

Los Resultados obtenidos en experimentos controlados, demuestran que el plasma porcino atomizado no es infectivo para el virus de la diarrea epidémica porcina (PEDv)

Investigaciones realizadas por la Asociación Norte Americana de Productores de Hemoderivados de Origen Animal Secados por Atomización (NASDBPP)

El virus que causa la diarrea epidémica porcina (porcine epidemic diarrhoea virus, PEDv) es un patógeno difícil de controlar que causa una gran mortalidad en cerdos jóvenes provocando grandes pérdidas económicas en la industria porcina. Este virus se caracteriza por propagarse muy fácil y rápidamente en las explotaciones porcinas. La principal ruta de infección es el contacto directo con cerdos infectados o con las heces procedentes de animales infectados. Hasta el momento no se han identificado de forma clara otros vectores de transmisión o causas de infección. No obstante se ha especulado mucho sobre el posible papel del pienso y algunos ingredientes del mismo en la transmisión de la enfermedad. Ciertas conclusiones, tomadas únicamente en base a datos epidemiológicos, han sido publicadas y aceptadas como hechos probados a pesar de no estar fundamentadas en datos experimentales objetivos que demuestren su validez. Este hecho ha generado una extensa discusión, tanto en congresos y seminarios del sector, como en diversas publicaciones y comunicados de prensa, sobre el papel de los piensos e ingredientes de los mismos en la transmisión de la enfermedad.

Tras las investigaciones realizadas sobre el primer caso de PEDv en Ontario (Canada) se concluyó que el pienso utilizado en la explotación, que contenía plasma porcino atomizado, era la fuente del virus. La agencia canadiense de inspección alimentaria (CFIA) declaró que se había detectado la presencia de virus infectivo en las muestras de plasma porcino pero no en el pienso que contenía este ingrediente. A pesar de estos resultados contradictorios, muchos han concluido que el plasma porcino atomizado contenía virus infectivo y que por tanto, este ingrediente fue el responsable de la transmisión del virus. En base a esta conclusión algunos veterinarios han recomendado no utilizar plasma porcino atomizado, y en algunos casos otros ingredientes de origen porcino, en piensos para cerdos a pesar de todos los beneficios sustentados y demostrados científicamente durante años derivados de la inclusión del plasma porcino atomizado en la alimentación porcina.

Esta publicación pretende por tanto revisar los resultados obtenidos en diferentes experimentos controlados realizados con el objetivo de comprobar la hipótesis de si realmente el plasma porcino atomizado contiene virus PED infectivo.

Hipótesis de trabajo: Si el plasma atomizado contuviera virus PED infectivo y lo transmitiera...

...entonces:	Resultados obtenidos en experimentos controlados:
El virus PED sobrevive al secado por atomización	El proceso de secado por atomización inactiva el virus PED
Las muestras de plasma atomizado investigadas por la CFIA contienen virus PED infeccioso	Las muestras investigadas por la CFIA fueron testadas en un bioensayo por la FDA y por NASDBPP y no resultaron infecciosas
El pienso que contiene plasma atomizado PCR positivo debería infectar a cerdos	Los lechones que recibieron un pienso conteniendo un 5% de plasma atomizado PCR positivo para el virus PED durante 14 días post-destete no resultaron infectados
Los cerdos de zonas libres del virus PED alimentados con pienso conteniendo plasma atomizado PCR positivo procedente de US deberían resultar infectados por el virus	Millones de cerdos en Brasil (entre 2,5 y 3,5 millones de cerdos) del Oeste de Canadá (entre 4,5 y 5 millones de cerdos) fueron alimentados desde el verano pasado con dietas conteniendo plasma porcino atomizado PCR positivo importado de US sin que se haya producido aparición del virus
El virus que contamina el plasma atomizado sobrevive a todo el proceso de distribución hasta que es consumido por cerdos	El virus PED inoculado experimentalmente a plasma atomizado no sobrevive tras: <ul style="list-style-type: none"> - 7 días de almacenamiento a temperatura ambiente (21°C) - 14 días de almacenamiento a 12°C - 21 días de almacenamiento a 4.0°C (refrigeración)
El virus que contamina el plasma atomizado sobrevive a todo el proceso de distribución hasta que es consumido por cerdos	El plasma investigado por la CFIA fue recogido por el cliente 29 días post-secado. El primer caso confirmado del virus PED en Canadá se produjo 71 días post-secado
<p>Conclusión: La posible infectividad del plasma porcino atomizado recogido e investigado por la CFIA fue debida a una contaminación posterior a la obtención y procesado del producto.</p> <p>Los resultados experimentales obtenidos demuestran que el plasma porcino atomizado no transmite ni propaga la diarrea epidémica porcina causada por el virus PED.</p>	

Resumen del documento

Resultado 1: La atomización inactiva el virus

Se inoculó plasma bovino líquido con el virus PED (cepa CV777) hasta una concentración final TCID₅₀ (dosis infecciosa media para tejidos en cultivo) de 10^{4,5} por ml de plasma líquido. Tres alícuotas diferentes del plasma líquido inoculado con PEDv fueron secadas por atomización utilizando un equipo de laboratorio (Büchi 190 Mini Spray Dryer) a una temperatura de entrada de 200°C (392°F). Con el objeto de emular las condiciones reales de producción del plasma atomizado comercial, el

producto fue procesado para alcanzar 70 o 80°C a través de su sustancia. La temperatura normal de salida del producto comercial en las plantas de producción es de 80°C a través de su sustancia, no obstante se obtuvieron y testaron muestras obtenidas a una temperatura inferior (70°C) para determinar si el virus puede permanecer activo a esa temperatura. Tanto las muestras líquidas como las atomizadas fueron analizadas para la infectividad del virus PED en células VERO en monocapa utilizando el procedimiento de micro-titulación con tres pases consecutivos en cultivos celulares nuevos de células VERO. La cepa del virus PED CV777 se utilizó en este estudio debido a que es bien conocido que esta cepa multiplica bien en células VERO y puede alcanzar una concentración de virus elevada para poder determinar y comprobar que la atomización inactiva una cantidad elevada del virus de la PED.

Resultados:

Condiciones de atomización ¹	Infectividad del plasma atomizado en tejido mediante cultivo
Procesamiento a 70°C a través de su sustancia	No detectado ²
Procesamiento a 80°C a través de su sustancia	No detectado

¹Temperatura de entrada al atomizador de 200°C
²La reducción estimada de la infectividad del virus PED en el plasma atomizado fue >10^{5,2} TCID₅₀/g. Se obtuvieron y analizaron tres muestras de plasma atomizado por condición. Cada muestra se sometió a tres pases seriados en células en cultivo.

Estos resultados indican que el virus de la PED es inactivado en condiciones simuladas de atomización comercial a temperaturas incluso inferiores a las que la industria utiliza para la producción comercial. La infectividad mediante el virus PED en las muestras de campo investigadas por la CFIA fueron probablemente como resultado de una contaminación post-procesamiento.

Resultado 2: Las muestras retenidas investigadas del lote sospechoso de la CFIA fueron analizadas mediante bioensayo y no resultaron infectivas

Como el plasma investigado por la CFIA se produjo en Estados Unidos, la CFIA solicitó una investigación a la FDA que por su parte inspeccionó la planta de producción americana, revisó todos los registros de producción incluyendo los del producto investigado por la CFIA y recogió muestras del lote específico de plasma atomizado. Tras revisar todos los registros se comprobó que el lote investigado había sido producido bajo las condiciones normales de producción.

De forma independiente, las muestras recogidas por la FDA y las equivalentes recogidas por NASDBPP fueron enviadas para realizar análisis posteriores incluyendo bioensayos con cerdos. Se utilizaron muestras del lote investigado por la CFIA y muestras de dos lotes de producción elegidos al azar.

Los *resultados* del bioensayo realizado por la FDA revelados recientemente muestran:

	PCR muestra	Bioensayo ¹	
		PCR	Serología
Muestra 1	Positivo	Negativo	Negativo
Muestra 2	Positivo	Negativo	Negativo
Muestra 3	Positivo	Negativo	Negativo

¹En el bioensayo se utilizaron tres muestras del lote investigado por la CFIA, que fueron preparadas e inoculadas a lechones de 17-19 días de edad (5 animales por muestra).

Los resultados del bioensayo muestran que las tres muestras de plasma porcino atomizado resultaron negativas en cuanto a infectividad del virus.

Los *resultados* de los bioensayos realizados por la Universidad de Minnesota a petición de la NASDBPP mostraron:

Identificación de la muestra	PCR inicial para PEDv (Ct)	Indicios clínicos 72 horas post inoculación ¹			PEDv RT-PCR en yeyuno(Ct)			IHC ²
		Cerdo-1	Cerdo-2	Cerdo-3	Cerdo-1	Cerdo-2	Cerdo-3	
Muestra 1 ³	31,28	0	0	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Muestra 2 ³	29,86	0	0	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Muestra 3 ⁴	29,86	0	0	1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Muestra 4 ⁴	30,71	0	0	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Control positivo	18,61	3	3	3	16,53	15,30	15,30	Positivo
Control negativo	-	0	0	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

¹ Índice fecal, 0=heces sólidas bien formadas, sin indicios clínicos; 1=heces blandas poco formadas; 2=heces líquidas; 3=diarrea y deshidratación
² IHC=Inmunohistoquímica
³ Las muestras 1 y 2 procedían del lote de plasma investigado por la CFIA
⁴ Las muestras 3 y 4 procedían de producto comercial seleccionado al azar

Los resultados obtenidos en ambos bioensayos (FDA y NASDBPP) muestran que las muestras procedentes del lote de plasma porcino atomizado investigado por la CFIA no son infectivas, sin embargo la CFIA informó que las muestras de plasma recogidas contenían virus PED infectivo. Es importante tener en cuenta que las muestras recogidas e investigadas por la CFIA fueron tomadas después de que el producto fuese recogido por el cliente y entregado y almacenado en la empresa productora de pienso donde se mantuvo hasta la fabricación del mismo.

Resultado 3: Alimentando lechones con piensos de destetados a 21 días con plasma porcino atomizado PCR positivo para el virus PED durante 14 días no se infectaron con este virus.

En el ensayo se utilizaron cuarenta y ocho lechones destetados a los 21 días de edad distribuidos al azar en dos grupos o tratamientos con 6 corrales por tratamiento (Trt) y 4 lechones por corral. Los dos grupos experimentales fueron:

- **Trt 1**- Lechones que recibieron una dieta control sin plasma porcino atomizado
- **Trt 2**- Lechones que recibieron una dieta en forma de harina conteniendo un 5% de plasma porcino atomizado comercial PCR positivo para PEDv (Plasma porcino Ct=26,2: Pienso completo Ct=30,1)

La composición de ambas dietas fue similar a la estándar comercial para lechones destetados. El plasma porcino atomizado se incluyó al 5% reemplazando concentrado de soja en condiciones iso-lisina. El lote de plasma porcino atomizado utilizado fue el que presentaba menor valor de Ct de

todos los producidos a lo largo del año 2014. Las dietas utilizadas se administraron en forma de harina durante 14 días post-destete, tras ese tiempo todos los animales recibieron una misma dieta control durante 7 días adicionales. La instalación en la que se realizó el experimento, había alojado anteriormente animales negativos para el virus de la PED.

Durante todo el ensayo se controló diariamente la aparición de síntomas clínicos relacionados con enfermedad respiratoria y entérica, así como la aparición y severidad de diarrea en todos los corrales y animales del ensayo. Se realizaron hisopos rectales de cada uno de los animales en los días 0, 3, 7, 14 y 21 para análisis de PEDv por PCR. Los animales fueron sacrificados y necropsiados el día 21 para control macroscópico de los principales órganos y tejidos con el fin de detectar cualquier anomalía. Así mismo, se recogieron muestras de contenido intestinal para análisis de PCR, muestras de tejido intestinal para IHC y muestras de sangre para analizar la presencia de anticuerpos contra el virus de la PED.

Resultados:

Análisis	Lechones grupo Control	Lechones grupo Plasma
PCR en muestra de heces día 0	Negativo	Negativo
PCR en muestra de heces día 3	Negativo	Negativo
PCR en muestra de heces día 7	Negativo	Negativo
PCR en muestra de heces día 14	Negativo	Negativo
PCR en muestra de heces día 21	Negativo	Negativo
PCR en tejido intestinal día 21	Negativo	Negativo
PCR en contenido intestinal día 21	Negativo	Negativo
Inmunohistoquímica día 21	Negativo	Negativo
Anticuerpos séricos contra el virus PED, día 21	Negativo	Negativo

Los resultados demuestran que tras alimentar lechones con una dieta conteniendo un 5% de plasma porcino atomizado comercial PCR positivo para el virus PED no existe ninguna evidencia de infectividad a lo largo de los 21 días post-destete.

Resultado 4: Infectando directamente con virus sobre muestra de plasma bovino atomizado se comprobó que el virus no sobrevive el tiempo que conlleva la cadena de distribución del plasma

En este experimento una cantidad conocida de plasma porcino atomizado fue inoculado con el virus PED hasta una concentración final TICD₅₀ de 10³ por gramo de producto y mantenido a temperatura ambiente (20-22°C) durante una semana. Las infectividad de las muestras iniciales y finales se testaron en células VERO en cultivo tal y como se ha descrito en estudios anteriores. A los 7 días de almacenamiento no se detectó virus PED infectivo en el plasma atomizado previamente inoculado.

Resultados:

Supervivencia del PEDv en Plasma Bovino Atomizado Mantenido a Temperatura Ambiente (20-22°C)	
Día de almacenamiento	Resultado del aislamiento del virus¹
0	Positivo
7	Negativo

¹ El crecimiento del virus en todas las muestras se realizó titulando cinco botellas (75cm²) de células VERO con 3 pases diferentes. En el día 0 la concentración del virus PED en el plasma fue de 1x10³ TCID₅₀ por gramo de producto. Un resultado positivo indica presencia y un resultado negativo ausencia de virus PED viable.

En base a los resultados obtenidos en el estudio anterior, se inició un nuevo experimento diseñado para comprobar la incidencia del tiempo de almacenamiento del plasma atomizado a diferentes temperaturas sobre la supervivencia del virus PED. En este experimento se contaminó externamente con el virus PED plasma bovino atomizado que fue almacenado a 4, 12 y 21°C. El aislamiento del virus, como se indica en experimentos anteriores, se realizó en los días 0, 7, 14 y 21 tras inoculación del virus (en total 12 muestras analizadas).

Resultados:

Supervivencia del PEDv en Plasma Bovino Atomizado Mantenido en Diferentes Condiciones de Almacenamiento¹			
Días de almacenamiento	Temperatura de almacenamiento		
	4°C	12°C	21°C
7	Positivo	Positivo	Negativo
14	Positivo	Negativo	Negativo
21	Negativo	Negativo	Negativo

¹ En cada dilución la titulación del virus se realizó en botellas de 75ml (25cm²) de células VERO con 3 pases diferentes. En el día 0 la concentración del virus en el plasma atomizado fue de 1x10^{2,8} TCID₅₀/g. Un resultado positivo indica la presencia y un resultado negativo la ausencia de virus PED viable.

Conclusiones:

- El virus de la PED sobrevive en plasma atomizado hasta 14 días cuando se almacena a 4°C, pero no sobrevive cuando el tiempo de almacenamiento a 4°C es de 21 días
- A 12°C el virus de la PED sobrevive en plasma atomizado hasta 7 días, pero no sobrevive cuando se almacena 14 o 21 días a esta temperatura
- A 21°C (temperatura ambiente) el virus de la PED no sobrevive en plasma atomizado durante 7, 14 y 21 días
- La supervivencia del virus de la PED cuando se inocula en plasma atomizado es dependiente de la temperatura y el tiempo de almacenamiento. El tiempo de supervivencia del virus es mayor a temperaturas inferiores de almacenamiento.

Los productos secados por atomización tienen una humedad inferior al 8% y una actividad biológica del agua inferior a 0.6. Los resultados indicados anteriormente sobre la estabilidad del virus PED en plasma atomizado, demuestran que incluso cuando el producto se almacena a 4°C el virus desaparece en 21 días.

El lote de plasma porcino atomizado investigado por la CFIA fue secado por atomización el 12 de noviembre de 2013. El cliente recogió el producto el 11 de diciembre de 2013, es decir, 29 días después de su atomización. El primer caso de diarrea epidémica porcina (PED) en Ontario se dio a

conocer el 22 de enero de 2014, lo que supone 71 días después del secado por atomización del plasma porcino.

Por lo tanto, resulta muy poco probable que el plasma porcino se hubiese contaminado en el almacén de la planta de producción, dado que el virus no hubiese podido sobrevivir en un ambiente seco más de 21 días, incluso a las condiciones ambientales invernales que tenía el almacén. Las temperaturas ambientales de la planta de producción y almacén de Iowa durante los últimos días de enero e inicio de febrero fluctuaron entre $-2,8^{\circ}\text{C}$ y $+2,8^{\circ}\text{C}$ (Figura 1). Durante ese mismo tiempo, la temperatura del plasma atomizado producido y almacenado en big-bags de 1 tonelada se mantuvo por encima de 15°C durante al menos 7 días tras su secado.

Cuando se evalúa toda esta información resulta lógico pensar que si el lote de plasma porcino investigado por la CFIA presentaba infectividad, la contaminación con el virus PED se produjo externamente en algún momento entre finales de diciembre del 2013 e inicios de enero del 2014.

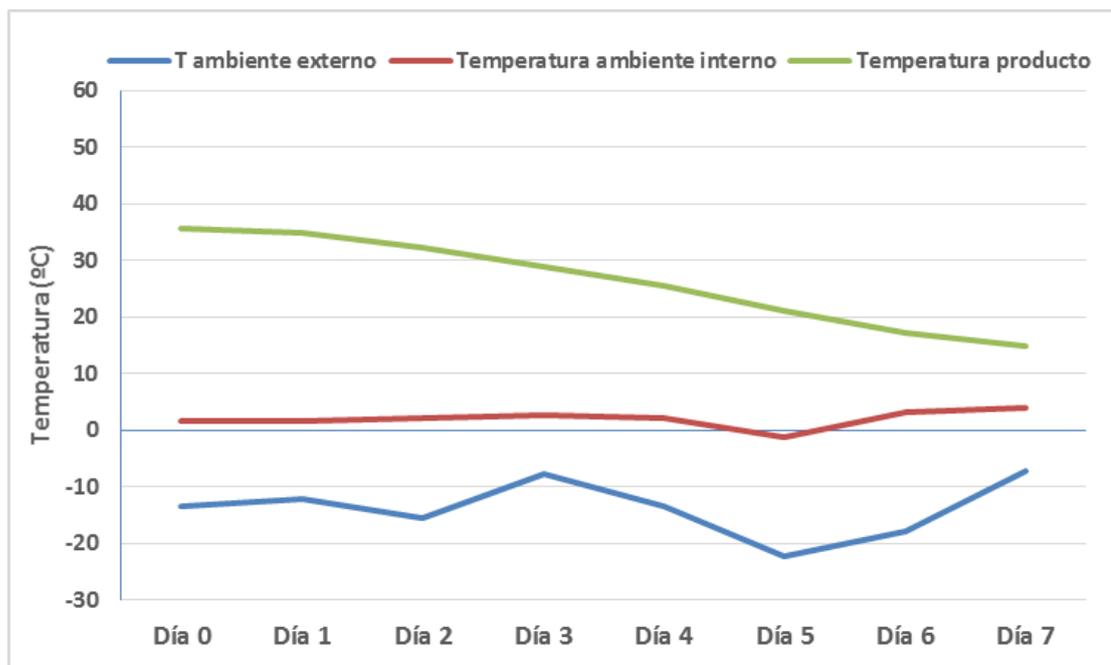


Figura 1. Evolución de la temperatura de un big-bag de una tonelada de plasma porcino atomizado almacenado en un almacén a condiciones ambientales en Iowa durante Febrero de 2014.

Resultado 5: Regiones como Brasil y el Oeste de Canada se han mantenido libres del virus PED a pesar de haber alimentado cerdos con plasma porcino atomizado PCR positivo para el virus PED importado de Estados Unidos.

APC Inc posee una planta de producción en el sur de Brasil dedicada exclusivamente al tratamiento de sangre porcina. Entre finales de diciembre de 2013 e inicios de enero del 2014 se tomaron varios lotes de sangre porcina atomizada para analizar la presencia de material genético del virus PED mediante PCR. Todas las muestras resultaron negativas, lo que confirma que el virus no está presente en Brasil tal y como ya habían comunicado los veterinarios de ese país. Durante el año 2013

se exportaron desde US a Brasil cantidades suficientes de plasma porcino atomizado para alimentar entre 2,5 y 3,5 millones de cerdos. A pesar de la gran cantidad de plasma porcino atomizado procedente de US (PCR positivo para el PEDv) que se utilizó como ingrediente en piensos de cerdo en Brasil, nunca se ha diagnosticado la diarrea epidémica porcina causada por PEDv en ese país.

Resultados:

Sangre porcina atomizada procedente de Brasil¹	
Fecha fabricación	Resultado PCR para PEDv
29 diciembre, 2013	Negativo
31 diciembre, 2013	Negativo
3 enero, 2014	Negativo
7 enero, 2014	Negativo
8 enero, 2014	Negativo
¹ Se estima que cada lote de sangre porcina atomizada se produjo a partir de la sangre de 100.000 cerdos brasileños	

Entre abril y diciembre de 2013 suficiente cantidad de plasma porcino atomizado para alimentar entre 4,5 y 5 millones de cerdo fue exportado desde US al oeste de Canadá. El plasma procedente de plantas norteamericanas era PCR positivo para PEDv. Sin embargo, durante ese periodo no se detectaron casos de diarrea epidémica porcina en el oeste de Canadá. De hecho la cabaña porcina del oeste de Canadá permaneció PEDv negativa durante marzo de 2014 con la excepción de un caso detectado en febrero del 2014 no relacionado con el consumo de pienso. A finales de abril se localizaron 3 muestras ambientales que fueron positivas a la presencia del virus en dos zonas de alta densidad de tránsito en la región de Manitoba. Según el director general de la Oficina Veterinaria Canadiense los casos de contaminación ambiental en Manitoba no se han correlacionado con granjas de las zonas.

Plasma porcino atomizado procedente del Oeste de Canadá¹	
Fecha de fabricación	Resultado PCR para PEDv
Agosto, 2013	Negativo
Septiembre, 2013	Negativo
Octubre, 2013	Negativo
Noviembre, 2013	Negativo
Diciembre, 2013	Negativo
Enero, 2014	Negativo
Febrero, 2014	Negativo
Marzo, 2014	Negativo
¹ El plasma porcino atomizado producido a partir de la sangre de cerdos sacrificados en mataderos del Oeste de Canadá fueron PCR negativos para PEDv a pesar de que los animales fueron alimentados con plasma porcino atomizado procedente de US desde el inicio del verano de 2013	

En síntesis, tanto los resultados obtenidos en experimentos controlados, como el hecho de que entre 2,5 y 3,5 millones de cerdos en Brasil y de 4,5 a 5,0 millones en el Oeste de Canadá hayan sido alimentados con piensos conteniendo plasma porcino atomizado PCR positivo para PEDv procedente de US, apoyan la conclusión de que el plasma porcino atomizado ni contiene virus PED infectivo ni transmite la enfermedad. No obstante, todos estos datos no excluyen la posibilidad de que el plasma porcino atomizado, o cualquier pienso que lo contenga, puedan resultar contaminado externamente con virus infectivo. De hecho, todos estos datos apoyan la hipótesis de que el plasma porcino

atomizado analizado por la CFIA fue contaminado con virus infeccioso en algún punto de la cadena de distribución del producto tras su comercialización y cercano al momento de administración a los animales.

Todos los datos indicados anteriormente, así como los publicados en el pasado, demuestran que la técnica de PCR únicamente indica presencia del genoma del virus en el plasma porcino atomizado, pero no distingue entre formas infecciosas y no infecciosas del virus. Un resultado PCR positivo por sí solo no indica que el material analizado contenga formas infecciosas del virus. Resulta absolutamente necesario realizar experimentos controlados, como los recogidos en este documento, para realmente comprobar si un ingrediente como el plasma porcino atomizado es seguro en términos de PEDv.

Conclusión

- La atomización inactiva el virus PED incluso a temperaturas inferiores a las que se utilizan en plantas de producción industrial de plasma porcino atomizado
- Cuando plasma en polvo es re-contaminado con virus, el virus PED pierde infectividad a los 7 días si el producto es almacenado a temperatura ambiente y en 21 días si se almacena a temperatura de refrigeración (4°C)
- Cerdos alimentados con plasma porcino atomizado PCR positivo para PED mediante bioensayo o mediante un estudio más amplio con cerdos al destete no se infectaron con el virus PED
- De igual forma, en regiones sin casos de PED, millones de cerdos fueron alimentados con plasma porcino atomizado PCR positivo para PED importado desde los Estados Unidos de América desde Abril del 2013 y esas regiones continúan siendo libres de virus PED.

Estos resultados nuevamente evidencian las investigaciones anteriores que demostraban que el plasma porcino atomizado es un ingrediente seguro y vital en el pienso de cerdos para una industria porcina global.

El plasma animal atomizado es una mezcla diversa y compleja de proteínas que proporcionan la base nutritiva que respalda toda una serie de efectos biológicos beneficiosos sobre la habilidad de los lechones para enfrentarse y superar el estrés asociado al periodo post-destete. Los beneficios asociados a la nutrición que el plasma porcino atomizado proporciona una herramienta clave en dietas post-destete, está mundialmente reconocida en la industria porcina debido a la extensa bibliografía existente sobre sus efectos beneficiosos en el crecimiento, consumo de pienso, morbilidad y supervivencia en el periodo de destete. De hecho, numerosos estudios demuestran que una alimentación suplementada con plasma animal atomizado beneficia, ayuda y mantiene a cerdos infectados con PCV2-SD, PRRS y otras enfermedades respiratorias y gastrointestinales, incluyendo TGE. Por lo tanto, en el caso de una infección con PEDv, cabría esperar que la suplementación de la dieta con plasma animal atomizado tuviese un potencial efecto beneficioso sobre la capacidad de los animales para superar la enfermedad.