



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL

Estudio de la correlación de fumonisinas y el virus del PRRS en cerdos

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS
P R E S E N T A:
Carolina Moreno Ramos

TUTOR: Dra. Susana E. Mendoza Elvira
Dr. Ernesto Moreno Martínez
COMITÉ TUTORAL: Dra. Isabelle Oswald



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL

Estudio de la correlación de fumonisinas y el virus del PRRS en cerdos

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS
P R E S E N T A:
Carolina Moreno Ramos

TUTOR: Dra. Susana E. Mendoza Elvira
Dr. Ernesto Moreno Martínez
COMITÉ TUTORAL: Dra. Isabelle Oswald
Profesor invitado: Dr. Abel Ciprián Carrasco
Dr. Jorge Tortora Pérez

JURADO

Presidente: DR.. HUMBERTO RAMÍREZ
Secretario: DRA.. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA
Vocal: DRA. ISABEL OSWALD
Vocal: DRA. IRMA TEJADA DE HERNANDÉZ
Vocal: DR. JOSÉ IVAN SÁNCHEZ BETANCOURT

DEDICATORIA

A DIOS

Por ayudarme y permitirme llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis metas en mi vida.

A MIS PADRES

Por su apoyo incondicional que siempre me han brindado, por todo su amor que me han dado y por su ejemplo de perseverancia, fortaleza y dedicación. Los amo.

A MI HERMANA

Diana como muestra de mi cariño y por estar siempre conmigo.

A MIS SOBRINOS

Emiliano y Fátima, por ser tan especiales y dar alegría. Los quiero

A G R A D E C I M I E N T O S

A la FES-Cuautitlán – UNAM

Por darme la oportunidad de aprender y ser parte de ella. Es un orgullo formar parte de esta institución.

Al comité tutorial

Dr. Ernesto Moreno Martínez, Dra. Susana Mendoza Elvira, Dra. Isabelle Oswald, Dr. Abel Ciprián, Dr. Jorge Tortora, gracias por sus conocimientos transmitidos, sus consejos y por todo su apoyo para finalizar este proyecto.

A los miembros del jurado

Dr. Humberto Ramírez, Dra. Susana Mendoza Elvira, Dra. Isabelle Oswald, Dra. Irma Tejada, Dr. José Iván Sánchez, por la revisión y correcciones realizadas en la elaboración de este proyecto, fueron muy valiosas.

CENASA

Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA); ubicada en Tecamac: Estado de México y a todos los que laboran ahí, por permitirme utilizar sus instalaciones para realizar el experimento de tesis.

AVIMEX

Por la donación de los lechones para la realización del experimento.

Al INRA – Toulouse, Francia

Por la oportunidad de trabajar con ustedes y compartir sus conocimientos, gracias por su amistad durante mi estancia en el laboratorio.

MC. Rosalía Meléndez

Por sus aportaciones en la elaboración del análisis estadístico, gracias por su amistad

Dr. Abel Ciprián y Dr. Jorge Tortora

Por sus evaluaciones realizadas en cada seminario durante el doctorado, por sus consejos, apoyo, amistad, tiempo y paciencia que siempre me brindaron. Mil gracias.

Dra. Susana Mendoza Elvira

Por confiar y creer en mí, por permitirme trabajar contigo, por tu apoyo, amistad. Gracias por ser mi amiga.

Dr. Ernesto Moreno

Por su confianza, observaciones y consejos para realizar este proyecto.

A todos los del laboratorio de virología (David Trujillo, Gabino) que de una u otra manera me ayudaron.

A Patricia Pérez, Ismael Lorenzo, Perla Rodríguez, Horacio Lara, Francisco Quezada, Enrique Salas, Dra. Sara Valdés, Juan Carlos Del Río García, Ángeles Ruíz, Ricardo López, gracias por su apoyo incondicional y sobre todo por su amistad.

Gracias a todos los que estuvieron conmigo en este tiempo.

Este trabajo se realizo en el laboratorio de virología de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán bajo la dirección de la Dra. Susana E. Mendoza Elvira y en la Unidad de Investigación en Granos y Semillas (UNIGRAS) bajo la dirección del Dr. Ernesto Moreno Martínez.

Este trabajo fue apoyado por la Catedra CON IN-39 y PAPIIT IN 209008, así como una beca para estudiar el doctorado por parte de CONACYT con número de registro 191969

RESUMEN

Dentro del grupo de micotoxinas, se encuentra la fumonisina B₁ (FB₁) producida por los hongos del género *Fusarium*. Por otro lado en las explotaciones porcinas la presencia del virus del síndrome reproductivo respiratorio porcino (vPRRS) causa pérdidas económicas importantes en la industria porcina mexicana. En este experimento se evaluó el efecto de la presencia de FB₁ y el vPRRS en cinco grupos de 5 cerdos; Grupo A: Control negativo; Grupo B: Inoculados con 12 ppm de FB₁ a partir del día 0; Grupo C: Inoculados con el vPRRS el día 8; Grupo D: Inoculados con vPRRS y con 12 ppm de FB₁ a partir del día 0; Grupo E: Inoculados con 12ppm de FB₁ a partir del día 0 e inoculados con vPRRS el día 8. Se evaluaron la Ganancia Diaria de Peso (GDP); cambios patológicos e histopatológicos en pulmón, hígado y riñón, mediante la prueba de RT-PCR se determinó la ausencia o presencia del vPRRS en los grupos tratados. Se observó un efecto pendiente negativa en ganancia de peso en el grupo D y E (-0.103 y -0.37 respectivamente) indicando pérdida de peso, con la presencia del vPRRS y la FB₁. En el porcentaje de lesiones macroscópicas pulmonares se encontró que el grupo B, presentó 1.4% consolidación rojiza, el grupo C 9.42% consolidación difusa el grupo D 5.41% consolidación difusa y 1.63% consolidación rojiza, y el grupo E, 5.91% , consolidación difusa y 3.50% consolidación rojiza. Los hallazgos histopatológicos, en pulmón se encontraron: septos alveolares engrosados con infiltrado mononuclear, con cambios vasculares y alvéolos limpios característicos de una neumonía intersticial. En el grupo D los patógenos que fueron administrados el día 0, provocaron neumonía intersticial difusa moderada. En el grupo E, se observaron lesiones pulmonares intersticiales severas. En hígado se observó poliploidía y células binucleadas, sugestivas de un cuadro de micotoxicosis en los grupos B, D y E. Otro órgano que presentó alteraciones fue el riñón en los grupos B, D, E y solo en un lechón en el grupo C, se encontró con infiltrado de células mononucleares, en asociación con estas partes dañadas de las nefronas, se observó glomérulo nefritis proliferativa, así como glomérulos reducidos de tamaño, retraídos y atrofiados. Por otra parte los resultados obtenidos para comprobar la presencia del vPRRS mediante la técnica de RT-PCR fueron negativos los grupos A y grupo B. Para los grupos C, D y E, que fueron inoculados con vPRRS de acuerdo al diseño experimental, resultaron positivos. Con base en los resultados obtenidos en este estudio se pudo observar que el vPRRS y la FB₁ tienen un efecto aditivo en el cerdo, también se observó en el grupo E, el mayor daño pulmonar.

ABSTRACT

Fumonisin B₁ (FB₁) belongs to a group of mycotoxins produced by fungi of the genus *Fusarium*. In swine farms, the presence of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) causes significant economic losses in the Mexican swine industry. In this experiment, the effect of the presence of FB₁ and PRRSV was evaluated in five groups of 5 pigs; Group A: Negative control; Group B: Inoculated with 12 ppm of FB₁ starting from day 0; Group C: Inoculated with PRRSV on day 8; Group D: Inoculated with PRRSV and 12 ppm of FB₁ starting from day 0 and Group E: Inoculated with 12 ppm of FB₁ starting from day 0 and inoculated with PRRSV on day 8. Daily Weight Gain (DWG) and pathologic and histopathologic changes in the lung, liver and kidney were evaluated, and the presence or absence of PRRSV was determined by the RT-PCR test in the groups treated. A negative slope effect was observed in weight gain in groups D and E (-0.103 and -0.37, respectively), indicating weight loss, with the presence of PRRSV and FB₁. Regarding the percentage of macroscopic lung lesions, it was found that group B had reddish consolidation, 1.4%; group C showed diffuse consolidation, 9.42%; group D had diffuse consolidation, 5.41% and reddish consolidation, 1.63%; and group E had diffuse consolidation, 5.91% and reddish consolidation, 3.50%. The histopathologic findings in the lungs were: thickened alveolar septa with mononuclear infiltrate, with vascular changes and clean alveoli characteristic of interstitial pneumonia. In group D, in which the pathogens were administered on day 0, moderate diffuse interstitial pneumonia was observed. Group E showed severe interstitial lung lesion. Polyploidy and binuclear cells were observed in the liver, suggesting mycotoxicosis in groups B, D, and E. Another organ that showed alterations was the kidney in groups B, D, and E, and a mononuclear cell infiltrate was found in only one piglet in group C. Proliferative glomerulonephritis was observed in association with these damaged parts of nephrons, as well as size-reduced, shrunk and atrophied glomeruli. On the other hand, the results obtained to prove the presence of PRRSV by the RT-PCR technique were negative for group A and group B, and were positive for groups C, D, and E, which were inoculated with PRRSV according to the experimental design. Based on the results obtained in this study, it could be observed that PRRSV and FB₁ have an additive effect in swine. It was also observed that group E had a greater lung damage histologically.

Keywords: Fumonisin B₁ | PRRS Virus | Pneumonia | Edema

INDICE

1. GENERALIDADES	
1.1 Hongos	1
1.1.1 Contaminación por hongos	3
1.1.2 Micotoxinas	5
1.1.3 Distribución geográfica de Micotoxinas	8
1.2 <i>Fusarium spp.</i> y Fumonisinias	
1.2.1 Fusarium	9
1.2.2 Fumonisinias	10
1.2.3 Estructura química	11
1.2.4 Mecanismo de acción de la Fumonisina B ₁	12
1.2.5 Patogenia de fumonisinias en cerdo	16
1.2.6 Signos clínicos y lesiones	17
1.2.7 Diagnostico	19
1.2.8 Análisis de laboratorio	19
1.3 Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS)	19
1.3.1 Etiología	22
1.3.2 Patogenia	22
1.3.3 Características del virus	23
1.3.4 Infecciones secundarias	24
1.3.5 Signos clínicos	25
1.3.6 Contagio	26
1.3.7 Diagnostico	27
1.3.8 Tratamiento	29
1.4 JUSTIFICACIÓN	31
1.5 HIPÓTESIS	32
2. OBJETIVO GENERAL	33
2.1 Objetivos particulares	33

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1	Evaluación de la concentración de Aflatoxinas y Fumonisina B ₁ en el alimento	34
3.1.1	Determinación de Aflatoxinas	34
3.1.2	Determinación de Fumonisina B ₁	34
3.2	Cultivo y cosecha de células	34
3.3	Conteo de células	35
3.4	Título del virus del PRRS	36
3.5	Fumonisina B1	36
3.6	Lechones	36
3.7	Diseño Experimental	37
3.8	Evaluación clínica	38
3.9	Registro de temperatura	38
3.10	Evaluación de ganancia de peso	39
3.11	Evaluación bioquímica	39
3.12	Evaluación patológica	39
3.13	Evaluación histopatología	39
3.14	Prueba de RT-PCR	40
3.15	Análisis Estadístico	40

4.0 RESULTADOS

4.1	Evaluación de la concentración de Aflatoxinas y Fumonisina B ₁ en el Alimento	41
4.2	Preparación de inóculos	41
4.3	Registro de temperatura	41
4.4	Evaluación clínica	42
4.5	Evaluación de peso corporal	43
4.6	Evaluación bioquímica	45
4.7	Evaluación patológica	49
4.8	Evaluación histopatológica	52
4.9	Prueba de RT-PCR	57

5.0 DISCUSIÓN 58

6.0 CONCLUSIONES 67

7.0 REFERENCIAS CITADAS 70

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fumonisina B ₁	12
Figura 2. Diferencia entre fumonisina B ₁ y Esfingosina.....	13
Figura 3. Sitios de bloqueo de la fumonisina en la síntesis de esfingolípidos.....	14
Figura 4. Pulmón de lechón intoxicado con FB ₁ mostrando consolidación rojiza.....	51
Figura 5. Pulmón de lechón inoculado con vPPRS mostrando consolidación purpura difusa.....	52
Figura 6. Pulmón de lechón correspondiente al grupo A, sin cambios patológicos aparentes, 40X.....	54
Figura 7. Pulmón de lechón correspondiente al grupo B, intoxicados con FB ₁ 12ppm vía oral por 18 días, 40X.....	54
Figura 8. Pulmón de lechón correspondiente al grupo C, inoculado con vPPRS, 8 días después de iniciado el experimento.....	55
Figura 9. Pulmón de lechón correspondiente al grupo D, Inoculado con vPPRS e intoxicados con FB ₁ 12ppm vía oral por 18 días 20X.....	55
Figura 10. Pulmón de lechón correspondiente al grupo E, intoxicados con FB ₁ 12ppm vía oral por 18 días, e inoculado con vPPRS 8 días después de iniciado el experimento 40X.....	56

INDICE DE GRAFICAS

Grafica 1. Promedio de la temperatura corporal en los cerdos de los grupos Tratados.....	42
Grafica 2. Comportamiento del peso corporal en los grupos.....	44
Grafica 3. Análisis de AST en suero de cerdos con diferentes tratamientos...46	
Grafica 4. Análisis de ALT en suero de cerdos con diferentes tratamientos...47	
Grafica 5. Análisis de GGT en suero de cerdos con diferentes tratamientos...48	
Grafica 6. Análisis de Colesterol en suero de cerdos con diferentes tratamientos.....	49
Grafica 7. Porcentaje de lesiones pulmonares	50
Grafica 8. Porcentaje de diferentes tipos de lesiones pulmonares.....	51

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Diseño y composición de los grupos experimentales.....	37
Cuadro 2. Promedio de peso corporal (media +/- desviación estándar) registrados durante el experimento.....	43
Cuadro 3. Ecuaciones de predicción de ganancia de peso, ajuste a comportamiento lineal y ganancia de peso de lechones tratados con FB_1 y vPPRS.....	45
Cuadro 4. Estudio Histopatológico.....	53

1.0 GENERALIDADES

1.1 Hongos

La alimentación es un factor de suma importancia para la producción animal, (80% de los costos), sin embargo por medio de un buen manejo, podemos obtener una mejor eficiencia y calidad en la producción. Hay, existen una serie de factores que modifican la calidad tanto nutritiva como organoléptica de los alimentos provocando deficiencias y pérdidas en la producción animal, entre estos factores podemos mencionar:

- Contaminación por insectos (Gorgojo del Frijol; Gorgojos del Maíz).
- Contaminación por microorganismos patógenos.
- Contaminación por sustancias químicas.
- Contaminación por metabolitos producidos por hongos.

En los últimos años, la contaminación de alimentos agrícolas y pecuarios con metabolitos secundarios (micotoxinas) producidos por hongos ha suscitado gran interés a nivel mundial, debido a sus efectos perjudiciales sobre la salud y la economía. Su producción es inevitable y depende de diferentes factores ambientales en el campo y/o durante el almacenamiento. El descubrimiento de nuevas micotoxinas y la presencia conjunta de ellas en el alimento se observan con frecuencia, lamentablemente la información sobre toxicidad, estabilidad y grado de incidencia de muchas de las micotoxinas que se han identificado es escasa. (Moreno, 1996; FAO/OMS/PMA, 1999).

Árpád and Radomir, (1999) mencionan, que se han aislado e identificado cerca de 100,000 especies de hongos, de los cuales 400 pueden ser considerados potencialmente tóxicos y solo el 5% son hongos conocidos productores de toxinas causando problemas de micotoxicosis, en una o más regiones del mundo. Los hongos pueden invadir a los granos desde el campo ó en el almacén provocando

una disminución en la calidad nutritiva y organoléptica en los alimentos invadidos. Entre los cambios observados en los alimentos podemos mencionar:

- a) Modificación de las características organolépticas del alimento: mal olor, mal sabor, mal aspecto con decoloración, apelmazamiento y disminución de la fluidez. Es evidente que todo esto conduce a una significativa disminución de la calidad del pienso (Gimeno, 1984; Jelinek, *et al.* 1989).
- b) Deterioro y reducción de las características nutritivas del alimento: en las fases de proliferación y crecimiento fúngico hay un consumo de nutrientes básicos por parte de los mohos y levaduras produciéndose una degradación de proteínas, grasas e hidratos de carbono así como también alteraciones en los valores vitamínicos. Todo esto conduce a una disminución del valor proteico, y energético de los alimentos (Christensen and Sauer, 1982; Gimeno, 1984; Jelinek, *et al.* 1989).
- c) Segregación masiva de enzimas que provoca reacciones de lisis fuertemente exotérmicas.

Es evidente que este calor perdido disminuye el valor energético original del alimento afectado. Por otro lado se pueden ocasionar explosiones e incendios por la acumulación en los silos del metano y otros gases inflamables que se desprenden en los procesos metabólicos de los hongos durante el ataque a las materias primas y piensos compuestos (Christensen and Sauer, 1982; Gimeno, 1984; Jelinek, *et al.* 1989).

- d) Reducción de peso en el producto almacenado (mermas) (Gimeno, 1984)
- e) Contaminación de las materias primas y piensos compuestos por metabolitos secundarios tóxicos llamados micotoxinas y producidos por algunas especies y estirpes fúngicas con capacidad genética para producirlas dentro de ciertas condiciones físicas, químicas y biológicas (Hamilton, 1976; Moreno y Gutiérrez, 1991; Placinta, *et al.* 1999).

En los animales provoca:

- a) Rechazo del alimento por parte de los animales debido a la alteración de las características organolépticas. (Placinta, *et al.* 1999).
- b) Disminución del índice de transformación en el animal por una deficiencia nutritiva y energética. (Placinta, *et al.* 1999).
- c) Implantación de micosis en los animales con la producción de enfermedades y problemas tales como (según diferentes géneros de hongos): Aspergillosis pulmonar (aves), por *Aspergillus fumigatus*, *A.flavus*, *A.nidulans*, *A.níger*, entre otras enfermedades o trastornos (Gimeno, A. 1991)
- d) Micotoxicosis. Ciertos hongos poseen la capacidad genética de sintetizar metabolitos tóxicos, causantes de diversos trastornos en el desarrollo y en la producción animal, además de ser un riesgo potencial para la salud humana al quedar residuos de estas toxinas en la carne, leche o huevo. (Moreno y Gutiérrez, 1991; Hamilton, 1976; Visconti *et al.*, 1999; Placinta, *et al.* 1999)

1.1.1. Contaminación por hongos.

Los hongos son organismos autótrofos, incapaces de sintetizar materia orgánica lo que los obliga a vivir como parásitos o saprobios, aprovechando desarrollarse sobre un sustrato que contenga los diversos nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo.

Se han establecido tres tipos hongos contaminantes de granos: hongos de campo, hongos de almacén y hongos de deterioro avanzado (Christensen and Sauer. 1982; Gimeno, 1991; Moreno y Gutiérrez, 1991)

- a) Hongos de campo: son agentes causales de enfermedades de los cultivos e invaden a los granos en el campo. *Fusarium*, *Alternaria*, *Aureobasidium* (*Pullularia*), *Acremonium* (*Cephalosporium*), *Cladosporium*, *Diplodia maydis*.

- b) Hongos de almacén: se desarrollan principalmente bajo condiciones de relativa humedad, después de la cosecha, durante el transporte, el secado lento, el almacenamiento y el procesado de los granos. *Aspergillus* y *Penicillium* principalmente.
- c) Hongos de deterioro: los cuales necesitan altos contenidos de humedad para su desarrollo y en la naturaleza se les encuentra colonizando materia orgánica en proceso de descomposición. *Absidia*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus niger* y *Rhizopus* entre otros.

De los hongos anteriormente mencionados algunos de ellos poseen la capacidad de sintetizar micotoxinas, sustancias químicas altamente peligrosas para la salud animal, causando mortalidad o bien baja eficiencia productiva, la cual se traduce en grandes pérdidas económicas. En adición directa o indirecta (a través de productos animales) el alimento contaminado tiene también un riesgo para la salud humana y animal (Christensen and Sauer, 1982; Gimeno, 1991; Moreno y Gutiérrez, 1991; Árpád and Radomir 1999).

De la gran variedad de hongos existentes en los diversos ecosistemas, los principales géneros que producen micotoxinas son *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, siendo las especies más reconocidas *Aspergillus flavus* Link; *Aspergillus parasiticus* Speare, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium moniliforme*, *Penicillium niger*, que sintetizan toxinas altamente hepatotóxicas, nefrotóxicas, inmunodepresoras y cancerígenas para los animales domésticos, aves y seres humanos. (D'Mello. and Macdonald , 1997; D'Mello, *et al* 1999).

Estas toxinas ocasionan pérdidas económicas considerables en todo el mundo, impactan en la salud humana, animal y en productos agrícolas que son desechados al ser inaceptados en el comercio nacional e internacional por no cumplir con las regulaciones existentes.

En la práctica los datos sobre incidencia y niveles de contaminación están limitados por factores tales como:

- Disponibilidad de un laboratorio para realizar los análisis
- Fiabilidad y sensibilidad de los métodos analíticos empleados. (Alonso, 2002).

1.1.2. Micotoxinas.

Las micotoxinas, como ya se señaló, son metabolitos secundarios producidos por ciertos hongos toxigénicos capaces de desencadenar cuadros de intoxicación aguda, carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos y estrogénicos que crecen en una amplia diversidad de productos y bajo diferentes situaciones (Christensen and Sauer, 1982; Gimeno, 1991; Moreno y Gutiérrez, 1991; Coulombe, 1993; D'Mello, *et al.* 1999; Alonso, 2002).

Seguramente las micotoxinas siempre han estado con nosotros, pero hasta hace unas cuantas décadas se les reconoció como un problema de salud pública y animal, debido a sus variados efectos tóxicos y su alta resistencia a los tratamientos térmicos, la presencia de micotoxinas en los alimentos y en piensos es potencialmente peligrosa. (Brook, and White, 1966).

La mayoría de las micotoxinas son compuestos policetónicos resultantes de las reacciones de condensación que tienen lugar cuando se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos en la biosíntesis de los ácidos grasos realizada por los hongos, estos ácidos grasos son metabolitos primarios los cuales son utilizados como reservorio de energía. (Jelinek, *et al.*, 1989 ; Gimeno, 1991; Coulombe, 1993; D'Mello, *et al.* 1999)

Existe una serie de factores que son determinantes para el crecimiento de los hongos y la producción de micotoxinas, desglosaremos brevemente alguno de ellos:

- A) Agua disponible (aw): es la relación existente entre el agua libre en los alimentos y la capacidad de los microorganismos para proliferar. La aw nos indica cual es la cantidad de agua disponible para el desarrollo de los microorganismos una vez se ha alcanzado el equilibrio hídrico en el sistema

alimento/medio ambiente. Los valores de a_w que los diversos grupos de hongos necesitan varían de acuerdo con el sustrato y la temperatura (Gimeno, 2002). Además el a_w influye en la producción de toxinas, principalmente en productos poco hidratados, se requiere de un a_w ligeramente superior que la a_w límite (0.86) para el crecimiento fúngico. (Alonso, 2002.)

- B) Humedad relativa (HRE): es la cantidad de humedad del ambiente que disponen los microorganismos, una vez alcanzado el equilibrio entre la humedad del producto y el vapor de agua del ambiente. Este se expresa en porcentaje. Con respecto al porcentaje de humedad relativa, valores inferiores al 65% representan un escaso crecimiento fúngico, el crecimiento y la proliferación se acelera con porcentajes de humedad $>75\%$ (Christensen and Sauer 1982; Moreno y Gutiérrez, 1991; Gimeno, 2002).
- C) Temperatura: la temperatura óptima se encuentra entre 25° y 30° C, sin embargo algunos autores indican una temperatura de 36° a 38° C y el límite máximo entre 40° y 45° C, sin embargo *Aspergillus flavus*; *A. candidus*; y *A. fumigatus* pueden crecer sin problemas hasta 55° C. Hay que destacar que la mayoría de los hongos no crecen por debajo de 5° C. (Christensen, and Sauer, 1982; Moreno y Gutiérrez, 1991; Gimeno, 1991; Gimeno, 2002). La temperatura para la producción de micotoxinas es ligeramente más baja que la temperatura óptima de crecimiento del hongo. (Alonso, 2002).
- D) Integridad del grano: Los tegumentos intactos del grano dificultan el acceso del hongo al almidón endospermico. Los granos partidos son mas susceptibles a la invasión y desarrollo fúngico que los granos enteros (Moreno y Gutiérrez, 1991; Gimeno, 2002).
- E) pH: Los hongos toleran un intervalo de pH (2.5 - 7.5), de modo general soportan mejor el medio ácido que el alcalino. Es de destacar que ellos mismos son capaces de alterar el pH, utilizando como fuente de energía los

ácidos orgánicos del alimento o los excretados por bacterias acidificantes que pueden aparecer durante el período de deterioro del alimento. (Gimeno, 2002)

F) Sustrato: en general los hongos se nutren de los micro y macroelementos existentes en cualquier material orgánico; sin embargo la producción de micotoxinas está ligada a la composición del sustrato (Christensen, and Sauer, 1982; Moreno, y Gutiérrez, 1991; Scudamore, *et al.*, 1998; Gimeno, 2002).

G) Oxígeno: la mayor parte de los hongos son aerobios, una carencia de oxígeno condiciona su crecimiento. El anhídrido carbónico puede inhibir la formación de algunas micotoxinas (como la aflatoxina) más que el crecimiento fúngico (Gimeno, 1991; Alonso, 2002).

H) Minerales: está relacionado con la composición del sustrato a pesar de que el hierro y el zinc son los elementos más importantes para un desarrollo fúngico, otros pueden ser necesarios para la producción de micotoxinas. (Gimeno, 2002).

I) Presencia de insectos: la presencia de insectos actúa como agente de diseminación de la micoflora y contribuye al crecimiento y multiplicación de los hongos (Moreno y Gutiérrez, 1991; Gimeno, 2002).

J) Estirpes específicas: En una misma especie fúngica, no todas las estirpes se comportan de la misma forma.

La sola presencia de hongos en un determinado producto, aún de una cepa productora de micotoxina no significa que la micotoxina esté presente o que se vaya a producir, para que suceda eso se requiere que concurren las condiciones ambientales de temperatura, humedad, sustrato y tiempo de incubación; sin embargo puede ocurrir el hecho de detectar la micotoxina sin la presencia del o los hongos productores, ya que éstos y sus esporas pueden

haber desaparecido, no ocurriendo lo mismo con las micotoxinas, que permanecen en el sustrato (Christensen, and Sauer, 1982; Jelinek, *et al.* 1989; Moreno y Gutiérrez, 1991; Juskiewicz, *et al.* 1992; ; Loste A. *et al.* 2002).

1.1.3. Distribución geográfica de las micotoxinas.

En todos los Continentes las diferencias climáticas entre el Norte, Centro y Sur favorecen el desarrollo de distintas especies de hongos. En Canadá y Estados Unidos de Norteamérica las micotoxinas más frecuentes son la ocratoxina, vomitoxina y zearalenona. En el Norte de Europa se presentan comúnmente la ocratoxina, vomitoxina y zearalenona. En las regiones frías se ha notificado la presencia de toxinas *Fusarium* asociadas con cereales en grano, en particular maíz, trigo y cebada, entre éstos se han reportado casos de fumonisinas en diversas regiones de Europa, América y Asia. (Sweeney and Dobson, 1998; FAO/OMS/PMA. 1999).

Se ha documentado que en Italia, Portugal y Zambia se han encontrado muestras de maíz contaminado con fumonisinas B₁, B₂ en niveles superiores a 4.5 mg/kg, con una incidencia del 82 al 100%. En la India niveles entre 300 y 600 mg/kg se ha encontrado en maíz contaminado con *Fusarium moniliforme* (D'Mello and Macdonald, 1997).

Los cereales en México y en otras partes del mundo, que son utilizados en la elaboración de alimento balanceado como el maíz, con frecuencia contienen concentraciones variables de micotoxinas. En México son pocos los estudios realizados sobre la incidencia de fumonisinas en el maíz cosechado para consumo animal y humano (Robledo, *et al.* 2001), los niveles reportados son de 0.67-13.3ppm y de 0.5-6.8ppm (Figueroa, *et al.* 2007), mientras que la concentración de aflatoxinas en 21 países fijaron como límite máximo 5ppb y cinco países aceptan hasta 10ppb (FAO, 2004). La presencia de éstas micotoxinas en los

granos es debido a que los hongos toxigénicos, pueden desarrollarse tanto en campo como en almacén (Moreno y Gutiérrez, 1991).

1.2 *Fusarium* spp y Fumonisinas.

1.2.1 *Fusarium*.

Dentro de los hongos el género *Fusarium* sp está reconocido mundialmente, ya que son capaces dependiendo de la especie, de producir una serie de toxinas de diversa estructura química. Muchas de las especies toxigénicas de *Fusarium* son descritas como las mayores patógenas para plantas y cereales, causando por ejemplo “podredumbre de la mazorca de maíz”, así como para alimento utilizado para el consumo animal (Placinta, et al., 1999).

De las toxinas más importantes desde el punto de vista de salud animal y productividad están los tricotecenos, zearalenonas, moniliformina y fumonisina (Chulze, et al., 1996; Viquez, et al., 1996; D’Mello, et al., 1999).

Los tricotecenos están subdivididos en 2 grupos básicos. Los tricotecenos del tipo “A” que incluyen a la toxina T-2, la toxina HT-2, el diacetoxyscirpenol (DAS) y al neosolaniol (NEO), producidos por los hongos *F. sporotrichioides* y *F. poae*; en el grupo “B” encontramos al deoxynivalenol (DON, también conocido como vomitoxina), nivanenol (NIV) y fusarenon X, producidos por *F. culmorum* y *F. graminearum* entre otros.

Otra toxina producida por el genero *Fusarium* es la zearalenona (ZEN), antes conocida como toxina F-2. Y finalmente encontramos a aquellas toxinas producidas por *F. moniliforme* (principalmente) y *F. proliferatum* que son: fumonisina, moniliformina y fusarin C.

Tanto *F. moniliforme* como *F. proliferatum* figuran entre los hongos más comúnmente asociados con el maíz, y que pueden recuperarse de la mayoría de los granos, incluso de los que parecen sanos. La presencia de fumonisinas en las plantaciones de maíz en el campo guardan una correlación positiva con la incidencia de casos de estas dos especies fúngicas que predominan durante la fase tardía de madurez (Visconti, et al. 1999; FAO/OMS, 1999).

1.2.2 Fumonisinias.

Las fumonisinias son el grupo de micotoxinas más recientemente descubiertas y han sido objeto de una atención considerable, son producidas principalmente por *Fusarium moniliforme* Sheldon, la fumonisina B₁ (FB₁) es la molécula predominante producida por el hongo. La fumonisina ha sido asociada con ciertas enfermedades en animales como son la leucoencefalomalacia en equinos (LEME) y edema pulmonar porcino (EPP) así como toxicidad cardiovascular, daño renal en ovejas, conejos y ratas; esta toxina ha sido relacionada como un carcinógeno en roedores y eso es una evidencia que es un factor que contribuye a cáncer de esófago en humanos. (Bolger, *et al.* 2001; WHO, 2000; Bouhet, *et al.* 2004; Taranu, *et al.* 2005). En humanos se ha reportado como un factor responsable o que contribuye al desarrollo de cáncer esofágico (Rheeder, *et al.* 1992).

La toxicosis por fumonisinias en cerdos fue llamada edema pulmonar porcino, después de una epidemia de una enfermedad fatal en cerdos alimentados con maíz contaminado con *Fusarium verticilloides* (*F.moniliforme*), este maíz fue cultivado en 1989 en Iowa, Illinois y Georgia. Los cerdos que murieron tuvieron un edema pulmonar severo, que no fue identificado en otras especies después de estar expuesto a fumonisina (Marasas, 2001).

El mecanismo general de acción de las fumonisinias es la inhibición de la síntesis de esfingolípidos. (Haschek, *et al.* 2001)

Visconti *et al.* 1999; FAO/OMS, 1999 señalan la presencia natural de fumonisinias principalmente en el maíz y sus productos, en Sudáfrica, Europa, Asia sudoriental, Taiwán, Brasil, Honduras, India, Canada, Argentina, Croasia y Nepal. Por ejemplo en Filipinas, Tailandia e Indonesia se ha observado una contaminación del 50% de maíz. Los países africanos son los mas afectados hasta un 90%, en estos países se han detectado niveles de fumonisina en maíz de 2000ppm y en alimento para animales rangos de 4000 a 11000ppm. Otros investigadores mencionan la presencia de fumonisina en Argentina, Costa Rica, Honduras y Venezuela pero en cantidades que van de 1 a 150ppm, afectando principalmente al maíz amarillo y

en el 83% de las muestras analizadas. (Chulze, *et al.* 1996; Placinta, *et al.* 1999; Gordon, *et al.* 2000).

Los productos de maíz refinado para consumo humano disponible en el comercio están por lo general contaminados en niveles de < 1ppm de fumonisina B₁ (FAO/OMS, 1999).

El efecto tóxico de las micotoxinas es difícil de demostrar, con base en los resultados obtenidos, las fumonisinas son consideradas como potenciales carcinógenos, dentro de la clasificación IARC (Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer), clase 2B (Zomborszky *et al.* 2002). La FB₁ es la que se encuentra con más frecuencia como contaminante natural y representa más del 70% del total de las fumonisinas encontradas, esencialmente en el maíz y sus subproductos (Gimeno, 2008), esto es de suma importancia debido a la toxicidad que puede provocar en los cerdos.

1.2.3 Estructura química.

Las fumonisinas fueron primeramente aisladas del hongo *Fusarium moniliforme*, sin embargo otras especies de *Fusarium* pueden producirlas, como *F. proliferatum*; *F. nygamai*; *F. anthophilium*; *F. dlamini* y *F. napiforme*. Recientemente un hongo *Alternaria* sp también mostró la capacidad de producir Fumonisina B₁. Estos son compuestos altamente polares, por lo que ellos son solubles en agua, pero insolubles en solventes orgánicos (Ross, *et al.* 1990; Nelson, 1992; Rosiles, *et al.* 1996). En la Figura 1 se muestra la estructura de la fumonisina B₁.

Seis diferentes fumonisinas han sido aisladas e identificadas: fumonisina A1, A2, B1 (descubierta en 1988), B2, B3 y B4, sin embargo solo FB₁, FB₂ y FB₃ han sido detectadas como contaminantes naturales en maíz (Placinta, *et al.* 1999; D'Mello, *et al.* 1999).

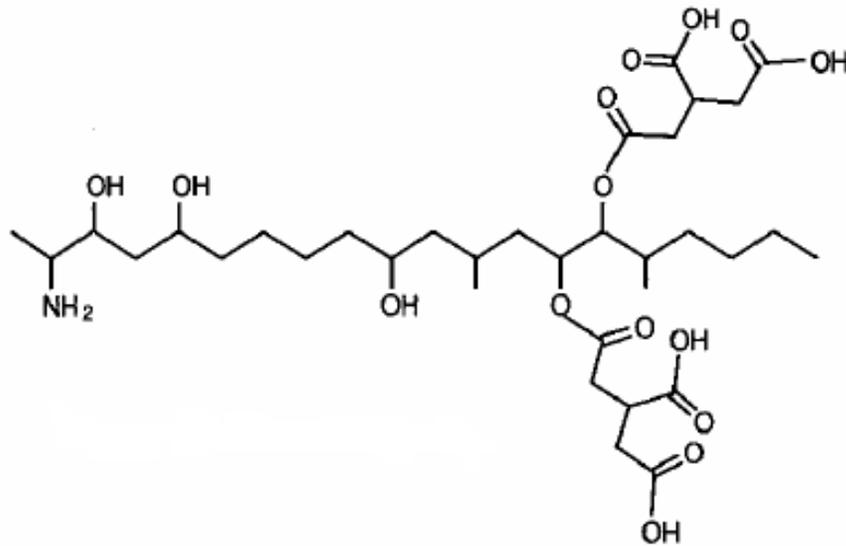


Fig. 1 FUMONISINA B₁ (Voss, *et al.* 2007)

1.2.4 Mecanismo de acción de la Fumonisinina B1

Las fumonisinas B1 tiene una unidad hidrocarbonada de cadena larga similar a la de la esfingonina y esfingosina (Fig.2), esta cadena juega un papel en su toxicidad. La FB₁ es la más toxica.

Diferentes autores mencionan que la Fumonisinina B1(FB1) interfiere con la biosíntesis de los esfingolípidos o la esfingosina (So) (Fig.3), debido a que la estructura química de la FB1 es similar al complejo alcohol-amino de la esfingosina (SO). (Soriano, *et al.* 2005; Constable, *et al.* 2003; Norred, *et al.* 1997).

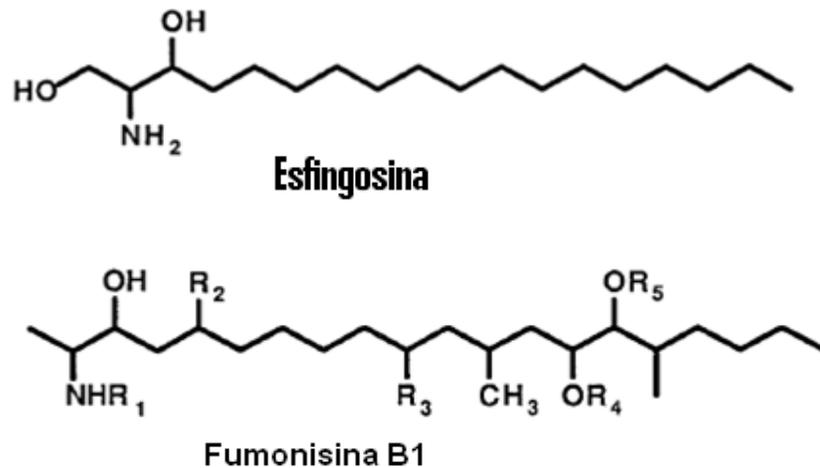


Fig. 2. Diferencia entre fumonisina B1 y Esfingosina (Norred, *et al* 1997)

Estos esfingolípidos (fosfoesfingolípidos y glicoesfingolípidos) son importantes en la integridad de la membrana celular, en la comunicación intercelular, son mediadores del crecimiento celular y de la diferenciación y muerte de las células. En los mamíferos, la concentración de esfingosina es, por lo general, de 3 a 5 veces más elevada que la de esfinganina. La esfinganina N-aciltransferasa y la esfingosina N-aciltransferasa (ceramida sintetasa) son enzimas fundamentales en el metabolismo de la biosíntesis de los esfingolípidos (fig. 3) (Lino, *et al.* 2004). Las fumonisinas pueden alterar la concentración y la proporción entre la esfingonina (Sa) y la esfingosina (So) de forma que se disminuye la biosíntesis de la esfingosina y se acumula esfingonina (fig.3). Estas micotoxinas pueden, en células eucarióticas, bloquear la biosíntesis de los esfingolípidos, que son la base de formación de mensajeros secundarios que controlan los diferentes procesos entre células tales como la activación y desactivación de proteínas específicas y la expresión genética (Lino, *et al.* 2004).

En cerdos, la inhibición parcial o total de la esfingosina y de la enzima N-aciltransferasa son las responsables de los problemas de hepatotoxicosis, de forma que la relación esfinganina/esfingosina ya fue indicada como biomarcador de intoxicación por fumonisinas (Mallmann, and Dilkin, 2007).

Farmacocinética de Fumonisina FB₁ y localización de residuos

Debido a que la biodisponibilidad de purificar la fumonisina es limitada, los más extensos estudios han sido ejecutados en roedores. En ratas las fumonisinas son pobremente absorbidas y excretadas rápidamente por hígado y en proporción menor degradadas a través de riñón. El estudio de la farmacocinética de la FB₁, la realizaron en cerdos. Se empleo FB₁ marcada con carbono 14 ([FB₁]¹⁴), fue administrada por vía intravenosa (I.V.) e intragastricamente (I.G.). Fueron recolectadas muestras de sangre, orina, heces, en intervalos de tiempo específico sobre las 72hrs. Después de la dosificación por I.V., la concentración en plasma se distribuyo triexponencial. Solamente algunos niveles de radiactividad fueron asimilados en plasma después de 3 días. Es eliminado primariamente en heces (58%) y orina (21.2%). Se observaron residuos de fumonisinas en tejido como hígado, riñón, intestino delgado, cerebro, pulmón, corazón y glándulas adrenales, 72hrs. después de ser administrada por V.I.

Cuando la fumonisina fue administrada I.G. la biodisponibilidad fue de 3-6%, después de 3 días, el total de residuos en tejidos fue de 10 a 20 veces más bajo que la dosis intravenosa (Prelusky, 1994).

En otro estudio reportado, los cerdos fueron alimentados con fumonisina marcada radiactivamente [FB₁]¹⁴ a una dosis de 2-3ppm por 24 días se observó acumulación de residuos en hígado y riñón. Posteriormente cuando se les cambió la dieta con alimento libre de [FB₁]¹⁴ la radiactividad disminuyó 35% después de 3 días, teniendo trazas después de 9 días. La fumonisina, por lo tanto, tiene muy mala biodisponibilidad oral en cerdos, sin embargo la distribución de la fracción adsorbida tuvo afinidad especifica por el hígado y se extiende al riñón.

Por lo tanto, las dietas contaminadas con FB₁, que son consumidas por cerdos por largos periodos pueden producir una acumulación de residuos potencialmente tóxicos en hígado y riñón (Haschek, *et al.* 2001).

1.2.5. Patogenia de fumonisinas en cerdos

Las fumonisinas B₁ y B₂ provocan problemas neurotóxicos, hepatotóxicos, nefrotóxicos, edemas pulmonares y lesiones cardíacas. (Gimeno, 2001).

Existen evidencias de daño bioquímico, celular y morfológico en los animales que consumen alimento contaminado con fumonisinas, dentro de las alteraciones que se observan en equinos, cerdos, rumiantes y pollos se encuentran daño hepático, del tracto gastrointestinal, cerebro, pulmón y mortalidad, así como, un efecto inmunosupresor al inhibir la replicación de células leucocitarias e inhibir la actividad fagocítica de los macrófagos. (D'Mello, *et al.* 1999; Placinta, *et al.* 1999).

En dietas con más de 120ppm de fumonisinas producen en cerdos edema pulmonar porcino (PPE) en un tiempo de 4-10 días. Si los niveles en la dieta son más de 50ppm causan hepatitis dentro de 7-10 días, pero los cerdos sobreviven al desarrollo de la enfermedad.

Concentraciones bajas de contaminación con FB₁ pero suministradas en periodos de tiempo prolongados dan lugar a una necrosis de hígado y a degeneraciones progresivas que interfieren con la síntesis proteica, la ganancia de peso vivo y el índice de desarrollo de los animales afectados (Mallmann y Dilkin, 2007).

La fumonisina B₁ y B₂ son similarmente tóxicas en cerdos y hay una relación constante en maíz contaminado en el campo. La fumonisina B₃ parece no ser tóxica en cerdos (Straw, *et al.*, 1999).

La enfermedad se ha reproducido experimentalmente por la alimentación de maíz contaminados con, *F. verticillioides*, y por la administración intravenosa de fumonisina B₁. Un estudio realizado por Harrison, *et al.* 1990, mostró que la FB₁ pura, a concentraciones de 0.4mg/kg peso corporal/4 días, causa edema pulmonar en cerdos por inyección intravenosa. Gumprecht, *et al.* 1998, desarrollaron edema pulmonar en el día 3, en cerdos alimentados con alimento contaminado con 20 mg de FB₁/kg de peso corporal /día. Las fumonisinas inducen acumulación de material membranoso en células endoteliales pulmonares, este cambio parece ser específico de este tipo de células en el cerdo (Haschek, *et al.*, 2001).

Gimeno, 2002 realizó un reporte de la toxicidad de fumonisinas en cerdos de acuerdo a diversos estudios:

1.- Cerdos machos castrados y cerdas alimentadas con dietas conteniendo 0.1 a 10 ppm de fumonisina B₁ por más de 8 semanas, en general la toxicidad de la fumonisina B₁ fue más grave en los cerdos machos que en las cerdas. Los machos que consumieron las dietas con 1 y 10 ppm disminuyeron la ganancia de peso vivo en 8 y 11% respectivamente. La contaminación más baja de 0.1ppm provocó en los machos un crecimiento anormal durante las primeras 5 semanas, el consumo de alimento fue un poco más alto que el control durante las 4 primeras semanas pero después disminuyó en 6-7% cada semana.

Las contaminaciones con 1 y 10 ppm provocan en los machos un aumento del colesterol a las dos semanas; en las hembras con 1 ppm de fumonisina B₁, al final de la prueba los niveles de colesterol se elevaron. En los machos hubo un incremento de peso del páncreas y glándulas suprarrenales así como un aumento de esfinganina y de la relación esfinganina/esfingosina

2.- Cerdos alimentados con dietas conteniendo 5 a 175 ppm (fumonisina B₁ + B₂), Los animales que consumieron 175 ppm desarrollaron edema pulmonar. Con valores de 23 ppm hubo aumento de niveles de algunas enzimas, daños en el hígado e incremento de la esfinganina y de la relación esfinganina/esfingosina, esto ultimo fue observado significativamente con niveles de 5 ppm.

3.- Lechones de 12 a 16 Kg de peso vivo alimentados con dietas conteniendo 200 ppm, desarrollaron edema pulmonar, ictericia y necrosis hepatocelular.

1.2.6 Signos clínicos y lesiones

Dentro de los signos clínicos observados se tiene que en dietas contaminadas con fumonisinas en niveles superiores a 120ppm causan en el 50% de los casos edema pulmonar intersticial agudo, hidrotórax y una mortalidad del 50 – 90%.

Algunos autores mencionan que las lesiones características de edema pulmonar porcino e hidrotórax son con trasudado torácico de 200-350ml de líquido claro, libre de células de color amarillo paja, los pulmones están pesados con bandas largas (3-10min), separando el tejido interlobular. Sin embargo otros autores reportan que los bronquios, bronquiolos y tráquea están relativamente limpios de edema y los alvéolos contienen poco edema.(Haschek, *et al.* 1992; Osweiler, *et al.* 1993; Colvin, *et al.* 1993).

Inicialmente hay letárgica, inquietud, depresión, hiperemia en piel, moderada salivación, disnea, respiración por la boca, debilidad posterior, postración, cianosis, debilidad general y muerte.

Los signos iniciales se comienzan después de 4 a 7 días de consumo de alimento con fumonisinas.

El consumo de fumonisinas de 75-100ppm dentro de 1-3 semanas causa ictericia, anorexia, pérdida de peso, pérdida de la condición corporal.

El análisis químico en suero muestra elevada concentración de gama glutamil transferasa (GGT), aspartato amino transferasa (AST), fosfatasa alcalina (ALP), lactato deshidrogenada (LDH), colesterol y bilirrubinas. Primero se incrementa en suero las enzimas y colesterol, después aumenta GGT y bilirrubina.

Se ha reportado incremento del número de macrófagos intravascular pulmonar con contenido de material osmiofilico, observado por microscopia electrónica, se propone que este material de fagocitosis esta compuesto de células dañadas.

Haschek, *et al* 1992, reportan que las lesiones típicas de una intoxicación subaguda por fumonisinas las son: necrosis pancreática y hepatosis así como la pérdida de la arquitectura hepática, aumento en el número de figuras mitóticas en hepatocitos y necrosis en células hepáticas. (Straw, *et al.* 1999).

También se ha reportado que los abortos son comunes entre 1 y 4 días después de haber iniciado signos agudos, se piensa que se debe a causa de la anoxia fetal por el edema pulmonar severo que se presenta(Osweiler, *et al.* 1993).

Se ha observado que ha concentraciones de 100ppm de fumonisina B₁ en el alimento, después de 30 días de gestación no causan aborto, anormalidades fetales o infertilidad (Straw, *et al.* 1999).

Por consiguiente, diferentes grados de contaminación pueden representar diferentes alteraciones en el cerdo.

1.2.7 Diagnóstico.

Los signos clínicos de dolor, respiración aguda con alta mortalidad, lesiones de edema intersticial y/o hidrotórax sugiere una toxicosis con fumonisinas. Es importante el historial de consumo de maíz o la calidad de este. Los cambios en los valores en la química del suero y la elevación de esfingonina/ esfingosina (Sa/So). Las enzimas hepáticas usualmente se elevan en los días 4 a 7 después de iniciar la exposición. Mientras que la GGT y bilirrubina continúan incrementándose en las semanas 1 a 2.

La proporción de Sa/So es el más sensible indicador para el daño por fumonisinas. Se puede detectar y cuantificar fumonisina en maíz y alimento, pero el análisis químico de rutina para detectar fumonisinas en tejido no es utilizable (Straw, *et al.* 1999).

1.2.8 Análisis de laboratorio.

El calcio sérico, el colesterol, AST (aspartatoamino transferasa), fosfatasa alcalina, LDH (lactato deshidrogenasa) y GGT (gamma glutamiltransferasa) se incrementan, del mismo modo se elevan los niveles séricos de esfingolípidos y la relación esfinganina: esfingosina (Bailly, *et al.* 2001).

1.3 Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS)

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) ha impactado económicamente a la industria porcina a nivel nacional e internacional, desde hace 20 años.

El PRRS también se le conoce como la enfermedad misteriosa del cerdo, enfermedad del cerdo azul, enfermedad de las orejas azules, síndrome disgenésico y respiratorio del cerdo, síndrome respiratorio y aborto epidémico porcino (PEARS), enfermedad del virus de Ielystad y virus del PRRS (vPRRS). A partir de 1987 se le considera oficialmente en los E.U. como una enfermedad nueva de los cerdos (Hill, 1990; Goyal, 1993; Christianson, *et al.* 1993; Rossow, 1998; Morilla, *et al.* 2003; Macías, *et al.* 2006).

El Síndrome reproductivo y respiratorio porcino (SRRP), es una enfermedad infecciosa de origen vírico, las manifestaciones clínicas están relacionadas principalmente con trastornos reproductivos en cerdas gestantes y problemas respiratorios en cerdos de todas las edades (lechones, recría y adulto). Entre las características más importantes de esta enfermedad destaca su alta capacidad de infección y transmisión. Una vez presente en una explotación el PRRS tiende a permanecer indefinidamente.

En 1987 un síndrome hasta entonces desconocido, causó pérdidas de producción importantes en las explotaciones porcinas de los Estados Unidos. En los años siguientes este síndrome se extendió por las regiones de producción porcina más importantes de Norteamérica y Canadá.

En Europa, una epidemia de las mismas características, durante el invierno de 1990/91 ocasionó unas pérdidas estimadas en más de un millón de cerdos. Posteriormente se extendió por todo el mundo, convirtiéndose en una enfermedad endémica en la gran mayoría de los países con una producción industrializada de ganado porcino.

En España, los primeros focos de la enfermedad se observaron clínicamente a finales de 1990, en explotaciones de cerdas reproductoras próximas a granjas de cerdos de engorda importados de Alemania, confirmándose en una explotación de Huesca en enero de 1991.

Estudios epidemiológicos retrospectivos realizados en EE.UU, Canadá, Asia, y Europa sobre bancos de sueros obtenidos de distintas explotaciones porcinas han

demostrado la presencia de este agente infeccioso desde 1979 en Canadá, 1985 en EE.UU, y Corea del Sur (en cerdos importados) y 1988 en Japón y Alemania. El virus del PRRS ha preocupado enormemente a los productores porcinos en el mundo entero, especialmente por la creciente popularidad del uso de la inseminación artificial. Las evidencias tanto experimentales como epidemiológicas han demostrado que el semen de cerdos infectados es una fuente potencial transmisora. Las secuelas de la enfermedad reproductiva han generado interés por la posibilidad de que los verracos sean una fuente transmisora del PRRS así como en los vientres sospechados con problemas de fertilidad. Aunque el verraco puede no presentar signos clínicos después de la infección, la presentación más importante también es la forma respiratoria en los cerdos jóvenes en crecimiento (Goyal, 1993; Weimersheimer, *et al.* 1997; Straw, *et al.* 1999).

En México como en otros países, los problemas asociados con esta enfermedad han generado pérdidas en la industria porcícola. En 1994 se presentó la enfermedad del PRRS en México debido a la importación de cerdos de E.U., se afectaron varias granjas en los Estados de Sonora, Jalisco, Aguascalientes y Guanajuato, donde fueron analizados 491 sueros (Correa, *et al.* 1994).

En 1999 se obtuvo el reconocimiento oficial de la enfermedad por parte de las autoridades sanitarias (Basto, *et al.* 2004). Sierra, *et al.* 2000, aislaron el vPRRS para tratar de caracterizar esta enfermedad en México y posteriormente realizar una correlación de éste con el cuadro clínico y la serología en 8 granjas porcinas ubicadas en 3 estados del país. En el 2003 en México se reportó otro estudio de la prevalencia del vPRRS en muestras colectadas de 1996 al 2001, los resultados mostraron una alta seroprevalencia del vPRRS, también observaron que la presencia del vPRRS incrementó las infecciones respiratorias así como de otros patógenos (Morilla, *et al.* 2003). Se tienen varios estudios de aislamientos del vPRRS en diferentes estados de la República Mexicana, que revelan la existencia de diversidad genética. (Macías, *et al.* 2006; Basto, *et al.* 2004).

1.3.1 Etiología

El vPRRS es un virus ARN de la familia *Arteriviridae*, dentro de la cual se encuentran el virus de la arteritis viral equina, el virus de la deshidrogenasa láctica del ratón y el virus de la enfermedad hemorrágica del simio. Su genoma está constituido por una cadena sencilla de 13-15 kb. Existe gran variabilidad antigénica y genética entre los diferentes aislamientos del vPRRS, especialmente entre los europeos y americanos (Plageman, *et al.* 1992; Conzelman, *et al.* 1993; Meulenbergh, 1998; Rossow, 1998; Macías, *et al.* 2006).

El virus causante de la enfermedad, *Lelystad* en Europa (Wensvoort, G. *et al.* 1992) y *ATTC VR-2332* (Collins, *et al.* 1992) en los Estados Unidos de América, presentan muchas propiedades similares y algunas diferencias antigénicas. Las cepas de los EE. UU. y Canadá están mucho más relacionadas serológicamente entre sí, que las cepas americanas y europeas.

En el campo existen variaciones en la agresividad del virus, la cual puede estar asociada, por las diferentes cepas que existen, no se sabe cuantas cepas existan, pero existen considerables variaciones antigénicas (Wensvoort, *et al.* 1992; Goyal, 1993).

En la actualidad, el virus de PRRS es endémico en casi todas las áreas productoras de cerdos en el mundo. Se cree que algunos países están libres del virus como Australia, Noruega, Suecia, pero los estados de infección de un país pueden cambiar rápidamente (Zimmerman, and Kyoung, 2000)

1.3.2 Patogenia

El virus tiene predilección por las células inmunitarias y causa la muerte de los macrófagos alveolares, causa la infección de estos macrófagos (dependiendo de su origen) y de los neumocitos del tipo II así como de los cultivos de monocitos periféricos del porcino. Los macrófagos, muestran una falla en su capacidad de liberar al ión súper óxido y causa además una reducción en la cantidad de los macrófagos alveolares a los 7 días después adquirir la infección. Se observan

cambios de corta duración en la sangre circulante, con una disminución en los linfocitos, monocitos y neutrofilos; hasta por 4 días después de la infección. El virus puede difundirse de los pulmones al resto del cuerpo; en la sangre, solamente en asociación con los leucocitos o monocitos que entonces emigran a diversos tejidos finos para convertirse en macrófagos tisulares. Con esta difusión PRRS puede alcanzar el aparato reproductor, conduciendo al desarrollo de daños asociados a la reproducción y que definitivamente alteran la fertilidad de los animales (Done, *et al.* 1995).

Por estas razones, el síndrome produce una predisposición a la infección por *Streptococo suis* tipo II y a una amplia variedad de agentes bacterianos como *Haemophilus pararsuis*, *Actinobacillus pleuroneumoniae*, *Salmonellas cholerae*, así como *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Pasteurella multocida* y a los agentes virales implicados comúnmente con el complejo respiratorio de la enfermedad; que incluyen el virus de la gripe de los cerdos (SIV) y el coronavirus respiratorio porcino (PRCV).

Durante las últimas fases de la infección (después de 28 días) se intensifica profundamente la función de la inmunidad humoral y de la mediada por células, se puede producir un estímulo de células B policlónicas (aumento de tamaño de los ganglios linfáticos), a menudo con agrandamiento de los centros germinales; estos efectos sobre las células inmunes tienden a producir inmunosupresión en los cerdos, dando como resultado una variedad de condiciones pulmonares de índole inflamatorio (Done and Paton, 1995), siendo en PRRS, la lesión esencial, una neumonía intersticial.

1.3.3 Características del virus

Mediante estudios de microscopía electrónica se ha observado que el virus del PRRS es un virus esférico, con envoltura y con un tamaño medio de 62 nm que puede oscilar entre 45 y 80 nm. Contiene una nucleocápside isométrica de 25 a 35 nm, aunque a veces se ha visto icosaédrica y presenta unas proyecciones de

superficie de unos 5 nm. Tiene una densidad de 1.13-1.15 g/ml en gradiente de sacarosa (Kim, *et al.* 1993).

El virus posee 6 proteínas estructurales, 4 glicoproteínas (GP2, GP3, GP4 y GP5), una proteína de membrana (M), no presenta diversidad genética, se sugiere que juega un papel importante en el ensamble y liberación de nuevas partículas virales. Tiene una proteína de nucleocápside (N), es la más pequeña de todas e induce una elevada producción de anticuerpos. La GP2 y GP3 son poco antigénicas, mientras que la GP4 y GP5 están involucradas en la inducción de anticuerpos neutralizantes (Meulenberg, *et al.* 1995; 1996).

El genoma del vPRRS es de aproximadamente 15 kb que ha sido secuenciado en su totalidad, en varios aislados americanos y en el aislado europeo de Lelystad.

Presenta 7 marcos de lectura abierta (ORF, por sus siglas en inglés). Los genes de los ORF1a, ORF1b, ocupan el 80% del genoma y codifican para la replicasa y proteínas involucradas en la replicación y transcripción del ARN viral. Los ORF 2-5 codifican para la GP2, GP3, GP4 y GP5 y el ORF 6 y 7, para la proteína M y la nucleocápside N respectivamente. El ORF 7 es el que permite detectar la mayoría de las cepas (Macías, *et al.* 2006; García, *et al.* 2007).

1.3.4 Infecciones secundarias

Bajo Condiciones de campo y experimentales se ha encontrado frecuentemente la asociación del virus de PRRS con infecciones secundarias, principalmente bacterianas como *Mycoplasma hyopneumoniae*, lo cual sugiere que el virus de PRRS puede suprimir, al menos localmente el sistema inmune del huésped (Done, and Paton, 1995).

En piaras norteamericanas crónicamente afectadas, existen infecciones concurrentes con PRRS, especialmente patógenos virales y bacterianos como: *Salmonella cholerasuis*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Mycoplasma spp.*

1.3.5 Signos clínicos

Los dos grupos principales de signos clínicos que son asociados con la presencia de PRRS son el reproductivo y el respiratorio (Rossow, 1998). El primero, incluye nacimientos prematuros, abortos de periodos retrasados, cerdos que nacen débiles y aumenta el número de lechones muertos en los nacimientos y momificados. (Christianson, *et al.* 1993)

En el segundo, las afecciones respiratorias, tienen gran importancia; sobre todo en cerdos neonatales, en los que existe disnea como mayor característica, es usualmente que ocurra en cerdos de 3 semanas de edad pero, también puede ocurrir en cualquier edad.

Los signos clínicos de PRRS varían considerablemente debido a varias causas; incluyendo diferencias en la susceptibilidad de la piara, los factores ambientales, el estado inmune, la cepa del virus; así como su combinación con otros virus que afecten a los cerdos (Done, 1995).

Signos clínicos en los lechones.- En lechones, se observan algunas características como capa del pelo áspero, baja tasa de crecimiento, conjuntivitis, edema periorbital y temblores de los músculos; en ocasiones, cuando están parados, se observan como estatuas o extienden las piernas e incluso muestran parálisis posterior, antes del inicio de la debilidad y de la falta total de coordinación muscular. El sangrado del ombligo puede también ser una característica y puede haber sangrado severo después del corte de cola. Cuando se dan las inyecciones de hierro puede haber hemorragia y el magullar masivo en los sitios de la inyección, especialmente si el lechón es de tres días de edad. La morbilidad en este período neonatal puede alcanzar casi 80 % y la mortalidad en la fase temprana de dependerá individualmente de cada granja pero puede alcanzar 100 % en esos que muestran signos clínicos (Done, 1995).

1.3.6 Contagio

El virus, se difunde rápidamente dentro de la granja, por contacto directo (Pol, *et al.* 1991) o por aerosoles (Terpstra, *et al.*, 1991). En el contagio por aerosoles, es importante la capacidad de supervivencia del virus en el medio ambiente; sin embargo, su supervivencia no es muy grande, ya que es un virus con envoltura; aunque puede sobrevivir en tejidos congelados, durante largos periodos e incluso años. Los casos mejor documentados de transmisión de la enfermedad son los debidos al movimiento de animales enfermos. Estos animales pueden transmitir la enfermedad por contacto hasta 14 semanas después de la inoculación experimental.

El virus se puede eliminar por distintas vías; siendo posible aislarlo de las fosas nasales, saliva, orina, secreciones prepuciales y heces de animales infectados; aunque el aislamiento a partir de las heces, no siempre es posible (Prieto, y Castro, 1998a).

Además, existen evidencias epidemiológicas y experimentales, que el virus se puede diseminar por inseminación artificial, cuando se usa semen obtenido en la fase aguda de la infección; ya que es posible aislar el virus del semen de verracos infectados experimentalmente (Prieto, *et al.* 1996b; Prieto, *et al.* 1997).

Otra forma importante de transmisión, es la vertical, en donde el virus es capaz de atravesar la barrera placentaria e infectar a los fetos en el útero, lo que da lugar a la aparición de lechones virémicos y presentar anticuerpos frente al virus o ambas cosas, al nacimiento.

El virus del PRRS, se ha aislado el día 0 de la infección de muestras de alfalfa, viruta, paja, plástico, botas de plástico y acero inoxidable, en condiciones de temperaturas entre 25 y 27° C. Sin embargo, puede aislarse durante un período de 11 días en el agua de la canalización, 9 días en agua de pozo y 4 a 6 días en soluciones amortiguadoras; de saliva, orina y heces, sólo se ha podido aislar el día de la contaminación; lo cual indica que es un virus muy lábil en el ambiente y que la única fuente de contaminación, sería la contaminación del agua de bebida, por los animales que estén eliminando el virus (Prieto y Castro, 1998a).

A la fecha, no se conoce ninguna otra especie animal susceptible a la infección por este virus ni se ha podido demostrar que las ratas o los ratones actúen como reservorio (Hooper, *et al.* 1992). Sin embargo, algunos datos obtenidos, parecen indicar que ciertas aves migratorias pueden ser infectadas, eliminando el virus por las heces entre los días 5 y 24 después de la infección, actuando de esta manera como vectores y llevando la enfermedad a zonas muy distantes del lugar inicial de la infección.

1.3.7 Diagnostico

Dada la complejidad de la enfermedad por efecto de la interacción de patógenos secundarios y factores medioambientales. La metodología del diagnóstico es difícil y tiene que apoyarse en varios procedimientos. Se puede emitir un diagnóstico presuntivo con base en los signos clínicos, falla reproductiva en las cerdas y enfermedad respiratoria en los cerdos en crecimiento (Done, 1995).

El diagnóstico definitivo requiere del aislamiento del virus, lo cual es difícil e implica el cultivo de macrófagos alveolares y solo una o dos líneas celulares son capaces de soportar el crecimiento aunque no todas las cepas (Mengeling, *et al.* 1996).

El virus del PRRS se ha aislado de muchos tejidos, principalmente de amígdalas, pulmones, bazo, timo, plasma, suero, riñones, el corazón y el cerebro (Pol, *et al.* 1991; Collins, *et al.* 1992; Magar, *et al.* 1995).

Técnicas

Se han utilizado 4 pruebas para detectar anticuerpos contra PRRS:

1. El ensayo de inmunoperoxidasa en monoestrato (IPMA), detecta anticuerpos de 1 a 2 semanas después de la infección y estos pueden persistir hasta durante 12 meses.
2. La prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFA), para la detección de anticuerpos IgM, de 5 a 28 días postinfección y la prueba para IgG, de 7 a

14 días, que pueden durar de 3 a 5 meses. Una colección de 30 muestras puede dar 95% de confianza al detectar un nivel de infección del 10%.

3. La prueba de seroneutralización (SN), es mucho menos sensible y puede detectar anticuerpos a los 9 a 11 días, pero estos a menudo no aparecen si no hasta después de 4 a 5 semanas de ocurrida la exposición.
4. El ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), detecta anticuerpos dentro de las 3 semanas posteriores a la exposición (Done, 1995).

La prueba de PCR es especialmente importante para evaluar semen libre del virus del PRRS, ya que el semen tiene un efecto tóxico en cultivos celulares y por lo tanto son pocas las maneras directas de identificar el virus en el semen. El uso de la polimerasa en cadena ofrece gran sensibilidad y especificidad, detecta aproximadamente 10 viriones por ml. de semen. Es mucho más económica que la prueba biológica y los resultados pueden obtenerse en dos días (Macías, *et al.* 2006; García, *et al.* 2007).

Aislamiento viral Para el aislamiento del virus se prefiere hacerlo a partir del suero; no obstante, el virus se aísla casi de todos los tejidos, incluyendo orina, hisopos rectales y lágrimas. Los animales infectados presentan viremia por 1 a 6 semanas. Los tejidos deben mantenerse en refrigeración o congelación. El virus fácilmente se degrada con calor o autólisis de los tejidos.

El aislamiento a partir de suero se puede hacer individualmente en cada suero o se puede hacer en combinaciones de 3 a 5 sueros previamente mezclados en cantidades iguales de animales de la misma edad.

En casos reproductivos se prefiere usar suero de lechones nacidos débiles para el aislamiento del virus en lugar de fetos o suero de la cerda. No es recomendable hacer el aislamiento de fetos debido a la autólisis. Suero de animales recientemente vacunados con la vacuna de virus vivo modificado no debe usarse

para el aislamiento ya que la vacunación causa eliminación del virus por 3 a 6 semanas después de su administración (Cuartero, 2000).

1.3.8 Tratamiento

No existe un tratamiento específico para la enfermedad y lo único que se puede hacer es aplicar medidas profilácticas. Se deben separar los cerdos que presenten signos respiratorios, a lugares donde no haya corrientes de aire, evitar que se mezclen con otros animales y se debe evitar la superpoblación para evitar el estrés.

Los antibióticos se han utilizado por la vía parenteral, en el agua o el pienso, para controlar las infecciones secundarias, se recomienda añadir tetraciclina al pienso de gestación durante 4 semanas, furazolidona al pienso de lactación e inyectar a los lechones con antibióticos de larga duración a los 3, 6 y 9 días de edad; además, dar tetraciclinas, sulfonamidas o tilosina durante 3 ó 4 semanas a los cerdos en crecimiento.

Para reducir la mortalidad perinatal se ha intentado asegurar que los lechones ingieran el calostro en el momento del nacimiento y a las 4 horas, además de darles electrolitos, glucosa y calostro natural y artificial.

Como medida para reducir el estrés en los lechones recién nacidos se ha propuesto evitar el corte de los colmillos, especialmente en los lechones nacidos débiles, y retrasar la inyección de hierro hasta los 3 días de edad y el corte de cola hasta los 5 días (Prieto, y Castro, 1998a).

Las cerdas que abortan o pierden toda la camada, se deben dejar sin cubrir hasta el momento en que deberían ser cubiertas en condiciones normales, para evitar los problemas de infertilidad que se presentan en el primer celo después de un aborto o un parto prematuro; como los problemas secreciones vaginales.

En los verracos, para mitigar los problemas de infertilidad, se debe recurrir a la inseminación artificial o al menos utilizar distintos verracos en cada monta para reducir el riesgo de repeticiones (Prieto, y Castro, 1998a).

1.4 JUSTIFICACIÓN

El maíz es un grano ampliamente utilizado en la alimentación de cerdos y es susceptible a la contaminación con hongos como *Fusarium* y producción de toxinas como fumonisinas.

Estas micotoxinas han adquirido gran importancia debido a los efectos nocivos que causan al ser ingeridas a través de los alimentos, tanto en el hombre como en los animales, ya que son producidas por hongos que se desarrollan en los granos destinados a la elaboración de alimentos balanceados. Las fumonisinas son consideradas como nocivas para los cerdos, sin embargo también son las menos estudiadas en esta especie, a pesar de su efecto en el aparato respiratorio así como el hígado y el esófago, reportada en animales y el hombre.

No se tienen datos de la incidencia de fumonisinas en México, así como el comportamiento de estas en presencia de otras enfermedades.

Gumprecht *et al*, 2001 menciona que las fumonisinas tiene especificidad de órgano y especie, en un trabajo que realizó con cerdos, ovejas, conejos, ratas, y observo que solo hubo alteraciones en el endotelio capilar pulmonar en cerdos, en las demás especies afectó otros órganos, por lo que la fumonisina fue específica de órgano y especie. El PRRS es una enfermedad que afecta al cerdo sobre todo al aparato respiratorio por lo que también es específico para esos órganos.

Por lo que se considera de interés estudiar el efecto sinérgico de la fumonisinas B₁ con el PRRS

Ambas afecciones provocan lesiones en el cerdo que se ven reflejadas en la productividad, por lo que se requiere de un estudio para evaluar dicho comportamiento

1.5 HIPOTESIS

Si las fumonisinas producen edema pulmonar entonces habrá una correlación con el virus del PRRS.

2.0 OBJETIVOS

Objetivo general.

Estudiar la correlación de fumonisinas y el PRRS en cerdos

Objetivos particulares

Evaluar el efecto de la fumonisina mediante un diseño experimental Fumonisina – PRRS.

Evaluar las alteraciones funcionales a través de pruebas bioquímicas en el suero de animales tratados.

Evaluar los signos clínicos.

Evaluar la ganancia de peso.

Evaluación histopatológica de lesiones.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Evaluación de la concentración de aflatoxinas y fumonisinas en el alimento.

3.1.1. Determinación de Aflatoxinas.

La cuantificación de aflatoxinas se llevó a cabo de acuerdo al método reportado en el manual de la AOAC 991.31(1995), empleando columnas con anticuerpos monoclonales contra la toxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ (Aflatest, VICAM Science Technology, 303 Pleasant St., Watertown, MA, USA).

3.1.2. Determinación de fumonisinas.

La cuantificación de las fumonisinas se llevó a cabo por medio de la técnica de columnas con anticuerpos monoclonales para fumonisinas (Fumonites, VICAM Science Technology, 303 Pleasant St., Watertown, MA, USA). Para ello se realizó la extracción colocando en un vaso de licuadora 50grs de muestra molida, 100ml de metanol al 80%, 5gr de NaCl, se homogenizó en licuadora por 1 min. Posteriormente se filtró a través de papel whatman No.1, se tomaron 10 ml y se llevó a un volumen de 50ml con solución buffer de fosfatos/tween-20 al 0.1%, nuevamente se filtró la solución con filtro de microfibra de 0.1µm., se tomaron 10ml y se pasaron a través de la columna de Fumonitest. Después de pasarlo por la columna se lavó pasando 10ml de solución buffer de fosfatos/tween-20 al 0.1%, se realizó un segundo lavado pasando 10ml de solución buffer de fosfatos. Posteriormente se eluyó pasando 1ml de metanol grado HPLC el cual fue recolectado. Al eluido se le agregó 1ml de revelador se homogenizó y se leyó en el fluorómetro (VICAM) y se obtuvo la lectura 4 minutos después en unidades de ppm (mg/Kg).

3.2 Cultivo y cosecha de células

Las células que se utilizaron para preparar el inóculo fueron de riñón de mono verde africano conocidas como MA-104 en medio mínimo esencial. Primeramente

se hizo un cultivo celular, examinando el monoestrato que no mostrara signos de contaminación o algún deterioro celular posteriormente se retiró el medio mínimo esencial de Eagle (EMEM. M0769. Sigma - Aldrich) de las cajas de Falcón de 25 cm², se lavó el monoestrato con 0.2ml/cm² de solución buffer de fosfatos (PBSA) por 5 minutos, en seguida se adiciono 0.1ml/cm² de tripsina sobre la cara opuesta donde se encontraba el monoestrato y se invirtió la caja para que actué la tripsina por 15 seg., se observó al microscopio invertido y cuando la formación bidimensional de las células se perdió y se volvieron redondeadas, se retiró parte de la tripsina hasta dejar una capa fina que cubra las células e inmediatamente se incubó la caja con la tripsina en posición horizontal por 5 minutos a 37°C, una vez pasado este tiempo se observaron las cajas al microscopio, hasta ver que el monoestrato se desprendió completamente y enseguida se adiciono 1ml de medio de crecimiento (EMEM, con 10% de suero fetal bovino). Con la ayuda de pipetas y puntas se tomó una muestra de las células y se procedió a contarlas en un hemocitómetro, una vez contadas estas fueron sembradas en cajas Falcón de 25 o 75 cm² y se les agregó EMEM junto con 1.5 g/l de NaHCO₃ al 1%, de piruvato y aminoácidos no esenciales más 10% de suero fetal bovino (BSF) en un volumen de 0.2 ml/cm², en una cantidad de 5 y 35 ml respectivamente; las cajas con la suspensión de células se incubaron en una estufa de cultivo a 37°C , hasta el siguiente subcultivo o cuando el rojo de fenol contenido en el medio indicara la necesidad de renovar el medio de cultivo.

3.3 Conteo de células

Se realizó el conteo de células en un hemocitómetro. Se hizo la lectura con el objetivo de 10X en el microscopio óptico y se contaron las células existentes en las 4 esquinas y en el cuadro central, para sumar el número total de células existentes se tomaron en cuenta los 5 cuadrados mas los otros 5 cuadrados del lado contrario, se obtuvo el número de células promedio por cuadro y se multiplicó por 10⁴. El resultado obtenido es el número de células por mililitro y cada que se subcultiven en cajas nuevas se adiciona 5x10⁴ células por ml o bien para las cajas

de cultivo de 25 y de 175 cm² se adiciona 1.25x10⁶ y 8.75x10⁶ células respectivamente (Vargas, 2001)

3.4 Título del virus del PRRS

Se colocaron 20 µl de medio de cultivo conteniendo células en suspensión, de la línea celular (PK-15 y/o SK-6) en todos los pozos de la microplaca; se colocó una de las cepas en estudio en cada fila y se realizaron las diluciones de base 10, se incubaron a 37°C en una estufa con 5% de CO₂ durante 3 días, se lavaron y secaron las microplacas; se les adicionaron 50µl del conjugado SDOW17, monoclonal antinucleocapside (ORF7) con dilución 1:80; se incubaron a 37°C durante 1 hora, se lavaron las placas, se revelaron con 20 ml de AEC (3-amino-9-ethyl-carbazole) + 10µl de H₂O₂ (30%), filtrado por un filtro con porosidad de 0.22µm, se leyeron los resultados, se utilizó la prueba de Reed and Muench, para obtener el título.

3.5 Fumonisina B₁

La toxina empleada fue fumonisina B₁ estándar (F1147.Sigma–Aldrich), con una pureza del 98%. Se preparó una solución a una concentración de 87ppm en agua destilada y se almacenó a una temperatura de 4°C. La administración de la fumonisina B₁ a los cerdos destetados fue de 12 ppm (mg/kg de peso vivo) diario/vía oral empleando una sonda.

3.6 Lechones

Se emplearon 25 cerdos recién destetados de 29 días de edad, con un peso de 4.17 a 7.6 kg, híbridos, de ambos sexos, procedentes de una granja libre de PRRS. El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de Virología y en la Unidad de Investigación en Granos y Semillas de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FES-C) de la Universidad Nacional Autónoma de México, en las unidades de asilamiento de las instalaciones del Centro Nacional de

Servicios de Diagnostico en Salud Animal (CENASA) ubicada en Tecamac Estado de México.

3.7 Diseño experimental

El diseño experimental fue completamente al azar con 5 tratamientos y 5 replicas por tratamiento. **Grupo A:** Control negativo. **Grupo B:** Intoxicados con 12ppm de Fumonisina B₁ (FB₁) a partir del día 0 (inicio del experimento). **Grupo C:** Inoculados con virus del PRRS (vPRRS) (6 nebulizadores cada uno con 6 ml, dando un total de 36ml por 30 min.) el día 8. **Grupo D:** Inoculados con vPRRS ((6 nebulizadores igual que en el tratamiento anterior) el día 0 e intoxicados con 12ppm de FB₁ a partir del día 0. **Grupo E:** Intoxicados con 12ppm de FB₁ a partir del día 0 e inoculados con vPRRS (igual a los tratamientos C y D) el día 8, las condiciones de cada grupo se pueden observar en el cuadro 1.

Cuadro 1: Diseño y composición de los grupos experimentales

Grupos	Tratamiento	Intoxicación con FB ₁ *	Desafío con el vPRRS*	
		Día 0	Día 0	Día 8
A	Control negativo	-	-	
B	Control FB ₁	+	-	
C	Control vPRRS	-	-	+
D	vPRRS	+	+	
	FB ₁			
E	FB ₁	+		+

* Nota: FB₁12ppmadministración vía oral; vPRRS 6 nebulizadores cada uno con 6 ml, dando un total de 36ml por 30 min

Alimento: Los cerdos fueron alimentados utilizando un alimento comercial con una composición de 16% de proteína, 5.50% de grasa, 5.50 de fibra cruda, a una ración de 250 a 300 gr / cerdo /día. El agua se administró *ad libitum* durante todo el periodo experimental. Tuvieron un periodo de adaptación de 5 días, en las unidades de aislamiento en el CENASA.

Inoculaciones: El trabajo experimental se inició cuando los lechones tenían 27 a 41 días de edad y se les administró FB₁, a una dosis de 12ppm (mg/kg p.v.) diario/vía oral por medio de una sonda por 18 días, a los grupos B, D y E. La inoculación del virus del vPRRS solamente al grupo D, a una dosis de 36ml (6 nebulizadores cada uno con 6ml) por 30 min., con una concentración de 10^{4.3} focos fluorescentes TCID₅₀/ml (dosis infectiva de cultivo de tejido), se empleó una cámara de nebulización donde los lechones fueron introducidos por un intervalo de tiempo de 30 minutos, pasado ese tiempo los lechones se sacaron de la cámara de nebulización.

Posteriormente a los 8 días de iniciado el experimento los grupos C y E, fueron inoculados con el vPRRS de la misma forma que el grupo D. Todos los grupos se instalaron en unidades de asilamiento en forma individual hasta el final del experimento.

Durante el experimento se llevó a cabo el registro de peso de los animales, se monitoreó su condición clínica y se realizó la toma de muestras sanguíneas. Al término del experimento (18días), todos los animales fueron sacrificados. Se realizó la necropsia, llevando a cabo la observación de las lesiones macroscópicas presentadas y toma de muestras de tejido pulmonar, hígado y renal para la evaluación histopatológica.

3.8. Evaluación clínica

Los lechones fueron observados diariamente considerando cualquier cambio en su comportamiento como en su apariencia, problemas respiratorios, consistencia del excremento, aspecto de párpados hinchados y lagrimeo, fluido en orificios nasales y apetito.

3.9. Registro de Temperatura

Diariamente se tomó la temperatura corporal vía rectal a cada uno de los cerdos en todos los grupos tratados, antes de proceder al manejo.

3.10. Evaluación de ganancia semanal de peso

A todos los cerdos de los grupos A, B, C, D y E, por la mañana se les registró el peso, durante los días, -5 (aclimatación), día 0 (inicio del experimento), día 8 y día 18 (final del experimento).

3.11. Evaluación bioquímica

A cada lechón se le colectó una muestra de sangre de 5 ml, directamente de la yugular, los días 0, 8, 16 a todos los grupos tratados. Los sueros obtenidos fueron empleados para la detección de la actividad de AST (aspartato-amino transferasa), ALT (alanino-amino transferasa), GGT (gamma glutamil-transferasa) y colesterol. Estas pruebas se realizaron empleando, Kits comerciales marca Stanbio Laboratory, así como un espectrofotómetro marca DU-530 Beckman Coulter.

3.12. Evaluación patológica

Los lechones fueron sacrificados al término del periodo experimental. Se sacrificaron por medio de electroinsensibilización, según se indica en la norma NOM-033-ZOO-1995.

Durante la necropsia se realizaron las observaciones y registro de las lesiones macroscópicas así como la localización, forma y tamaño de las lesiones según el lóbulo afectado. Para la determinación del grado de lesión neumónica se realizó con base en la observación y registro de la vista dorsal y ventral pulmonar. El porcentaje de lesión fue calculado como lo indica Ciprián, *et al.* 1988.

3.13. Evaluación Histológica

Para la evaluación histológica se tomaron fragmentos de tejido pulmonar, hígado, riñón; conteniendo tejido sin cambios patológicos aparentes (SCPA) y tejido lesionado, los cuales fueron fijados en formalina amortiguada al 10%, para su posterior procesamiento y por último se realizó la tinción con hematoxilina y eosina. (Harms, *et al.* 2001 ;Valladares, *et al.* 2007)

3.14. Prueba de RT-PCR

Se obtuvieron muestras sanguíneas de 1ml, directamente de la vena yugular en tubos que contenían EDTA, los días 0, 8, 16, para procesarlas mediante la técnica de RT-PCR anidada y demostrar la presencia o ausencia de los ácidos nucleicos del vPRRS.

3.15 Análisis estadístico

Con el propósito de determinar si había diferencias estadísticas, en la ganancia de peso, el porcentaje de lesión pulmonar, AST, ALT, GGT y colesterol en los diferentes grupos, se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de un vía. Las medias de los grupos fueron comparadas con la prueba de Tukey, para constatar la existencia de diferencias significativas entre ellos. Los datos se analizaron utilizando el software estadístico Statgraphics Plus versión 5.0 con un nivel de significancia ($P < 0.05$).

Para el análisis del comportamiento de peso de los grupos, se realizó una regresión lineal simple, para los valores promedio de cada variable y grupo, utilizando herramientas de Excel.

Se determinó de la ecuación de predicción, la pendiente (m) que indicó en forma indirecta la velocidad del aumento o pérdida de peso, el coeficiente de determinación (R^2), que indicó la dependencia de las variables a diferencia del coeficiente de correlación (r) que determinó el ajuste de los datos experimentales a la curva de predicción, así como la ganancia diaria en promedio y el porcentaje que representó éste.

4. RESULTADOS

4.1 Evaluación de la concentración de aflatoxinas y fumonisina B₁ en el alimento.

En la evaluación de la concentración de aflatoxinas y fumonisina B₁, en el alimento empleado para el consumo de los cerdos, se encontró, 3ppb (µg/kg) de aflatoxinas y 1ppm (mg/kg) de fumonisina B₁.

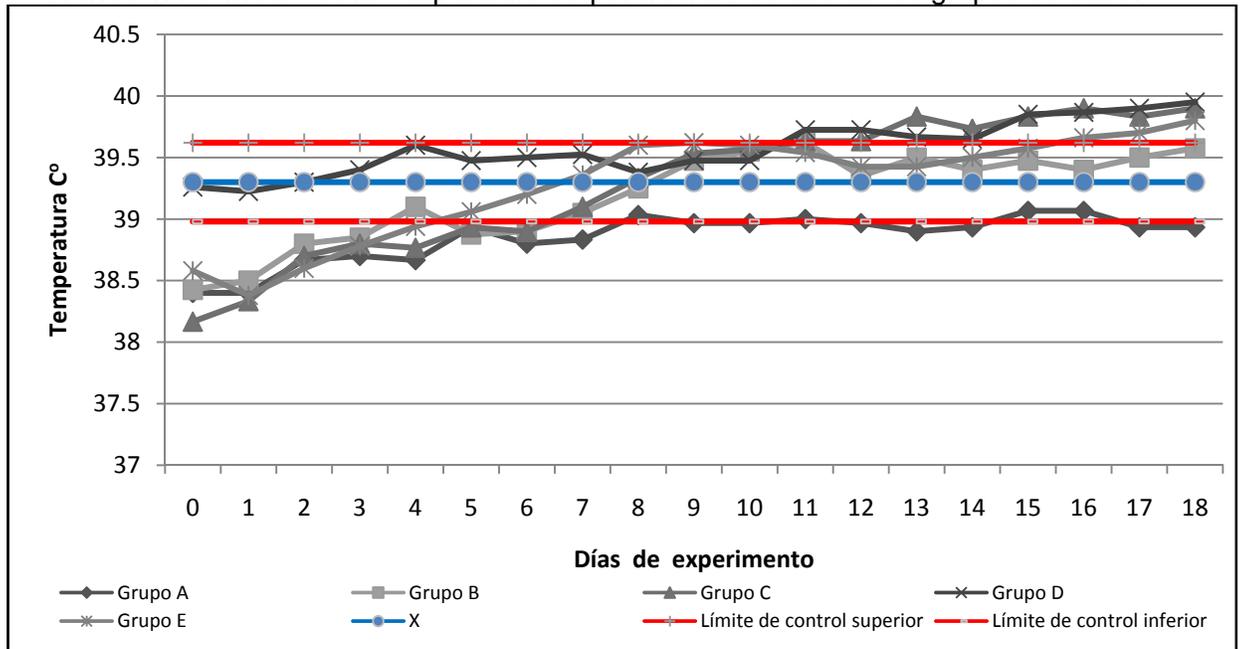
4.2. Preparación de los inóculos:

vPRRS - el título del virus se estandarizó a una concentración de 10^{4.3} focos fluorescentes TCID₅₀/ml.

FB₁ – el inóculo que se utilizó, se ajustó a 12 ppm (mg/kg).

4.3. Registro de Temperatura

Los resultados obtenidos de la temperatura corporal promedio en los lechones se muestran en la grafica 1. Los cerdos del grupo A control negativo, mostrarón una temperatura promedio de 39°C, a partir del día 7 hasta el final del experimento, de igual manera el grupo B intoxicado con FB₁, permaneció dentro del rango normal de temperatura. Los cerdos del grupo C, inoculados únicamente con vPRRS y los grupos D y E que también se les inoculo el virus más la toxina, presentaron hiperemia desde el día 14 hasta el final del experimento.

Grafica 1. Promedio de la temperatura corporal en los cerdos de los grupos tratados.

Grupo A Control; Grupo B FB₁; Grupo C vPRRS; Grupo D vPRRS-FB₁; Grupo E FB₁-vPRRS

4.4. Evaluación Clínica

Los lechones fueron evaluados diariamente antes del manejo, con la finalidad de observar los signos clínicos en cada tratamiento, anotándose en los registros individuales.

Los lechones del grupo A no mostraron signos clínicos aparentes en el periodo experimental. Los lechones del grupo B intoxicados con FB₁, mostraron ligera anorexia, depresión, postración, heces fluidas. Los lechones del grupo C inoculados con el vPRRS, mostraron moderada anorexia, depresión, párpados hinchados, fluido en orificios nasales, disnea, pelo áspero. Los lechones del grupo D inoculados con el vPRRS e inoculados con FB₁, manifestaron moderada anorexia, depresión, fluido en orificios nasales, estornudo, heces fluidas. Los lechones del grupo E intoxicados con FB₁ e inoculados con vPRRS, mostraron moderada anorexia, depresión, fluido nasal, estornudo, heces fluidas.

4.5 Evaluación de ganancia de peso.

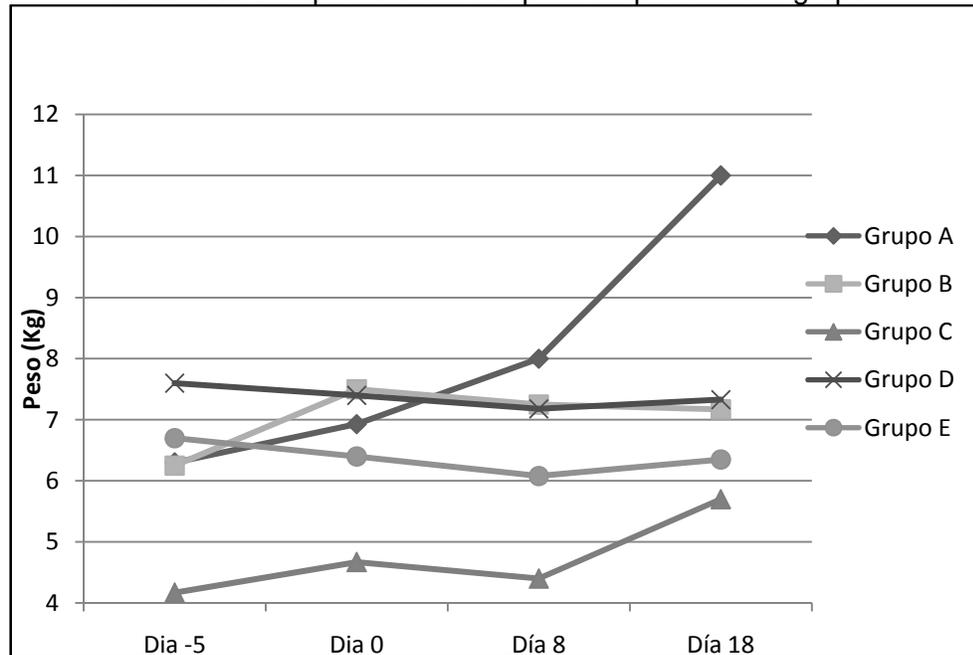
Los resultados se muestran en el cuadro 2, se presentó mayor dispersión en el peso de los cerdos en el grupo B, con valores de desviación estándar (SD), hasta de 3.39kg. El día 18 se presentó mayor dispersión en el grupo D, con un valor de SD de 4.35 kg. Aunque el peso promedio inicial de los cerdos en el día -5, fue diferente 4.17 para grupo C y 7.6 para grupo D.

Cuadro 2. Promedio de peso corporal (media +/- desviación estándar) registrados durante el experimento

Peso (kg)				
Tratamiento	Día -5	Día 0	Día 8	Día 18
Grupo A	6.3 +/- 0.57	6.93 +/- 0.60	8.0 +/- 1.0	11.0 +/- 1.0
Grupo B	6.25 +/- 2.06	7.5 +/- 2.38	7.25 +/- 3.39	7.17 +/- 2.61
Grupo C	4.17 +/- 1.25	4.67 +/- 1.61	4.4 +/- 1.23	5.7 +/- 3.29
Grupo D	7.6 +/- 0.55	7.4 +/- 0.42	7.18 +/- 1.12	7.33 +/- 4.35
Grupo E	6.7 +/- 1.30	6.4 +/- 1.19	6.08 +/- 1.39	6.35 +/- 2.91

NOTA: Grupo A Control; Grupo B FB₁; Grupo C vPRRS; Grupo D vPRRS-FB₁; Grupo E FB₁-vPRRS

El análisis de regresión lineal simple, que se presenta en la grafica 2, se observa que la mayor ganancia de peso lo tuvo el grupo A control, comparado con los demás grupos. Los grupos B, C, D y E, tuvieron un comportamiento similar en un rango de 5.7 y 7 kg de peso. Sin embargo se observa una pequeña pérdida de peso en los grupos D y E.

Grafica 2. Comportamiento del peso corporal en los grupos

NOTA: Grupo A Control; Grupo B FB,; Grupo C vPRRS; Grupo D vPRRS-FB,; Grupo E FB,-vPRRS

Los resultados del peso fueron analizados por las ecuaciones de predicción donde el grupo A control presentó una pendiente de 1.51, los grupos D y E presentaron pendientes negativas -0.103 y -0,37 respectivamente. El grupo A mostró 29.6% de ganancia de peso, los grupos D y E tuvieron una pérdida de peso de 2.05 y 2.34%, lo cual se observa en el cuadro 3.

Cuadro 3. Ecuaciones de predicción de ganancia en peso, ajuste a comportamiento lineal y ganancia en peso de lechones tratados con FB_1 y vPRRS

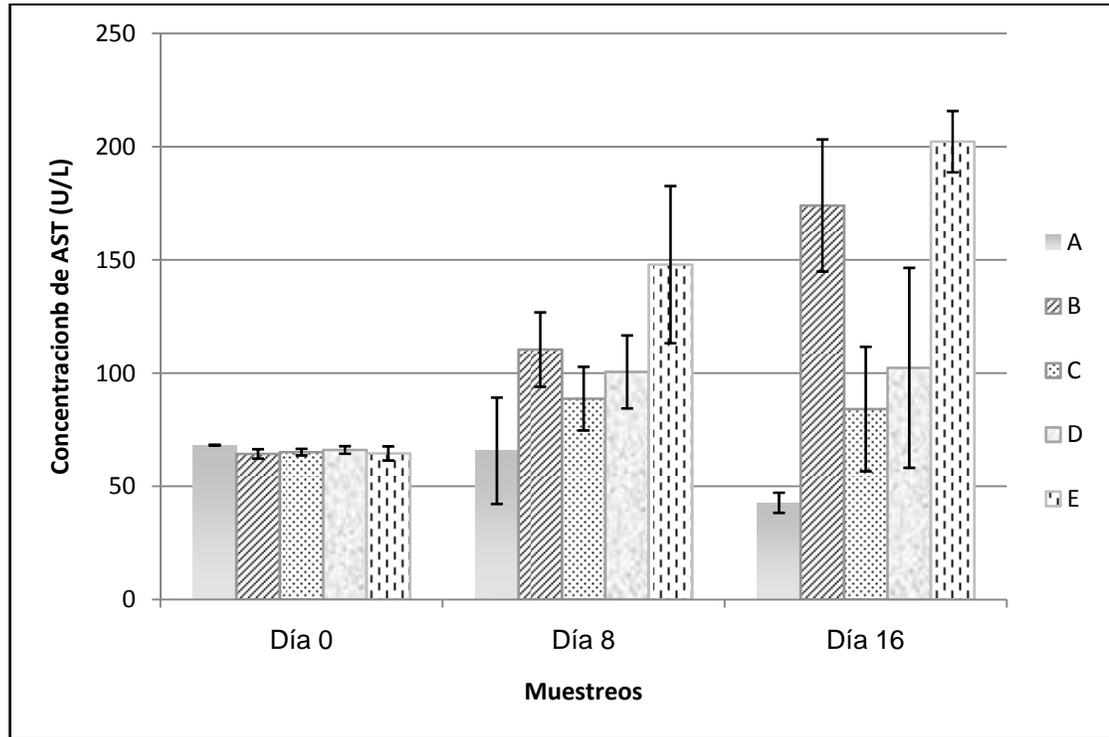
	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E
Ecuación de predicción	$y = 1.51x + 4.26$	$y = 0.25x + 6.41$	$y = 0.43x + 3.65$	$y = -0.103x + 7.63$	$y = -0.37x + 6.72$
R²	0.883	0.351	0.682	0.58	0.48
Ganancia de peso promedio (kg)	1.57	0.31	0.51	0.09	0.12
% de ganancia en peso	29.61	5.75	6.38	- 2.05	- 2.34

NOTA: Grupo A Control; Grupo B FB_1 ; Grupo C vPRRS; Grupo D vPRRS- FB_1 ; Grupo E FB_1 -vPRRS

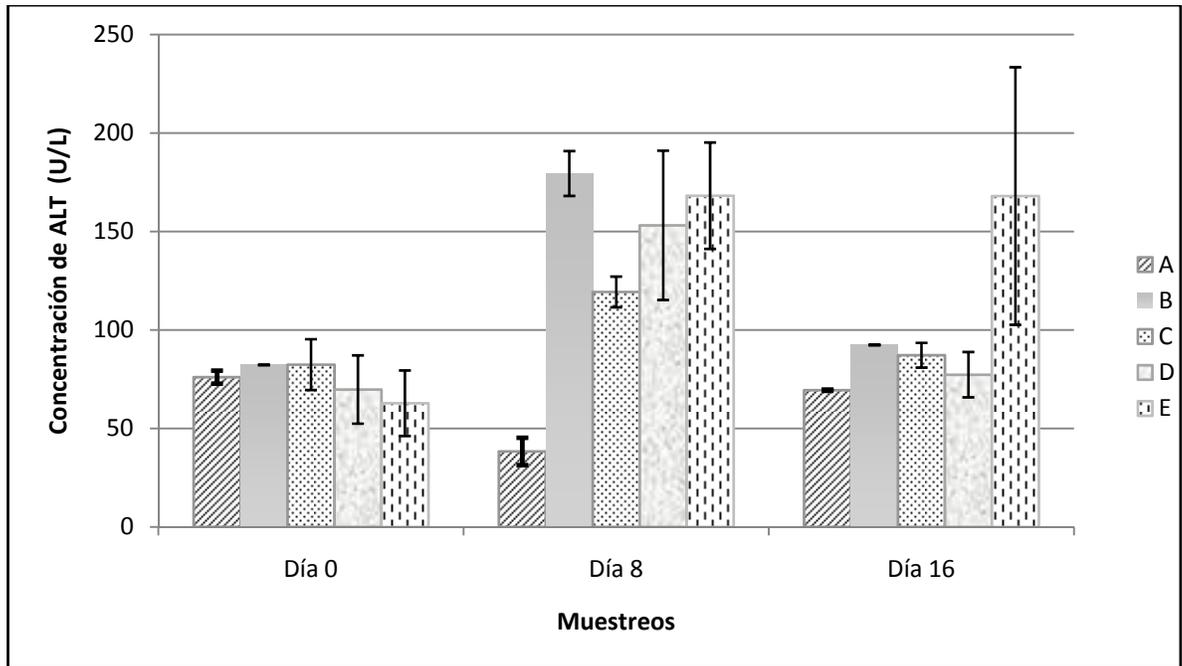
4.6. Evaluación Bioquímica

Los sueros de todos los animales, fueron analizados para la detección de AST (aspartato-amino transferasa), los resultados se muestran en la grafica 3, donde se indica el comportamiento del promedio, y la desviación estándar. El grupo A control, mostró una disminución en su actividad enzimática durante el experimento. El grupo B tratado con FB_1 , presentó valores promedio en los muestreos 2 y 3 de 110 a 174 u/l. El grupo C tratado solo con vPRRS, tuvo una ligera elevación en el segundo muestreo con valor de 88 u/l. En el grupo D tratado con vPRRS y con FB_1 , fue constante su nivel de 102.4 u/l, mientras que en el grupo E tratado con FB_1 y con vPRRS, mostró un aumento gradual en su actividad hasta llegar a un valor de 202.29 u/l.

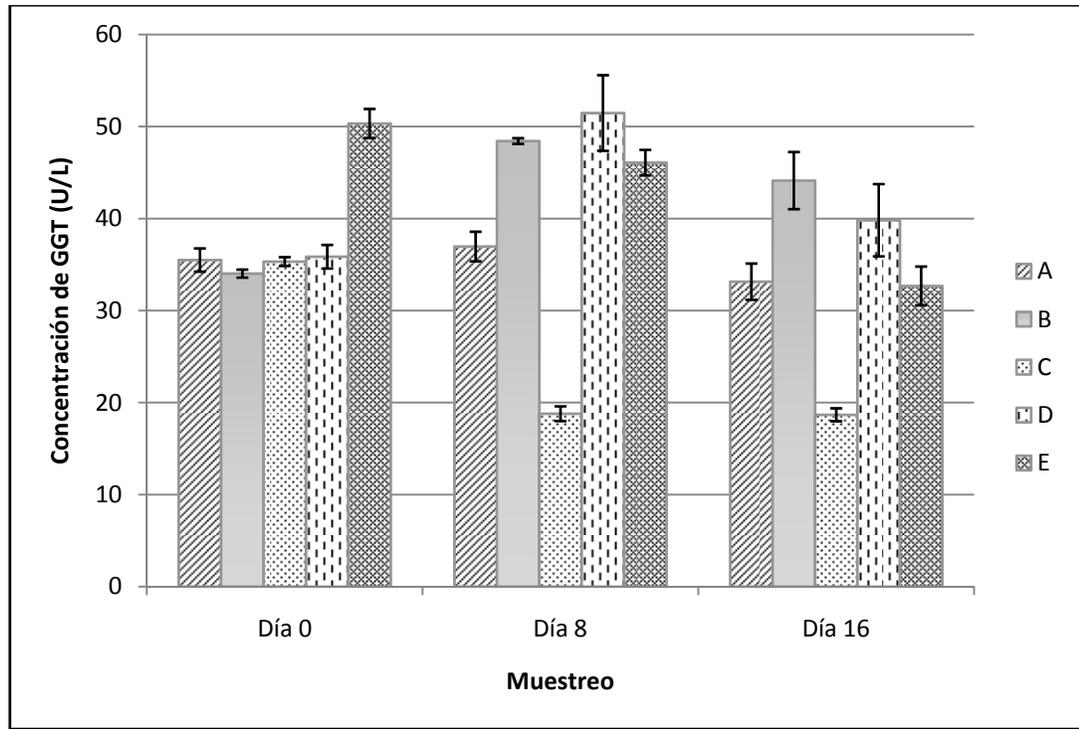
Con relación a los muestreos dos y tres presentaron diferencias significativas entre los valores de medias ($P < 0.05$).

Grafica 3. Análisis de AST en suero de cerdos con diferentes tratamientos

Por otro lado se evaluó la presencia de ALT (alanino-amino transferasa) en suero, donde se observó que el grupo A, presentó una baja actividad en el segundo muestreo de 38 u/l, que se observa en la grafica 4. El grupo B, C, D y E mostraron una elevación de su actividad enzimática en el segundo muestreo con valores de 179.48, 119, 153 y 168 u/l respectivamente. En el tercer muestreo los grupos B, C y D bajaron sus niveles, pero el grupo E mostró un valor de 168u/l. El comportamiento del promedio de ALT y la desviación estándar para cada tratamiento y en cada muestreo, presentó diferencias significativas entre los valores de medias ($P < 0.05$), se muestran en la grafica 4.

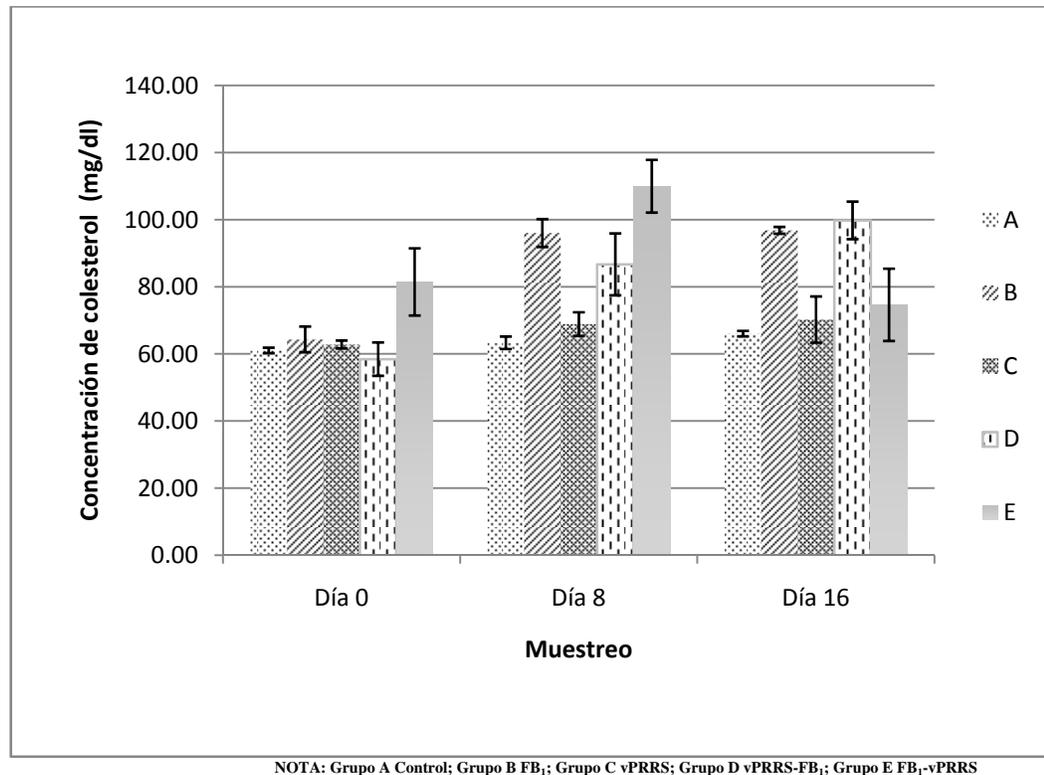
Grafica 4. Análisis de ALT en suero de cerdos con diferentes tratamientos

Los resultados de la presencia GGT (gamma glutamil-transferasa) en suero se muestran en la grafica 5. El grupo A, no mostró elevación en sus niveles durante el experimento. El grupo B, presentó una elevación de 48u/l en el segundo muestreo y un valor de 44u/l en el tercer muestreo. El grupo C, manifestó una baja actividad enzimática con valor de 18 u/l. En el grupo D, mostró valores en el segundo y tercer muestreo de 51 u/l y 40 u/l respectivamente. El grupo E, mostró una disminución en sus niveles de 50, 46 y 32 u/l. Los tres muestreos presentaron diferencias significativas entre medias ($P < 0.05$).

Grafica 5. Análisis de GGT en suero de cerdos con diferentes tratamientos

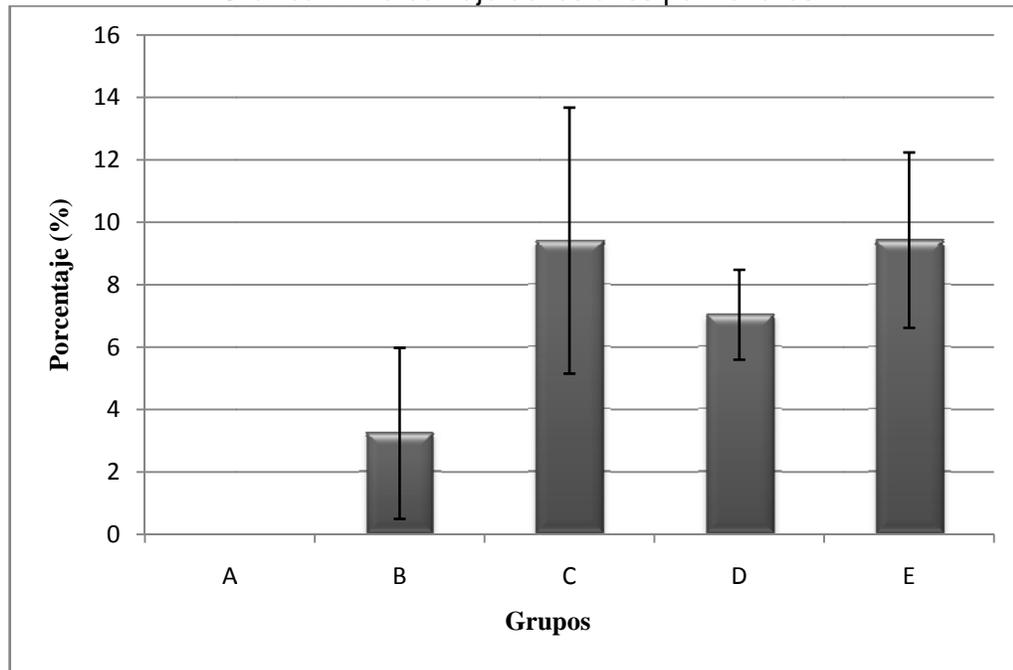
NOTA: Grupo A Control; Grupo B FB₁; Grupo C vPRRS; Grupo D vPRRS-FB₁; Grupo E FB₁-vPRRS

Los resultados de colesterol presente en el suero se muestran en la grafica 6. Donde el grupo A, no mostró elevación en sus niveles durante el experimento. El grupo B, presentó una elevación de 96 (mg/dl) en el segundo y tercer muestreo. El grupo C, no presentó cambios en sus niveles. En el grupo D, mostró un aumento gradual en sus niveles 86.7y 99.8 (mg/dl). El grupo E, manifestó en el segundo muestreo una elevación de 110 (mg/dl). Se presentaron diferencias significativas entre las medias ($P < 0.05$).

Grafica 6. Análisis de colesterol en suero de cerdos con diferentes tratamientos

4.7 Evaluación patológica

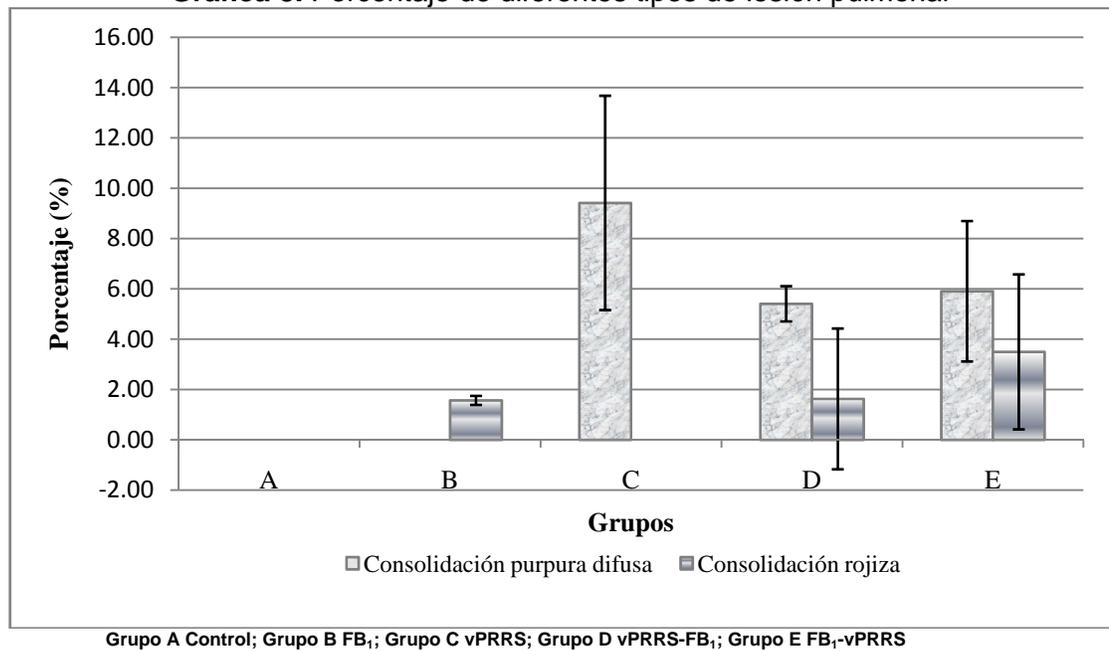
Al realizar la necropsia se hicieron observaciones de las lesiones pulmonares macroscópicas de cada uno de los cerdos. Estas lesiones se reportaron en porcentaje de lesión pulmonar como se muestra en la gráfica 7. El grupo A control negativo, no presentó cambios patológicos aparentes, el grupo B, presentó 3.24% lesiones pulmonares. Las lesiones desarrolladas en el grupo C, fueron de neumonía intersticial, mostrando color rojo grisáceo en lóbulos o difuso en el tejido pulmonar. Por otra parte las lesiones en los grupos C y E, presentaron valores promedio de 9.4 % respectivamente. El grupo D presentó 7.0% de lesión pulmonares totales.

Grafica 7. Porcentaje de lesiones pulmonares

Nota: Grupo A Control; Grupo B FB₁; Grupo C vPRRS; Grupo D vPRRS-FB₁; Grupo E FB₁-vPRRS

En la grafica 8 se observa el porcentaje de tipo de lesión pulmonar, el grupo B presentó consolidación rojiza con 1.4%, el grupo C mostró 9.42% de consolidación purpura difusa, en el grupo D presento 5.41% consolidación purpura difusa y 1.63% de consolidación rojiza, el grupo E mostró 5.91% consolidación purpura difusa y 3.50% de consolidación rojiza.

En hígado y riñón los grupos A, B, C, D, y E no mostraron cambios patológicos aparentes a la necropsia.

Grafica 8. Porcentaje de diferentes tipos de lesión pulmonar

En la fig. 4, se observa la consolidación rojiza, que presentó el grupo B, así como también los grupos D y E que fueron intoxicados con FB₁.

En la fig.5, se muestra la consolidación rojiza difusa, que presentaron los grupos C, D y E inoculados con vPRRS

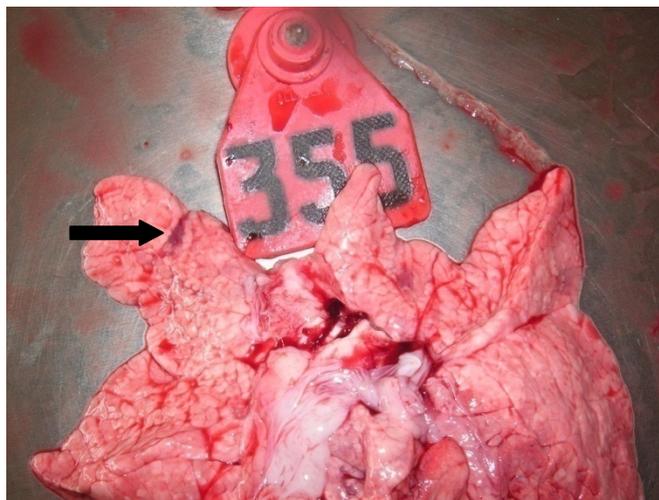


Fig. 4. Pulmón de lechón intoxicado con FB₁ mostrando consolidación rojiza

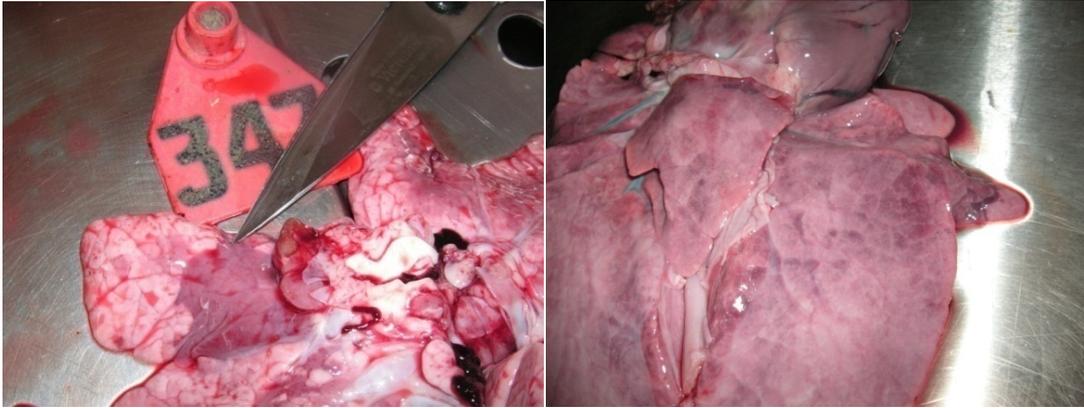


Fig. 5. Pulmón de lechón inoculado con vPRRS mostrando consolidación purpura difusa

4.8 Evaluación histopatología

Los resultados histopatológicos se muestran en el Cuadro 4. El grupo A no presentó cambios aparentes. El grupo B presentó en pulmón, ligera neumonía intersticial y solo un cerdo mostró congestión severa hemorrágica y algo de edema. En hígado, se observó poliploidia y cambio graso y el riñón presentó glomerulitis proliferativa, así como túbulos ciegos con poliploidia e infiltrado mononuclear.

El grupo C mostró en pulmón neumonía intersticial, atelectacia y alveolos limpios. Este grupo no presentó cambios en hígado y solo un cerdo presentó en riñón lesión intersticial con infiltrado mononuclear y lesión tubular.

En los grupo D y E presentaron lesiones en pulmón, de neumonía intersticial difusa moderada y neumonía intersticial difusa severa respectivamente y en hígado presentaron poliploidia y binucleadas en ambos grupos, en riñón mostraron glomerulitis proliferativa, nefrosis en reparación, túbulos ciegos con poliploidia e infiltrado mononuclear, estas lesiones se localizaron en contorneado proximal, tanto en el grupo D como en el grupo E.

Cuadro 4 . Estudio histológico

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E
Pulmón	No presentó cambios patológicos aparentes	Ligera neumonía Intersticial. Congestión en uno de los cortes y en otro severa congestión, hemorrágica y algo de edema	Neumonía intersticial, atelectacia, alvéolos limpios, escasos polimorfonucleares, BALT negativos o con escasa actividad	Neumonía intersticial difusa moderada, atelectacia y enfisema, hiperemia y ligera hemorragia con edema, alvéolos limpios con escasos macrófagos activados, escasos polimorfonucleares, BALT negativos o con escasa actividad. Un corte presento neumonía exudativa con abundante polimorfonucleares	Neumonía intersticial difusa severa, atelectacia y enfisema, hiperemia y ligera hemorragia, alvéolos limpios con escasos macrófagos activados, escasos polimorfonucleares, BALT negativos o con escasa actividad.
Hígado	No presentó cambios patológicos aparentes	Poliploidia y cambio graso	No presentó cambios	Poliploidia y binucleadas	Poliploidia y binucleadas
Riñón	No presentó cambios patológicos aparentes	Glomerulitis proliferativa, nefrosis en reparación, túbulos ciegos con poliploidia e infiltrado mononuclear, aparentemente la lesión se localiza en contorneado proximal	Solo en un lechón se observo lesión intersticial con infiltrado mononuclear, fibrosis y lesión tubular	Glomerulitis proliferativa, nefrosis en reparación, túbulos ciegos con poliploidia e infiltrado mononuclear, aparentemente la lesión se localiza en contorneado proximal	Glomerulitis proliferativa, nefrosis en reparación, túbulos ciegos con poliploidia e infiltrado mononuclear, aparentemente la lesión se localiza en contorneado proximal

Grupo A Control; Grupo B FB₁; Grupo C vPRRS; Grupo D vPRRS-FB₁; Grupo E FB₁-vPRRS

En pulmón la lesión predominante fue la neumonía intersticial, septos alveolares engrosados con infiltrado de mononucleares, con cambios vasculares (hiperemia, ligera hemorragia) y alvéolos limpios sin o con escasos macrófagos, en general no hubo actividad del BALT. al grupo A, no mostró cambios patológicos aparentes (SCPA) como se observa en la fig.6.

En la fig. 7 se observa dilatación de capilares alveolares de moderada a severa con distribución difusa y presencia, de un material eosinofilo, de escasa cantidad correspondiente a edema.

En la fig. 8 se observan septos alveolares engrosados con infiltrado mononuclear característico de neumonía intersticial, que presentó el grupo C

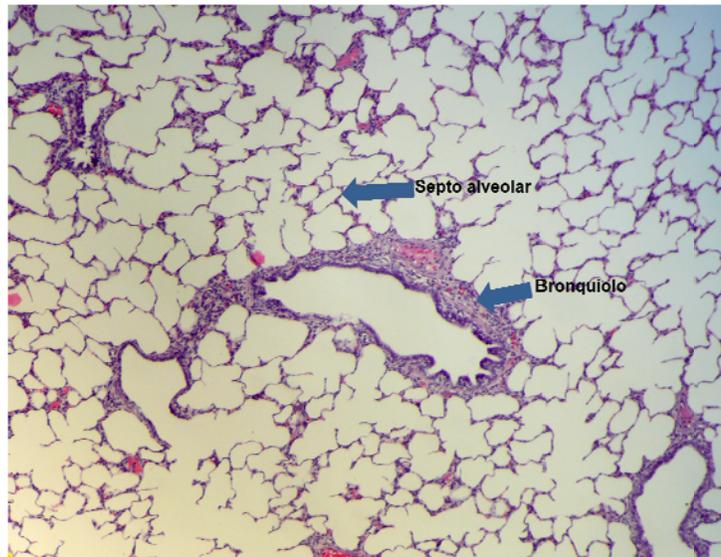


Fig. 6 Pulmón de lechón correspondiente al grupo A, sin cambios patológicos aparentes. 40X.

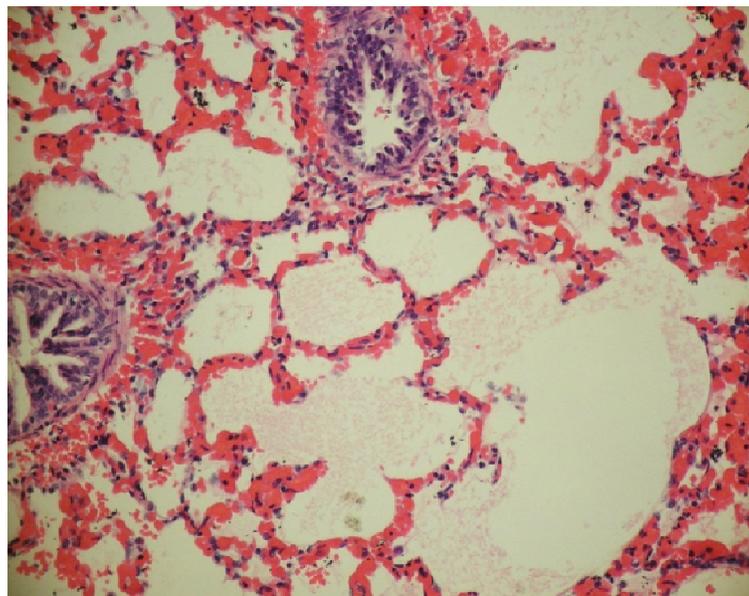


Fig. 7 Pulmón de lechón correspondiente al grupo B, intoxicado con FB₁ 12ppm vía oral por 18 días. 20X

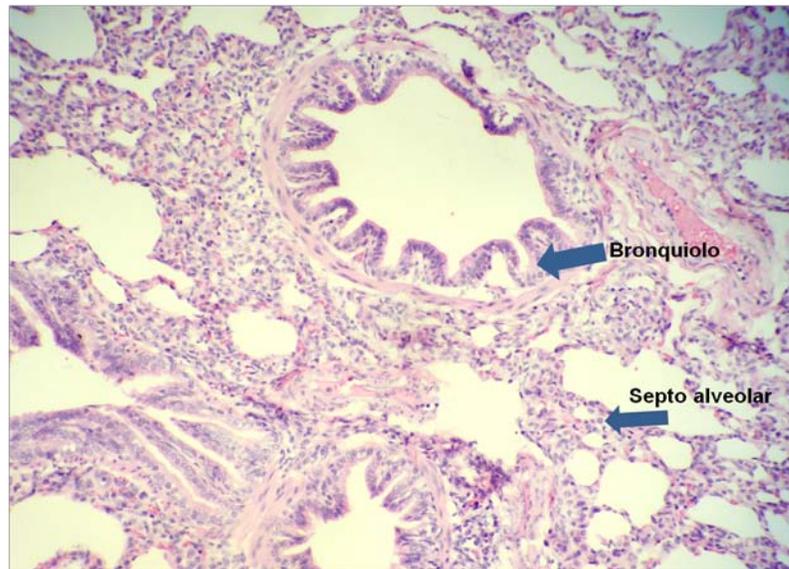


Fig. 8 Pulmón de lechón correspondiente al grupo C, inoculado con vPRRS 8 días después de iniciado el experimento

En el grupo D los lechones fueron tratados con vPRRS y FB₁, cabe enfatizar que en este grupo, tanto la toxina como el virus se administraron en el día 0, inicio del experimento, en este grupo se observó una neumonía intersticial difusa moderada (fig.9). Solo en un caso se presentó una complicación bacteriana con neumonía exudativa purulenta.

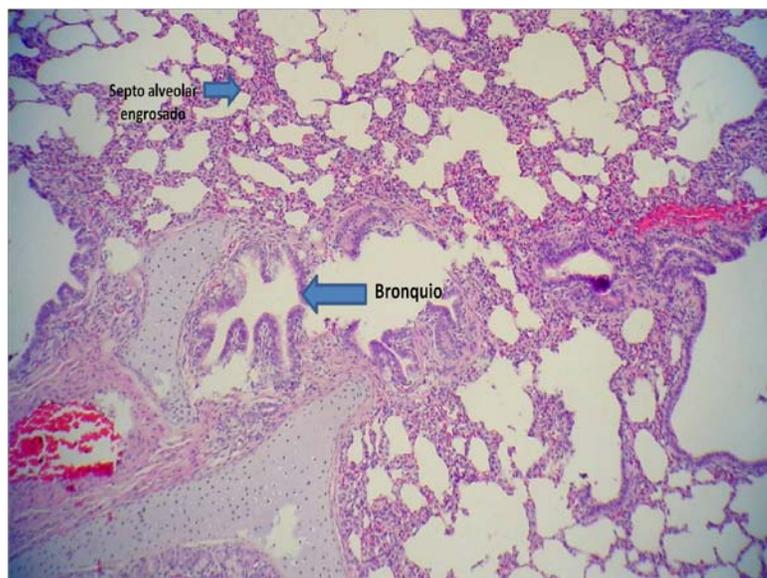


Fig. 9 Pulmón de lechón correspondiente al grupo D, inoculado con vPRRS e intoxicado con FB₁ 12ppm vía oral por 18 días.20X.

En el grupo E donde se administró primero FB_1 y 8 días después de iniciado el experimento se inoculó con vPRRS, mostró una lesión pulmonar intersticial difusa severa (fig.10)

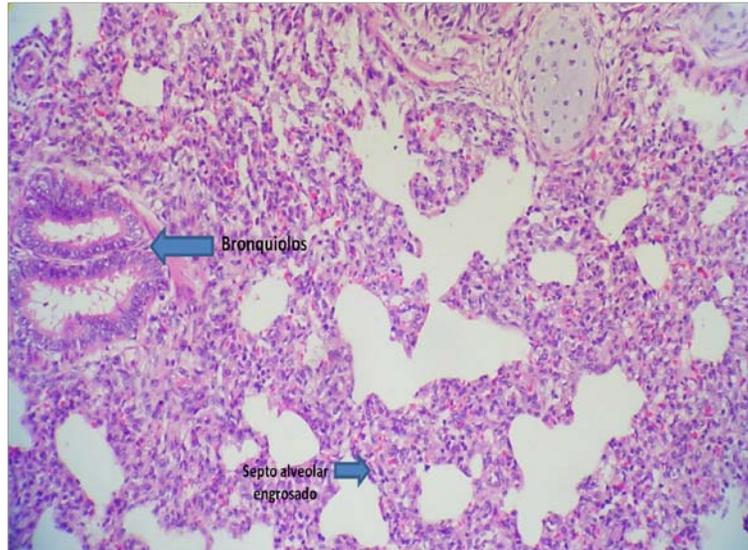


Fig. 10 Pulmón de lechón correspondiente al grupo E, intoxicado con FB_1 12ppm vía oral por 18 días e inoculado con vPRRS 8 días después de iniciado el experimento.

. La lesión renal, se caracterizó por que los túbulos presentaron células de citoplasma basófilo, sugerentes de células inmaduras de reparación, estos túbulos en forma más marcada presentaron poliploidía y en la mayoría de las lesiones observadas no presentaron luz (reparación aberrante, no funcional), se localizan próximos al glomérulo y en las áreas de tubos rectos interlobulillares, por lo que probablemente corresponden al túbulo contorneado proximal.

En la mayoría de los casos, se observó infiltrado de células mononucleares en asociación con estas partes dañadas de las nefronas. A nivel glomerular se observaron glomérulos hinchados, que sugieren glomerulitis proliferativa, también se observaron en menor frecuencia glomérulos reducidos de tamaño, retraídos y atróficos. Algunos cortes presentaron infiltrados de mononucleares intersticiales a nivel cortical y raramente a nivel medular. Estas lesiones fueron más notorias en los grupos B, D, E, pero no, en el grupo C.

En hígado la poliploidía y la abundancia de células binucleadas es sugestiva de un cuadro de micotoxicosis.

4.9. Prueba de RT-PCR

Los resultados obtenidos para comprobar la presencia del vPRRS mediante la técnica molecular de RT-PCR anidada fueron negativos para los grupos A control negativo y grupo B solo FB₁. Para los grupos C, D y E que fueron inoculados con vPRRS de acuerdo al diseño experimental, resultaron positivos.

1. DISCUSIÓN

Las micotoxinas provocan pérdidas económicas en las granjas por las diferentes afecciones que producen en los animales. Debido a que se encuentran presentes como contaminantes en una gran variedad de cereales con lo que se preparan las dietas para los animales. Dentro de las micotoxinas, las fumonisinas han sido asociadas con edema pulmonar porcino y leucoencefalomalacia equina (Rosiles, *et al.* 1996).

Los cereales en México y en otras partes del mundo que son utilizados en la elaboración de alimentos balanceados como el maíz, frecuentemente se encuentran contaminados con micotoxinas, en México son pocos los estudios realizados sobre la incidencia de fumonisinas en el maíz cosechado para consumo animal y humano (Robledo, *et al.* 2001), los niveles reportados son de 0.67-13.3ppm y de 0.5-6.8ppm (Figueroa, *et al.* 2007), mientras que la concentración de aflatoxinas en 21 países fijaron como límite máximo 5ppb y cinco países aceptan hasta 10ppb (FAO, 2004). La presencia de éstas micotoxinas en los granos es debido a que los hongos toxigénicos, pueden desarrollarse tanto en campo como en almacén (Moreno, *et al.* 1991).

En este estudio se realizó la determinación de la concentración de Aflatoxinas y FB₁, en el alimento comercial empleado para el consumo de los lechones, con el propósito de descartar la presencia de concentraciones altas de aflatoxinas y FB₁, y así poder interferir en el experimento.

Las concentraciones encontradas en el alimento empleado en el experimento tanto de aflatoxinas (3ppb) como de FB₁ (1ppm), fueron muy bajas y debido al corto tiempo de experimentación no en los animales experimentales. En el grupo A control negativo, donde solo recibió el alimento, no se encontraron lesiones macroscópicas ni microscópicas.

Con respecto, al registro de temperatura corporal mostraron que los grupos C, D y E, inoculados con el vPRRS, en el periodo de incubación desarrollaron elevación de temperatura en comparación con el grupo A control ($P < 0.05$), el grupo B, inoculado únicamente con FB₁, no presentó hiperemia. Estos resultados coinciden

con un estudio previamente reportado, donde cerdos tratados con dosis orales bajas (equivalente de 5-8 ppm) de Fumonisinias contenidas en el material de cultivo durante 20 días, presentaron temperaturas de 39.5-39.8°C (Halloy, *et al*, 2005). Por otro lado, en un estudio realizado por Rossow, *et al*, 1994, observaron un aumento de temperatura corporal en cerdos de 1, 4 y 10 semanas de edad inoculados, con vPRRS. Una de las características en cerdos destetados inoculados con vPRRS es el desarrollo de fiebre. Rossow, 1998. Esto concuerda con los resultados de este experimento.

Otro parámetro que se midió fue, el registro de peso corporal de los animales que se realizó, durante este estudio, mostró, una ganancia de peso equivalente a 29.61%, en el grupo A como era de esperarse, en la ecuación de predicción presentó una mayor pendiente ($m= 1.51$), lo que indica una mayor velocidad de aumento de peso. En el grupo C se observó una pendiente de 0.43 que indica una menor velocidad de aumento de peso, este valor puede ser debido a la dispersión de peso que se tuvo en el último día del experimento. Sin embargo, los grupos D y E presentaron una pendiente negativa ($m= -0.103$ y -0.37 respectivamente) indicando que había una pérdida de peso, que puede deberse al efecto del virus más la toxina sin importar el orden de inoculación.

Los valores del coeficiente R^2 fueron más elevados en el grupo A control negativo (0.883), por la menor variación del peso durante el estudio (desviaciones estándar de ± 0.57 a ± 1.0); la mayor ganancia en peso en promedio se presentó en el grupo A, con valor de 1.57 kg representando casi el 30% de aumento de su peso original, y la menor ganancia correspondió al los grupos D y E con una valor de -2.05% y

-2.34% respectivamente, estos resultados concuerdan con lo reportado, en la literatura, ya que tanto el vPRRS como la FB_1 , provocan una pérdida de peso en los animales afectados (Harrison, *et al*. 1990; Sierra, *et al*. 2000). Se ha reportado que a dosis de 1, 5, 10 así como de 20 y 40 ppm (mg/kg de alimento) de FB_1 , no se presenta efecto en la ganancia de peso en cerdos con pesos iniciales de 8.5-10kg (Zomborszky, *et al.*, 2000; 2002).

En este estudio aunque no se observaron ganancias de pesos en los grupos tratados con virus y micotoxina, los resultados fueron sugestivos de un efecto sobre los animales.

Por otra parte los cambios en algunos parámetros bioquímicos en suero, se ha establecido que aparecen elevados, casi siempre, en la segunda semana de la presencia del efecto tóxico (Zombrosky, *et al.* 2000).

En este estudio los resultados de la evaluación de la presencia de AST (aspartato-amino transferasa) en suero, mostraron, en el grupo B, tratado solo con FB₁, un incremento de actividad de 110 a 174 U/L y el grupo E tratado con FB₁ y vPRRS mostró un aumento de 147 a 202 U/L, proporcional al tiempo de exposición de la FB₁, esto coincide con lo reportado por Zombrosky, *et al.* 2002, quienes investigaron el efecto de la dosis de FB₁ con respecto al tiempo, encontrando que AST incrementó su actividad (86-90 U/L) en animales tratados con 10 ppm de FB₁, este incremento se manifiesta mejor en tratamientos con mayor tiempo de exposición a la toxina. Haschek, *et a.* / 2001, también observaron un incremento de la actividad de AST por la presencia de FB₁.

En este experimento se sugiere que el incremento de actividad de la AST esta relacionado con daño hepático, este incremento varia dependiendo de la dosis administrada (Wilfried and Ulrich, 2000), sin embargo en este estudio no se observaron lesiones patológicas hepáticas, pero si se mostró un incremento en la actividad de AST.

En la evaluación de la ALT (alanino-amino trasferasa) en suero, se observó un incremento de actividad en los grupos B, D y E (179, 153 y 168 respectivamente) posteriormente una baja de ésta, excepto el grupo E que mantuvo el incremento de actividad con un valor de 168 U/L, este comportamiento coincide con lo reportado (Zombrosky, *et al.* 2000; 2002; Haschek, *et al.* 2001), de igual manera que AST, va a depender de la dosis y tiempo de exposición. También es un indicador de daño hepático, si bien, no se encontraron lesiones hepáticas, se observó un incremento de la ALT en los grupos donde estuvo presente la FB₁.

En la evaluación del incremento de actividad de la GGT (gamma glutamil-transferasa), los grupos B, D y E mostraron un incremento en los niveles, estos grupos fueron tratados con FB₁, lo que coincide con lo reportado (Zombrosky, *et al.* 2000; 2002; Haschek, *et al.* 2001). Su actividad aumenta solo en afecciones hepáticas y de los conductos biliares

En este perfil enzimático se puede observar que las actividades de las diferentes enzimas no evolucionan en forma uniforme, en una afección hepática la actividad de AST es diferente a la observada en ALT, por el contrario la GGT reacciona más lento y esta actividad se presentó sin mostrar cambios patológicos, lo que nos sugiere el inicio de una lesión.

En la determinación de colesterol en suero los grupos B y D presentaron un incremento en sus niveles hasta el final del experimento, el grupo E presentó en el segundo muestreo el nivel más alto de todos los grupos, sin embargo, en el tercer muestreo disminuyó su valor. El aumento de los niveles de colesterol es un indicador de una toxicosis por la presencia de FB₁. (Haschek, *et al.* 2001). Sin embargo el perfil enzimático y determinación de colesterol pueden ser empleados como indicadores inespecíficos de la toxicosis por fumonisina (Velázquez, 2007). No obstante, a pesar de haber empleado en este estudio, una dosis baja de FB₁ (12ppm) en un periodo corto (18 días), se pudo observar el efecto de ésta en los cerdos tratados.

En cuanto a porcentaje de lesiones pulmonares, en el grupo C la presencia del vPRRS mostró valores promedio de 9.4%, comportamiento similar fue observado en el grupo E con la presencia del vPRRS y la FB₁ provocaron lesiones con un porcentaje de 9.4%. Esto indica que el vPRRS por si solo, provoca el mismo porcentaje de daño que cuando esta acompañado de FB₁.

En el porcentaje de los diferentes tipos de lesión, se presentaron dos diferentes lesiones, consolidación purpura difusa y consolidación rojiza. Los cerdos del grupo C inoculados únicamente con vPRRS, así como cerdos de los grupos D y E que también fueron infectados con vPRRS mostraron lesiones pulmonares de consolidación purpura difusa en lóbulos, comparado con el color rosa del pulmón

del grupo A control. Estas lesiones presentadas causadas por el vPRRS concuerda con lo reportado por Halbur, *et al*, 1996; Rossow, 1998; Thacker, *et al*. 1999; Harms, *et al*. 2001.

La consolidación rojiza solo se mostró donde estuvo presente la FB₁ (grupo B, D y E). Este efecto sugiere, que la FB₁ quizá pueda ser el promotor del desarrollo en el daño de consolidación rojiza, muy similar a los producidos por agentes bacterianos, sin embargo no se aisló ningún agente bacteriano, por lo que se podría pensar que la FB₁ sea capaz de producir estas lesiones. En el grupo D, se observó que el vPRRS, en la primera etapa se replicó provocando lesiones, por lo que el efecto de daño de la FB₁ fue menor comparado con el grupo B. Sin embargo en el grupo E, donde se administró en el día 0 la FB₁ y 8 días después se inoculó el vPRRS, mostró mayor porcentaje del efecto de consolidación rojiza comparado con el grupo D, alcanzando el mismo porcentaje que en el grupo B. Por lo que se puede pensar que si influye el orden de inoculación del virus y la micotoxina para el desarrollo de lesiones pulmonares.

En relación a los signos clínicos se observó que el grupo C, presentó signos moderados, anorexia, depresión, postración, disnea, pelo áspero, parpados hinchados, los cerdos de los grupos D y E presentaron los mismos signos de leves a moderados, estos signos son similares a lo reportado por Fraile, 2004. La presentación clínica de la infección del vPRRS depende de la edad del cerdo infectado, usualmente pueden variar de un día a otro, incrementándose la anorexia al paso del tiempo (Goyal, 1993). En un estudio realizado por Rossow, *et al*. 1994 observaron que los parpados hinchados ó edema periocular es un signo clínico presente en cerdos jóvenes expuestos a vPRRS, ellos mencionan que el edema puede ser causado por un incremento en la permeabilidad local ó por un incremento en la presión linfática eferente secundaria a la linfadenopatía regional.

Por otra parte, microscópicamente, las lesiones pulmonares encontradas a la necropsia en los grupos donde se inoculó el vPRRS (C, D y E), mostraron neumonía intersticial, que es característico de este síndrome, como lo refiere

Ramírez, *et al.* 2006. La lesión en pulmón por vPRRS puede variar cuantitativamente en severidad, pero son similares cualitativamente (Rossow, 1998). En el grupo B, se presentó una ligera neumonía intersticial, caracterizada por un ligero engrosamiento de los septos alveolares por macrófagos, estas observaciones concuerdan lo descrito por Halloy, 2005. La lesión más severa se observó en el grupo E, cuando los animales se intoxicaron con FB₁ y posteriormente fueron inoculados con vPRRS, lo cual se pudo deber a que una de las alteraciones causadas por la fumonisinas es la inmunodepresión, favoreciendo que el virus se desarrollara y causara una lesión más severa. Como lo refiere Gimeno, 2008, la asociación del consumo de alimento contaminado con más de 20ppm de FB₁ con la aparición de la enfermedad del PRRS, en 8 grupos de animales que presentaron signos clínicos de la enfermedad del vPRRS.

Esto nos lleva a pensar que la intoxicación con fumonisina puede provocar susceptibilidad a infecciones por otros microorganismos como es el estudio de Hall, *et al.* 1990, donde observaron los signos clínicos característicos de neumonía en animales tratados con micotoxinas e infectados con *P. multocida*. Oswald *et al.* 2003; 2005, demostraron que la administración oral de purificado FB₁ aumenta la susceptibilidad de los lechones a la infección experimental con cepa patógena de *Escherichia coli*, esta susceptibilidad se asoció con la disminución de los niveles de ARNm codificado para IL-8 en el íleon de los cerdos tratados FB₁. Investigaron el efecto de la exposición oral con fumonisina, sobre la inflamación de pulmones causada por *P. multocida*, la ingestión del extracto de micotoxinas aumentó la expresión de IL-18 y RNAm de IFN- γ , comparado con la infección con *P. multocida* se observó un aumento de la expresión de TNF- α . La combinación de tratamiento con fumonisina y *P. multocida*. se tuvo expresión de RNAm para TNF- α , IFN- γ e IL-18 y se observó un aumento significativo lesiones pulmonares principalmente neumonía intersticial subaguda en estos animales, por lo que demostró que la fumonisina es también un agente que predisponen al desarrollo de neumonía causada por *P. multocida*. No se conoce el mecanismo por el cual la

FB₁ en cerdos predispone a patologías pulmonares inducidas por *P.multocida* (Halloy, *et al.* 2005), sin embargo, puede estar relacionado con la capacidad de la FB₁ de inhibir macrófagos intravasculares pulmonares para eliminar partículas y bacterias de la circulación (Smith, *et al.* 1996). Estudios *in vitro*, evidencian que las fumonisinas influyen en la respuesta inflamatoria, para ello se incubaron macrófagos alveolares pulmonares con FB₁ provocando a una reducción significativa del número de células viables (Liu *et al.*, 2002). Alternativamente, la vulnerabilidad del endotelio capilar pulmonar porcino a la toxina (Gumprecht *et al.* 2001) puede dar lugar a daños pulmonares e iniciar un proceso inflamatorio pulmonar que se incrementa por la infección bacteriana. El papel de las micotoxinas como co-factores para el desarrollo circovirus porcino tipo 2 (PCV2) ha sido especulado (Burch y Rowsell, 2001). Un estudio *in vitro* con células SK-6 infectadas con PCV2 y desafiadas con FB₁, observaron que la FB₁ estimula inicialmente la replicación de PCV2, así como la inducción de apoptosis (Bauerman *et al.* 2008)

Las fumonisinas en cerdos provocan hepatotoxicosis, edema pulmonar, problemas cardiacos, problemas renales e inmunosupresión (Gimeno, 2008), disminución en el consumo de alimento, ganancia de peso vivo, índice de conversión (Harrison, *et al.* 1990, Hascheck, *et al.* 2001). Hay que considerar que el efecto toxico de FB₁ va a depender de la concentración, por consiguiente, diferentes grados de contaminación pueden presentar diferentes alteraciones en el cerdo. Los resultados mostrados en este estudio, con una dosis baja de 12ppm de FB₁ y tiempo de exposición corto, se observaron menores ganancias de peso, así como los cambios patológicos macroscópicos en pulmón fueron de leves a moderados. No obstante, sí se presentaron cambios histopatológicos, en pulmón, hígado y riñón.

Sin embargo ha sido reportado previamente por Zomborszky, *et al.* 2000, que cerdos destetados, alimentados con dietas conteniendo FB₁ en concentraciones de 10, 20, 40 mg/kg de alimento por 4 semanas, muestran un problema ligero de

edema pulmonar con dosis bajas, sin embargo, los animales que consumieron alimento con dosis altas de 40mg/kg de FB₁, presentaron problemas severos de edema pulmonar. Esto concuerda con nuestros resultados obtenidos bajo el diseño experimental planteado, empleando una dosis baja de FB₁ (12ppm) por 3 semanas (18 días) y solo dos cerdos manifestaron un ligero edema pulmonar, por lo tanto no todos los cerdos del grupo B, tratado de igual manera presentaron la misma severidad del daño ocasionado por la FB₁, como se pudo observar. El tiempo fue corto y la concentración baja, esto fue debido a que se administró al mismo tiempo que el vPRRS que tiene actividad de daño en un tiempo corto, los animales empezaron a deteriorarse y a morir, por lo tanto se sacrificaron todos los animales de todos los grupos.

Por otra parte, en este estudio, las lesiones observadas a nivel histológico en riñón en los grupos B, D y E, son sugestivas de procesos tóxicos, aparentemente en túbulo contorneado proximal, que se pueden relacionar con la presencia de FB₁, de los cuales no hay reportes previos en cerdos, solo en roedores (Riley, *et al.* 2006), por lo que se sugiere realizar trabajos enfocados a evaluar este efecto. Los cambios observados, podrían ser más severos y extensos con dosis más altas y explicar en forma crónica el edema pulmonar que no se observó claramente en este trabajo. Se sugiere por los resultados que la glomerulonefritis y el vPRRS pueden conducir a una hipoproteínemia por lo tanto al desarrollo de edema.

En el grupo C, donde solo se trataron con vPRRS también se observaron lesiones renales, lo que fue notorio ya que no es común la presencia de estas alteraciones en esta patología. Cooper, *et al.* 1997, reportaron lesiones renales asociadas con la infección del vPRRS, mostrando infiltrado inflamatorio observado en la corteza renal y medular, así como cambios vasculares renales.

Los resultados que determinaron la presencia del vPRRS mediante la RT-PCR anidada fueron negativos para los grupos A control negativo y grupo B control de FB₁. Sin embargo para los grupos C, D y E fueron positivos debido a que todos fueron inoculados con el vPRRS, estos resultados concuerda con el diseño experimental planteado.

Este trabajo se enfocó a evaluar el comportamiento en conjunto de FB₁ y vPRRS en cerdos, el cual mostró una correlación entre FB₁ – vPRRS, que fue el objetivo general de este estudio. Se observó que al estar presente el virus y la micotoxina, provocaron alteraciones en las ganancias de peso, elevación de temperatura corporal, incremento de los niveles enzimáticos hepáticos indicativo de daño por la presencia de FB₁. No se observaron lesiones macroscópicas en hígado y riñón, pero histológicamente sí, lo que nos sugiere que la concentración de FB₁, empleada para intoxicar a los cerdos fue muy baja y el tiempo de exposición muy corto; estas dos variables son muy importantes para poder definir la toxicidad por FB₁. Sin embargo, la concentración de dosis infectiva del virus empleada para producir la enfermedad en los cerdos sí fue suficiente para poder desarrollar la enfermedad y observar las afecciones por esta.

De acuerdo a lo anterior se puede decir que sí se cumplieron los objetivos planteados en este trabajo.

CONCLUSIONES

El interés de la presente tesis se centró en estudiar el comportamiento de la FB₁ en presencia del vPRRS, donde se llegó a las siguientes conclusiones:

- ❖ En el registro de temperatura corporal, los grupos C, D y E inoculados con vPRRS desarrollaron elevación de temperatura en comparación con el grupo A control.
- ❖ En la evaluación de ganancia de peso, el grupo D y E, presentaron pendientes negativas, indicando una pérdida de peso, que puede asumirse al efecto del virus más la micotoxina.
- ❖ Se observó un aumento a partir del día 8 en los niveles de AST en suero, en el grupo B, tratado solo con FB₁ y en el grupo E tratado con FB₁ y vPRRS, el incremento fue proporcional al tiempo de tratamiento. En este experimento se sugiere que el incremento de actividad de la AST está relacionado con daño hepático, debido a la presencia de FB₁, sin embargo en este estudio no se observaron lesiones patológicas hepáticas, pero sí se mostró un incremento en la actividad de AST.
- ❖ Se observó un aumento en los niveles de ALT en suero, en los grupos B, D y E, en el día 8, sin embargo el que se mantuvo en incremento hasta el final del experimento fue solo el grupo E, de igual manera que AST, también es un indicador de daño hepático, si bien, no se encontraron lesiones hepáticas, se observó un incremento de la ALT en los grupos donde estuvo presente la FB₁.
- ❖ Los niveles de GGT en suero se incrementaron en los grupos B, D y E, que fueron tratados con FB₁.

- ❖ Los niveles de colesterol en suero se incrementaron en los grupos B, D y E, este parámetro es un indicador de una toxicosis por la presencia de FB₁.
- ❖ El incremento de enzimas hepáticas como son AST, ALT, GGT así como la determinación de colesterol pueden ser empleados como indicadores inespecíficos de la toxicosis por FB₁, aunque este incremento se manifiesta mejor en tratamientos con mayor tiempo de exposición a la FB₁ y concentraciones más altas.
- ❖ En lo que respecta al porcentaje de lesiones pulmonares, el grupo C tratado únicamente con vPRRS por si solo presentó mayor porcentaje. El grupo E tratado con vPRRS y FB₁ mostró el mismo comportamiento que el grupo C.
- ❖ La lesión de consolidación rojiza solo se presentó, donde estuvo presente la FB₁ (grupos B, D y E), lo que sugiere que la FB₁, quizá pueda ser el promotor del desarrollo de este tipo de lesión.
- ❖ En el grupo E tratado con FB₁ y 8 días después se inoculó con vPRRS, mostró mayor porcentaje de consolidación rojiza, comparado con el grupo D tratado con FB₁ y vPRRS al mismo tiempo, lo que se puede pensar que si influye el orden de inoculación del virus y la micotoxina.
- ❖ Los signos clínicos observados, fueron característicos de la afección por vPRRS en los grupos C, D y E.
- ❖ Microscópicamente se presentaron lesiones pulmonares de neumonía intersticial en los grupos tratados con vPRRS, así como en el grupo B tratado solo con FB₁ siendo esta neumonía intersticial ligera.

- ❖ En los grupos B, D y E se observaron en hígado células binucleadas y poliploidia, que son células mal formadas, que pueden desencadenar una neoplasia y puede, ser causadas por la micotoxina.
- ❖ Las lesiones histológicas de riñón, en los grupos B, D y E son sugestivas de proceso tóxicos que se pueden relacionar con la presencia de FB₁. No hay reportes previos en cerdos con relación al daño renal por lo que se sugiere realizar trabajos enfocados a evaluar este efecto.
- ❖ El grupo C tratado solo con vPRRS presentó lesiones en riñón, no es común la presencia de estas alteraciones en esta patología.
- ❖ Con respecto a la prueba de RT-PCR anidada, reveló que los grupos C, D y E fueron positivos a vPRRS lo que concuerda con el diseño experimental.

7.0 REFERENCIAS CITADAS

- Alonso Díez AJ, González Montaña JR, Rejas López J. 2002. Micotoxinas en rumiantes. Un problema apasado y presente. *Congreso de la Sociedad Española de Medicina Interna Veterinaria*. León: Universidad de León, p.p. 66-81. ISBN 84-7719-810-1.
- Árpád. B and Radomir, L., 1999. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Food Science and Technology*. 10: 223-228.
- Bailly J.D., G. Benard., J.Y. Jouglar., S. Duran and P. Guerre. 2001. Toxicity of *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B1 in ducks. *Toxicology*. 163: 11-22.
- Basto, E.G., Williams, J.J., Alzina, L.A., Pech, M.V. 2004. Determinación del costo de desecho de marranas de auto reemplazo seropositivas a PRRS en una granja del estado de Yucatán. *Téc. Pecu. Méx.* 42 (2): 295-301.
- Bauerman, V.F., Simon, L.N., Conceicao, C.J., Viancelli, A., Mallmann, A.C., Ciacci-Zanella, J. Analysis of the effect of fumonisin B1 in porcine circovirus type 2 (PCV2) replication and induction of apoptosis *in vitro*. 2008. Proceeding of the 20th IPVS congress, Durban, Southafrica 22-26 June. Pag. 249.
- Bravo, M.M. 2007. Evaluación Hematológica e histopatológica de cerdos inoculados con el virus del síndrome respiratorio y reproductivo (PRRSv) y de cerdos contacto. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Concepción. Chillan-Chile.
- Burch, D.G.S. and Rowsell, C. 2001. The role of mycotoxins in PMWS-Fact or fiction *The Pig Journal*. 48: 142-147
- Bouhet, S., Hourcade, E., Loiseau, N., Fikry, A., Martínez, S., Roselli, M., Galtier, P., Mengheri, E., Oswald, I.P. 2004. The mycotoxin fumonisin B1 alters the proliferation and the barrier function of porcine intestinal epithelial cells. *Toxicol. Sci.* 77(1): 165-171. Epub. 2003. Nov. 4
- Bullerman, L. B. 1996. Occurrence of fusarium and fumonisins on food grains and in foods. *Adv. Exp. Med. Biol.* 392, 27-38.
- Bolger, M., Coker, R. D., Dinovi, M., Gaylor, D., Gelderblom, M. O., Paster, N., Riley, R. T., Shephard, G., and Speijers, J. A. 200. Fumonisin. In *Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, paper 74. World Health Organization Food Additives, series 47, 103-279.
- Brook, P.J. y White, E.P. 1966. Fungus toxins affecting mammals. *Ann. Rev. Phytopath.* 4: 171-194.

- Christensen, C.M. and Kaufmann, H.H. 1969. Grain storage. The role of storage fungi in quality loss. University of Minnesota Press. Minneapolis. Minn. 153.
- Christensen, C.M; and D.B. Sauer, 1982. Microflora in Storage of Cereal Grains and their Products. Ed. American Association of Cereal Chemists. St. Paul MN. Pp 219-240.
- Christianson, W.T., Choi, C.S., Collins, J.E., Molitor, T.W., Morrison, R.B. and Joo, H.S. 1993. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses. *Can.J.Vet.Res.* 57(4): 262-268.
- Chulze, S.N., M.L. Ramirez; M.C. Farnochi., M. Pascale and G. Visconti. 1996. *Fusarium* and fumonisin occurrence in Argentinian corn at different ear maturity stage. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2797-2801.
- Ciprián A., Pijoan C., Cruz T., Camacho J., Tórtora J., Colmenares G., López R.R., De la Garza M., 1988. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida pneumonia*. *Can.J.Vet.Res.* 52: 434-458.
- Collins J. E; Benfield D. A. and Christianson W; 1992. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (Isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs *Journal Veterinary Diagnostic Invest.* 11(4):117-119.
- Colvin, B.M.; Cooley, A.J. and Beaver, R.W. 1993. Fumonisin toxicosis in swine. *J Vet Diagn Invest.* 5:232-241.
- Constable P.D., Smith G.W., Rottinghaus G.E., Tumbleson M.E. and Haschek W.M., 2003. Fumonisin-induced blockade of ceramide synthase in sphingolipid biosynthetic pathway alters aortic input impedance spectrum of pigs. *AJP-Heart Circ Physiol.* Vol.284: H2034-H2044
- Conzelman, K.K.; Visser, N; van Woensel, P and Thiel H.J. 1993. Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus a member of the arterivirus group. *Virology.* 193: 329- 339.
- Cooper, V.L., Hesse, R.A., Doster, A.R. 1997. Renal lesions associated with experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS) infection. *J.Vet.Diagn.Invest.* 9: 198-201.
- Correa, G.P., Coba, A.M., Weimersheimer, J., Anaya, E.A.M., Millian, F., Canto, J. 1994. Presence of antibodies against pig abortion and respiratory syndrome (PEARS) in imported and native pigs from several areas of México. The 13th International pig veterinary society congress. Bangkok, Thailand.

- Coulombe R.A. 1993. Biological action of micotoxins. J. Dairy Sci. 76: 880-891.
- Cuartero, L. 2000. Relationship between clinical signs and porcine reproductive and respiratory syndrome virus serum titers in an acute field outbreak. Thesis in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science. University of Minnesota.
- D'Mello. J.P.F and Macdonald A.M.C. 1997. Mycotoxins. Animal Feed Science and Technology. 69: 155-166
- D'Mello J.P.F., C.M. Placinta., A.M.C. Macdonald. 1999. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implication for animal health, welfare and productivity. Animal Feed Science and technology 80: 183-205.
- Done S. H. 1995. Síndrome Reproductivo y Respiratorio del porcino (PRRS). Pigs-Misset pag.12-15.
- Done, S.H and Paton D. J; 1995. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) Veterinary Record 136(14):32-35.
- FAO/OMS/PMA. 1999. Tercera Conferencia Internacional FAO/OMS/PMA sobre Micotoxinas. Túnez 3-6 de marzo
- FAO. 2004. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO Food and Nutrition paper 81. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome,2004.
- Figuroa, G.R.M., Reynoso,M.M., Reyes, V.W.P. 2007. Control del crecimiento y producción de fumonisinas por *Fusarium verticillioides* usando butilhidroxianisol bajo diferentes condiciones de actividad de agua. Scientia-CUCBA. 9 (1):23-30.
- Fraile,S.L. 2004. Neumonía vírica producida por el virus del Síndrome Reproductivo Respiratorio Porcino. Ed. Lleida. www.Exopol.com
- García, A.R., Rodríguez, V.P., Kukielka, D.K. 2007. Aplicación de la RT-PCR en tiempo real para el Diagnóstico de PRRS. RCCV. 1(2): 646-653.
- Gimeno, A. 2002. Revisión Genérica del Problema de los Hongos y las Micotoxinas en la Alimentación Animal. www.mycotoxin.com ; www.engormix.com
- Gimeno, A. 1984. Determination of citrinin in corn and barley on thin layer chromatographic plates impregnated with glycolic acid. J.Assoc. Off. Anal. Chem. 67(1) 194-196.
- Gimeno, A. 1991. VII Curso de especialización en Nutrición y Patología. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. E.T.S. Ingenieros Agronomos,. Madrid 30 y 31 de mayo. Pp 1-33

- Gimeno, A. y Martins ML. 2001. XVII Seminario G-TEMCAL organizado por G-TEMCAL/DANONE, Lisboa Portugal y publicado en www.mycotoxin.com ; www.engormix.com
- Gimeno, A. 2008. Las fumonisinas y sus efectos indeseables en la producción porcina. www.mycotoxin.com ; www.engormix.com
- Gumprecht, L.A., Beasley, V.R., Weigel, R.M., Parker, H.M., Tumbleson, M.E., Bacon, C.W., Meredith, F.I., Haschek, W.M. 1998. Development of fumonisin-induced hepatotoxicity and pulmonary edema in orally dosed swine: morphological and biochemical alterations. *Toxicol Pathol.* 26 (6): 777-788.
- Gumprecht, L.A.; Smith, G.W.; Constable, P.C.; Haschek, W.M. 2001. Species and organ specificity of fumonisin-induced endothelial alterations: Potential role in porcine pulmonary Edema. *Toxicology.* 160: 71-79.
- Gordon S.S., W.F.O. Marasas., N.L. Leggott., H. Yazdanpanah., H. Rahimian and N. Safari. 2000. Natural occurrence of fumonisin in corn from Iran. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1860-1864.
- Goyal, S.M. 1993. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *J.Vet.Diagn.Invest.* 5: 657-664.
- Hall, W.F., Bane, D.P., Kilroy, C.R., Essex-Sorlie, D.L. 1990. A model for the induction of *Pasteurella multocida* type-A pneumonia in pigs. *Can. J. Vet. Res.* 54: 238-243
- Halloy, D.J., Gustin, P.G., Bouhet, S., Oswald, I.P. 2005. Oral exposure to culture material extract containing fumonisins predisposes swine to the development of pneumonitis caused by *Pasterella multocida*. *Toxicology.* Sep. 15; 213(1-2): 34-44.
- Halbur, P.G., Prem, S.P., Meng, X.J., Lum, M.A., Andrews, J.J., Rathje, J.A. 1996. Comparative pathogenicity of nine US porcine reproductive and respiratory.
- Hamilton P.B. 1976. Effect of aflatoxin on animals and the relationship with nutrition. *Feedstuffs.* 48: 22-23.
- Harms, P.A., Sorden, S.D., Halbur, P.G., Bolin, S.R., Lager, K.M., Morozov, I. and Paul P.S. 2001. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet.Pathol.* 38: 528-539.
- Harrison, L.R., Colvin, B.M., Greene, J.T., Newman, L.E., Jr. Cole, J.R. 1990. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisina B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *J.Vet.Diagn.Invest.* 2: 217-221.

- Haschek,W.M.; Moetlin,G.;Ness,D.K.; Harlin,K.S.; Hall, W.F.; Vesonder, R.F.; Peterson, R.E. and Beasley,V.R. 1992. Characterization of fumonisin toxicity in orally and intravenously dosed swine. *Mycopathologia*. 117:83-96.
- Haschek,W.M; Gumprecht, L.A.; Smith, G.; Tumbleson M.E., Constable P.D. 2001. Fumonisin toxicosis in swine: An Overview of porcine pulmonary edema and current perspectives. *Environmental Health Perspectives*. 109:supplement 2: 251-257.
- Hill, H. 1990. Overview and history of mystery swine disease (swine infertility/respiratory syndrome). *Proceeding of Mystery Swine Disease Committee Meeting, Livestock conservation Institute, Denver, Co.* pp. 29-31.
- Hooper S. A; White M. E. and Twiddy, N;1992 An out break of blue-eared pig disease (porcine reproductive and respiratory Syndrome) in four pig herds in Great Britain *Veterinary Record* 131(7):140-144.
- Hooper C. C; Alstine, Van, W. G; Stevenson, W.G. and Kanitz C. L: 1994 Mice and rats (laboratory and feral) are not a reservoir for PRRS virus. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation* 6:13-15.
- Jelinek, C.F; A.E. Pohland and G.E. Wood. 1989. Worldwidw occurrence of mycotoxins in foods and feeds an update. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72: 223-230.
- Juszkiewicz T, Piskorska-Pliszczynska J. 1992. Occurrence of mycotoxins in animal feeds. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 11(4):211-5.
- Kim, H.S., Kwang, J., Yoon, I.J., Joo,H.S. and Frey, M.L. 1993. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch.Virol.* 133: 477-483.
- Lino, C.M.; Silva, L.J.G.; Pena, A.S. (2004). "Fumonisin: presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativos" *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 99:181-192.
- Liu, B.H., Yu, F.Y., Chan, M.H., Yang, Y.L. 2002. The effect of mycotoxins, fumonisin B1 and aflatoxin B1, on primary swine alveolar macrophages. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 180: 197-204.
- Loste A., Sáez T., Ramos J.J., Fernández A. 2002. Principal micotoxicosis en el ganado ovino. *Pequeños rumiantes*. 3,3; 8-12.
- Macías, M.J., Placencia, Y.G., Osorio, F., Saavedra, P.A., Leyva, R.J., Hernández, J. 2006. Aislamiento y caracterización del gen ORF5 del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) en México.*Vet.Méx.* 37(2): 197-208.

- Magar R; Robinson Y; Dubuc C and Laroche R. 1995 Evaluation of the persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pig carcasses. *Veterinary Record* 137:559-561.
- Mallmann, C.A.; Dilkin, P. (2007). "Fumonisin" en *Micotoxinas e Micotoxicoses em Suínos*. Sociedade Vicente Pallotti- Editora, Santa Maria, Brasil. pp.105-127.
- Marasas, W.F.O. 2001. Discovery and occurrence of the fumonisins: A historical perspective. *Environmental Health Perspectives*. 109 (2): 239-243.
- Mayes, P.A. 1988. Metabolism of acylglycerols and sphingolipids in: Murray, R.K., Granner, D.K. Mayes, P.A. and Rodwell, V.W. (eds) *Harper's Biochemistry*. 21 ed. Appleton and Lange Norwalk, pp. 218-225.
- Mengeling W. L; Vorwald A. C; Lager K. M and Brockmeir S. L. 1996 Comparison among strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus for their ability to cause reproductive failure. *Am. J. Vet. Res.* 57(6):834-839.
- Meulenberg, J.J.M., Besten, A.P.D., Kluyver, E.P.D., Moormann, R.J., Schaaper, W.M and Wensvoort. 1995. Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 Lelystad virus. *Virology*. 206: 155-163
- Meulenberg, J.J.M and Besten, A.P.D. 1996. Identification and characterization of sixth structural protein of Lelystad virus: the glycoprotein GP2 encoded by ORF2 in incorporated in virus particles. *Virology*. 255: 44-51
- Meulenberg J.J.M. 1998. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) molecular characterization of the agent. In proceeding of the 15^a IPVS Congress, Birmingham, England. Pp 143-147.
- Moreno M.E. y M.G. Gutiérrez, 1991. La biología de *Aspergillus flavus* y la producción de aflatoxinas. Primera edición. UNAM, México D.F., pp 1-15.
- Moreno, M. E. 1996. El maíz y las aflatoxinas en: La industria de la masa y la tortilla: desarrollo y tecnología. Torres, F., Chong, I y Quintanilla J. 139-145 pp. PUAL-UNAM.
- Morilla, A., González-Vega, D., Diosdado, F y Estrada, E. 2003. Seroepidemiology of PRRS in México. 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases. Roma. Pp. 59.
- Nelson P.E. 1992. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia* 117: 29-36.

- Norred W.P., Plattner R.D., Dombrink-Kurtzman M.A., Meredith F.I., Riley R.T. 1997. Mycotoxin-induced elevation of free sphingoid bases in precision-cut rat liver slices: specificity of the response and structure-activity relationships. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 147: 63-70
- Oswald, I.P., Desautels, C., Laffitte, J., Fournout, S., Peres, S.Y., Odin, M., Le Bars, P., Le Bars, J., Fairbrother, J.M. 2003. Mycotoxin fumonisin B1 increases intestinal colonization by pathogenic *Escherichia coli* in pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (10): 5870-5874.
- Oswald, I.P., Marin, D.E., Bouhet, S., Pinton, P., Taranu, I., Accensi, F. 2005. Immunotoxicological risk of mycotoxin for domestic animals in Europe. *Food Addit. Contam.* 22: 354-360.
- Osweiler, G.D.; Schwartz, K.J. and Roth, J.R. 1993. Effect of fumonisin contaminated corn on growth and immune function in swine. (abstr.) *Midwestern Sec. Am Soc Anim Sci.* Mar 30. Des Moines Iowa.
- Placinta C.M., J.P.F. D'Mello and A.M.C. Macdonald. 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 78: 21-37.
- Plageman, P.G. and Moening, V. 1992. Lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus and simian hemorrhagic fever virus: a new group of positive-strand RNA virus. *Advances in Virus Research*, 41: 99-192
- Pol J.M. A. Van Dijk J. K. Wensvoort G. And Terpstra C. 1991. Pathological ultrastructural and immunohistochemical changes caused by Leystad virus in experimentally induced mystery swine disease (synonym: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS)). *Veterinary Quarterly* 13:137-143.
- Prelusky, D.B., Trenholm, H.L., Savard, M.E. 1994. Pharmacokinetic fate of 14C-labelled fumonisin B1 in swine. *Nat. Toxins*. 2(2): 73-80.
- Prieto C; Suarez P. Martin Rillo S; Simarro Y.; Solana A. and Castro J.M. 1996. Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) on development of porcine fertilized ova in vitro. *Theriogenology* 46: 687-693.
- Prieto C; Suarez P; Bautista J.M; Sanchez R; Rillo S. M; Simarro Y; Solana A. and Castro J.M. 1996. Semen changes in boars after experimental infection with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Theriogenology* 45: 383-395.
- Prieto C; Suarez P; Simarro Y; García C. Rillo S. M. and Castro J.M. 1997. Insemination of susceptible and preimmunized gilts with boar semen containing porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology* 47:647-654.

- Prieto C y Castro J. M. 1998a. Síndrome reproductivo y respiratorio porcino: aspectos mas importantes de la enfermedad Parte1. Anaporc 175:1-15.
- PrietoC y Castro J.M. 1998b Síndrome reproductivo y respiratorio porcino: aspectos mas importantes de la enfermedad Parte 4. Anaporc 178:49-77.
- Ramírez, E., Ruiz, A., Islas, A., Leoeq, C., Carrasco, L., Quezada M. 2006. Características hematológicas y patológicas de cerdos inoculados experimentalmente con el aislado chileno del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino. Arch. Med. Vet. Vol. XXXVIII. (2): 151-159.
- Rheeder, J. P., Marasas, W. F. O., Thiel, P. G., Sydenham, E. W., Shepard, G. S., and Van Schalkwyk, D. J. 1992. *Fusarium moniliforme* and fumonisinas in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytophatology* . **82**, 353–357.
- Riley, R.T. and Voss, K.A. 2006. Differential sensitivity of rat kidney and liver to fumonisina toxicity: organ-specific differences in toxin accumulation and sphingoid base metabolism. *Toxicological Sciences*. 92(1): 335-345.
- Robledo, M.L., Marín, S., Ramos J.A. 2001. Contaminación natural con micotoxinas en maíz forrajero y granos de café verde en el Estado de Nayarit (México). *Rev.Iberoam. Micol*. 18: 141-144.
- Rosiles, M,R; García, T,M.; Ross, F,P. 1996. Confirmación fisicoquímica de la fumonisina B1 en maíz y alimento para équidos que murieron leucoencefalomalacia. *Vet.Mex*. 27(1):111-113.
- Ross P.F., P.E. Nelson, J.L. Richard, G.D. Osweiller, L.G. Rice, R.D. Plattner and T.M Wilson. 1990. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolate associated with equine leukoencephalomalacia and pulmonary edem syndrome in swine. *Appl. Environ. Microbiol*. 56: 3224-3226.
- Rossow, K.D., Bautista, E.M., Goyal, S.M., Molitor, T.W., Murtaugh, M.P., Morrison, R.B., Benfield, D.A., Collins, J.E. 1994. Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one, four, and 10 week old pigs. *J.Vet.Diagn.Invest*. 6: 3-12
- Rossow, K.D. 1998. Porcine, Reproductive and respiratory syndrome. *Vet.Pathol*. 35: 1-20.
- Scudamore K.A; A. Yamashita and M.T. Hetmanski. 1998. Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs. II Determination of mycotoxins in maize and maiza products. *Food Addit. Contam*. 15: 30-55
- Shin. 1997. Monitoring of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection boars. *Veterinary Microbiology* 55(1)337-346.

- Sierra, N., Ramírez, R., Mota, D. 2000. Aislamiento del virus del PRRS en México: Estudio clínico, serológico y virológico. Arch.Med.Vet. 32 (1): 1-9.
- Smith, G.W., Constable, P.D., Smith, A.R., Bacon, C.W., Meredith, F.I., Wollenberg, G.K., Haschek, W.M. 1996. Effects of fumonisin-containing culture material on pulmonary clearance in swine. Am. J.Vet.Res. 57: 1233-1248.
- Soriano J.M., González L., Catalá A.I.(2005) Mechanism of action of sphingolipids and their metabolites in the toxicity of fumonisin B1. Progress in Lipid Research 44: 345-356.
- Straw, BE; D´Allaire,S; Mengeling, W; Taylor, DJ. 1999. Diseases of Swine. Iowa state university press. AMES, Iowa U.S.A. 8th Edition. Pag. 731-742
- Sweeney, M.J. and A.D.W. Dobson. 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus* and *Penicillium* species. International Journal of Food Microbiology. 43: 141-158.
- Thacker, E.L., Halbur, P.G., Ross, R.F., Thanawongnuech, R., and Thacker, B.J.1999. *Mycoplasma Hypneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory, syndrome virus-induced pneumonia. Journal of clinical microbiology, Mar.: 620-627.
- Taranu, I.,Marin, D.E., Bouhet, S., Pascale, F., Bailly, J.D., Miller, J.D., Pinton, P., Oswald, I.P. 2005. Apr; 84(2): 301-307. E.pub 2005 Jan 19.
- Terpstra C; Wensvoort G; Pol J.M.A. 1991 Experimental reproduction of porcine enedemic abortion and respiratory syndrome (Mystery swine disease) by infection with Lelystad virus Koch's pstulates fulfilled. Veterinary Quarterly 13:131-136.
- Velázquez G.C.A. 2007. Análisis de micotoxinas aminohidroxiladas. www.cervantesvirtual.com. Consultada Abril 2009
- Valladares, J.C.C., Salinas,V. 2007. Manual de Procedimientos de Laboratorio, Laboratorio de Control de Calidad y Patología Aviar PAPSA. N.L., México
- Vargas P.L. 2001. Manual de practicas. Laboratorio Clínico. FMVZ. UAT.
- Viquez, O.M., M.E. Castell-Perez and R.A. Shelby. 1996. Occurrence fumonisin B1 in maiz grown in Costa Rica. J. Agric. Food Chem. 44: 2789-2791.
- Visconti A., W.F.O. Marasa., J.D. Millar and R. Riley. 1999. Tercera conferencia internacional mixta FAO/OMS/PNUMA sobre micotoxinas. Micotoxinas de interés creciente. Túnez, Túnez. 3-6 marzo.

- Voss, K.A.; Smith, G.W.; Hascheck, W.M. 2007. Fumonisin: Toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. *Animal Feed Science and Technology*, (3-4):299-325. 137
- Wang, E., W.P. Norred., C.W. Bacon., R.T. Riley and A.H. Merrill. 1991. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisin. *J. Biol. Chem.* 266: 14486-14490.
- Weimersheimer R. J; Canto A. G. J; Anaya E. A; Coba A. M; Milian S. F. Ad Correa G. P. 1997. Frecuencia de anticuerpos contra el virus del Síndrome Disgénésico y respiratorio en cerdos sacrificados en rastros de México. *Técnica Pecuaria Mex.* 35(3):139-144.
- Wensvoort G; Terpstra C; Pol J. M. 1991 Mystery Swine Disease in the Netherlands: isolation of Lelystad virus. *Veterinary Quarterly* 13:121-125.
- Wensvoort, G., Kluyver, E.P., Luijtz, E.A., Den Besten, A., Harris, L., Collins, J.E., Christianson, W.T., Chladek, D. 1992. Antigenic comparison of Lelystad virus and swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4(2): 134-138.
- WHO (2000). *Environmental Health Criteria 219: Fumonisin B1*, 153 pp. United Nations Environmental Programme, the International Labour Organization and the World Health Organization. International Programme on Chemical Safety, Geneva
- Wilfried K., Ulrich M.D., 2000 *Diagnostico clínico de Laboratorio en veterinaria* 4ª. Edición Editores Médicos, S.A. Madrid España, 112-133, 148-155.
- Zimmerman, J. and Kyoung, Jim, Y. 2000. PRRS Epidemiology. *Memorias del Simposium Internacional sobre enfermedades del cerdo*. Irapuato, Guanajuato, México. Academia de Veterinaria Mexicana, A.C.
- Zomborszky, K.M., Vetesi, F., Repa, I., Kovács, F., Bata, A., Horn, P., Toth, A. (2000). Experiment to Determine Limits of Tolerance for Fumonisin B₁ in Weaned Piglets. *J. Vet. Med. B* (47): 277-286
- Zomborszky, K.M., Vetesi, F., Horn, P., Repa, I., Kovács, F. (2002). Effects of prolonged exposure to low-dose fumonisin B₁ in pigs. *J. Vet. Med. B* (49): 197-201.