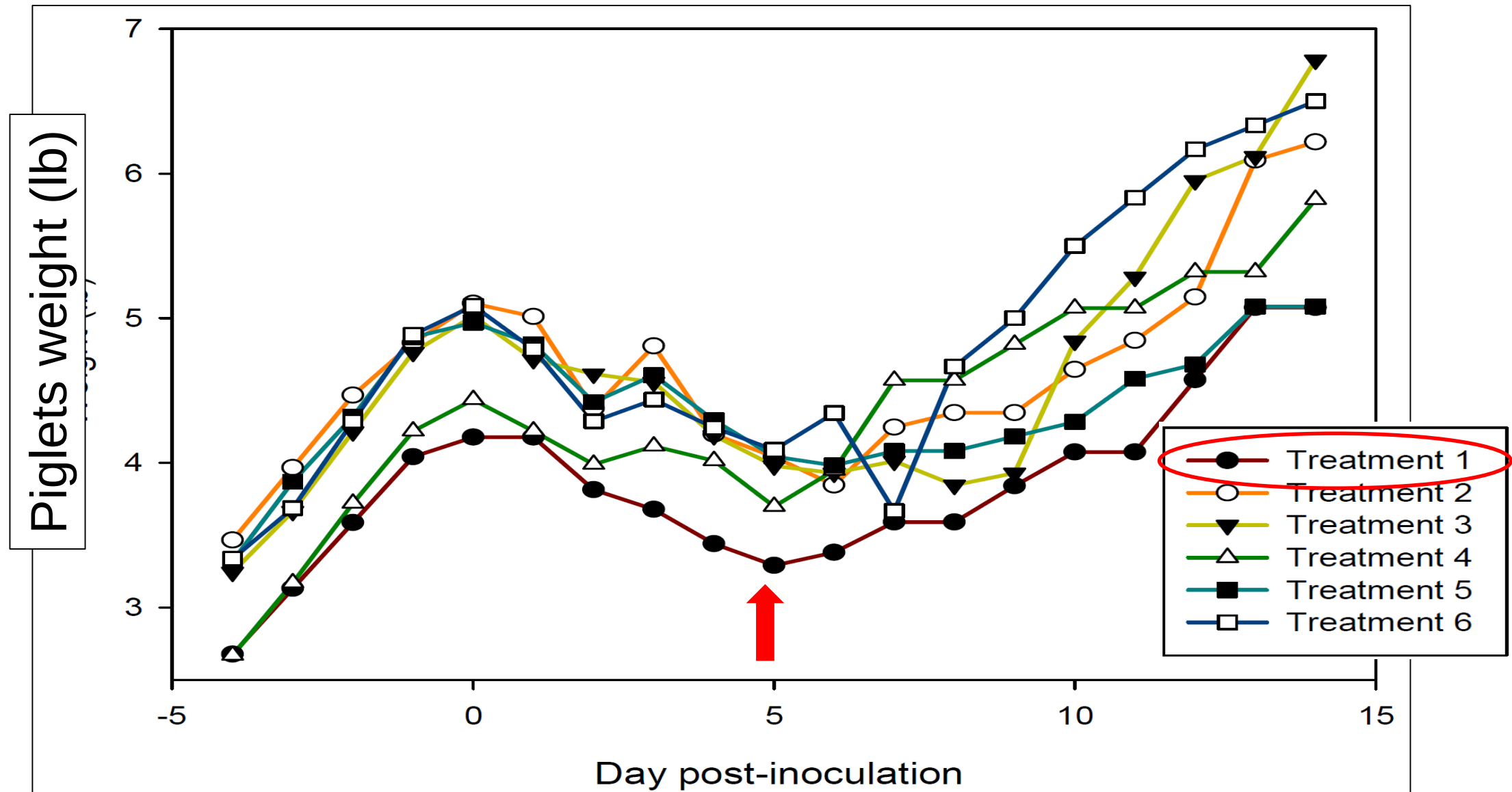
- 1) **Peso corporal**
- 2) Temperatura corporal
- 3) Excreccion viral heces
- 4) Supervivencia
- 5) Respuesta inmune humoral



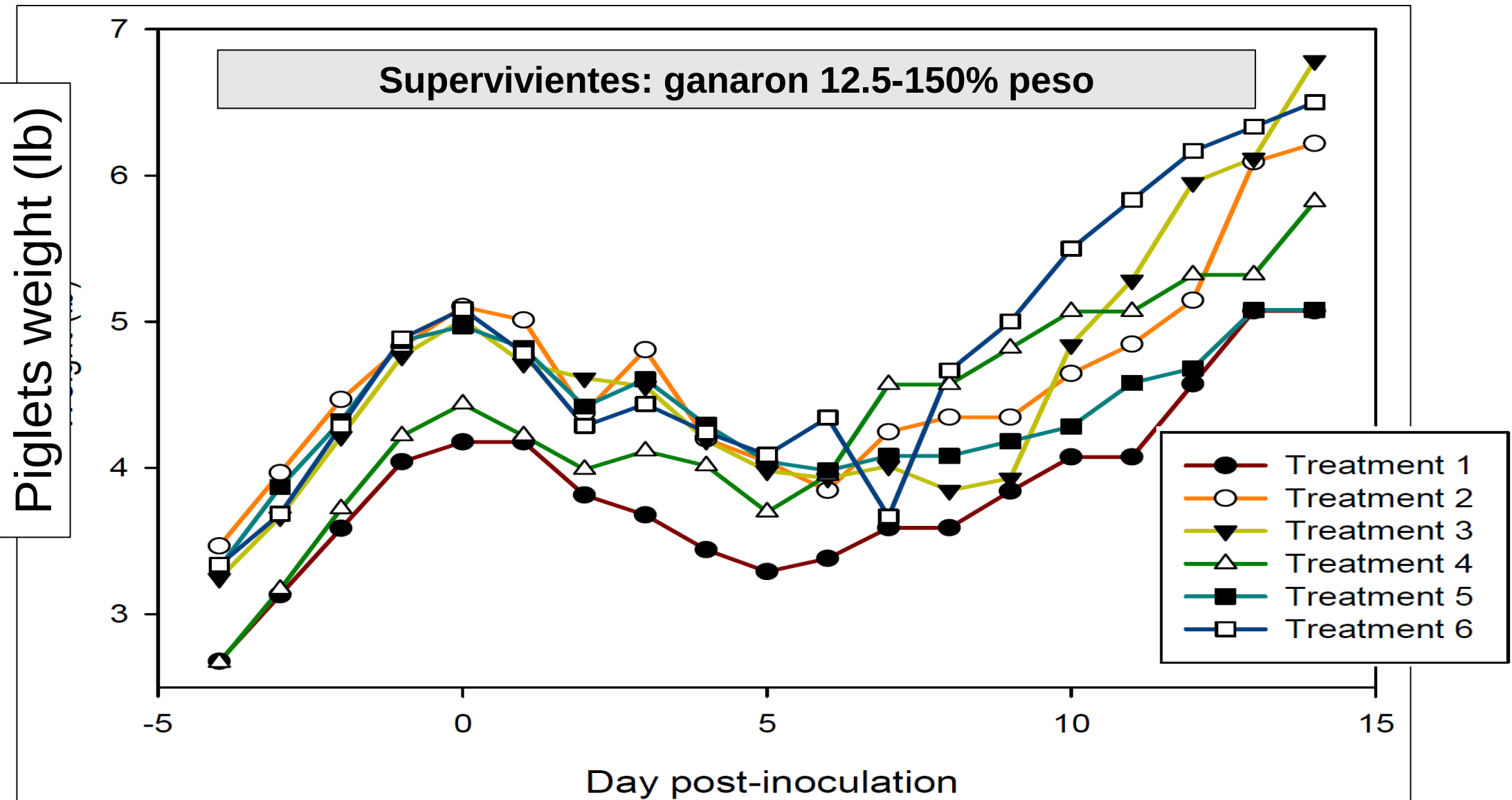
Peso corporal



Peso corporal



No Diferencias significativas entre tratamientos

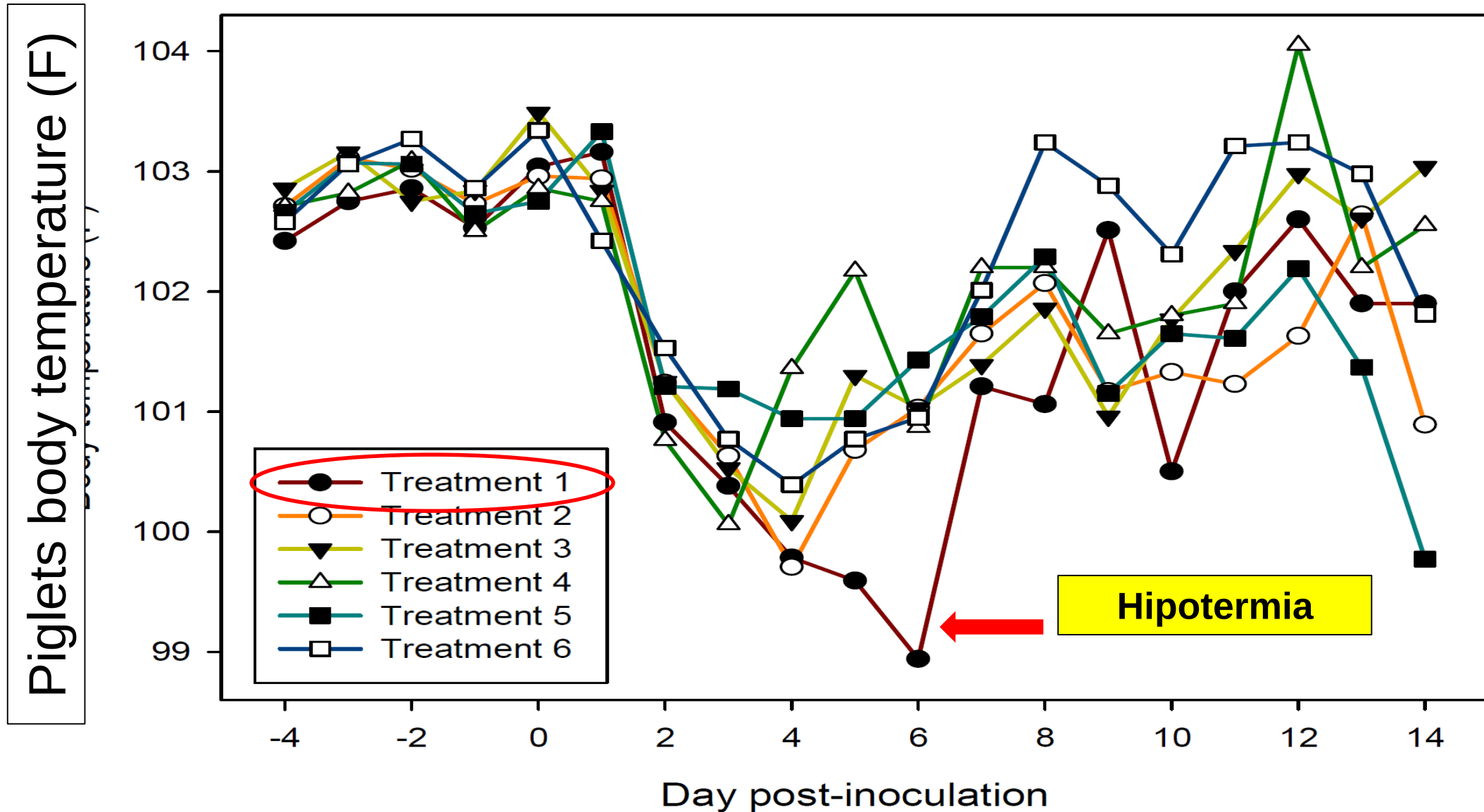


Efecto Ab pasivos anti-PEDV

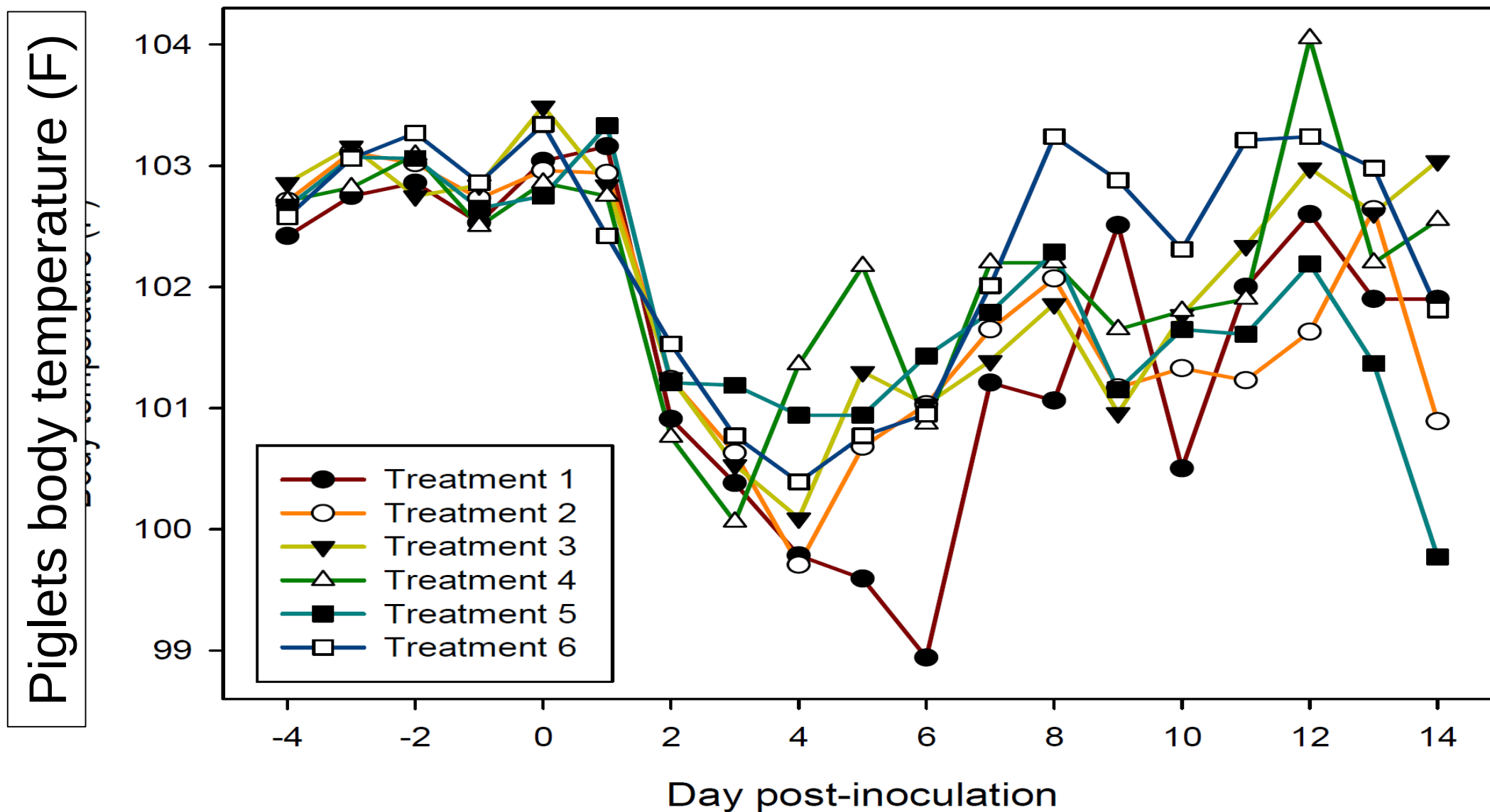
- 1) Peso corporal
- 2) **Temperatura corporal**
- 3) Excreccion viral heces
- 4) Supervivencia
- 5) Respuesta inmune humoral



Temperatura corporal

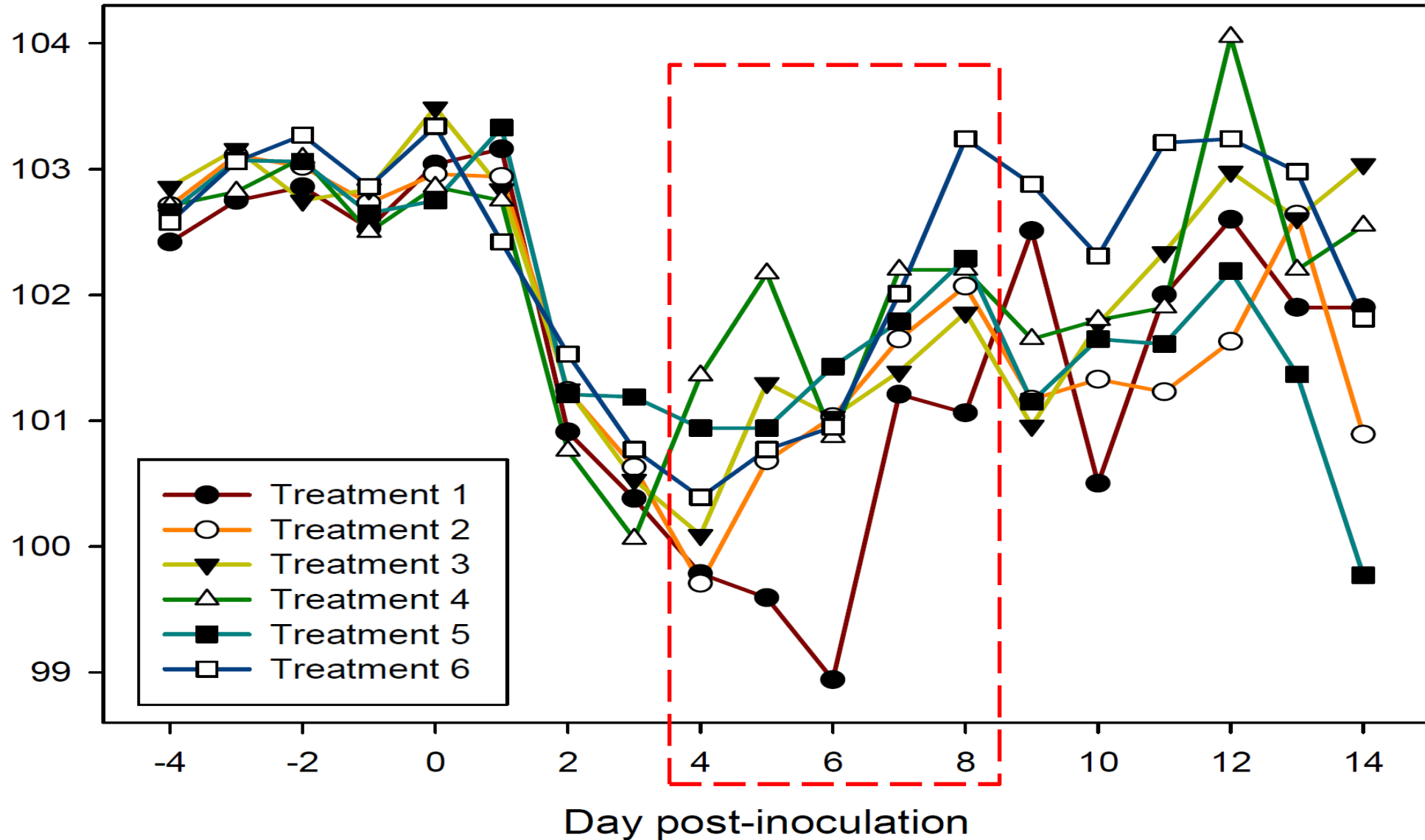


No diferencias significativa cuando trat. Definido como 6 grupos

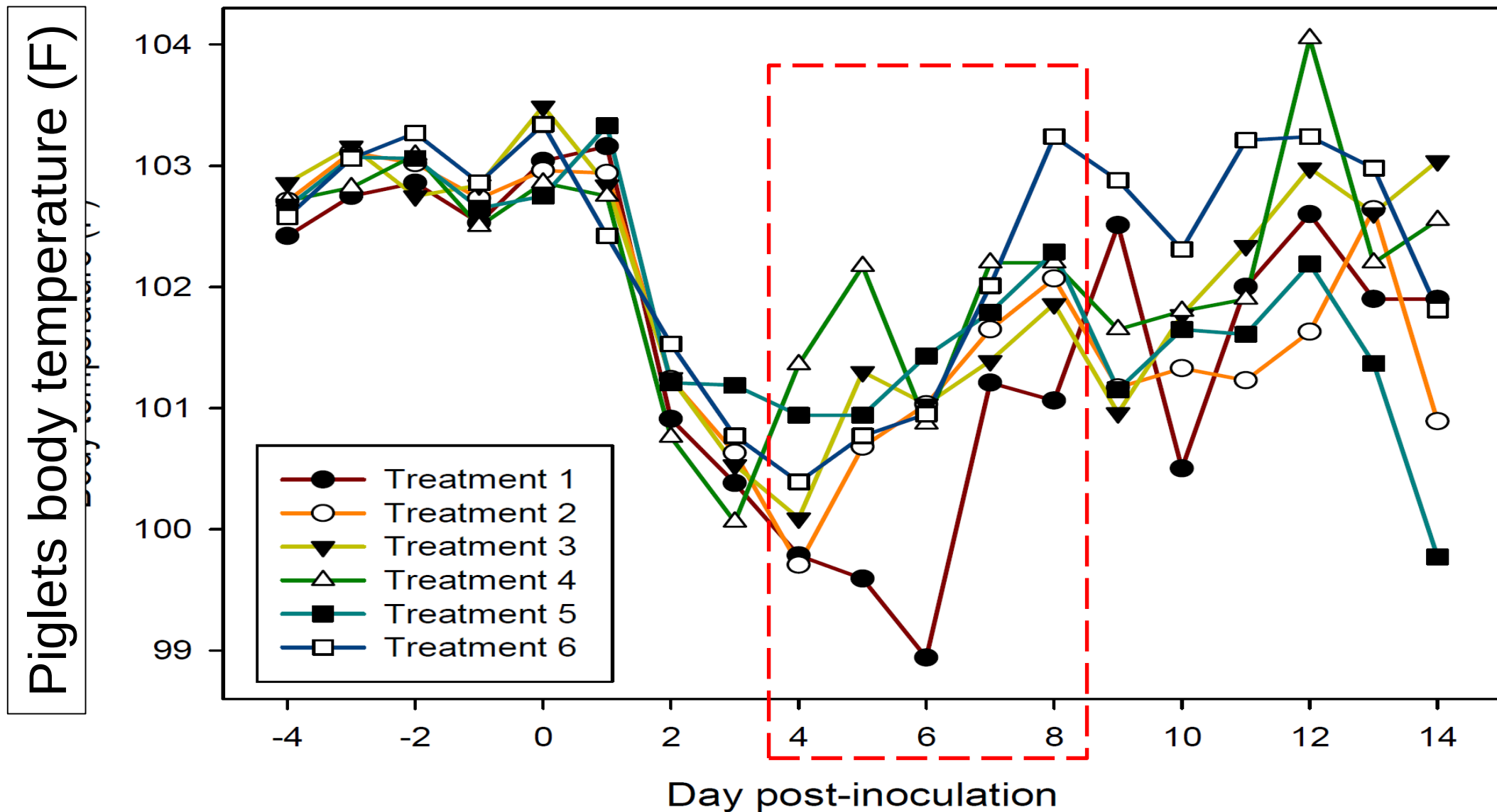


Diferencias significativas cuando comparamos:
Grupo Ab - (tratamiento 1) vs **Grupo Ab+** (tratamiento 2-6)

Piglets body temperature (F)



Grupo Ab+ group (trat. 2 to 6) recupero temp. mas rapido
grupo Ab- o grupo 1 ($p < 0.05$)

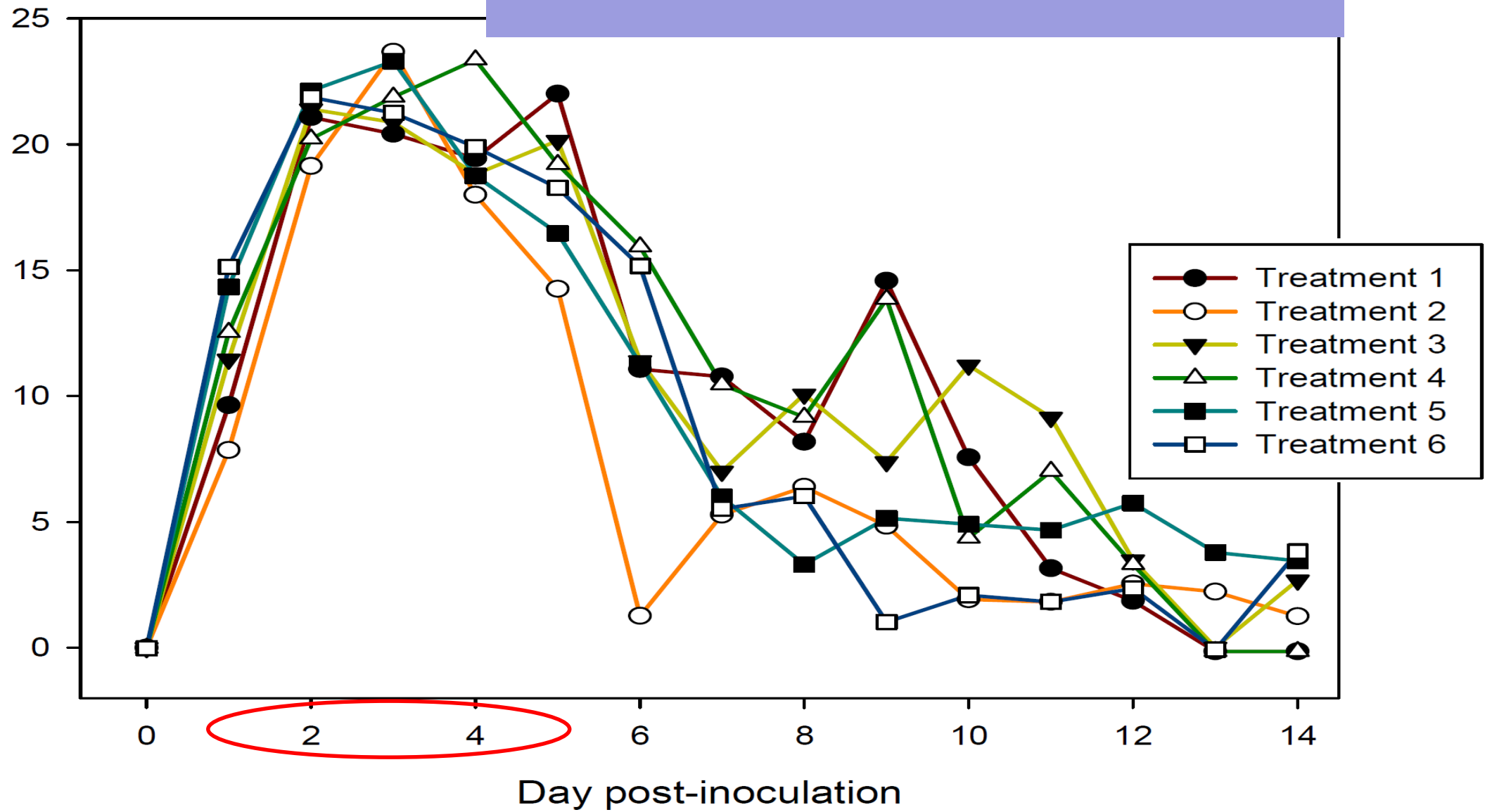


Efecto Ab pasivos anti-PEDV

- 1) Peso corporal
- 2) Temperatura corporal
- 3) **Excreccion viral heces**
- 4) Supervivencia
- 5) Respuesta inmune humoral

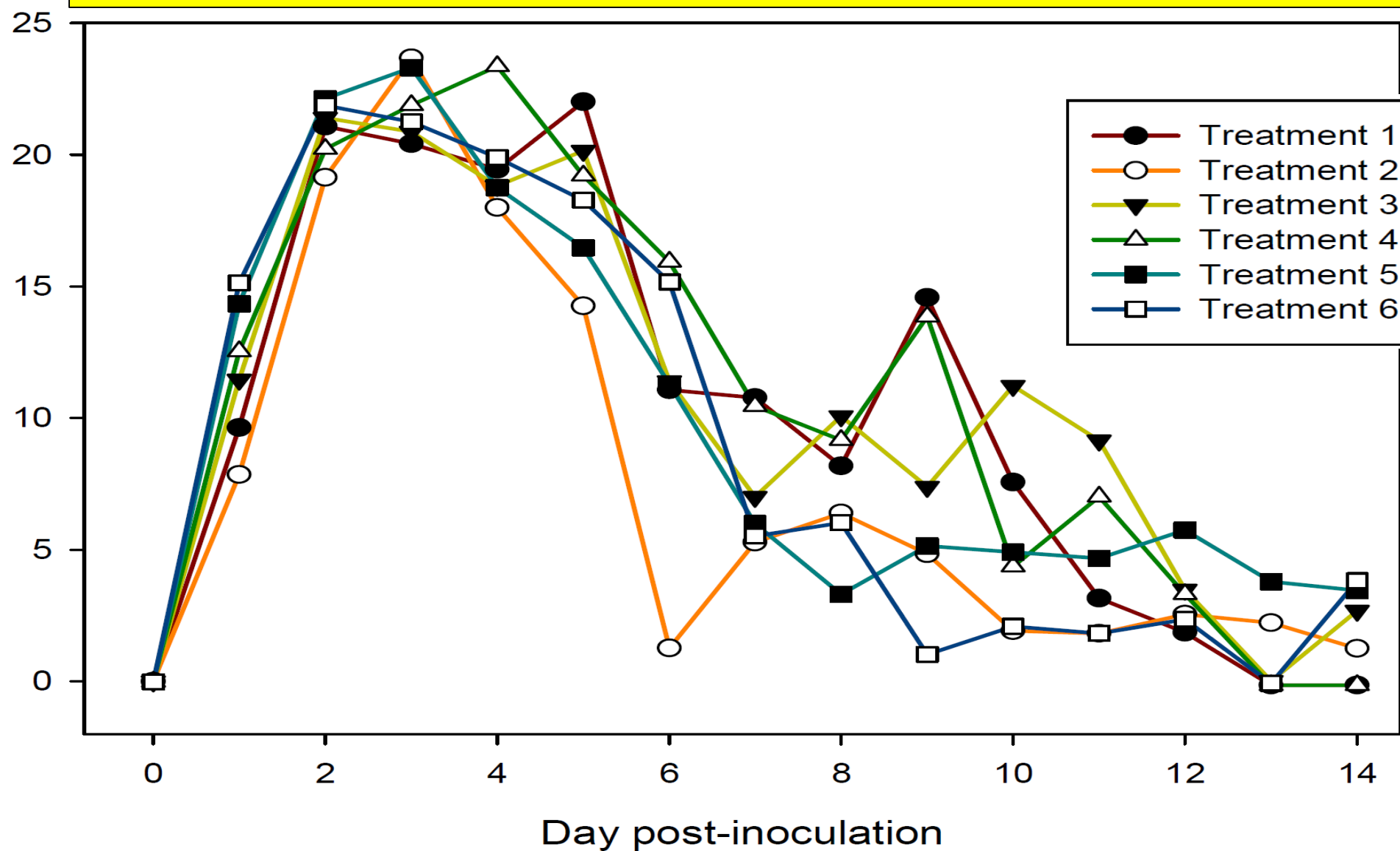


Feces qRT-PCR (converted Cq)



No Diferencias significativas entre tratamientos, sean definidos como 6 grupos o 2 grupos (Ab+ Ab-)

Feces qRT-PCR (converted Cq)

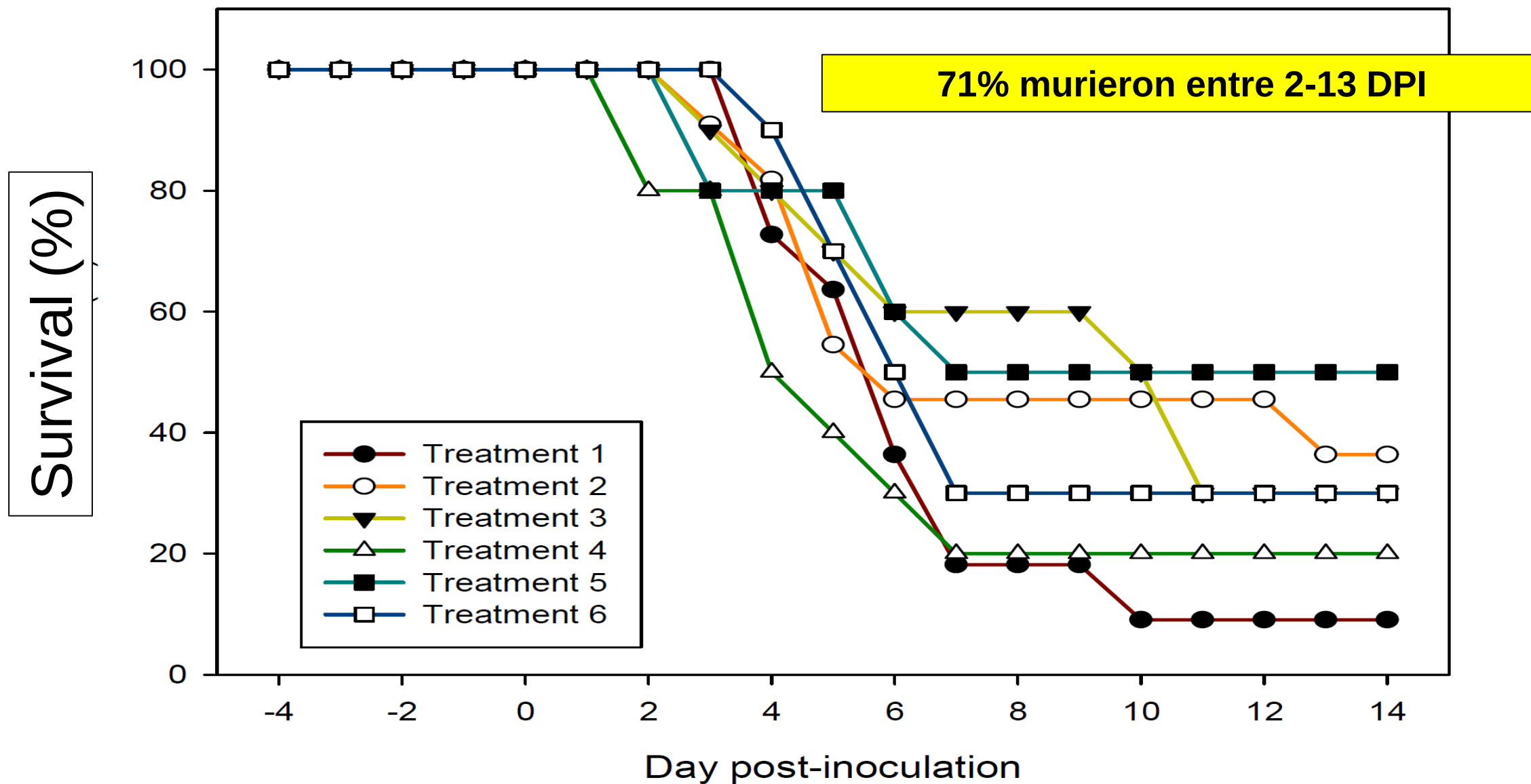


Efecto Ab pasivos anti-PEDV

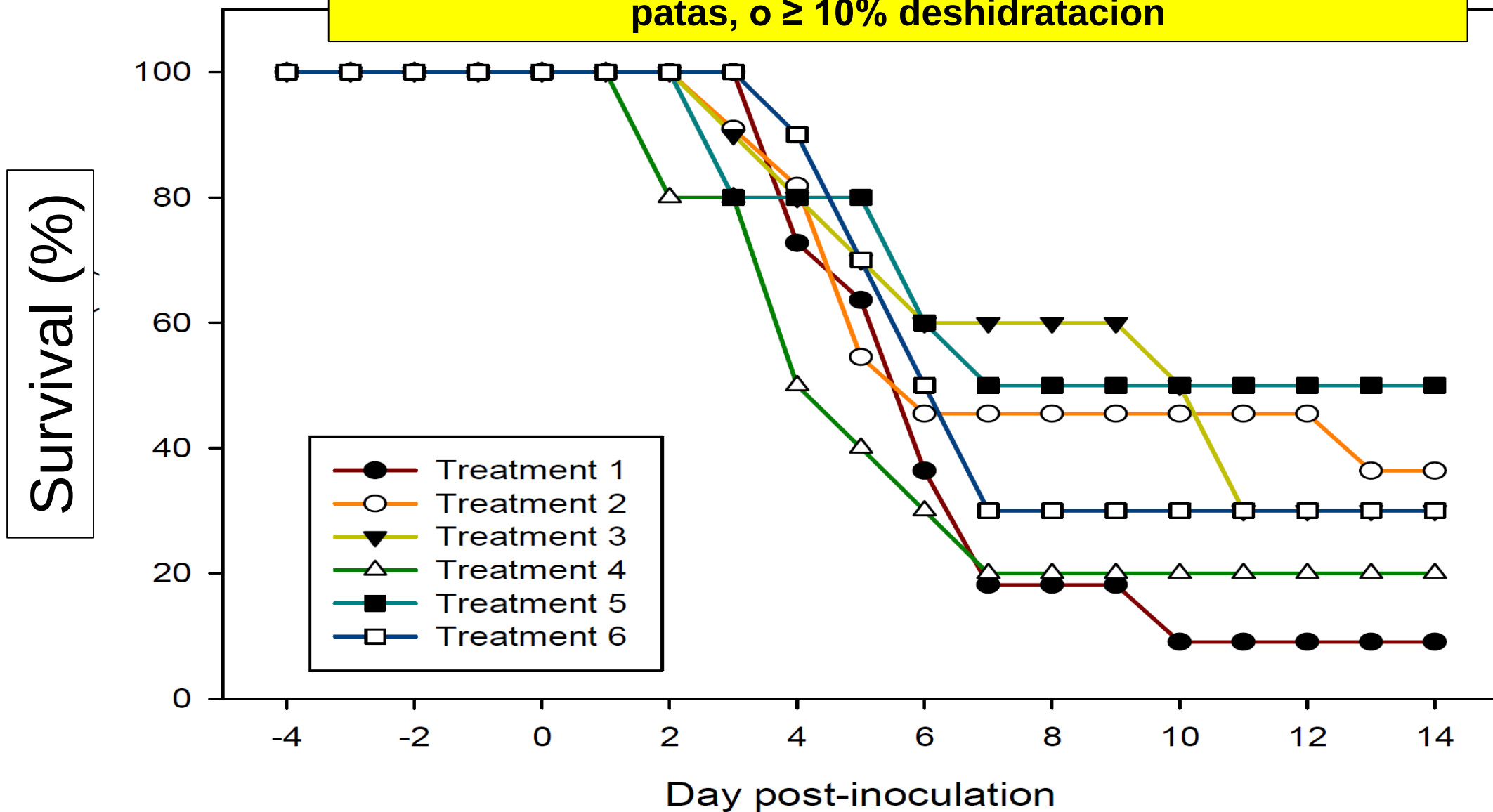
- 1) Peso corporal
- 2) Temperatura corporal
- 3) Excreccion viral heces
- 4) **Supervivencia**
- 5) Respuesta immune humoral



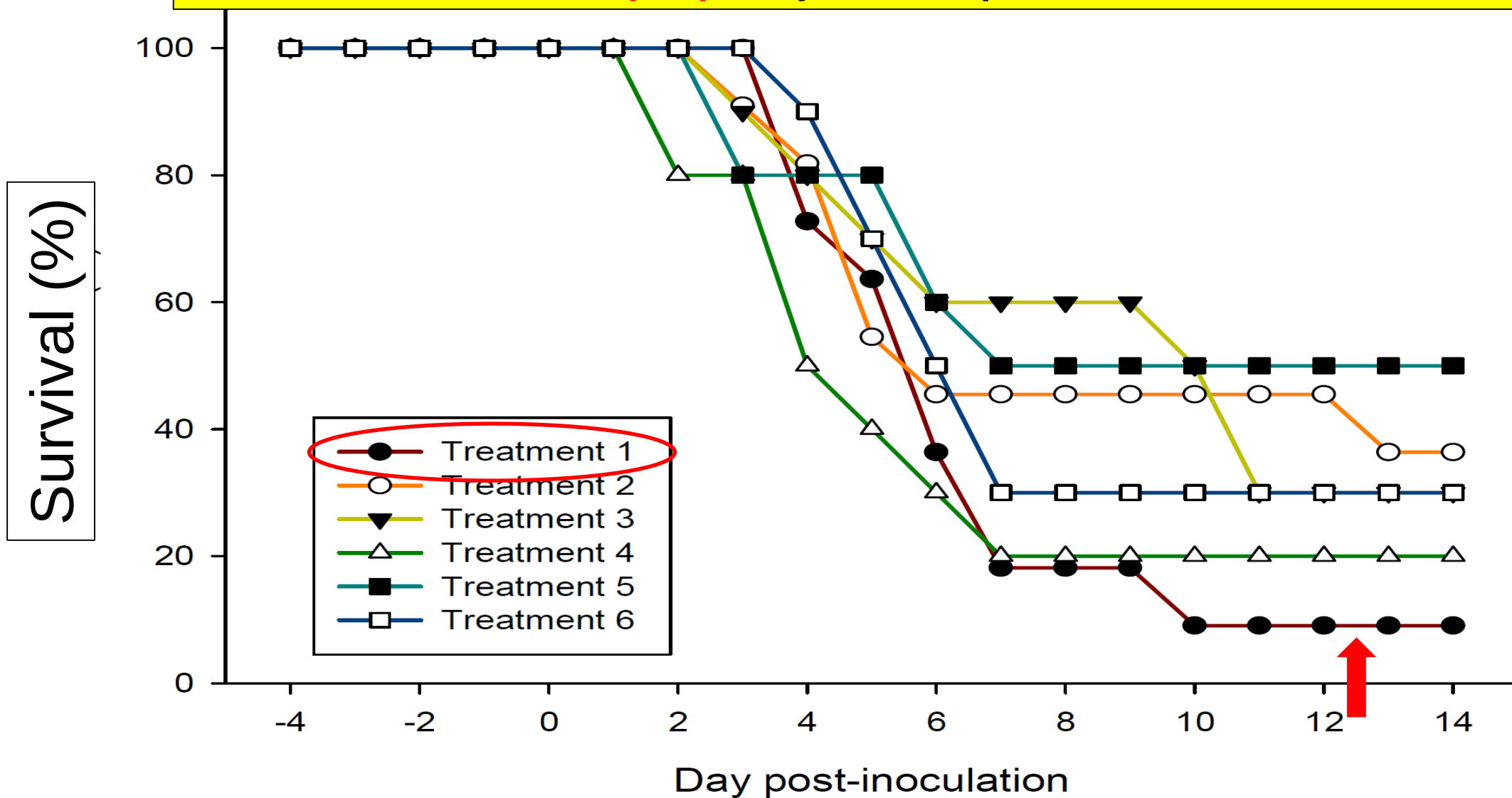
Supervivencia (lechones)



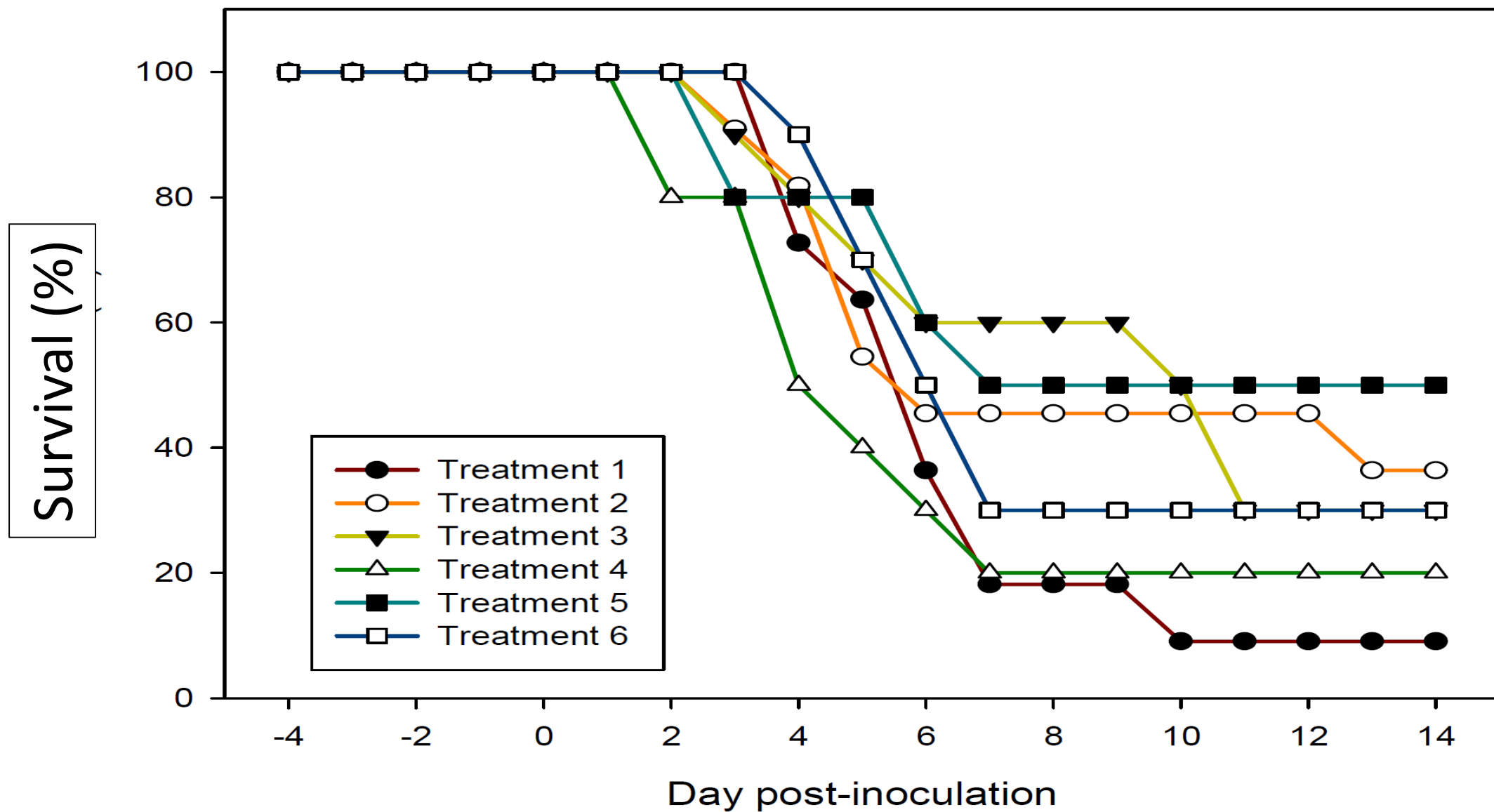
22.7% sacrificados: incapaces de mamar, mantenerse 4 patas, o $\geq 10\%$ deshidratacion



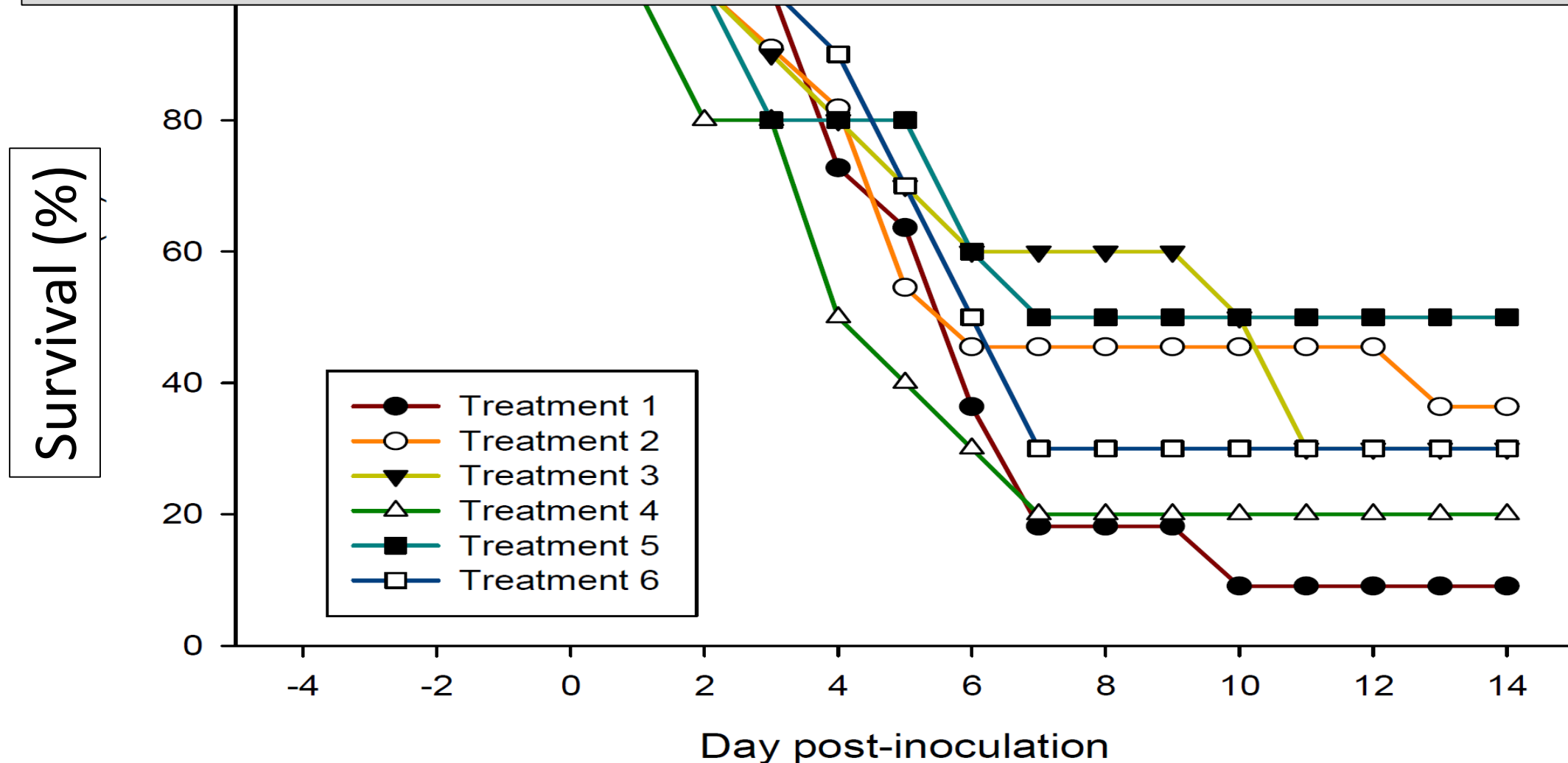
Lechones tratamiento 1 (Ab-) > bajo ratio supervivencia



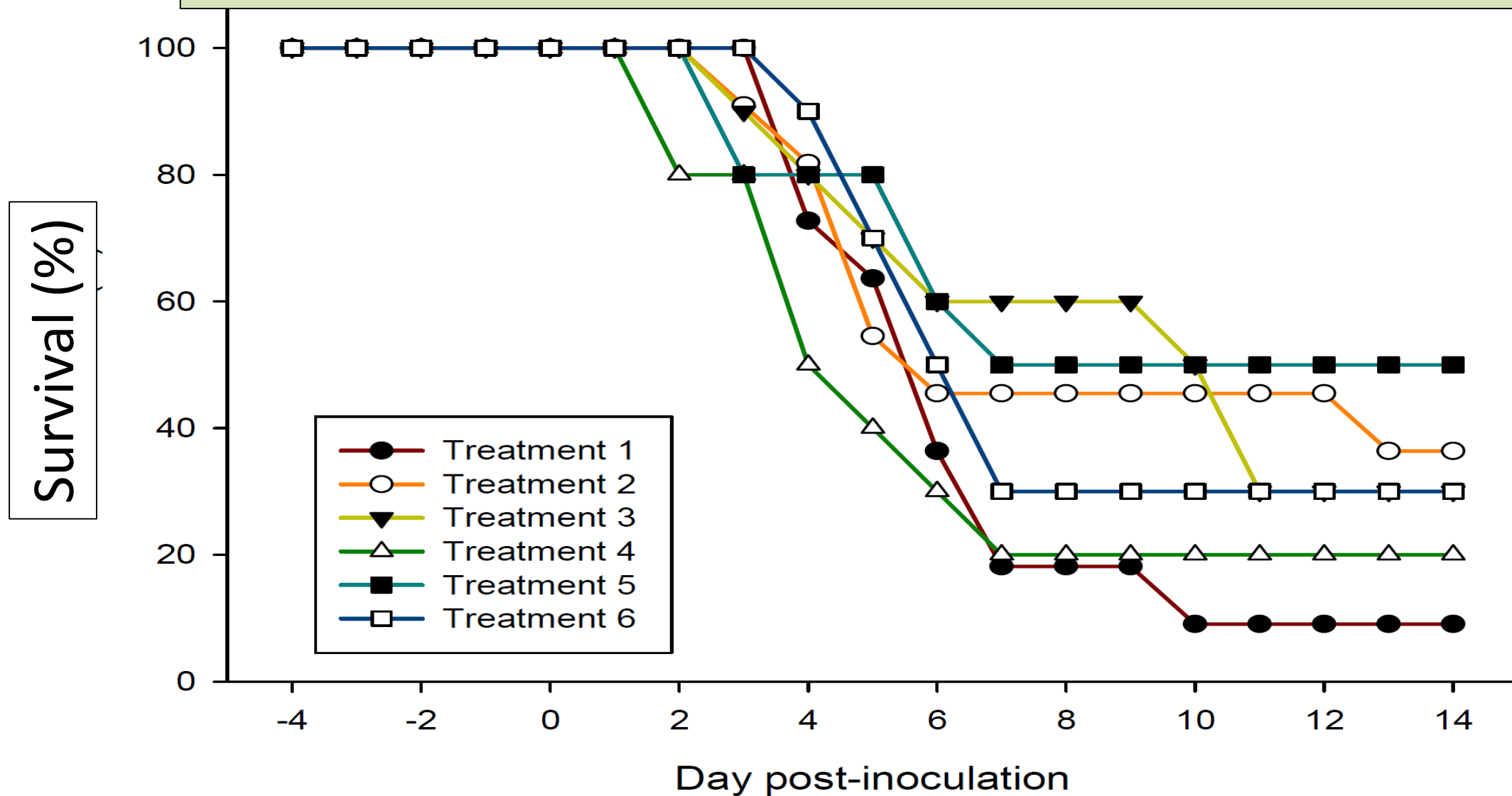
No diferencias significativas → trat. definido 6 grupos



Hazard regression analysis basado en 2 unicos grupos de trat. Mostraron dif. significativa ($p < 0.05$) entre los dos grupos: **Ab+ (33.3% supervivencia)** vs **Ab- (9.1% supervivencia)**



Mayores niveles de anticuerpos circulantes
resultaron en mayores ratios de supervivencia ($p < 0.05$)



Efecto Ab pasivos anti-PEDV

- 1) Peso corporal
- 2) Temperatura corporal
- 3) Excreccion viral heces
- 4) Supervivencia
- 5) **Respuesta inmune humoral**



Assay (piglet serum)	Treatment	Day post inoculation		
		-4	0 ^a	14
FFN arithmetic mean (SE)	1	<1:8	<1:8	1:64
	2	<1:8	1:5.3	1:19.7
	3	<1:8	1:6.1	1:19.7
	4	<1:8	1:8.0	1:32.0
	5	<1:8	1:17.1	1:11.3
	6	<1:8	1:32.0	1:16.0
PEDV IgA ELISA least square mean S/P (SE)	1	0.5	0.2	2.2
	2	0.7	0.7	2.0
	3	0.6	1.1	1.9
	4	0.6	1.8	1.3
	5	0.6	2.8	1.2
	6	0.7	3.3	1.4
PEDV IgG ELISA least square mean S/P (SE)	1	0.6	0.5	1.7
	2	0.7	0.7	1.0
	3	0.7	0.7	1.5
	4	0.7	0.8	1.3
	5	0.7	1.1	1.0
	6	0.7	1.4	0.9

^a 24 h tras administracion intraperitoneal de concentrado de Ab anti-PEDV

Assay	Group	Day post inoculation		
		-4	0 ^a	14
FFN arithmetic mean (SE)	1	<1:8	<1:8	1:64
	2	<1:8	1:5.3	1:19.7
	3	<1:8	1:6.1	1:19.7
	4	<1:8	1:8.0	1:32.0
	5	<1:8	1:17.1	1:11.3
	6	<1:8	1:32.0	1:16.0
PEDV IgA ELISA least square mean S/P (SE)	1	0.5	0.2	2.2
	2	0.7	0.7	2.0
	3	0.6	1.1	1.9
	4	0.6	1.8	1.3
	5	0.6	2.8	1.2
	6	0.7	3.3	1.4
PEDV IgG ELISA least square mean S/P (SE)	1	0.6	0.5	1.7
	2	0.7	0.7	1.0
	3	0.7	0.7	1.5
	4	0.7	0.8	1.3
	5	0.7	1.1	1.0
	6	0.7	1.4	0.9

^a 24 h tras administracion intraperitoneal de concentrado de Ab anti-PEDV

Assay	Group	Day post inoculation		
		-4	0	14
FFN arithmetic mean (SE)	1	<1:8	<1:8	1:64
	2	<1:8	1:5.3	1:19.7
	3	<1:8	1:6.1 ^b	1:19.7
	4	<1:8	1:8.0 ^b	1:32.0
	5	<1:8	1:17.1 ^b	1:11.3
	6	<1:8	1:32.0 ^b	1:16.0
PEDV IgA ELISA least square mean S/P (SE)	1	0.5	0.2	2.2
	2	0.7	0.7	2.0
	3	0.6	1.1	1.9
	4	0.6	1.8 ^b	1.3
	5	0.6	2.8 ^b	1.2
	6	0.7	3.3 ^b	1.4
PEDV IgG ELISA least square mean S/P (SE)	1	0.6	0.5	1.7
	2	0.7	0.7 ^b	1.0
	3	0.7	0.7 ^b	1.5
	4	0.7	0.8 ^b	1.3
	5	0.7	1.1 ^b	1.0
	6	0.7	1.4 ^b	0.9

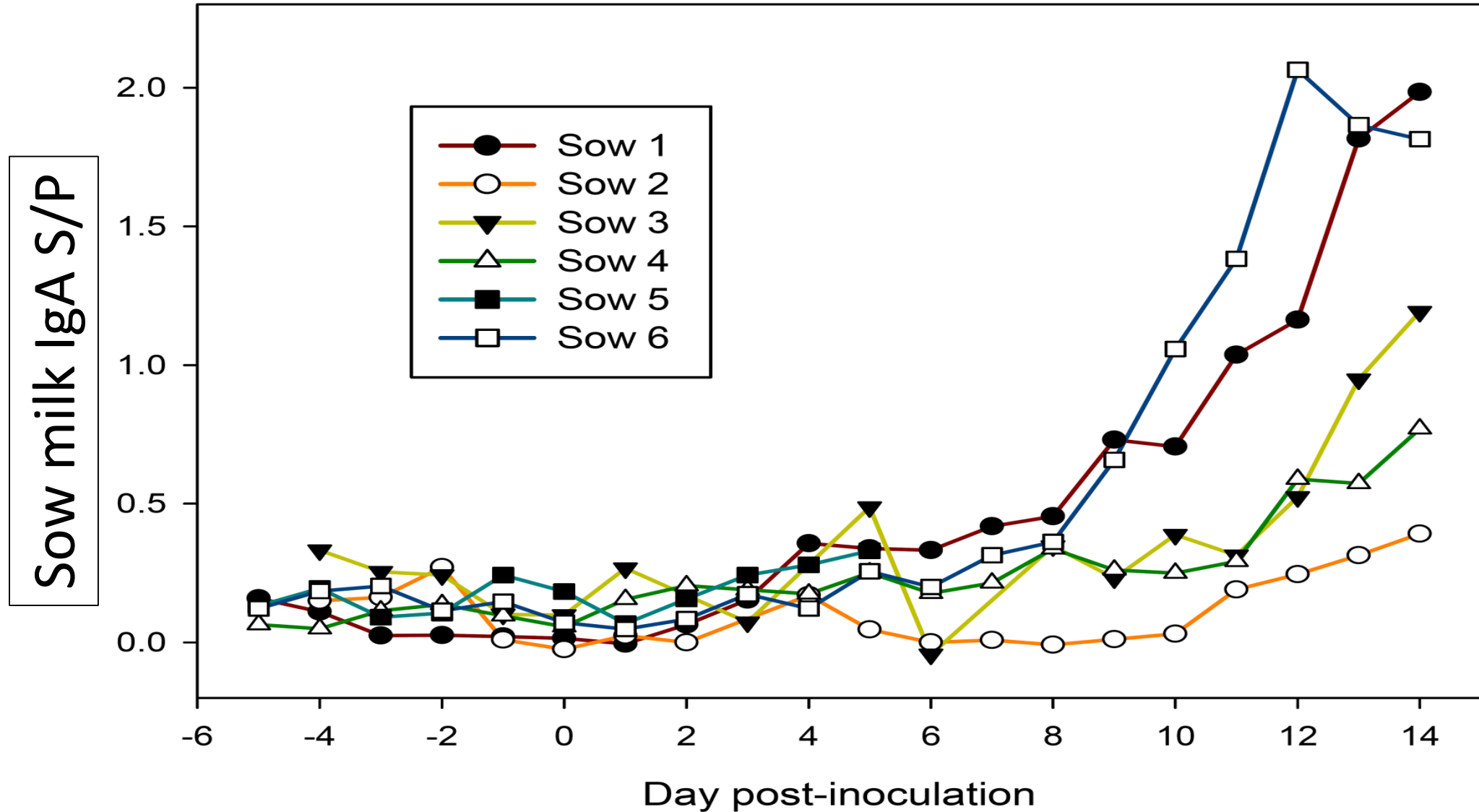
^b Tratamiento 2-6 mostraron niveles Ab significativ. Diferentes que trat. 1 (p < 0.02)

Assay	Group	Day post inoculation		
		-4	0	14
FFN arithmetic mean (SE)	1	<1:8	<1:8	1:64
	2	<1:8	1:5.3	1:19.7
	3	<1:8	1:6.1 ^b	1:19.7
	4	<1:8	1:8.0 ^b	1:32.0
	5	<1:8	1:17.1 ^b	1:11.3
	6	<1:8	1:32.0 ^b	1:16.0
PEDV IgA ELISA least square mean S/P (SE)	1	0.5	0.2	2.2
	2	0.7	0.7	2.0
	3	0.6	1.1	1.9
	4	0.6	1.8 ^b	1.3
	5	0.6	2.8 ^b	1.2
	6	0.7	3.3 ^b	1.4
PEDV IgG ELISA least square mean S/P (SE)	1	0.6	0.5	1.7
	2	0.7	0.7 ^b	1.0
	3	0.7	0.7 ^b	1.5
	4	0.7	0.8 ^b	1.3
	5	0.7	1.1 ^b	1.0
	6	0.7	1.4 ^b	0.9

Assay	Group	Day post inoculation		
		-4	0	14
FFN arithmetic mean (SE)	1	<1:8	<1:8	1:64
	2	<1:8	1:5.3	1:19.7
	3	<1:8	1:6.1 ^b	1:19.7
	4	<1:8	1:8.0 ^b	1:32.0
	5	<1:8	1:17.1 ^b	1:11.3
	6	<1:8	1:32.0 ^b	1:16.0
PEDV IgA ELISA least square mean S/P (SE)	1	0.5	0.2	2.2
	2	0.7	0.7	2.0
	3	0.6	1.1	1.9
	4	0.6	1.8 ^b	1.3
	5	0.6	2.8 ^b	1.2
	6	0.7	3.3 ^b	1.4
PEDV IgG ELISA least square mean S/P (SE)	1	0.6	0.5	1.7
	2	0.7	0.7 ^b	1.0
	3	0.7	0.7 ^b	1.5
	4	0.7	0.8 ^b	1.3
	5	0.7	1.1 ^b	1.0
	6	0.7	1.4 ^b	0.9

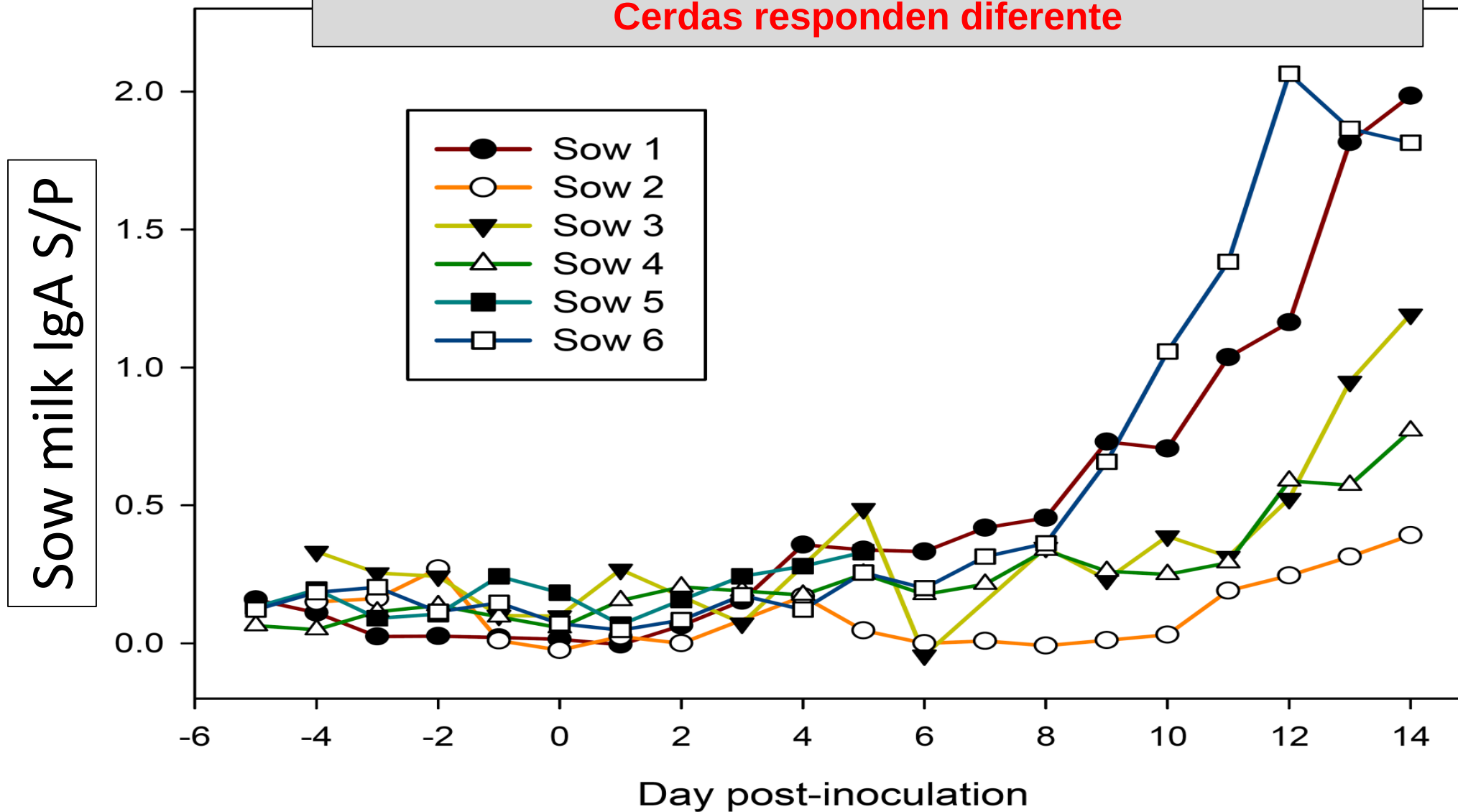
^b Significativamente diferentes de grupo 1 (Wilcoxon rank test, p < 0.02)

Respuesta IgA en leche

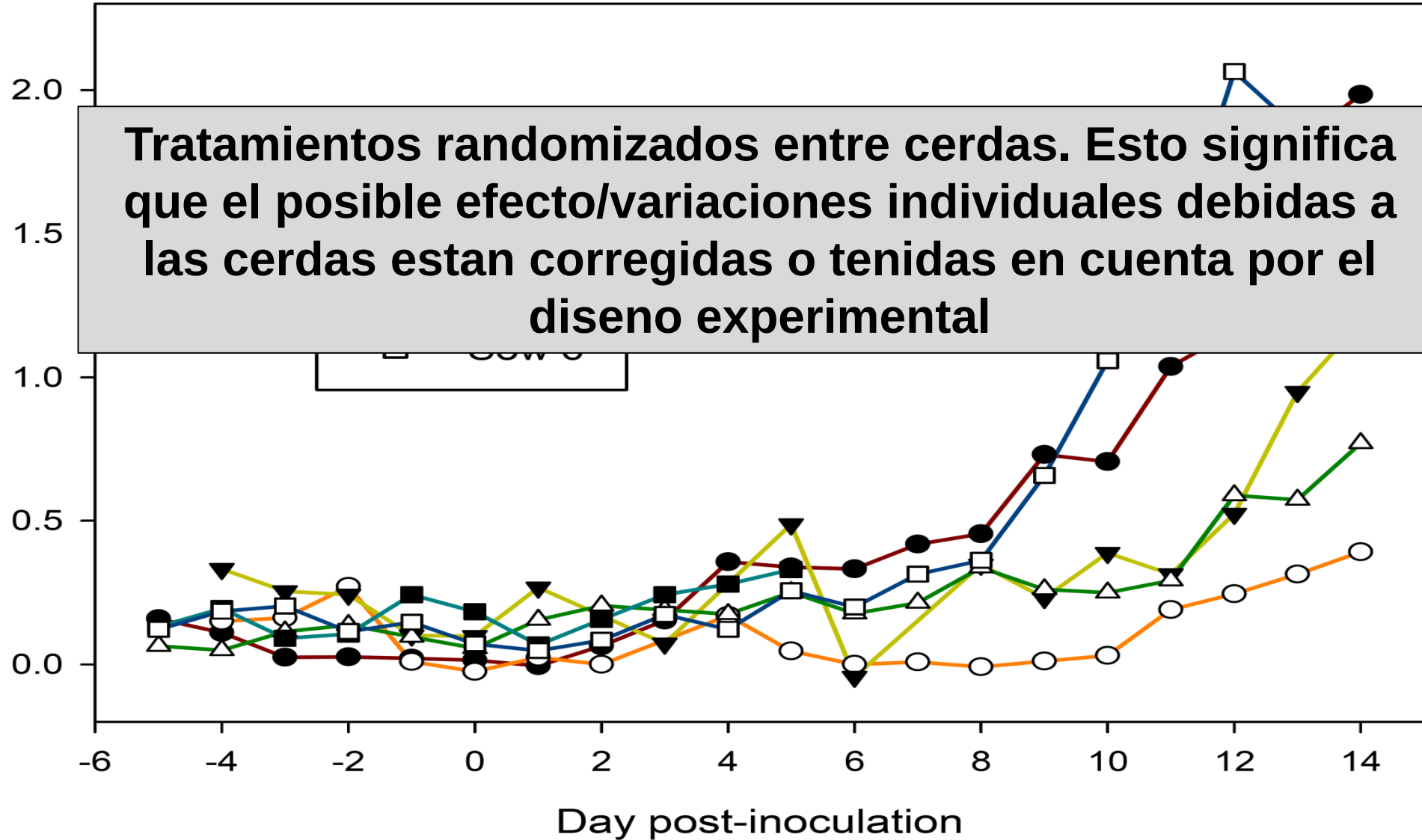


Cerdas expuestas a heces de lechones contaminadas con PEDV

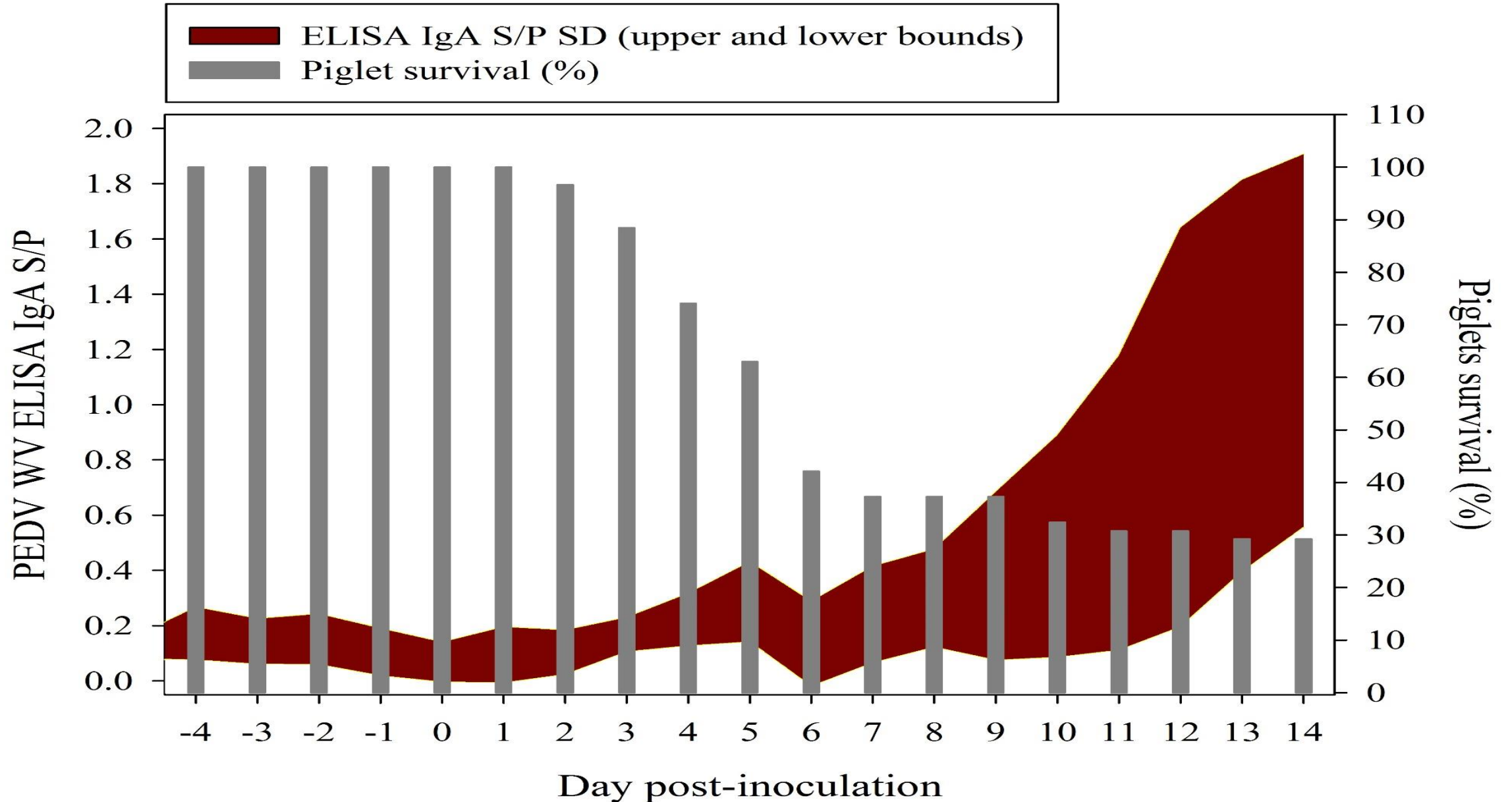
Cerdas responden diferente



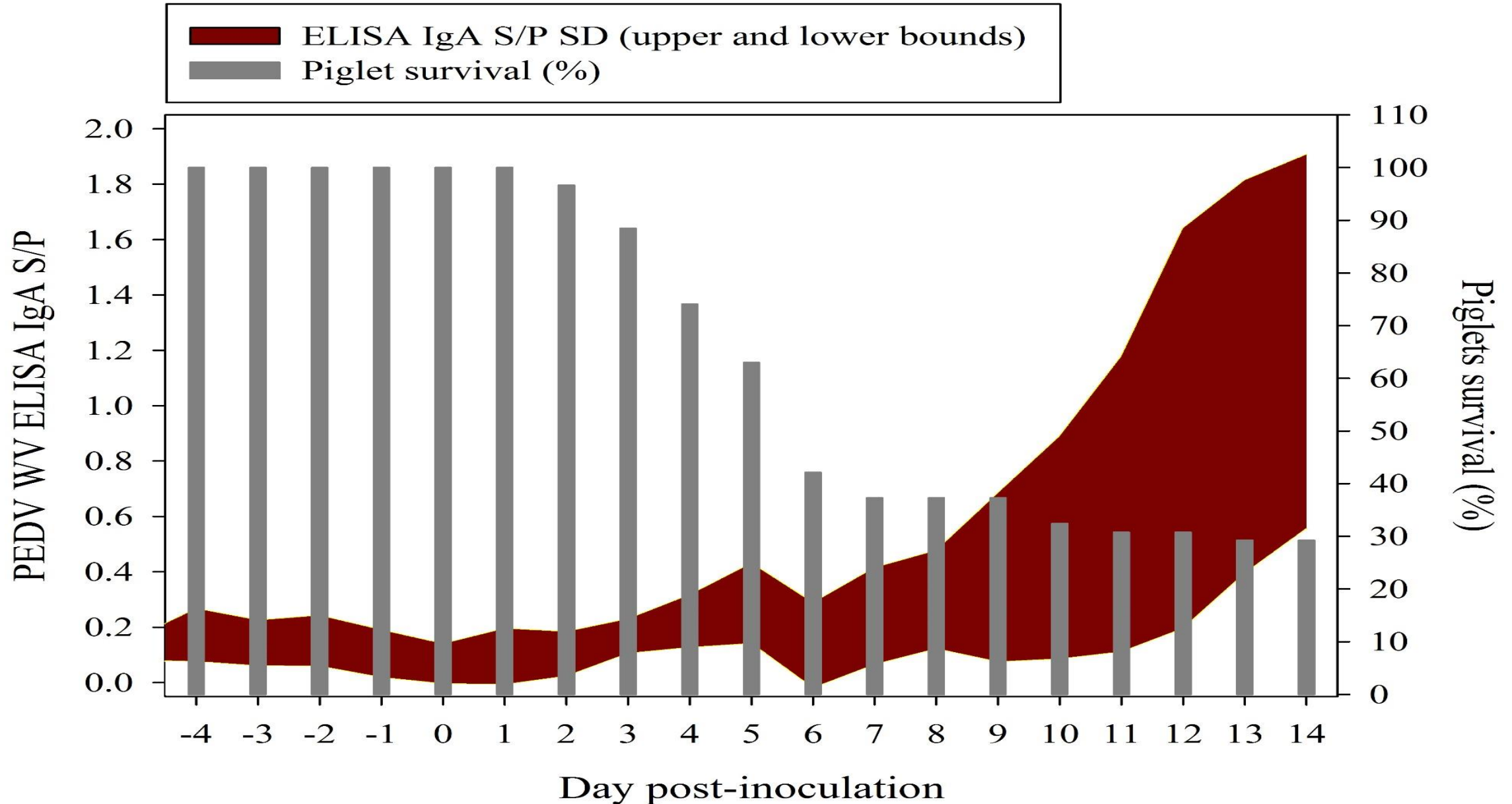
Sow milk IgA S/P



IgA en leche – % supervivencia



Ratios mortalidad mas altos ocurrieron antes de que los niveles IgA en leche incrementaran...



Para llevar a casa...

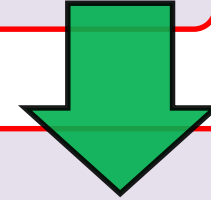
- **Anticuerpos circulantes (IgG e IgA) ...**
 - Tienen un efecto significativo en la temperatura corporal y ratio supervivencia de lechones
 - Recuperan mas rapido de la hipotermia
 - Mayor supervencia (33.3%) comparado con group control Ab- (9.1%)
 - No encontramos efecto significativo en peso corporal y excreccion viral en heces.

Conclusiones

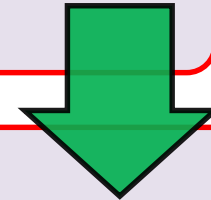
- **Ab circulantes “protegen” lechones...a cierto nivel...**
 - Anticuerpos circulantes tienen valor
 - No contradice para nada la idea central de la inmunidad frente PEDV (lecciones de TGEV)

Pero...cuales son los mecanismos por los que los Ab circulantes afectan los resultados clinicos tras infeccion con PEDV...?

Ab circulantes anti-PEDV

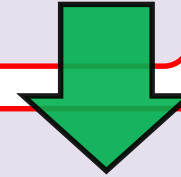


No impacto Temp.corporal – Efecto
compensatorio sobre lechones
supervivientes??

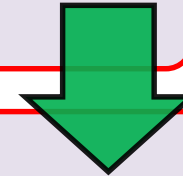


Regeneracion mucosa(*Stevenson et al., 2013*)
> disponibilidad leche

Ab circulantes anti-PEDV



No impacto excrec. viral – No
neutralizacion



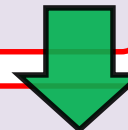
Ab neutralizantes no acceso al
lumen intestinal

SIN EMBARGO...

Ab IgG circulantes



Inducen cel B-precursoras (lamina propria intestinal)



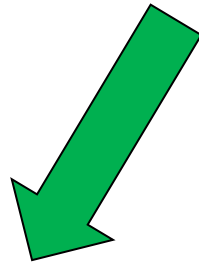
Mucosal plasma cells



Secretion of dimeric SIgA

PROTECCION

Anticuerpos
Circulantes
ASISTEN



Disminuyendo
mortalidad



Termoregulacion

Objetivos

- **Estudio 1:** Evaluar proteccion frente PEDV en lechones naïve administrados con niveles especificos de anticuerpos anti-PEDV.
- **Estudio 2:** Evaluar proteccion frente PEDV en lechones de madres inmunizadas (inmunidad maternal).

Objetivo

- **Estudio 2:** Cuantificación del efecto de los anticuerpos maternos (inmunidad lactogénica) en respuesta a infección experimental con PEDV en neonatos.

Outline

1. Importancia y planteamiento

- 2. Objetivos del estudio
- 3. Materiales y Metodos
- 4. Resultados
- 5. Conclusiones preliminares



- Inmunidad maternal importante proteccion
 - Exposicion oral controlada (feedback) usada para establecer inmunidad & minimizar perdida lechones
- Que papel juegan los Ab maternos en la proteccion frente a PEDV?



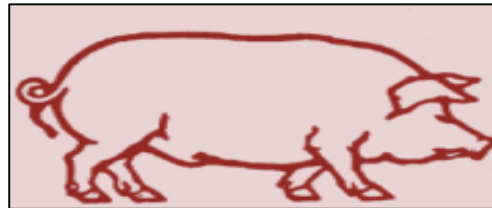
Outline

1. Importancia y planteamiento
- 2. Objetivos del estudio**
3. Materiales y Metodos
4. Resultados
5. Conclusiones preliminares

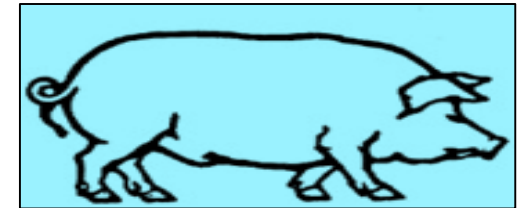


Objetivos del estudio

- Definir rol de los Ab maternos (inmunidad lactogenica) en proteccion lechones vs PEDV
 - Excreccion viral en heces lechones
 - Temperatura corporal
 - Peso corporal
 - Supervivencia



**Cerdas anti-PEDV Ab
negativas**



**Cerdas anti-PEDV Ab
positivas**

Outline

1. Importancia y planteamiento
2. Objetivos del estudio
- 3. Materiales y Metodos**
4. Resultados
5. Conclusiones preliminares



Diseno Experimental

Grupo 3:
lechones control
negativo

**Hembras
seronegativas (n = 2)**



(~100 days gestacion)

PARTO

Lechones control neg (n = 22)

Grupo 1: lechones
control positivo

**Hembras
seronegativas
(n = 6)**



(~100 days gestacion)

PARTO

**Lechones de hembras
Seronegativas
(n = 13)**

Grupo 2: lechones de
hembras inmunizadas

**Hembras seropositivas
(n = 8)**



(~100 days gestacion)

PARTO

**Lechones de hembras
inmunizadas
(n = 91)**

Grupo 1: lechones control positivo

Cerdas PEDV negativas
(n = 6)



(~100 days gestacion)

PARTO

Lechones
(n = 13)

Grupo 2: lechones de hembras inmunizadas

Cerdas PEDV inmunes
(n = 8)



(~100 days gestacion)

PARTO

Lechones
(n = 91)



PEDV CHALLENGE
 10^3 TCID₅₀/ml

Inoculacion, monitoreo, muestreo (leche, suero, heces) x 12-14 dias

PEDV inoculo

- PEDV USA/IN/2013/19338E propagado en Vero cells
 - 7th passage of the virus
- Stock: 1×10^5 TCID₅₀ por ml
- Inoculacion
 - 1×10^3 TCID₅₀ per ml
 - Mezcla con milk replacer (1:4)
 - 5 ml oral
 - 2 dias post-parto (DPI 0)



Valoracion clinica

- Peso corporal
- Singos clinicos
- Temperatura corporal



Coleccion muestras

- Suero
 - Hembras: -8 DPI & 12 DPI
 - Lechones: 0 DPI & 12 DPI
- Leche (diario)
 - centrifugation at 13,000 x g , 15 min, 4 °C
- Fecales (diario)
 - 1 g + 1 ml PBS (1X)
 - Pool (=1) por litter o camada



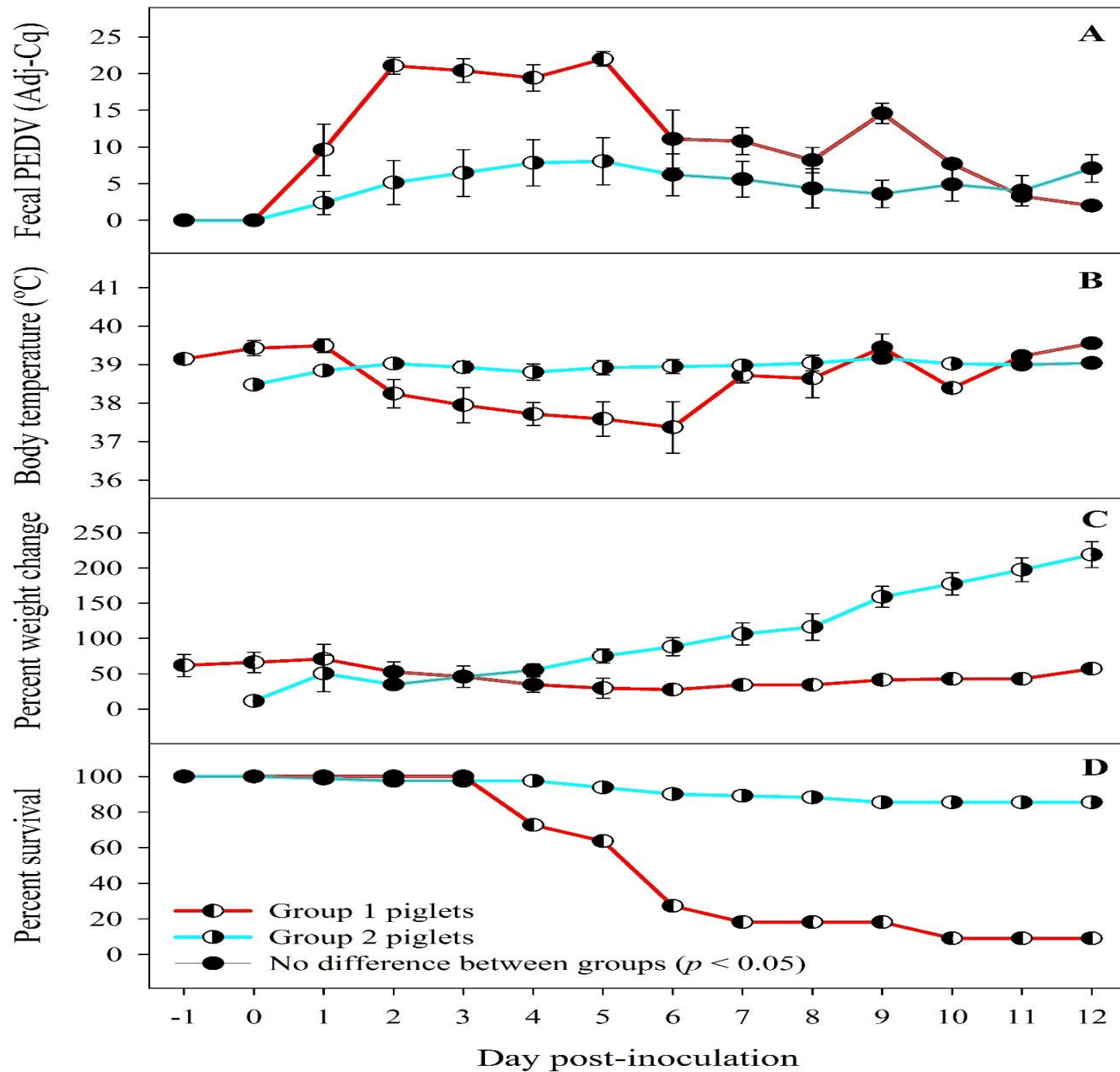
Testing

- Perfil anticuerpos (IgG e IgA)
 - Leche y suero
 - PEDV WV IgG/IgA ELISA
- Excreccion viral en heces
 - Pool (=1) heces/camada/dia
 - PEDV real time RT-PCR
 - Analisis valores Ct convertidos (35 - ct)

Outline

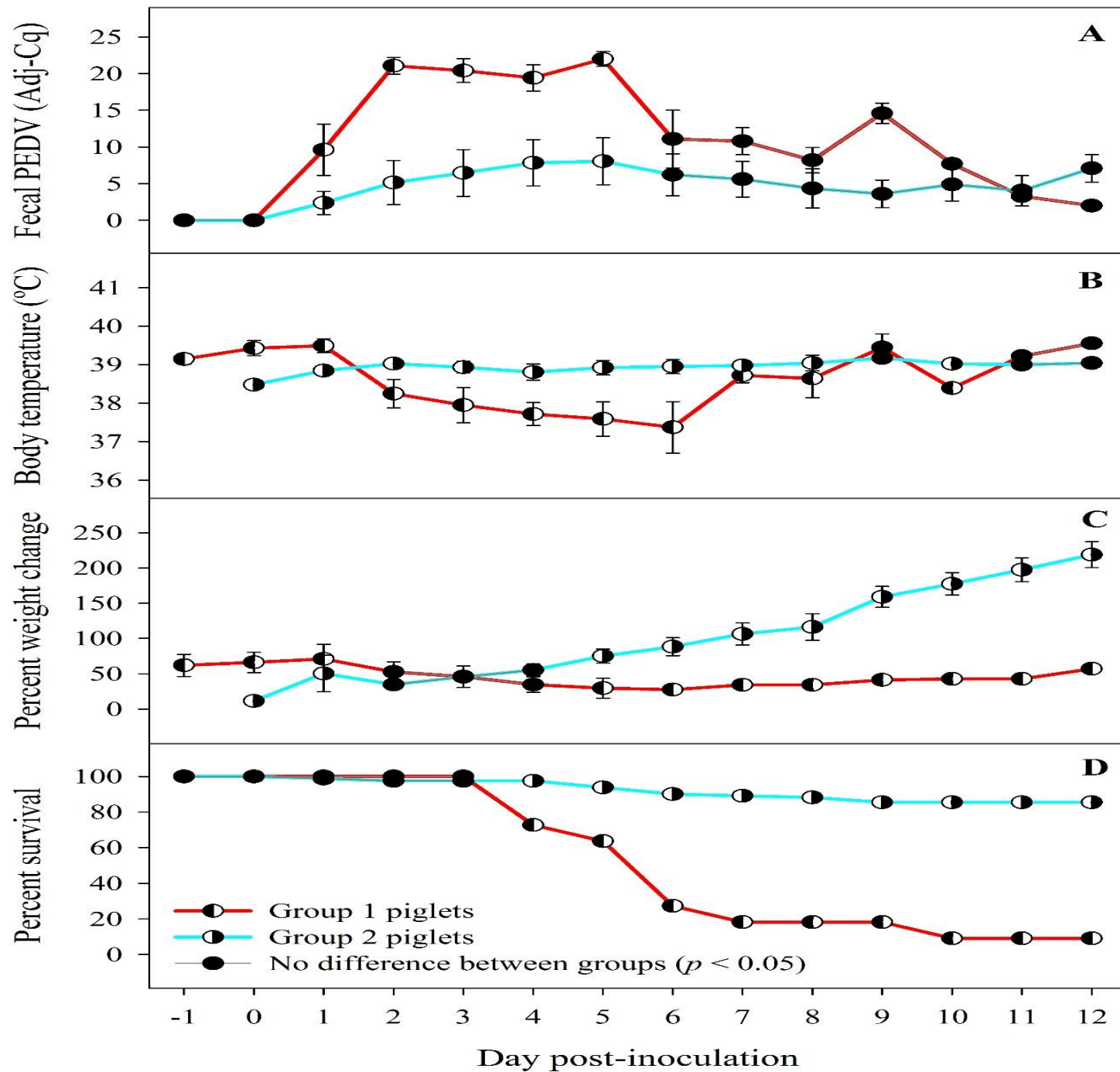
1. Importancia y planteamiento
2. Objetivos del estudio
3. Materiales y Metodos
- 4. Resultados**
5. Conclusiones preliminares





Grupo 1: lechones paridos de hembras PEDV naïve

Grupo 2: lechones paridos de hembras previamente expuestas a PEDV

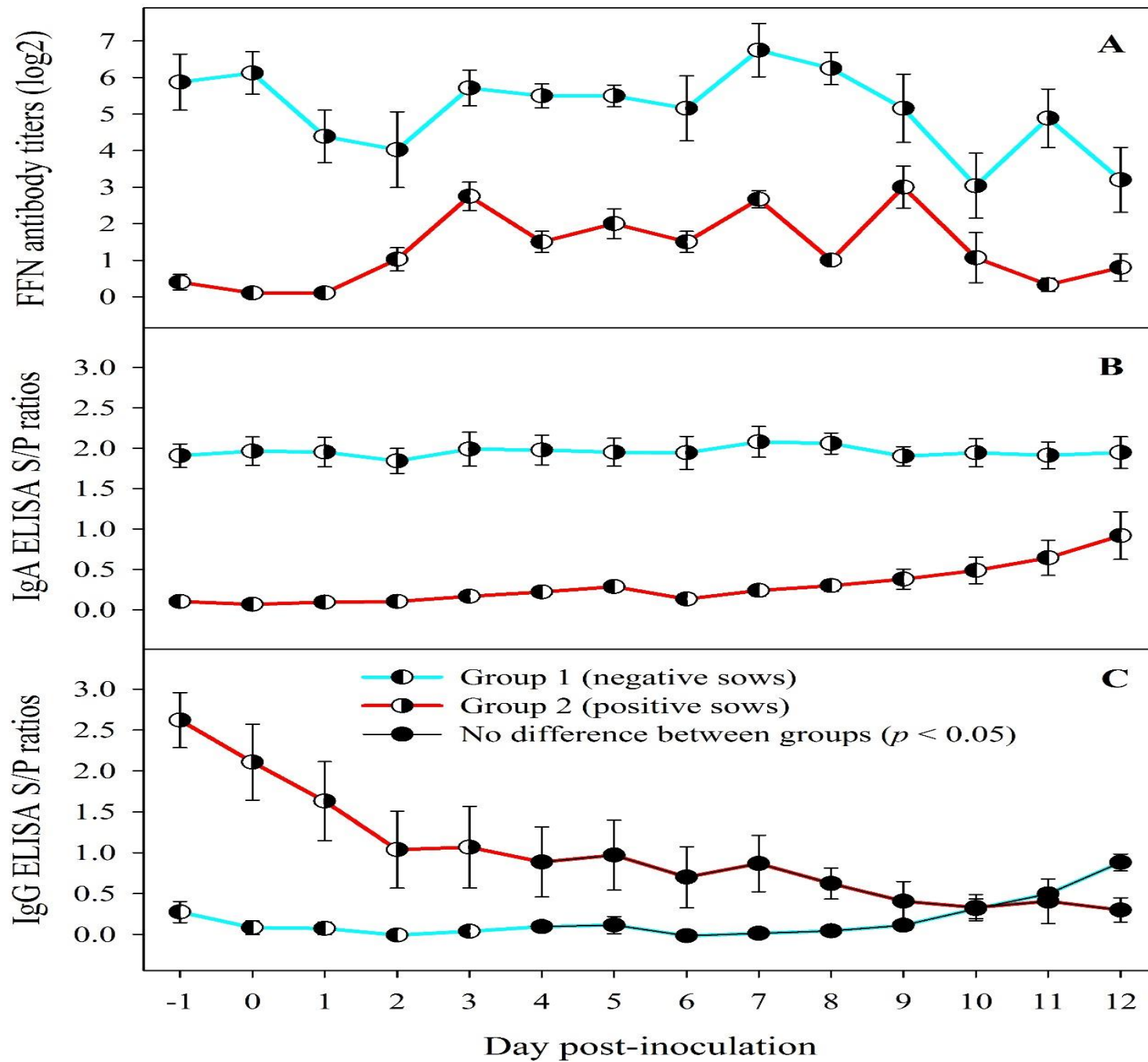


Grupo 2 excretan < virus

Grupo 2 > ganancia peso

Grupo 2 → No hipotermia

Grupo-2 < ratio mortalidad



Niveles Ab en suero lechones

Assay	Group	DPI 0	No. of piglets	DPI 12 or 14 ^a	No. of piglets
FFN antibody titer arithmetic mean (SE)	1	< 1:8 (0)	11	1:16	1
	2	1:39 (1.1)	91	1:13 (1.1)	78
	3	< 1:8 (0)	22	< 1:8 (0)	22
PEDV IgA ELISA least square mean S/P (SE)	1	0.6 (0.1)	11	1.7	1
	2	2.5 (0.06)	91	1.9 (0.07)	78
	3	0.6 (0.01)	22	0.3 (0.009)	22
PEDV IgG ELISA least square mean S/P (SE)	1	0.2 (0.05)	11	2.1	1
	2	5.4 (0.06)	91	2.1 (0.1)	78
	3	0.3 (0.01)	22	0.02 (0.004)	22

^a Observation period ended on DPI 12 for Groups 1 and 3 and DPI 14 for Group 2.

Niveles Ab secreciones mamarias

Group	Sow	FFN		IgA ELISA		IgG ELISA	
		AUC	Maximum FFN titer	AUC	Maximum IgA S/P	AUC	Maximum IgG S/P
1 ^b	1	11.3	1:4	5.2	1.2	1.7	0.9
	2	12.5	1:16	2.7	0.2	1.2	0.6
	3	9.0	1:8	3.1	0.5	4.2	1.2
	4	12.5	1:4	2.9	0.6	1.9	0.7
	6	13.2	1:16	5.8	2.0	1.3	0.9
	$\bar{x}$ (SE)	11.7 (0.7)	1:8 (0.4)	3.9 (0.7)	0.9 (0.3)	2.1 (0.5)	0.9 (0.1)
2	7	51.0	1:256	24.7	2.3	13.3	3.0
	8	76.6	1:1024	23.7	2.1	15.1	3.3
	9	47.3	1:64	21.2	2.6	13.1	1.9
	10	75.1	1:512	24.1	2.2	14.1	2.3
	11	68.6	1:256	33.2	2.7	28.8	3.5
	12	68.5	1:128	26.8	2.4	19.4	2.9
	13	80.0	1:256	32.6	2.7	23.2	4.4
	14	41.0	1:64	26.4	1.7	16.3	3.3

Para llevar a casa...

- Inmunidad maternal (lactogenica) protege a los lechones frente al PEDV (mitigando severidad presentacion clinica).
- Mecanismos de inmunidad lactogenica frente a PEDV probablemente incluya ambos components humoral y celular.
- Previous estudios han demostrado tambien el papel de los anticuerpos circulantes en la proteccion frente a PEDV.

Conclusion General

- **La combinacion de inmunidad sistematica y a nivel mucosa critica en la proteccion vs PEDV**
 - Prevencion viremia durante estadios tempranos post-infeccion.
 - Mejor termoregulacion y ratio de crecimiento
 - Menor excreccion viral y mortalidad,
 - Prevencion infeccion “local” del virus (mucosa intestinal) (Langel et al., 2016)

Faculty, staff, estudiantes ISU-VDL



≈22 Faculty, 100 Technical Staff, & 20 Graduate Students/Residents



**Dr. Luis G. Gimenez-Lirola,
515-294-4751
luisggl@iastate.edu**



Pre-Congreso

Lapisa®

Actualizaciones en el diagnóstico e Inmunidad frente al DEP



Juan Manuel Hernández

- Graduado en UCV-FCV
- Gerente Técnico para Lapisa
- Responsable de las cuentas claves en México



Evaluación de una vacuna inactivada contra el virus de la Diarrea Epidémica Porcina (vDEP)

Hernández J.¹; Gimenez Lirola L.²; Flores A.³; Macías M.³; Massa A.³; Orozco V.¹; Armenta C.¹

¹Laboratorio Lapisa

²Universidad de Iowa State, USA

³Lab de Diagnostico de Lapisa

juan.hernandez@lapisa.com



Agenda

- Introducción
- Objetivo
- Materiales y Métodos
- Resultados
- Conclusiones
- Próximos planes



Introducción

- Primer caso 1971 en Inglaterra.
- Se difunde al resto de Europa afectando cerdos de engorda
- Década de los 90's afecta Europa y Asia.
- 2010 cepas de alta patogenicidad en China.
- Abril 2013 primeros casos en Estados Unidos.
- Julio 2013 primeros casos sospechosos en México
- Hasta la fecha continúan los brotes



Objetivo

El objetivo de este estudio fue demostrar la presencia de anticuerpos en hembras vacunadas, con una vacuna inactivada contra el virus de la *Diarrea Epidémica Porcina* (vDEP), detectando anticuerpos con una ELISA de virus completo validada por La Universidad Estatal de Iowa* (ISU)

*Gimenez-Lirola, Luis G (ISU-VDL) luisggl@iastate.edu





Materiales y Métodos

- Se seleccionaron 2 grupos de Tx de 15 cerdas cada uno
- Seleccionadas según la paridad, identificadas y diferenciadas como Tx (1) Hembras No vacunadas y Tx(2) Hembras vacunadas
 - ✓ Cuatro (4) hembras primerizas negativas (G1)
 - ✓ Siete (7) hembras entre 2 y 4 partos (G2)
 - ✓ Cuatro (4) hembras de más 4 partos (G3)
- Hembras primerizas negativas
- Hembras multíparas previa infección natural (100 días antes)



Materiales y Métodos

- El protocolo de vacunación se realizó en dos dosis administradas a la 6ta y 3era semana preparto para ambos grupos
- Tx (1) se le administró solución salina a razón de 2mL/Intramuscular
- Tx (2) se le administró una vacuna experimental inactivada contra el vDEP desarrollada por laboratorio LAPISA SA de CV a razón de 2 mL/Intramuscular



Materiales y Métodos

- Se tomaron muestras de suero sanguíneo a todas las hembras a la 6ta (1), 3era (2) y 1ra(3) semana pre parto
- Se realizaron muestreos para calostro y/o leche a las 12 (1), 24 (2)y 48 (2) horas posteriores al parto para cada hembra de cada Tx
- Los sueros sanguíneos y el calostro fueron colectados y enviados para su análisis a la (DVL/UIS) para la detección de IgG e IgA mediante una técnica de Elisa, con puntos de corte para IgG en suero S/P=0,8 y para IgA en calostro S/P= 0,6

Resultados

Los resultados fueron expresados en promedios de S/P ratio para **IgG en suero**, identificándolos como (muestreo basal y muestreo final) para ambos Tx

Tx 1: Primerizas (0,107- 0,051); hembras de 2-4 (1,247- 1,187) y hembras de >4 p (2,072-1,124)

Tx 2: Primerizas (0,123- 0,185); hembras de 2-4 p (0,535-1,409) y hembras de >4 p (2,055-2,302)



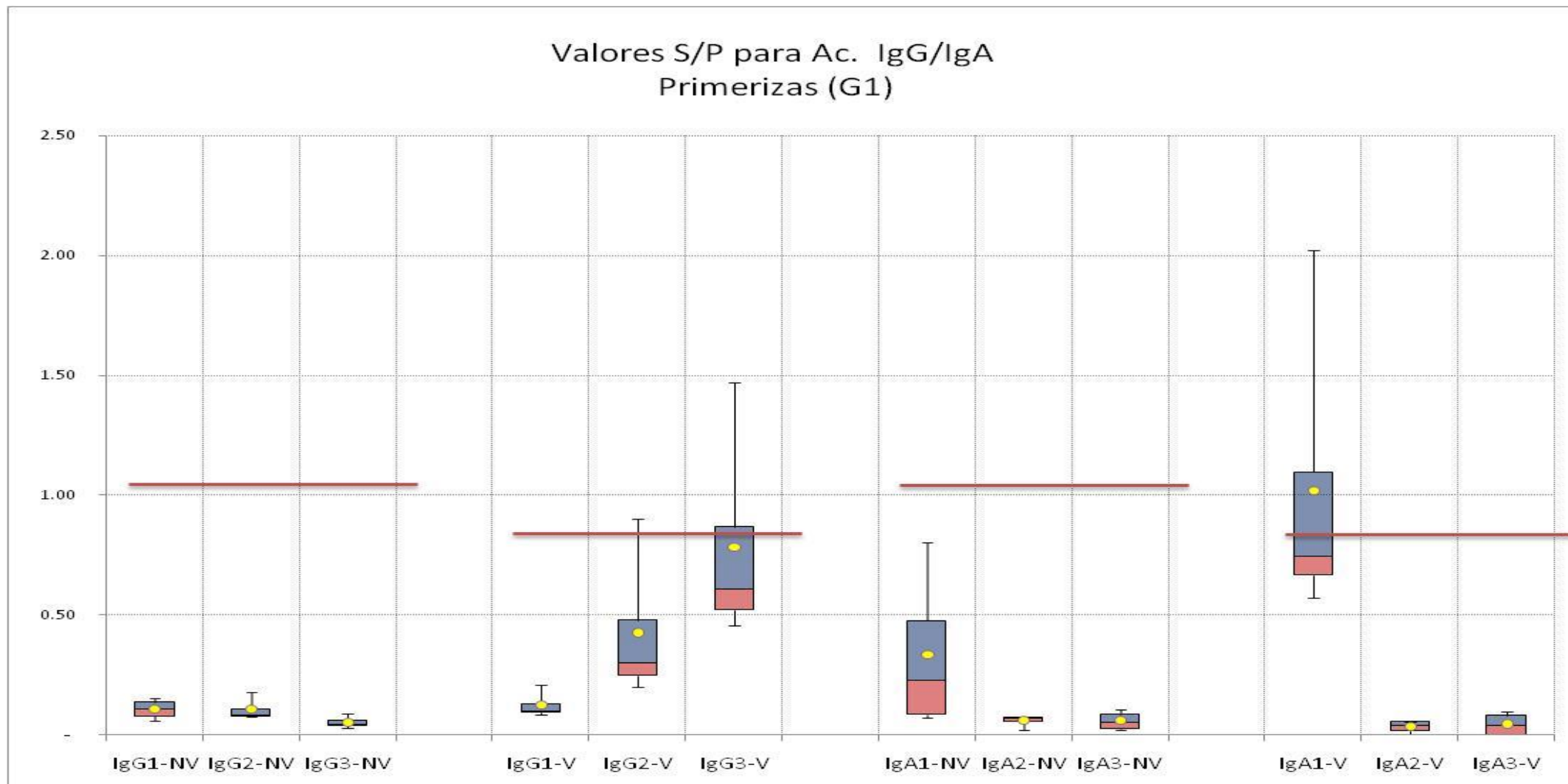
Resultados

Los resultados fueron expresados en promedios de S/P ratio para **IgA en calostro**, identificándolos como (12,24 y 48 horas P/P) para ambos Tx

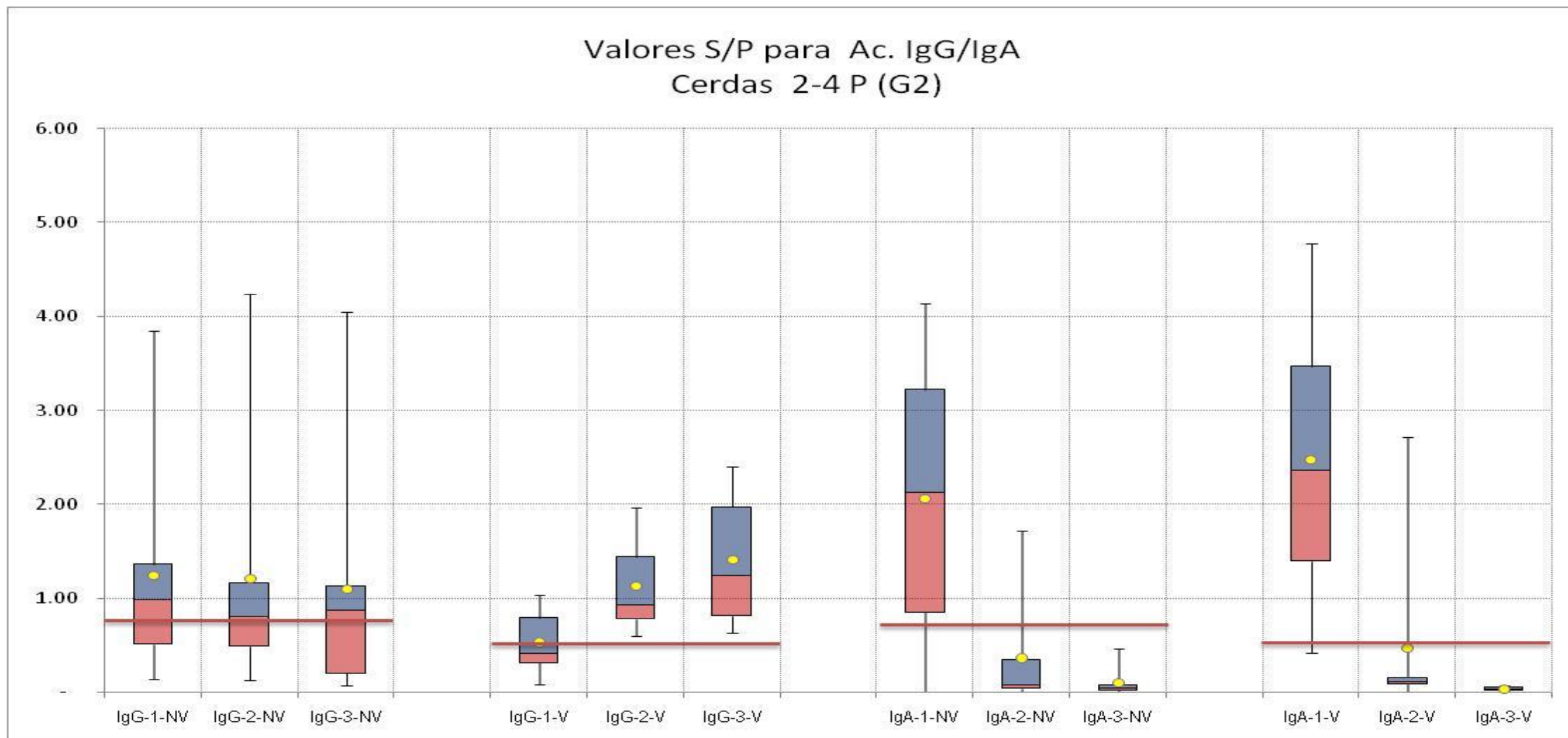
Tx 1: Primerizas (0,333- 0.059); hembras de 2-4 p (2,404 -0.429) y hembras de >4 p (3,175-0,234)

Tx2: Primerizas (1,021- 0,045); hembras de 2-4 p (2,470-0,476) y hembras de >4 p (4,100- 1,895)

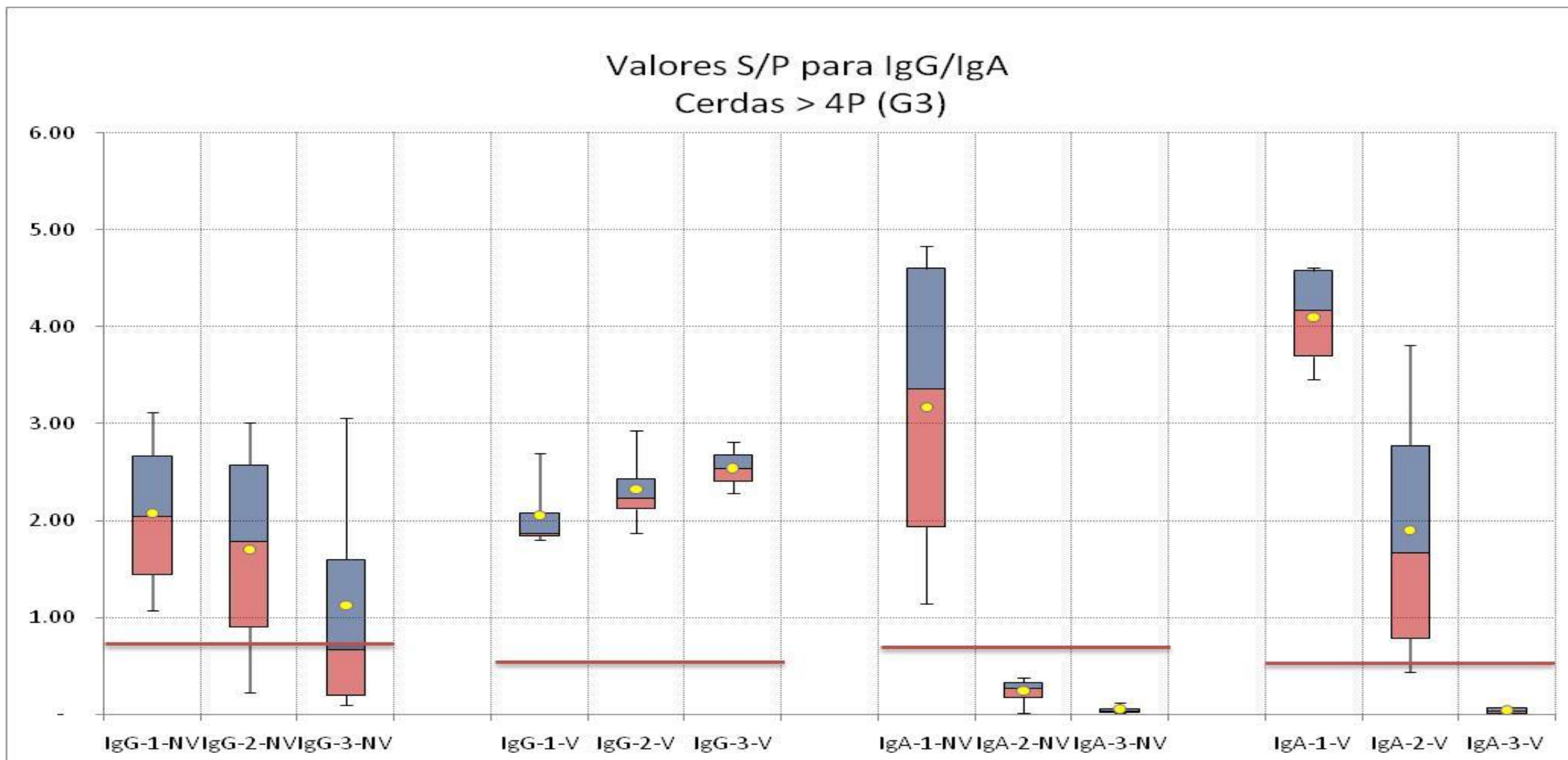
Resultados



Resultados



Resultados



Conclusiones

- La vacuna experimental generó inmunidad tanto para IgG en suero como para IgA en calostro, en hembras vacunadas vs las no vacunadas.
- La respuesta humoral tanto para IgG en sueros e IgA en calostro expresada como S/P fue mayor en hembras vacunadas vs hembras no vacunadas

Próximos Planes



Identificación PCR



Secuenciación



Infección de líneas celulares



Incubación



Multiplicación



Mezclado y envasado





Pre-Congreso

Lapisa®



SESIÓN DE PREGUNTAS

Lapisa®



Lapisa®