



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“ESTUDIO DE PARVOVIRUS PORCINO EN GRANJAS DE LA
PIEDAD MICHOACÁN”**

MAESTRÍA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

P R E S E N T A:

MVZ. PAULA DEYDRETH PARDAVÉ GONZÁLEZ

**TUTORA PRINCIPAL
FES-C DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA**

**COMITÉ TUTORAL:
FES-C DR. HUMBERTO RAMÍREZ MENDOZA**

FMVZ DR. ABEL CIPRIÁN CARRASCO

México, D.F.

AGOSTO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Resumen..... | 3 |
| 1.- INTRODUCCIÓN..... | 4 |
| 1.1.- Parvovirus Porcino..... | 8 |
| 1.2.-Agente etiológico..... | 8 |
| 1.3.-Replicación viral..... | 11 |
| 1.4.-Propiedades del virus..... | 11 |
| 1.4.1.-Propiedades hemoaglutinantes, y antigénicas del virus..... | 11 |
| 1.4.2.-Resistencia del virus a temperatura y agentes químicos..... | 13 |
| 1.5.-Aislamiento viral..... | 14 |
| 1.6.-Epidemiología..... | 14 |
| 1.7.-Transmisión..... | 15 |
| 1.8.-Patogenia..... | 18 |
| 1.9.-Signos Clínicos..... | 23 |
| 1.10 -Lesiones..... | 25 |
| 1.10.1.-Lesiones macroscópicas y microscópicas fetales..... | 25 |
| 1.11.-Diagnóstico..... | 26 |
| 1.11.1.-Serología..... | 26 |
| 1.11.2 Prueba de Hemoaglutinación (HA)..... | 27 |
| 1.11.3 Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (IHA)..... | 29 |
| 1.12.- Prevención y control..... | 30 |
| 1.13.- JUSTIFICACIÓN..... | 32 |
| 1.14.- HIPÓTESIS..... | 32 |
| 2.- OBJETIVOS..... | 33 |
| 2.1.- Objetivo General..... | 33 |
| 2.2.- Objetivos Específicos..... | 33 |
| 3.- MATERIAL Y MÉTODOS..... | 34 |
| 3.1.- Identificación del Parvovirus Porcino a partir de fetos momificados..... | 34 |
| 3.2.- Estudio serológico de cerdas en granjas..... | 37 |
| 4.-RESULTADOS..... | 39 |
| 5.- DISCUSIÓN..... | 56 |
| 6.- CONCLUSIONES..... | 58 |
| 7.- REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA..... | 60 |

Resumen

El Parvovirus Porcino (PPV), es un virus ubicuo con distribución mundial presente en la mayoría de las explotaciones porcinas, que afecta a cerdas reproductoras. El virus pertenece al género *Parvovirus* que proviene del latín *Parvus*, *parvo*, *parvu*, de la familia *Parvoviridae*. Subfamilia *Parvovirinae*.

La enfermedad se presenta, cuando el virus infecta durante el primer y segundo tercio de la de la gestación, ocasionando la muerte embrionaria o fetal, con reabsorción o momificación de los productos. Existiendo embriones o fetos que no se infecten debido a que el tipo de placentación es individual. Cuando la infección trasplacentaria ocurre después de la segunda mitad de la gestación, (70 días) los fetos sobreviven en útero sin daño aparente.

En el presente estudio se determinó la presencia de PPV a partir del sobrenadante de fetos momificados, así como el título de anticuerpos de los fluidos corporales de lechones nacidos muertos y suero de cerdas reproductoras de 5 granjas de La Piedad Michoacán, México.

Mediante la prueba de Hemoaglutinación en fetos momificados menores a 160 mm de largo dorsal e Inhibición de la Hemoaglutinación en lechones nacidos muertos y el suero de las cerdas reproductoras. Se obtuvo una seroprevalencia del 80%, siendo mayor está en granjas con mayor población de cerdos.

El análisis estadístico experimental realizado para el presente fue análisis de varianza y se realizó empleando el paquete SSPS Statistics versión 18.0, analizando los resultados de las muestras provenientes de los 25 fetos momificados y lechones nacidos muertos recolectados de las 5 granjas donde se detectaron los primeros signos sospechosos de PPV, así como de los sueros provenientes de la toma de sangre de 35 cerdas reproductoras al azar de cada

una de las 5 granjas muestreadas, con un total de 175 muestras obtenidas de cerdas reproductoras, con diferente número de parto; basadas en la historia clínica que presentaron las cerdas.

Se concluyó que la infección ubicua, como PPV están presentes en cerdas reproductoras, generalmente no provoca brotes explosivos, sin embargo repercuten en la producción. Adicionalmente, no se les da la atención necesaria para controlarla. En este estudio se reitera la ubicuidad del virus en cerdas previamente vacunadas y se dan las recomendaciones para realizar el diagnóstico que sirva en la toma de decisiones para controlar la enfermedad en las granjas afectadas.

1.- INTRODUCCIÓN

La porcicultura mexicana en la actualidad está inmersa en una serie de cambios caracterizados principalmente por buscar un incremento en la producción que le permita ubicarse dentro de los estándares internacionales y alcanzar una calidad de excelencia para poder comercializar de una forma más fácil sus productos a un mejor precio y con ello obtener una mayor rentabilidad en sus operaciones comerciales (Fuentes *et al.*, 2006).

En lo que concierne a la reproducción. Teniendo como base al sistema de producción industrial, se ha hecho énfasis en los últimos 20 años, por un lado en tratar de aprovechar el potencial de la cerda como productora de lechones, tanto incrementando su prolificidad, como reduciendo el intervalo entre partos; y por el otro con la introducción y el uso a gran escala de la inseminación artificial (Cabrera, 2008).

Lo anterior ha traído una mayor eficiencia en la reproducción de esta especie, aumentando el número de partos por hembra al año y empleando a reproductores genéticamente superiores. Con esto se logra cumplir la principal meta del

productor desde un punto de vista de la reproducción. Esto es lograr una mayor cantidad de cerdos nacidos por cerda por año. El tamaño de la camada esta influenciado por una serie de factores entre los que están: El reclutamiento folicular, la tasa de ovulación, el índice de concepción, la sobrevivencia embrionaria, la edad a la pubertad y el intervalo destete a estro, ya que intervienen en el índice de fertilidad, sobrevivencia embrionaria y en la salud reproductiva de la pira (Gavadea, 2008).

Las diferentes causas que provocan alteraciones en la reproducción pueden actuar en una o más de las tres fases del ciclo gestacional, es decir, en la Implantación, Ovulación, Fecundación, en la fase embrionaria y posteriormente durante el periodo de lactancia. Las causas que con más frecuencia provocan trastornos durante las dos primeras fases del ciclo gestacional pueden ser de distinta naturaleza: anatómica (malformaciones y anomalías del aparato reproductor), nutricionales (tanto elementos nutritivos, como presencia de sustancias tóxicas en los alimentos), causas ambientales, factores de manejo así como, fallos en la reproducción asociados a distintos agentes infecciosos (Flores, 2008).

Son numerosos los microorganismos bacterianos y virales asociados a trastornos o alteraciones de la reproducción que actúan en una o más fases del ciclo reproductivo. Debido a la complejidad para la identificación de los signos clínicos y epidemiológicos de la falla reproductiva, Wrathall en el año 1975, en una clasificación clásica, divide estos procesos en tres grandes grupos:

1. Infecciones del GRUPO I: Incluyen en este grupo las infecciones producidas por microorganismos, que se encuentran en el medio ambiente de todas las explotaciones porcinas y que se consideran comensales o saprofitos. Las infecciones incluidas en este grupo guardan una cierta

relación con la falta de higiene, alimentación deficiente, instalaciones inadecuadas (*Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella choleraesuis*, etc (Fuentes *et al.*, 2006).

2. Infecciones del GRUPO II: En esta división se agrupan aquellas enfermedades producidas por virus cuya infección no demuestra ningún tipo de signo en las cerdas reproductoras (se observa una respuesta inmunitaria a la infección) pero si puede afectar a los embriones y/o fetos dependiendo del momento de la infección y la gestación. Dentro de las causas incluidas en este grupo destaca la PARVOVIROSIS PORCINA (PP) (Sánchez, 2008).

Dado que estos virus tienen la particularidad de replicarse en células en mitosis, por tanto poseen un particular tropismo por las células de los tejidos embrionarios y fetales, el fracaso de la reproducción es la única respuesta clínica a la infección por el PPV (Fuentes *et al.*, 2006).

3. Infecciones del GRUPO III: El signo dominante de estas infecciones es el aborto, que también puede estar acompañado de otras alteraciones como momificaciones, mortalidad neonatal y retorno al estro, así como signos respiratorios tales como son Leptospirosis, Brucelosis, Clamidiosis, Enfermedad de Aujeszky, Influenza Porcina, Fiebre Porcina Clásica, Circovirus Porcino Tipo 2 (PCV-2) y Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino, (PRRS) (Perea, 2007; Zheng *et al.*, 2012).

La clasificación de los virus que afectan a los porcinos se divide en dos grupos:

Grupo I. Virus que provocan un grave daño placentario y una lesión leve a los embriones y fetos: Virus de la Enfermedad de Aujeszky (VEA), Estomatitis

Vesicular (VEV), Exantema Vesicular (VEVS), Fiebre Porcina Clásica (CSFV) Mateusen *et al.*, 2007).

Grupo II. Virus que ocasionan un daño placentario leve y un intenso daño al embrión o al feto. Generalmente, no producen aborto pero cursan con repetición de estros cuando existe absorción de embriones en el primer tercio de la gestación, presencia de momificaciones totales o parciales, mortalidad y muertes neonatales: Parvovirus Porcino, Enterovirus Porcino, Virus de la Encefalitis Japonesa B, Virus de la Influenza Porcina (Fuentes *et al.*, 2006).

La muerte del embrión, reabsorción y momificación produce una disminución en el número de lechones que nacerán vivos. Esta condición infecciosa denominada SMEDI (stillbirths, mummification, embryonic death and infertility) es decir muertes al nacimiento, momificación, muerte embrionaria e infertilidad, se presenta como todo un síndrome reproductivo (Chen *et al.*, 2009). Se describe que los principales virus involucrados en el síndrome de SMEDI son: Enterovirus Porcino, el virus de la Fiebre Porcina Clásica (CSFV), el virus de la Pseudorrabia o enfermedad de Aujeszky, virus de la Influenza Porcina, virus de la Encefalitis Japonesa B, virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS), Circovirus Porcino (PCV), Rubulavirus, el virus Menangle, el Parvovirus Porcino, y el Reovirus. De estos virus, solamente el virus de la Influenza Porcina, el virus de la Encefalitis Japonesa B y el virus de la Fiebre Porcina Clásica producen malformaciones congénitas en el cerdo (Sungseok *et al.*, 2012). Es importante recordar que tanto los Parvovirus como los Enterovirus fueron identificados durante varios años con la sigla "SMEDI", hoy día esta denominación se ha dejado de lado y se prefiere mencionar a cada enfermedad por separado (Fuentes *et al.*, 2006; Sánchez, 2008).

Los cerdos pueden infectarse simultáneamente con dos o más patógenos virales, se han realizado estudios de la combinación y secuencia de varias combinaciones

de virus DNA del cerdo como Pseudorrabia (PRV), Circovirus Porcino tipo 1 (PCV1) y tipo 2 (PCV2) y Parvovirus Porcino (PPV) (Kennedy *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2012), además se ha demostrado la infección simultánea de los cerdos con el virus de Parvovirus Porcino (Candelo *et al.*, 2002 Pérez *et al.*, 2012) y el Síndrome Mutisistémico y Adelgazamiento Postdestete (PMWS), (García *et al.*, 2004; Segalés, 2007). Enfermedad asociada a la infección por Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2) (Rose *et al.*, 2007; Ting *et al.*, 2009; Segalés, 2012).

1.1.- Parvovirus Porcino

El PPV se detectó por primera vez como contaminante de cultivos celulares de la Fiebre Porcina Clásica. El primero en aislar el PPV en cerdos del continente americano fue Mengeling en el año de 1972, quien aisló el virus a partir de cornetes nasales de cerdos con rinitis atrófica. Tras su descubrimiento, rápidamente se relacionó al virus con trastornos reproductivos, ya que posteriormente el PPV fue aislado de tejidos de fetos momificados y de lechones nacidos muertos. La capacidad del PPV de replicar en fetos porcinos se demostró primero por la inoculación directa de fetos porcinos que se encontraban en el útero y posteriormente por la inoculación oro-nasal del PPV en cerdas preñadas seronegativas (Sánchez, 2008).

1.2.- Agente etiológico

El PPV es un agente infeccioso específico del cerdo, ya que se ha observado que no tiene relación antigénica con otros parvovirus, como el del ratón, rata, gato, perro, bovino, conejo. El PPV puede mostrar diferencias en la virulencia, dependiendo de la cepa involucrada (Ramírez *et al.*, 1998).

La familia Parvoviridae incluye dos subfamilias, Densovirinae y Parvovirinae. Los *Densovirinae*: Infectan insectos, mientras que la subfamilia Parvovirinae Infecta vertebrados y es dividida en cinco géneros Dependovirus, Bocavirus, Eritrovirus, Parvovirus y Amdovirus (Xiao *et al.*, 2012).

La subfamilia Parvovirinae se divide en dos géneros: en base a su ácido nucleico y su capacidad para replicarse:

Parvovirus: Infectan vertebrados y replican en forma autónoma

Dependovirus: Dependen de un virus auxiliar para su replicación, generalmente de un Adenovirus, denominado también dependovirus adenoasociados (Simpson *et al.*, 2002; Grigori *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2009).

El PPV por su capacidad para replicarse sin ayuda de otros virus, se caracteriza por tener polaridad negativa al ácido desoxirribunúcleico (ADN) (Cadar *et al.*, 2012).

El PPV es clasificado en el género *Parvovirus* que proviene del latín *Parvus*, *parvo*, *parvum* que significa pequeño de la familia *Parvoviridae*. Subfamilia *Parvovirinae* (Chen *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2012).

El virión tiene un diámetro de 18 a 26 nm, con una simetría icosaédrica, compuesta de 32 capsómeros discontinuos, (20 hexones y 12 pentones) con tres proteínas en su cápside una principal (consta de cápsides “llenas” con una densidad boyante en Colruro de Cesio (CsCl) de 1.38 gr/ml y una menor con cápsides “vacías” con una densidad boyante de 1.29 gr/ml, con lo que se demuestran los picos de infectividad y de hemoaglutinación del virus. Es un virus no envuelto, o desprovisto de lípidos esenciales, con un peso de 5.3×10^6 Dalton (Straw y Zimmerman, 2006; Antonis *et al.*, 2006).

El genoma viral es un ADN Constituido por el 20% de proteínas, el 80% es una cadena sencilla lineal con 5.000 nucleótidos de un peso molecular de 1.4×10^6 donde cerca del 26.5% del peso corresponde al virión (Simpson *et al.*, 2002; Straw y Zimmerman, 2006).

El genoma contiene dos marcos de lectura abiertos (MLA) también llamados Open Reading Frames (ORFs). El ORF1 ubicado en la proteína no estructural (NS1 (75.5 kDa), NS2, y NS3) y el ORF 2 ubicado en la proteína estructural denominada (VP1, VP2 y VP3), que contiene un pequeño ORF denominado SAT en la proteína NS para dar inicio al codón debajo de la iniciación de la proteína VP2 (Wilhelm *et al.*, 2006; Shangjin *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011; Cadar *et al.*, 2012).

La proteína estructural VP1 (83 kDa), es caracterizada por intervenir en la adherencia a la célula blanco para la replicación viral, la proteína VP2 (64 kDa) posee propiedades hemoaglutinantes y una tercera proteína en la cápside viral VP3 (60 kDa) que es producida por el procesamiento proteolítico de VP2 (Rico, 2003; Zimmerman *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2008; Hao *et al.*, 2009).

El virus se ha identificado mundialmente, se han aislado cinco cepas de PPV denominados como NADL-2, NADL-8, Kresse, IAF-A54 e IAF-A83.

La cepa NADL-2 (5075 nucleótidos), es una cepa de baja virulencia, sólo causa viremia limitada en infecciones experimentales, no atraviesa la barrera placentaria (Simpson *et al.*, 2002; Grigori *et al.*, 2003; Ting y Shangjin, 2009).

La cepa NADL-8 aislada de momias y de fetos muertos, causa viremia, puede atravesar la barrera placentaria e infectar a los fetos hasta causarles la muerte.

La cepa Kresse e IAF-A54 las cuales han sido asociadas con dermatitis, pueden causar la muerte de los fetos.

La cepa IAF-A83 asociada a problemas entéricos, no produce ninguna lesiones en fetos (Rico, 2003; Grigorio *et al.*, 2003; Lee y Macbaty, 2008; Ting y Shangiin, 2009).

Otro tipo de PPV fue descubierto en el 2001 incidentalmente durante un brote de Hepatitis E, en Myanmar en China. Este virus fue tentativamente denominado tipo 2 (PPV2). En el 2006-2007 fue encontrado en suero, en el sureste de China denominada enfermedad de fiebre alta. El PPV2 en Hungría tuvo una prevalencia del 6.4% en diferentes especies (Xiao *et al.*, 2012). El estatus taxonómico de este virus fue debido a nueve casos reportados en el Comité Internacional de Taxonomía de los Virus (ICTV), y fue clasificado dentro de la subfamilia *Parvovirinae* del genero *Parvovirus* que afectan a vertebrados y replica de forma autónoma denominado a este virus como Parvovirus Porcino tipo 2 PPV2 (Tijssen *et al.*, 2011).

1.3.- Replicación viral

La replicación tiene lugar en el núcleo de células que presentan un elevado índice mitótico. En ese sentido puede apreciarse su afinidad por el embrión y el feto en desarrollo, donde pueden verse los antígenos víricos por la técnica de Inmunofluorescencia.

La replicación viral es citocida y se caracteriza por la adherencia del virus a través de la proteína estructural VP1 de la cápside a la célula, rodeándola hasta realizar una endocitosis, posteriormente se realiza la denudación del virus (perdida de la cápside) se realiza la translocación del ADN viral al núcleo, síntesis de ácido ribonucleico mensajero (ARNm vírico temprano, y ácido ribonucleico (ARN) de las proteínas tempranas dependiente del ADN, replicación del ácido nucleico de progenie, seguido por transcripción de ARNm tardío y producción del ARN de las

proteínas tardías ocurriendo el autoensamblaje de la cápside. La acción de la proteína no estructural sobre el ADN viral, la translocación de la cápside al núcleo y la replicación del ADN es necesario para que la célula huésped entre en la fase S (segunda fase del ciclo biológico, donde se lleva a cabo la síntesis de ADN), pero el parvovirus no tiene la capacidad para inducir a las células en reposo para iniciar la síntesis de ADN, por lo que necesita de varias ADN polimerasas (Mengeling *et al.*, 2000; Simpsom *et al.*, 2002; Grigori *et al.*, 2003). Las secuencias terminales sobre el ADN lineal del parvovirus se emplean como cebadores para comenzar la síntesis de ADN, la introducción del ADN en las cápsides intactas que proceden a la liberación del virus por lisis celular (Straw y Zimmerman, 2006).

1.4.- Propiedades del virus

1.4.1.- Propiedades hemoaglutinantes y antigénicas

En cuanto a su poder antigénico, el virión contiene tres proteínas estructurales que forman la cápside denominadas VP1, VP2 y VP3. La hemoaglutinina del PPV es una característica de la proteína VP2 que reside en la cubierta proteica del virus. El PPV induce la formación de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación y neutralización (Cadar *et al.*, 2012), de rápida aparición que persisten por largo tiempo en porcentajes elevados. Por ello la inmunidad adquirida por los animales infectados es sólida y duradera, ya que en condiciones naturales los animales sufren una re infección permanente (Rico, 2003).

Sus propiedades hemoaglutinantes, en eritrocitos son evidentes principalmente en glóbulos rojos de cobayo, rata, pollo, gato y del grupo "O" positivo de humano, los de otras especies animales como ovinos, caballos, patos, muestran variaciones considerables y resultados equívocos (Choi *et al.*, 2000). Para su propagación, el PPV requiere células en proceso activo de división; su estudio en el laboratorio se

ha realizado con cultivos de tejidos de origen porcino (Straw y Zimmerman, 2006; Lee y Macbaty, 2008).

La actividad hemoaglutinante del virus es altamente dependiente de la temperatura en el momento en el que se realizan las pruebas de Hemoaglutinación e Inhibición de la Hemoaglutinación (Cadar *et al.*, 2012), se pueden obtener títulos a 4°C durante 12 horas, mientras que la capacidad hemoaglutinante es pobre o nula a 37°C.

La proteína neutralizante NS-1 más importante para la replicación viral, también es un importante regulador trans-activador de la expresión de genes virales ya que interactúa con el factor de transcripción Sp1. Dominio activacional potente localizado dentro de los ácidos C-terminal de amino ácidos de NS-1 (Ting y Shang-jin, 2009).

Los aislamientos de PPV son antigénicamente similares entre si, aunque no idénticos, es así como recientemente se han descrito aislados “variantes” que difieren en algunas características genéticas y antigénicas respecto a las cepas de referencia o a las cepas presentes en vacunas de uso masivo. El PPV es también cercano antigénicamente a otros virus del mismo género, aunque su identidad puede ser confirmada mediante ensayos serológicos como inhibición de la hemaglutinación o ELISA (Lee y Macbaty, 2008).

1.4.2.- Resistencia del virus a temperaturas y agentes químicos

El virus es muy resistente a temperaturas, agentes químicos, enzimas, variaciones en el pH y desinfectantes. La característica del virus de no ser envuelto le confiere una amplia resistencia por ser un virus hidrofílico.

El PPV se mantiene fácilmente en el ambiente contaminado en secreciones y excreciones durante largos períodos de tiempo, hasta cuatro meses en un granja vacía contaminada. Cabe destacar que el agente viral es extremadamente termoestable al calor, pudiendo permanecer activo a 70°C durante 2 horas, al someterlo a 80 °C por cinco minutos pierde infectividad y capacidad hemoaglutinante, es muy estable a 4 °C, resiste a pH ácido entre 3 y 9, (Grigori *et al.*, 2003).

Por ser un virus sin envoltura, resiste tratamientos con solventes lípidicos como el éter, etanol, cloroformo y a las enzimas como la tripsina, a desinfectantes comunes como el alcohol, yodado, fenoles, y amonios cuaternarios. Sin embargo, se inactiva fácilmente con hipoclorito sódico o hidróxido de sodio, por lo que el primero es el desinfectante elegido para su uso en locales contaminados (Straw y Zimmerman, 2006; Ting y Shangjin, 2009).

1.5.- Aislamiento viral

El PPV puede ser cultivado en monocapas de testículo o riñón de cerdo, en los que crece y se desarrolla adecuadamente, en los cuales produce un leve efecto citopático, evidenciado por la aparición de numerosos cuerpos de inclusión intranucleares, basófilas redondeadas. Las partículas virales forman masas amorfas y marginación de la cromatina, existe vacuolización del citoplasma, y necrosis celular. No se han detectado diferencias antigénicas entre los diferentes aislamientos realizados en los últimos años (Zhang y Shangiin, 2008).

1.6.- Epidemiología

PPV presenta distribución mundial y se encuentra en la mayoría de las explotaciones con poblaciones densas de cerdos. En tales explotaciones valores

aproximados al 100% de los animales adultos de más de un año son seropositivos (Rueda *et al.*, 2001).

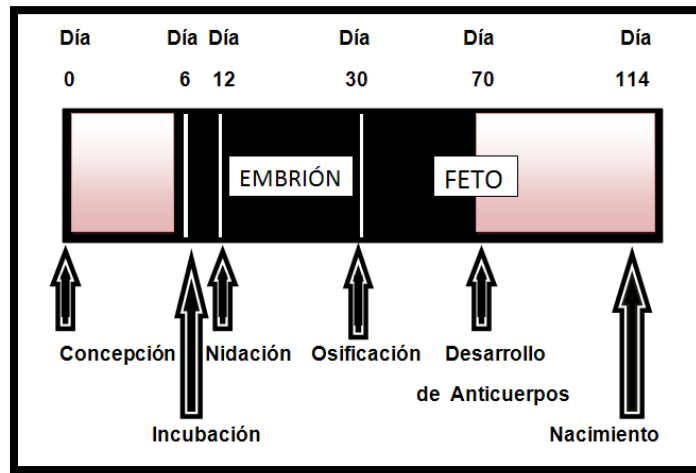
La enfermedad se presenta cuando hembras inmunes son expuestas al virus durante la primera mitad de la gestación, el embrión está protegido por la zona pelúcida del ovocito y por tanto es susceptible a la infección (Osnaya, 2006). Cuando la infección se presenta en el primer tercio de la gestación, ocasionará muerte embrionaria, con reabsorción embrionaria. Cuando la infección trasplacentaria ocurre después de la segunda mitad de la gestación, los fetos sobreviven en útero sin signos aparentes. Esto se debe a que la infección requiere de 10 a 14 días, o hasta más, para cruzar la barrera placentaria y afectar a los fetos (Mengeling *et al.*, 2000; Straw y Zimmerman, 2006).

A partir del día 12 de gestación se pierde entre el 25% y 40% de los embriones, al parecer debido al medio uterino y no por falla en el desarrollo del embrión (Falceto, 2006; Mota, 2006).

Durante la etapa del embrión, la infección por PPV infecta y mata a los embriones provocando reabsorción. El estadio del feto comienza alrededor del día 30 de gestación cuando la organogénesis se ha completado y da inicio a la osificación. La infección del embrión durante la etapa de feto puede causar la muerte, pero la reabsorción es difícil debido al desarrollo del esqueleto fetal. Fisiológicamente la muerte embrionaria después del día 30 de gestación se atribuye a procesos infecciosos, como por el parvovirus porcino (Leman *et al.*, 1986; Ramírez *et al.*, 1998).

Alrededor de los 70 días de la gestación, el feto es capaz de producir anticuerpos suficientes para protegerse contra los efectos mortales de PPV. (Fig. 1), entonces la infección fetal con PPV es subclínica (Rueda *et al.*, 2001; Fuentes *et al.*, 2006). El grado de actividad mitótica es de vital importancia para los tejidos del feto antes y después de los 70 días de gestación (Mengeling *et al.*, 2000; Spadaro *et al.*, 2010).

Fig.1.- Proceso de desarrollo de Parvovirus Porcino durante la gestación.



Fuente: Mengeling *et al.*, 2000.

Cuando nacen los lechones son seronegativos, pero adquieren pasivamente los anticuerpos al mamar el calostro de las cerdas inmunizadas (Fenati *et al.*, 2009). Los anticuerpos adquiridos pasivamente protegen a los cerdos neonatos de la infección con PPV persisten hasta con 3 y 6 meses de edad (Ostanello, 2005; Mesonero *et al.*, 2011). Esta inmunidad pasiva interfiere en el proceso natural de infección y el desarrollo de la inmunidad activa, lo que afecta la difusión de la enfermedad (Straw y Zimmerman, 2006; Spadaro *et al.*, 2010).

1.7.- Transmisión

Se disemina fácilmente en poblaciones porcinas debido a su marcada estabilidad y a la frecuente existencia de infecciones subclínicas, tanto en lechones como en animales adultos. Las fuentes de contagio son los corrales contaminados que constituyen el gran reservorio del virus. Las cerdas en desarrollo contaminadas son el principal reservorio del virus (Spadaro *et al.*, 2010)

La vía de entrada del PPV es por contacto directo (oro-nasal) con heces contaminadas con el agente viral, siendo está la principal fuente de contagio en el medio, además puede existir una transmisión venérea (por semen contaminado).

El PPV tiene poco o ningún efecto clínico en los verracos maduros, sin embargo, se ha aislado de los linfonodos escrotales y de semen, después de siete semanas de la infección. El verraco se contamina en el momento de la monta por contacto con el moco vaginal de cerdas infectadas, el virus se multiplica e invade el testículo, sin afectar la espermatogénesis (Mengeling *et al.*, 2000; Rueda *et al.*, 2001; Straw y Zimmerman, 2006).

Luego de la infección primaria se establece rápidamente una viremia (1-8 días post-infección). Las cerdas primerizas o al inicio de la gestación presentan riesgos de trastornos reproductivos inducidos por el PPV (Spadaro *et al.*, 2010). Tras la exposición de los animales seronegativos, el virus replica principalmente en tejidos linfoides, pulmones, hígado, riñones y músculos del corazón, de hecho, puede detectarse en todos los tejidos, excepto en el cerebro (Opriessnig *et al.*, 2004). La viremia se detecta normalmente 2 a 3 días después de la infección, persiste unos 4 o 5 días y se cree que juega un papel importante en la infección trasplacentaria del agente viral. El virus persiste en el animal infectado durante mucho tiempo, posiblemente durante toda la vida del cerdo, ya que en los animales infectados, se mantienen elevados los títulos de anticuerpos en suero durante largo tiempo. La transmisión de virus de la cerda a la camada ocurre verticalmente por vía trasplacentaria y no por vía horizontal (Mengeling *et al.*, 2000). El virus es capaz de cruzar la barrera placentaria luego de una viremia consecutiva a una infección viral primaria, pasando de la circulación materna a los tejidos fetales. La posibilidad de que este virus cruce la placenta aumenta cuando existen grandes cantidades de virus presentes o en viremias de larga duración. En general se acepta que este paso aumenta en los últimos estadios de la gestación cuando la circulación es mayor. (Kim y Chae, 2003). Las cerdas que presentan inmunidad después de una infección o que tienen anticuerpos séricos consecutivos a una vacunación, están totalmente protegidas contra la diseminación trasplacentaria después de la re exposición con el virus de campo (Rico, 2003).

El tiempo para la infección trasplacentaria de los fetos es alrededor de las dos semanas post- infección. En camadas infectadas, todos o algunos de los cerdos podrían ser infectados directamente por infección trasplacentaria con PPV. No se presenta difusión intrauterina a fetos adyacentes ya que cada feto presenta su propia placenta. Esto se demuestra por las diferencias en el tamaño de los fetos momificados, correspondiente al tiempo de muerte fetal (Zhang *et al.*, 2008).

Los cerdos infectados eliminan el virus en gran cantidad por excreciones y secreciones, en bajas concentraciones en orina, heces, tonsilas y secreciones nasales durante la segunda semana postinfección (Kim *et al.*, 2003). Los verracos pueden transmitir el virus mecánicamente por secreciones y excreciones incluido el semen. Usualmente no se observan síntomas clínicos en machos después de la infección (Kim y Chae, 2003), no encontraron evidencia de fertilidad o libido alterada en machos después de ser infectados con el PPV. Los machos pueden eliminar el virus por el semen durante la fase aguda de la infección; no se ha demostrado exudación más allá de esta fase, pero la posibilidad de portadores inmunotolerantes de virus de PPV, como resultado de infección temprana en útero ha sido sugerida. Los embriones pueden llevar el virus adherido a la zona pélcida de los ovocito, lo que hace inviables a los embriones y fetos no inmunocompetentes alrededor del día 67 de la gestación. El virus no afecta a las hembras de 1-4 semanas antes de la inseminación o monta natural. Pero atraviesa la placenta en aquellas que se infectan durante la inseminación o durante los 90 días subsecuentes. Las cerdas son susceptibles al fallo reproductivo inducido por el PPV si se infecta en cualquier momento durante los primeros dos tercios de la gestación (Mesonero *et al.*, 2011).

En cerdas adultas el virus se elimina en heces durante 14 días posteriores a la infección. Los lechones infectados "*in útero*" pueden eliminar el virus durante 9 semanas (Mengeling *et al.*, 2000; Rico, 2003).

Dada su alta resistencia, el virus puede permanecer activo en lugares libres de animales. Las ratas pueden ser portadoras y eliminar el virus. El contagio entre granjas se produce por la introducción de animales portadores sanos (Straw y Zimmerman, 2006).

1.8.- Patogenia

Los fallos en la reproducción varían en función de la vía de entrada del virus. Así cuando el contagio tiene lugar por vía venérea, el efecto de la infección es inmediato, retornando al celo alrededor del día 21 después del servicio (retorno a estro cíclico) debido a la mortalidad de todos los óvulos fecundados y a la reabsorción tisular. Sin embargo, cuando la vía de entrada es la oro-nasal, la expresión clínica dependerá, además del momento de la gestación en que se produzca dicha infección (Straw y Zimmerman, 2006).

En hembras gestantes infectadas en la 1ª mitad de la gestación, el virus causa muerte embrionaria y fetal con reabsorción o momificación. En estados más avanzados de la gestación no se presentan secuelas (Leman *et al.*, 1986). Después de la infección ocurre una viremia, el virus pasa a placenta y posteriormente a los fetos. La infección trasplacentaria requiere 10 a 14 días en llevarse a cabo y puede haber infección intrauterina parcial de los lechones. El virus no afecta los tejidos maternos. Los fetos mueren por daño colectivo a tejidos, incluyendo la placenta (Mesonero *et al.*, 2011).

La gestación en los porcinos es mantenida por la hormona progesterona producida por el cuerpo lúteo, la masa intrauterina configurada por el feto y las membranas fetales. La preñez puede mantenerse, hasta el parto, sin embargo la totalidad de los productos están muertos por fetos muertos (Mengeling *et al.*, 2000). Antes del día 12 de la gestación, la pérdida de viabilidad de los productos se da por una falla de la concepción y un retorno al estro en un lapso regular de 21

días. Si sobreviven 4 o más embriones la gestación se mantiene. Si hay muerte embrionaria de toda, la camada después del día 12, la hembra se demora en regresar de nuevo en estro. Este hecho puede llegar hasta el día 27 post servicio, o bien, se genera un estado de pseudopreñez y una vuelta al estro en un período largo (día 90), pero antes que el fin de la gestación (113 -120 días) (Mengeling *et al.*, 2000). En estos casos puede ocurrir una reabsorción fetal, pero los mecanismos que mantienen la función luteínica continúan actuando, incluso en ausencia de preñez. Cuando el feto tiene más de 30 días, posee un esqueleto óseo, si muere se produce la momificación. A menos que hubiera un proceso sistémico, el cuerpo lúteo no está afectado por lo que la gestación se mantiene. Las hembras afectadas presentan un parto distócico ya que los fetos no elevan su nivel hormonal por lo que no estimulan su propio nacimiento (Straw y Zimmerman, 2006; Zhang y Shangiin, 2008).

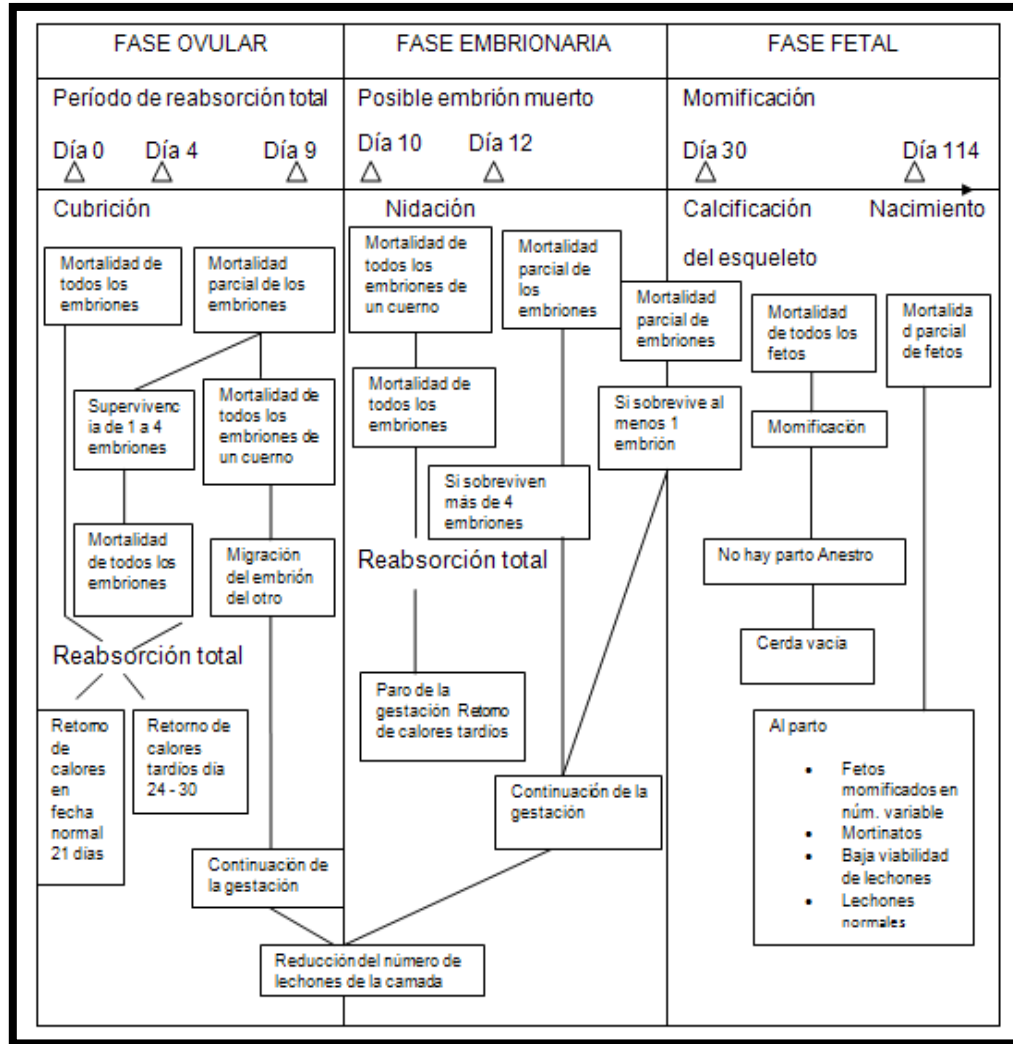
El PPV es patógeno solamente para el feto. Las consecuencias de la infección dependerán del período en que se produce. Cabe aclarar que los cerdos adultos que se infectan desarrollan rápidamente una respuesta inmunológica que los protege de reinfección (Staw y Zimmerman, 2006).

Cuando el óvulo es infectado durante los 4 días posteriores al servicio, el efecto es el mismo que cuando la infección se produce por vía venérea, la muerte de los embriones. Esta mortalidad pasa a menudo desapercibida dado que la cerda repite el estro a los 21 días después. Cuando la infección tiene lugar a partir del 4 día de gestación, los óvulos fecundados se verán afectados de forma gradual, por difusión intrauterina del virus, produciéndose al cabo de un tiempo una reabsorción total de los tejidos y dando lugar a un retorno a estro tardío (24-30 días después del anestro). En el período próximo a la nidación (9 a 12 días después de la fecundación) pueden ocurrir varias manifestaciones clínicas: si la infección se produce inmediatamente antes de la nidación, puede ser que sólo se

vean afectados los óvulos fecundados de un solo cuerno uterino, mientras que los del otro migran y en consecuencia, la gestación continúa normalmente, manifestándose solamente como una reducción del tamaño de la camada (Wilhelm *et al.*, 2006; Zhang y Shangjin, 2008; Mesonero *et al.*, 2011).

Si la infección se produce después de la nidación (fase embrionaria), el virus se diseminará y afectará a todos los embriones, con reabsorción total de los mismos, por tanto la cerda presentará un retorno a estro tardío, o bien la cerda no parirá después de un anestro (cerda vacía). (Cuadro 1). Si la infección se produce durante el periodo fetal, es decir, a partir de los 30-35 días del comienzo de la gestación, lo que marca el principio de la fase fetal caracterizada por la calcificación del esqueleto del embrión, la reabsorción de tejidos fetales no es posible, una infección en este momento provoca en el feto hemorragias, edemas y se produce una deshidratación completa del feto (momificación), dando lugar a las siguientes situaciones (Perea, 2007; Zhang y Shangjin, 2008).

Cuadro1.- Modo de acción de los virus dependiendo de la fase de gestación.



Fuente: Zhang y Shangiin, 2008.

Si la infección ocurre al inicio de esta fase, todos los fetos pueden verse afectados de una forma progresiva y escalonada, al mismo tiempo que la gestación continúa

su curso, no pariendo la cerda y por consiguiente, no retornando a celo después de un anestro, se tiene la impresión de tener cerdas infértiles. También puede ocurrir que la afectación progresiva de todos los fetos no tenga lugar, puesto que pasados los primeros 70 días de gestación éstos fetos ya son inmunocompetentes frente al virus, por lo que se observa durante el parto una camada de tamaño reducido (4-6 lechones), así como el nacimiento de fetos momificados (Mengeling *et al.*, 2000). La muerte ocurre generalmente antes del comienzo del desarrollo del sistema inmune y su inmunocompetencia (70 días). Cuando todos los fetos son infectados y se momifican, la cerda no entra en celo por lo que el encargado de área la considera como vacía o estéril (Mesonero *et al.*, 2011).

En el caso de infección generalizada no son infectados todos los fetos por lo que el parto presenta lechones momificados de varios tamaños, algunos nacidos muertos y otros normales. Si la infección ocurre alrededor de los 70 días, el feto produce una respuesta inmune y nace aparentemente normal pero con presencia de antígenos y anticuerpos (Mengeling *et al.*, 2000; Straw y Zimmerman, 2006; Sánchez, 2008).

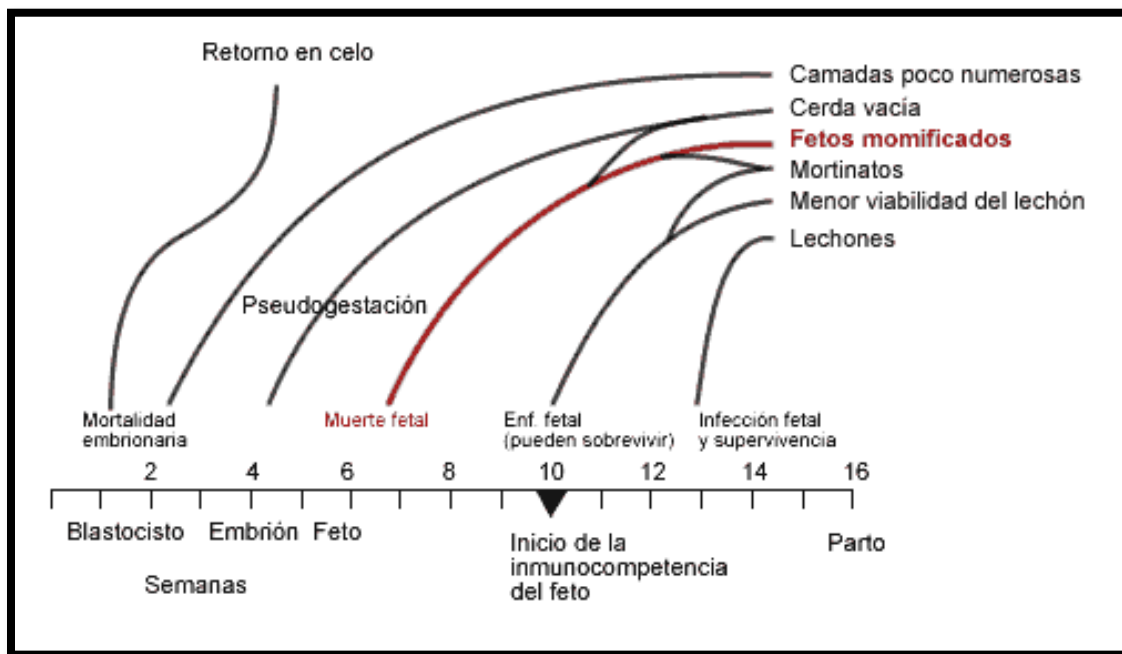
1.9.- Signos clínicos

Los signos generalmente son subclínicos o pasan inadvertidos. Las cerdas desarrollan anticuerpos de 7 a 9 días posteriores a la infección. En casos crónicos aparecen mortinatos, lechones débiles y de baja viabilidad (Straw y Zimmerman, 2006).

Después de la infección trasplacentaria, el virus se multiplica solamente en tejidos fetales sin afectar los tejidos maternos. En cerdas reproductoras se observa la repetición de estros, fallo reproductivo generalizado, reducción del tamaño de la camada, la presencia de fetos momificados, lechones nacidos muertos, (Candelo e Hidalgo, 2002; Ting y Shangjin, 2009, Spadaro *et al.*, 2010) con mayor incidencia

en cerdas de primer parto, en donde la infección puede llegar a reducir hasta un 36% la tasa de partos y un aumento de la frecuencia de las camadas de menos de cinco lechones. También se puede observar pseudogestaciones y/o repeticiones irregulares. La sintomatología puede observarse en toda la nave con animales susceptibles a la enfermedad. (Fig. 2). La muerte fetal seguida de momificación se presenta cuando la infección ocurre antes que se desarrolle su sistema inmunológico (Mengeling *et al.*, 2000).

Fig. 2.- Manifestaciones clínicas en la gestación de la cerda.



Fuente: Sánchez, 2008.

Retorno al celo (estro).

Se asocia a una aparente falla de la concepción después de la monta. Si la hembra vuelve a manifestar estro a las 3 semanas posteriores al primer servicio, se dice “que volvió al servicio en forma temprana”. Si el calor se presenta entre 22 días a 50 días se trata de una “vuelta al servicio retardado” (Candelo e Hidalgo, 2002; Ting y Shangjin, 2009).

La vuelta al servicio temprana' generada por una causa de PPV se debe a la absorción del embrión, dentro de los 12 días después de la concepción. En este caso el virus actúa en los líquidos ovarianos o espermáticos, en el endometrio, o bien, se produce una viremia pocos días después del servicio (Spadaro *et al.*, 2010).

La vuelta al estro retardada se debe a la muerte y reabsorción de embriones entre 15 a 30 días de gestación, o también debido a una viremia en la madre entre 1 a 3 semanas después de la monta. Si hay más de 4 embriones que sobreviven a los 30 días de gestación pasan al estado fetal, pero cuando los fetos mueren no ocurre la “vuelta al estro” o celo ya que sus esqueletos óseos no pueden ser reabsorbidos por el útero (Antonis *et al.*, 2006; Fenati *et al.*, 2009).

1.10.- Lesiones

1.10.1.- Lesiones macroscópicas y microscópicas fetales

La lesión primaria es daño a membranas de células endoteliales en vasos sanguíneos pequeños. En casos agudos se encuentran petequias y equimosis en pulmón, daño leve en túbulo renales, nefritis intersticial, necrosis focal en hígado, infiltración linfocítica en glándulas adrenales y en casos raros los lechones nacidos muertos presentan meningoencefalitis con infiltración linfocítica perivascular, además de miocarditis no supurativa (Kennedy *et al.*, 2000; Shangjin *et al.*, 2009).

En fetos y lechones nacidos muertos afectados se aprecia edema, líquido seroso sanguinolento en cavidades, a veces hemorragias petequiales en corteza renal, ictericia, así como necrosis focal con manchas grises en hígado y con aparición de numerosos cuerpos de inclusión intranucleares. Decoloración de piel y otros tejidos convirtiéndose progresivamente más oscuro después de la muerte, reducción de fluidos fetales (deshidratación). Los fetos que producen anticuerpos y sobreviven a la infección, es decir los infectados alrededor del día 70 de gestación o posterior, tienen cambios compatibles con una respuesta inmune. Los cerdos nacidos muertos, pero infectados en forma congénita, presentan meningoencefalitis (Mengeling *et al.*, 2000).

1.11.- Diagnóstico

1.11.1.- Serología

Detectar la presencia del antígeno viral. Se realiza mediante las técnicas de inmunofluorescencia directa y hemoaglutinación. Aunque también se puede realizar el aislamiento viral (Staw y Zimmerman, 2006).

Debido al gran número de agentes que pueden producir estos cuadros clínicos, el diagnóstico específico se logra mediante técnicas de laboratorio que permiten evidenciar la presencia del agente etiológico, ya sea a través de antígenos específicos (IHA).

1.11.2 Prueba de Hemoaglutinación (HA).

Inicialmente, la HA se aplicó para el análisis del virus de Influenza, sin embargo como explicaremos más adelante, se puede aplicar para realizar ensayos sobre cualquier virus con proteínas estructurales con propiedades hemaglutinantes. El nombre de Hemaglutinación se debe al hallazgo que los virus de Influenza podían aglutinar eritrocitos (Savón *et al.*, 2003). Posteriormente se determinó que el origen de esta propiedad se debe a la existencia de una glicoproteína presente en la envoltura viral a la cual se le denominó como hemaglutinina. Actualmente se sabe que una gran cantidad de virus poseen proteínas externas con estas características por lo que el método tiene una amplia aplicabilidad en el análisis de diferentes entidades virales (Rico, 2003; Diaz, 2009). También se descubrió que la hemaglutinina tiene el papel de funcionar como el ligando viral encargado de reconocer al receptor en las células blanco. De manera general, el receptor corresponde a las moléculas de ácido siálico presente sobre la superficie de los glóbulos rojos, aunque dependiendo del virus esta molécula puede estar enlazada en diferentes tipos de enlaces químicos. A este respecto cabe resaltar que la función de la hemaglutinina, no es entonces aglutinar eritrocitos, más bien es participar en el primer paso de la replicación viral que es la adsorción, pero sus propiedades sirven para desarrollar la prueba de HA que se utiliza como un ensayo *in vitro* (Pazos *et al.*, 2002).

Cuando el feto por acción del PPV se ha momificado, se encontraran en grandes concentraciones del virus en órganos parenquimatosos, (Rico, 2003; Díaz, 2009). Es por eso que una de las técnicas de rutina para la identificación del virus es la hemoaglutinación (HA). Cuando el antígeno se encuentra unido o formando parte de células, o partículas, la reacción Ag-Ac se puede detectar y cuantificar por el aglutinado formado, la cual por su sencillez y sensibilidad permite saber junto con la técnica de inmunofluorescencia, si el virus está presente en los tejidos momificados (Straw y Zimmerman, 2006).

Los títulos de HA producidos varían dependiendo de la especie de la cual se utilicen los eritrocitos (Leman *et al.*, 1986), los virus de Parvovirus Porcino son capaces de aglutinar eritrocitos de cobayo, pollo, humano tipo "O" positivo esto ocurre cuando la hemaglutinina del virus interactúa con los receptores específicos constituidos por ácido siálico en la fracción CD46 o proteína cofactor que se ubican sobre la membrana de los eritrocitos (Savón *et al.*, 2003).

De la misma manera como la cantidad de antígenos se presenten en los órganos, los títulos pueden variar entre los diferentes fetos de una misma camada, esto es debido a la tolerancia individual de cada feto, así mientras más pequeños (<16 cm) sean los fetos momificados, se obtendrán títulos más altos de hemoaglutinación, esto es debido a que los fetos fueron infectados por el virus antes de que el sistema inmune se desarrollara por lo que es incapaz de responder inmunológicamente. Por otro lado, en los fetos más grandes (> 16 cm) se obtendrán títulos altos por medio de la prueba de Inhibición de la hemoaglutinación (IHA) ya que desarrollaron anticuerpos contra el virus pero no poseerán el antígeno viral por lo cual el nivel de anticuerpos será elevado (Rico, 2003; Straw and Zimmerman, 2006; Mengeling *et al.*, 2000).

Se consideran positivas aquellas muestras clínicas donde se observa hemaglutinación (formación de una malla en el fondo de la placa). Los controles de eritrocitos negativos no deben mostrar aglutinación sino un botón claramente definido. Los antígenos de PPV positivo con diluciones de 4 unidades hemaglutinantes. Después de conocer el título hemaglutinante de cada antígeno (el cual es el recíproco de la última dilución de la muestra en la que se detecta una reacción positiva) se busca la dilución de los mismos donde hay cuatro UHA. Estas cuatro unidades se hallan dividiendo el título hemaglutinante entre cuatro. De acuerdo a los valores observados, se debe preparar la dilución de cada antígeno en solución salina Fisiológica pH 7.02 (Savón *et al.*, 2003; Morilla, 1996). Una prueba de HA positiva implica la sospecha de un virus presente en la muestra, sin embargo la determinación exacta del virus involucrado en una

patología es aún incierta. Por esta razón se debe aplicar una prueba que permita la plena identificación del tipo de virus.

1.11.3 Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (IHA):

Para realizar un diagnóstico definitivo se debe realizar una prueba que evidencie una respuesta específica del huésped hacia este virus. Dicha respuesta está representada por la presencia de anticuerpos específicos, por lo que la prueba empleada para ello se conoce como Inhibición de la Hemaglutinación (IHA), que se basa en un principio fundamental de inmunología: la unión específica del anticuerpo al sitio antigénico en la molécula de la hemaglutinina, interfiere con el enlace de la HA viral con los receptores en los eritrocitos (Savón *et al.*, 2003). Este hecho permite identificar al virus y se conoce como neutralización vírica. La existencia de anticuerpos que puedan reconocer a cepas virales específicas permite diagnosticar plenamente cual virus en particular es el responsable de alguna patología (Morilla, 1996).

En la técnica de IHA se detectan títulos elevados de anticuerpos (Ac) en fetos (de más de 16 cm, >70 días de gestación) y en las cerdas (Spadaro *et al.*, 2010). Esta prueba mide los anticuerpos que reaccionan con la hemaglutinina para evitar la aglutinación de los eritrocitos. La IHA es un ensayo moderadamente sensible que se utiliza ampliamente en el diagnóstico de las infecciones. Esta prueba tiene dos elementos fundamentales: antígeno y sueros, para su realización se requieren eritrocitos de la misma especie utilizados en la hemoaglutinación, a los cuales se les ha unido la misma muestra que se desea detectar o cuantificar. Si estos eritrocitos son puestos en presencia de anticuerpos preparados frente a dicha sustancia se producirá su aglutinación. Por el contrario, cuando se añade un suero problema que contiene la sustancia a cuantificar entonces los anticuerpos se unirán a dicha sustancia y no a los glóbulos rojos (Savón *et al.*, 2003).

En cerdos adultos, el valor diagnóstico de los anticuerpos Ac es casi nulo. Sin embargo, la serología en fetos tiene un valor diagnóstico excepcional. Los fetos, a partir de los 70 días desarrollan una respuesta inmune que pone en evidencia la detección de anticuerpos, de órganos parenquimatosos (pulmón, riñón e hígado) del feto o también se puede realizar en lechones vivos sospechosos de poseer al virus (Mesonero *et al.*, 2011).

La reacción en cadena de la polimerasa PCR, es muy sensible y se utiliza para identificar segmentos de ADN del PPV en fetos momificados (Mendoza *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009). Esta prueba permite replicar entre cientos de miles de millones de veces, in vitro, pequeñas cantidades de ADN, la reacción imita un fenómeno de replicación del ADN que ocurre en forma natural en la célula blanco (Caryn *et al.*, 2006; Mendoza *et al.*, 2008. Pérez *et al.*, 2012).

Otra técnica de diagnóstico es el método de amplificación del ácido nucleico, mediante la amplificación isotérmica (LAMP), desarrollado por Notomi *et al.*, 2000. La ventaja de LAMP es la habilidad de amplificación específica del ADN secuenciado bajo condiciones isotérmicas entre 63°C y 65°C, obteniendo el resultado en 60 minutos. El método ha sido aplicado exitosamente para el diagnóstico etiológico en problemas de fallas reproductivas así como síndromes respiratorios, Hao *et al.*, 2009 evaluaron el potencial de LAMP para el desarrollo de un sistema de detección rápida y sencilla para parvovirus porcino (Hao *et al.*, 2009).

1.12.-Prevención y Control

Los problemas reproductivos provocados por el PPV se pueden prevenir asegurándose que todas las cerdas han desarrollado una inmunidad activa antes de concebir por primera vez. Cuando las hembras primerizas no reciben una adecuada inmunización, ya sea por infección natural o artificial contra el PPV, el

riesgo de problemas reproductivos es elevado (Tijssen *et al.*, 2011). Puede suceder que a pesar de su ubicuidad, la circulación del PPV no asegura la infección natural de todas las hembras (Ac maternas persistentes, poblaciones cerradas). La vacunación contra PPV evita la manifestación clínica pero no la circulación viral. Si no se vacuna o no se sigue un protocolo adecuado, entonces pueden producirse episodios recurrentes de retorno al estro, momificación y mortinatos, en hembras de 1 o 2 partos (Spadaro *et al.*, 2010).

Ya que la infección es endémica en la mayoría de los rebaños, la inmunidad es debido al resultado de la exposición natural. El tamaño de la camada se incrementa con el número de ciclos estrales previos al apareamiento (Sánchez, 2008).

La tasa de ovulación y el tamaño de la camada se incrementan con la edad o pariciones avanzadas, estabilizándose después de 6 o 7 camadas (Falceto, 2006). La tasa de nacidos muertos aumenta ligeramente después de la cuarta parición de manera que la ventaja de mantener cerdas viejas, se pierde en forma gradual (Spadaro *et al.*, 2010).

La vacunación es un método eficiente para controlar la enfermedad, el éxito de la vacunación depende de usarlo en combinación con un eficaz adyuvante el cual mejore la respuesta inmune, de estos es que active efectores específicos del sistema inmune de los animales, auxiliar de las células T (Th1, Th2) y reforzar la respuesta inmune humoral o celular contra el antígeno (Xia *et al.*, 2011). Sin embargo, para asegurar la inmunidad pasiva a la progenie, es una práctica común vacunar a las cerdas una vez o dos veces antes de la concepción y al menos una vez al año a partir de entonces, confiriéndole Ac a las crías por medio del calostro (Mengeling *et al.*, 2000).

Existen diversos tipos de vacunas contra PPV incluyendo vacunas vivas atenuadas, las cuales han sido usadas durante años. La desventaja que tienen es el alto costo, la posibilidad de revertir el efecto patogénico de la vacuna. Las vacunas inactivas son las más utilizadas para PPV. Sin embargo existe déficit en la respuesta inmune celular específica ya que, fracasa al incrementar la inmunogenicidad por que el antígeno es insuficiente volviéndola inespecífica para el control y prevención de PPV. Las vacunas subunitarias tiene niveles de protección moderados y las vacunas a base de ADN tienen menor inmunogenicidad (Wang *et al.*, 2012).

En cerdas multíparas se recomienda vacunar a las dos semanas postparto. Actualmente, se tiende al uso de vacunas inactivas, que pueden ser monovalentes, bivalentes o trivalentes (combinadas con enfermedad de Erisipelosis, Leptospirosis) (Rivera *et al.*, 2003; Perea, 2007).

1.13.- Justificación

La constante problemática en fallas de la reproducción tales como muerte embionaria y fetal provocada por PPV en las explotaciones porcinas de La Piedad Michoacán, han tenido un impacto económico muy grande por consecuencia los parámetros productivos de la granja se ve afectada, ya que los animales que presentan está enfermedad son improductivos y solo generan un gasto sin obtener ningún beneficio de ellos.

Por lo cual surge el interés de detectar la presencia de PPV en granjas de La Piedad Michoacán, para conocer el estado inmune de las granjas a través del estudio serológico en fetos momificados menores de 16 cm de largo dorsal y madres infectadas, mediante prueba de IHA y HA ya que la serología traduce el estado inmunitario, conduce a establecer un perfil serológico de la explotación.

1.14.- Hipótesis

Al identificar la presencia de Parvovirus Porcino, mediante la técnica de hemoaglutinación a partir del sobrenadante de fetos momificados menores de 160 mm de largo dorsal, se podrá confirmar la prevalencia del virus en las cerdas reproductoras.

2.- OBJETIVOS

2.1.- Objetivo general

- Identificar la prevalencia de la Parvovirus Porcina en un determinado número de granjas porcinas de La Piedad, Michoacán.

2.2.- Objetivos específicos

- Identificar el Parvovirus Porcino en fetos momificados mediante pruebas de hemoaglutinación (HA), y en suero por la prueba de Inhibición de la hemoaglutinación (IHA).
- Estimar la edad de los fetos momificados y lechones nacidos muertos a través de una fórmula matemática, descrita por (Ramirez *et al.*, 1998).
- Correlacionar la presencia de lechones momificados y nacidos muertos con el nivel de Anticuerpos presentes en cerdas reproductoras provenientes de diferentes granjas de La Piedad Michoacán a través de una prueba matemática

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- Identificación del Parvovirus Porcino a partir de fetos momificados

Se recolectaron 25 fetos momificado en 5 granjas del municipio de La Piedad, en el estado de Michoacán en las que reportaron problemas reproductivos. Además se recolectaron 175 sueros a partir de muestras de sangre de las cerdas reproductoras, que se transportaron en refrigeración al Laboratorio de Virología en el edificio de posgrado de campo 1 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, donde se llevó a cabo dicho proyecto.

A los fetos momificados se les retiró la placenta, se limpiaron con toallas de papel y midieron para conocer la edad al momento de la muerte. Para estimar la edad fetal (EF) se midió la longitud de los fetos (LF) en milímetros, mediante las mediciones del espacio entre la región occipital y hasta la base de la cola (primeras vertebrae coccígeas) (Fig. 3).

La fórmula que se utilizó para estimar la edad fetal fue la siguiente:

$$EF = LF + 70.59 / 3.25$$

En donde:

EF= edad fetal en días

LF= longitud del feto en mm

(Ramírez *et al.*, 1998).

Fig. 3. Limpieza y Medición de fetos momificados.



Para la obtención de los órganos se incidió ventralmente a los fetos momificados y lechones nacidos muertos en la línea media (Fig.4) se extrajo el hígado, pulmones y riñones, que fueron macerados por separado en matraz Tembrock con solución PBS pH 7.2 en proporción 1:10. Posteriormente se sometieron a tres ciclos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación en baño maría a 37°C. A continuación fueron centrifugados, por 20 minutos a 3000 rpm, se obtuvo el sobrenadante y se mantuvo en congelación a -70°C (Brecher, 2003).

Fig. 4.-Incisión de la línea ventral de fetos momificados.

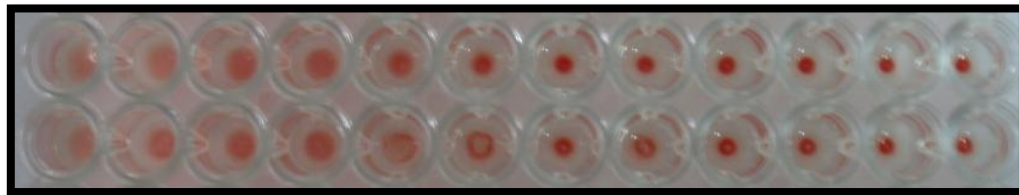


Se procedió a realizar la prueba de hemoaglutinación: para lo cual se utilizaron placas de microtitulación con fondo en "U", en cada pozo de dilución de la microplaca con una pipeta multicanal se colocaron 0.50 µl de solución BABS (PBS más fracción V de albúmina bovina al 1%). La fracción V de albúmina bovina es utilizada debido a su capacidad para promover la aglutinación específica de los eritrocitos (Sandoval, 2011), a continuación se tomaron 0.50 µl con una micro pipeta de la muestra sospechosa. Con la misma punta se hicieron las diluciones desde 1:2 hasta 1:1024 por duplicado de cada muestra. En seguida se adicionaron 0.50 µl de la suspensión de eritrocitos de pollo, se agitó y se dejó reposar a 4°C durante un mínimo de 1 hora.

El título de HA fue en la última dilución en la que se presentó hemoaglutinación (Venosa *et al.*, 2007), teniendo en esta 1 unidad hemoaglutinante (UHA) y recorriendo dos diluciones hacia atrás hasta tener 4 UHA (Rivera *et al.*, 2003). (Fig. 5).

Fig. 5.- Unidad Hemoaglutinante

Título: 1:2 1:4 1:8 1:16 1:32 1:64 1:128 1:256 1: 512 1:1024



4 UHA 2UHA 1UHA

Para realizar la prueba de la inhibición de la hemoaglutinación, se tomaron muestras del suero sospechoso, los lechones nacidos muertos mayores de 160 mm de largo dorsal después de haberlos medido y colocado en bolsas de

polietileno amarrados de las patas traseras haciéndole una línea ventral cortando órganos (Peter, 2009). Se recolectaron los líquidos corporales (Fig. 6), se centrifugaron a 3000 rpm durante 20 minutos, se obtuvo el sobrenadante.

Fig. 6.- Lechones nacidos muertos en bolsas de polietileno y recolección de fluidos corporales.



3.2.- Estudio serológico de cerdas en granjas

Para analizar los títulos de anticuerpos del suero de las cerdas reproductoras, mediante la prueba inhibición de la hemoaglutinación, con diferente número de parto; basadas en la historia clínica que presentaron.

La sangre se obtuvo al puncionar la vena marginal de la oreja de las cerdas, con previo lavado de la zona, se tomaron de 3 a 5 ml de sangre con una aguja del número 21 ó 22, se vaciaron en tubos y se centrifugaron durante 30 minutos a 3,000 rpm. Se recuperó el suero y se mantuvo en congelación (Peter, 2009).

Para el procedimiento de la prueba de hemoaglutinación se utilizó PBS más Fracción V de Albúmina Sérica (BABS) al 1% y los eritrocitos de pollo al 0.5% (Morilla, 1996).

En la placa de microtitulación con fondo en “U”, con una micropipeta multicanal se colocaron 0.50 µl de BABS, se adicionó 0.50 µl de la muestra sospechosa. Con la misma punta se hicieron las diluciones dobles desde 1:2 hasta 1:4096, se adicionaron 0.50 µl de suero positivo en la dilución en que contiene 4 UHA título de HA $64/4=16$ ml, tomando 15 ml de PBS y 1 ml de la muestra positiva), se agitó y reposó durante 1 hora a 4°C, posteriormente se adicionó 0.50 µl de eritrocitos al 0.5 %, se agitó y se dejó incubar a 4°C durante 2 horas (Opriessning *et al.*, 2004).

Para interpolar los títulos del antígeno de los fetos momificados y los títulos de anticuerpos en los lechones nacidos muertos, así como de las cerdas reproductoras, se obtuvieron las medias con sus respectivas desviaciones estándar, análisis de varianza y se realizaron las pruebas de comparaciones entre medias. Se utilizó un análisis de varianza comparando las medias empleando el paquete SSPS Statistics versión 18. 0.

La prevalencia es la frecuencia de la enfermedad en un punto designado en el tiempo, referida a una población específica y en un tiempo determinado y se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Prevalencia} = \frac{\text{Número de animales seropositivos}}{\text{Total de animales analizados}}$$

(García, 1990).

4.- RESULTADOS

De las 25 muestras recolectadas, 12 de ellas fueron fetos momificados menores de 160 mm (> 70 días) de los cuales se hizo una macerado de órganos, 13 fueron lechones nacidos muertos mayores de 160 mm (< 70 días), se recolectaron fluidos corporales, (Cuadro 3). Se estimó la edad fetal utilizando la forma antes descrita (Ramírez *et al.*, 1998).

Cuadro 3.- Edad Fetal: Fetos Momificados y Nacidos Muertos.

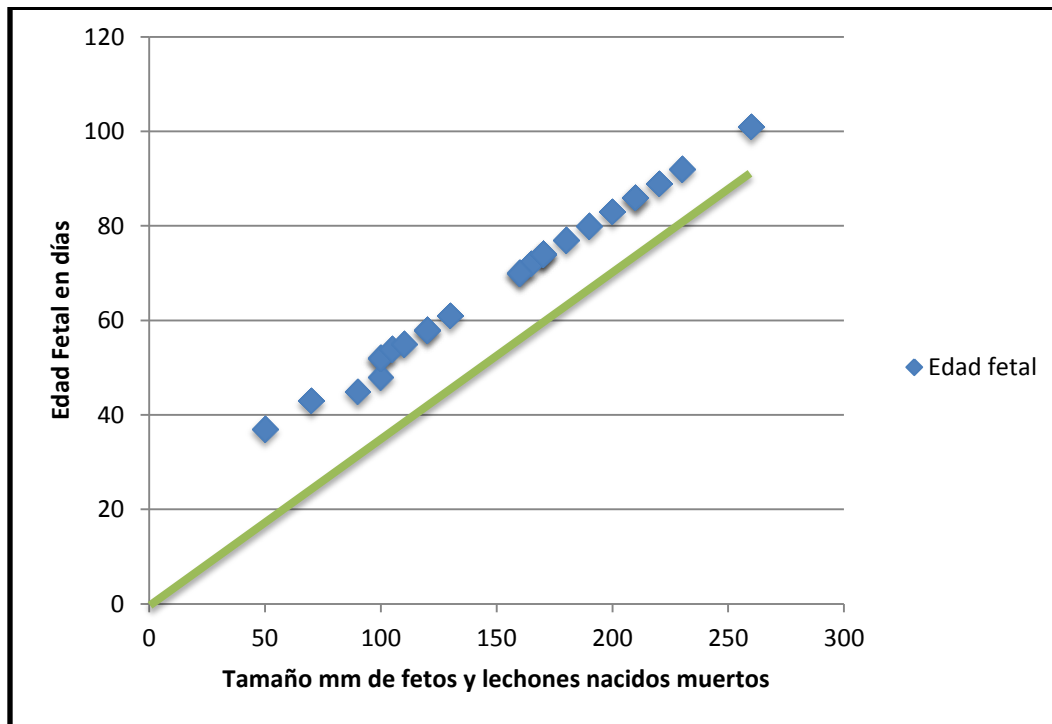
| No. Muestra | Granja | No. Parto | Muestra | Tamaño mm/cm | Edad fetal |
|-------------|--------|------------|---------|--------------|------------|
| 1 | A | 5to. Parto | Tejido | 90mm/9 cm | 45 días |
| 2 | A | 5to. Parto | Tejido | 120mm/12cm | 58 días |
| 3 | D | Primeriza | Tejido | 100mm/10cm | 48 días |
| 4 | D | Primeriza | Tejido | 50mm/5cm | 37 días |
| 5 | B | Primeriza | Tejido | 70mm/7cm | 43 días |
| 6 | B | 2do. Parto | Tejido | 100mm/10cm | 52 días |
| 7 | B | Primeriza | Suero | 160mm/16cm | 70 días |
| 8 | B | 6to. Parto | Suero | 180mm/18cm | 77 días |
| 9 | Sin ID | 2do. Parto | Tejido | 100mm/10cm | 52 días |
| 10 | B | 3er. Parto | Suero | 170mm/17cm | 74 días |
| 11 | B | 3er. Parto | Suero | 165mm/16.5cm | 72 días |
| 12 | D | 2do. Parto | Suero | 170mm/17cm | 74 días |
| 13 | D | Primeriza | Suero | 200mm/20cm | 83 días |
| 14 | E | 2do. Parto | Suero | 170mm/17cm | 74 días |
| 15 | E | 3er. Parto | Suero | 210mm/21cm | 86 días |
| 16 | E | 2do. Parto | Tejido | 130mm/13cm | 61 días |
| 17 | C | Primeriza | Suero | 230mm/23cm | 92 días |
| 18 | C | Primeriza | Suero | 210mm/21cm | 86 días |

| | | | | | |
|----|---|------------|--------|--------------|----------|
| 19 | D | 5to. Parto | Suero | 220mm/22cm | 89 días |
| 20 | D | Primeriza | Tejido | 120mm/12cm | 58 días |
| 21 | D | Primeriza | Tejido | 105mm/10.5cm | 54 días |
| 22 | D | Primeriza | Tejido | 110mm/10cm | 55 días |
| 23 | C | 4to. Parto | Suero | 190mm/19cm | 80 días |
| 24 | C | 4to. Parto | Suero | 160mm/16cm | 70 días |
| 25 | C | Primeriza | Suero | 260mm/26cm | 101 días |

La mayoría de los fetos momificados fueron menores a 160 mm, por lo que tenían menos de 70 días de gestación cuando fueron afectados por el virus.

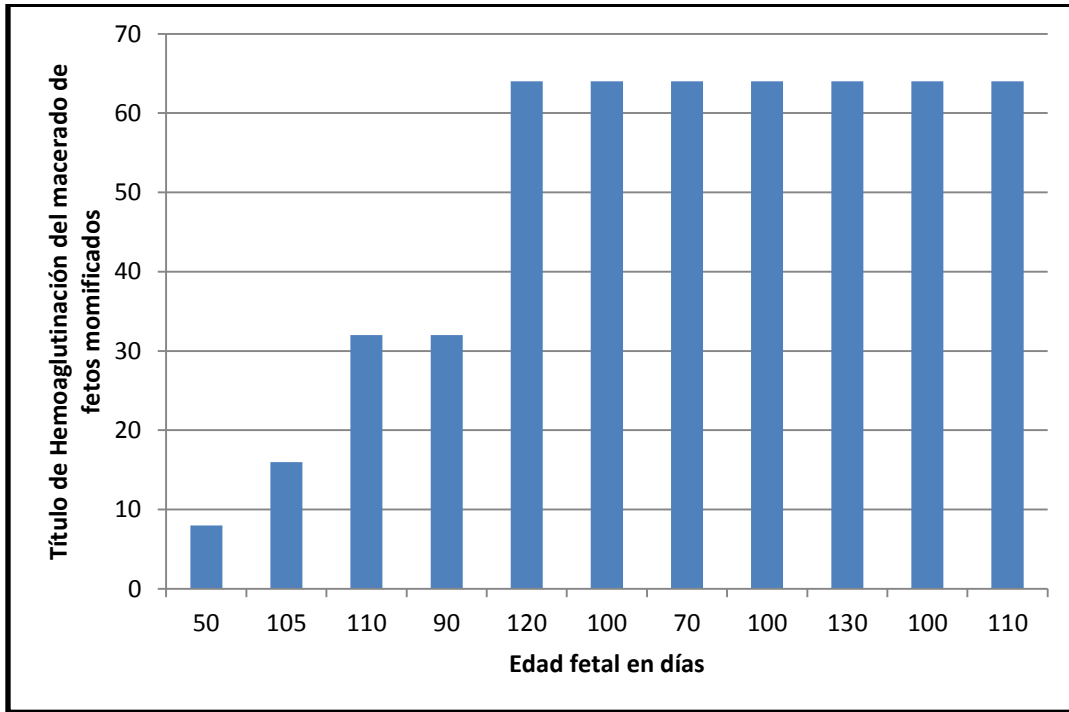
La edad fetal de los fetos momificados y los lechones nacidos muertos el interés se centra en determinar si el tamaño en milímetros, va en proporción a la edad fetal en días de la gestación, estimada con la fórmula matemática antes mencionada, arrojando resultados positivos es decir que va de acuerdo con la intensidad con la que se presenta la edad en proporción al tamaño (Grafica 1).

Grafica 1- Edad fetal de fetos momificados y lechones nacidos muertos



Mediante la prueba de HA del macerado de órganos de fetos momificados, se pudo demostrar la presencia del PPV, la incidencia más alta fue para las muestras que obtuvieron un título de 64, basada en diluciones positivas dobles, (1:8, 1:32 y 1:64). Las muestras que obtuvieron el título más alto (64) corresponden a fetos momificados que su medida oscilo entre los 70 y 1200 mm de largo dorsal, por lo que la estimación de la edad fetal fue de 58 días en promedio, predominando fetos momificados de cerdas primerizas y de segundo parto (Grafica 2).

Grafica 2. Título de Hemoaglutinación del macerado de fetos momificados



Se analizaron estadísticamente los anteriores resultados obteniendo una media de 47.27 ± 23.85 , corresponde al 63.6 % para los títulos (64) de la prueba de Hemoaglutinación (Cuadro 2).

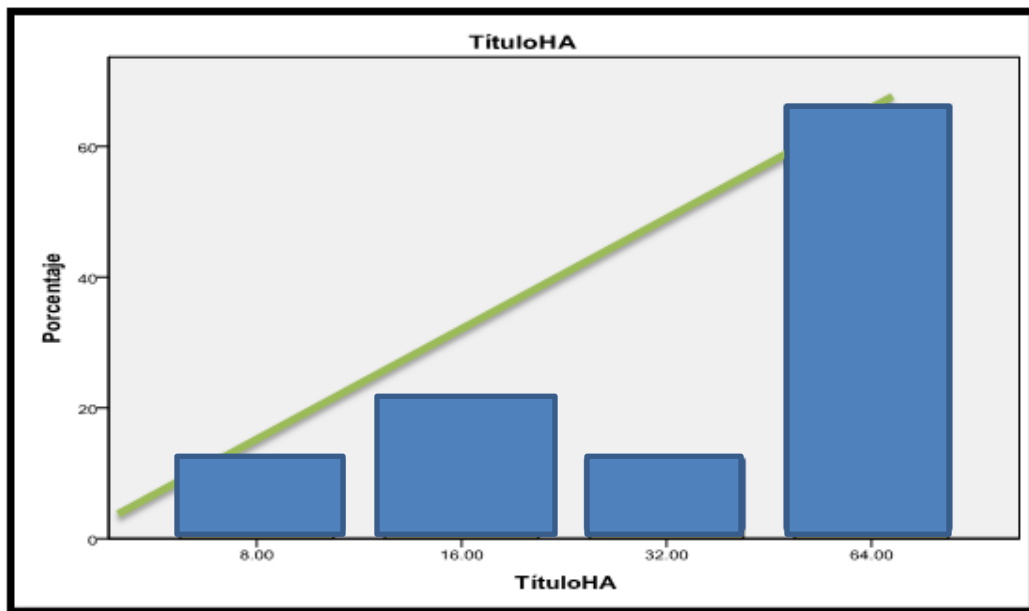
En el Grafico 3, se observan los títulos de HA y la frecuencia (%) con la que se presentan estos.

Cuadro 2.- Promedio de los títulos de la prueba de hemoaglutinación.

| | |
|---------------------|--------|
| Media | 47.27 |
| Mediana | 64.00 |
| Moda | 64.00 |
| Desviación estándar | 23.85 |
| Varianza | 569.01 |
| Rango | 56 |

| Título HA | Frecuencia | Porcentaje |
|-----------|------------|------------|
| 8 | 1 | 9.1 |
| 16 | 2 | 18.2 |
| 32 | 1 | 9.1 |
| 64 | 8 | 63.6 |

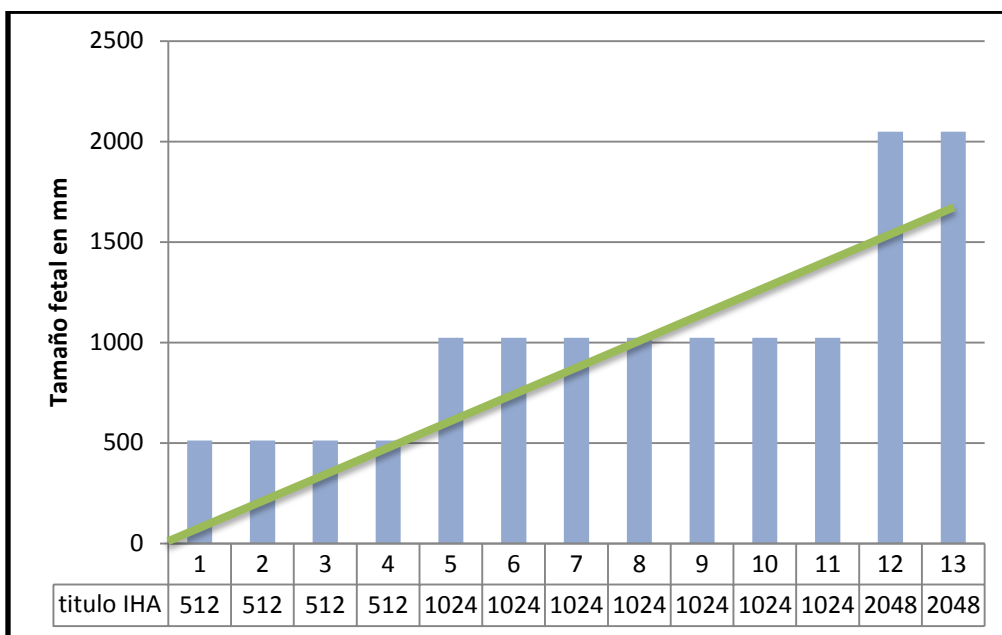
Grafica 3 Título de la prueba HA del macerado de órganos de fetos momificados.



Al realizar la prueba de IHA a los lechones nacidos muertos se obtuvieron títulos de 512 a 2048; (Grafica 4). De los cuales se pudo detectar títulos de anticuerpos a partir de fluidos corporales de los lechones nacidos muertos. En cuanto a la edad

fetal, esta oscilo entre los 61 y 110 días de gestación, obteniendo títulos de anticuerpos de 512 a 2048. Estos lechones provienen de cerdas de primer hasta sexto parto conforme al registro productivo de cada cerda.

Grafica 4.- Título IHA de lechones nacidos muertos:



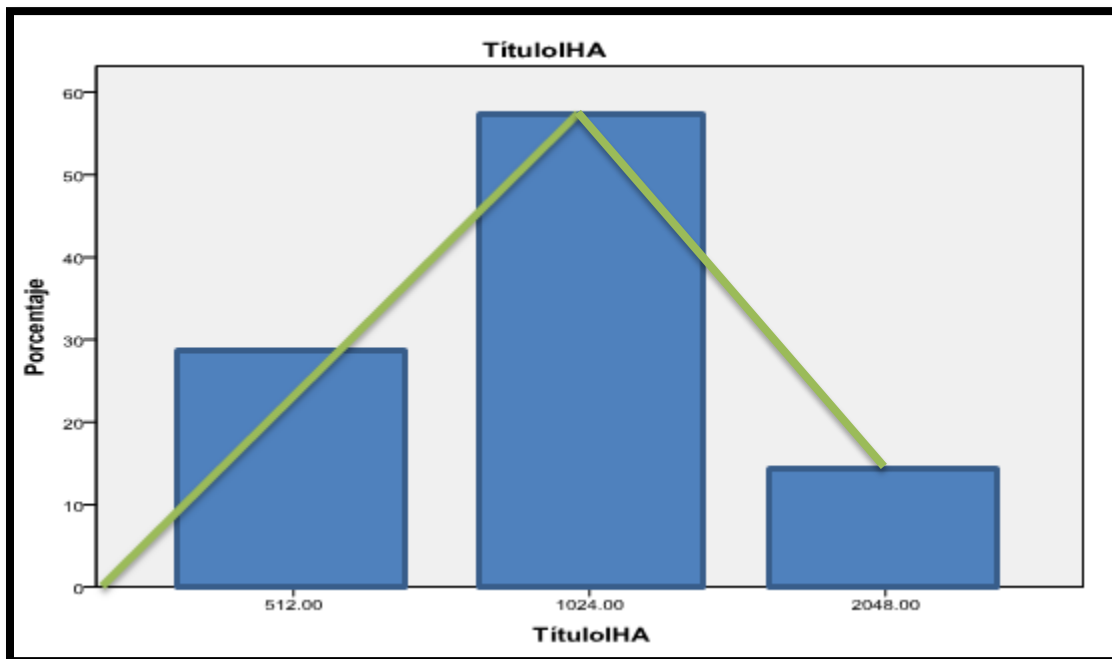
Los títulos en los lechones nacidos muertos fueron de 1024 +/- 491.91 con una promedio de 28.6 para los títulos de 512, 57.1% para los títulos de 1024 y 14.3% para el título 2048, los cuales se representan mediante una gráfica de barras. (Cuadro 3 Grafica 5).

Cuadro 3.- Promedio de la Prueba de IHA para los lechones nacidos muertos

| | |
|---------------------|---------|
| Media | 1024 |
| Mediana | 1024 |
| Moda | 1024 |
| Desviación estándar | 491.91 |
| Varianza | 2419.79 |
| Rango | 1536 |

| Título IHA | Frecuencia | Porcentaje |
|------------|------------|------------|
| 512 | 4 | 28.8 |
| 1024 | 8 | 57.1 |
| 2048 | 2 | 14.3 |

Grafica 5.- Frecuencia de los títulos de la prueba IHA de los lechones nacidos muertos.



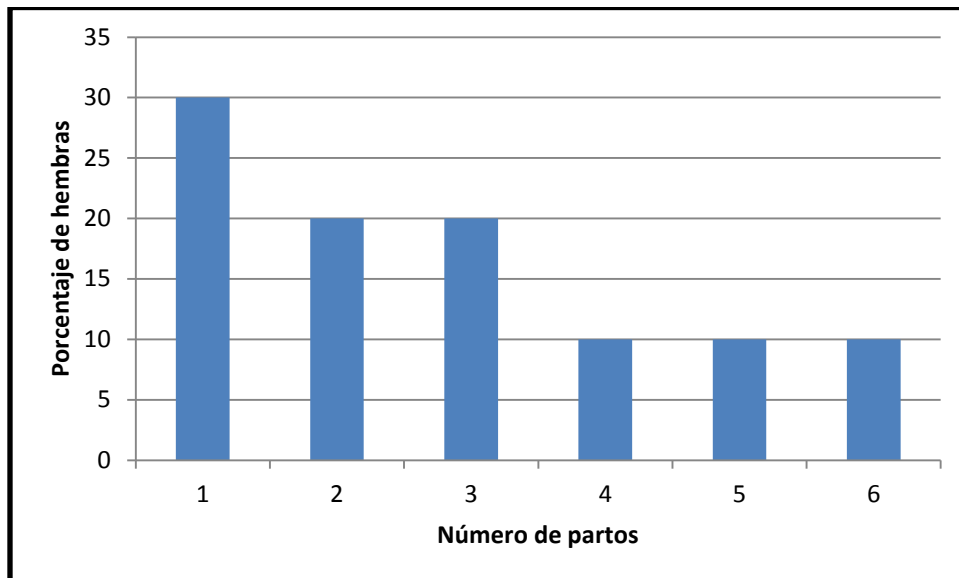
Tanto los títulos de IHA analizados para cada una de las 35 muestras de cada granja, así como los porcentajes y prevalencia del PPV en cada granja es muy

variable, alcanzado prevalencias del 100%. Las cerdas con respecto al número de partos se mostraron positivas con porcentajes más elevados las de 1º a 3º parto, mientras que las cerdas a partir del 4º parto en adelante ya muestran positividad con menores porcentajes de anticuerpos cuadro 4, y grafica 6

Cuadro 4. Intervalo de títulos de IHA, porcentajes y prevalencia de cada una de las granjas

| Granja | No. De cerdas reproductoras | Intervalo de Título IHA | Porcentaje (%) | Prevalencia (%) |
|--------|-----------------------------|-------------------------|----------------|-----------------|
| A | 3500 | 512-4096 | 88% | 100% |
| B | 3500 | 256-2048 | 40% | 85% |
| C | 3200 | 256-1024 | 54% | 54% |
| D | 3200 | 256-2048 | 54% | 62% |
| E | 1000 | 512-4096 | 92% | 100% |

Grafica 6.- Porcentaje de hembras positivas a PPV en relación al número de partos.



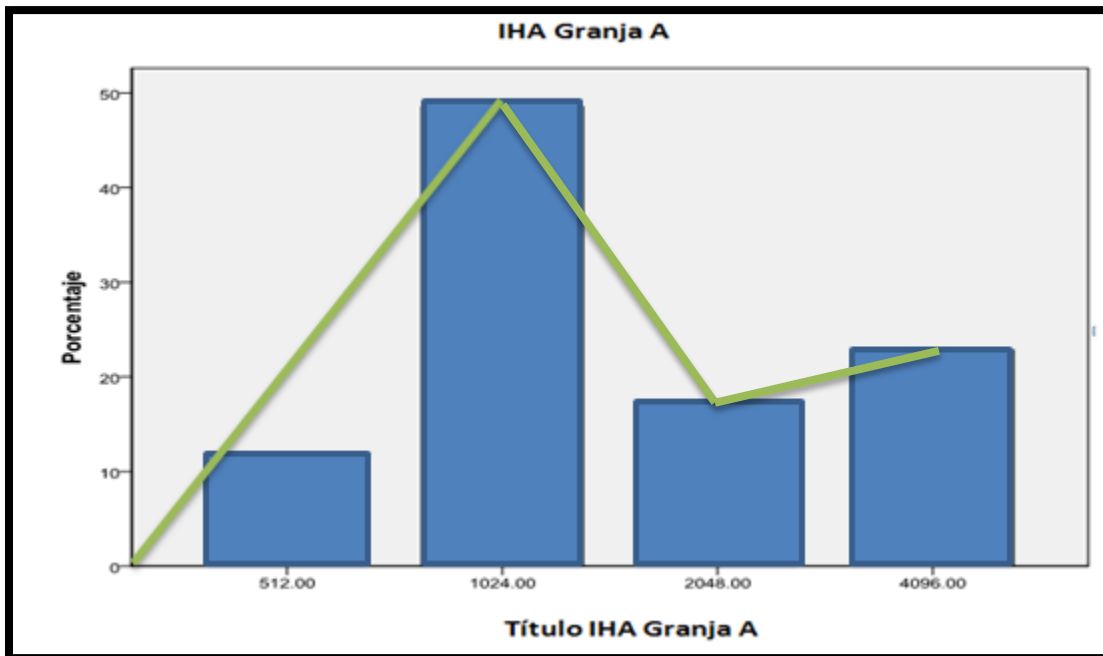
En la granja A, los títulos de IHA fueron de 1843.20 +/- 1321.20. Obteniendo un promedio positivo de anticuerpos contra PP en la cerdas, con una porcentaje de 48.6% para las muestras que obtuvieron títulos de 1024, con un error de $P > 0.05$, (Cuadro 5 y Grafica 7). Mediante la formula matemática anterior, se pudo estimar los niveles de anticuerpos de PP presentes en las cerdas reproductoras. Al hacer una relación de los fetos momificados se puede corroborar que solo un 18% del total de los fetos momificados proveniente de esta granja, obteniendo títulos de 64 para la prueba de HA.

Cuadro 5.- Promedio de la prueba IHA para la granja A.

| | |
|---------------------|----------|
| Media | 1823.20 |
| Mediana | 1024 |
| Moda | 1024 |
| Desviación estándar | 1321.20 |
| Varianza | 17455.70 |
| Rango | 3584 |

| Título IHA | frecuencia | Porcentaje |
|------------|------------|------------|
| 512 | 4 | 11.4% |
| 1024 | 17 | 48.6% |
| 2048 | 6 | 17.1% |
| 4096 | 8 | 22.9% |

Grafica 7.- Promedio de los títulos de IHA de la granja A.



Los títulos de la prueba IHA en la granja B van desde 256 hasta 2048. Al analizar los fetos momificados y lechones nacidos muertos granja, se puede corroborar un 24% del total de los fetos momificados predominando lechones nacidos muertos mayores a 70 días de gestación, que se analizaron a partir de fluidos corporales.

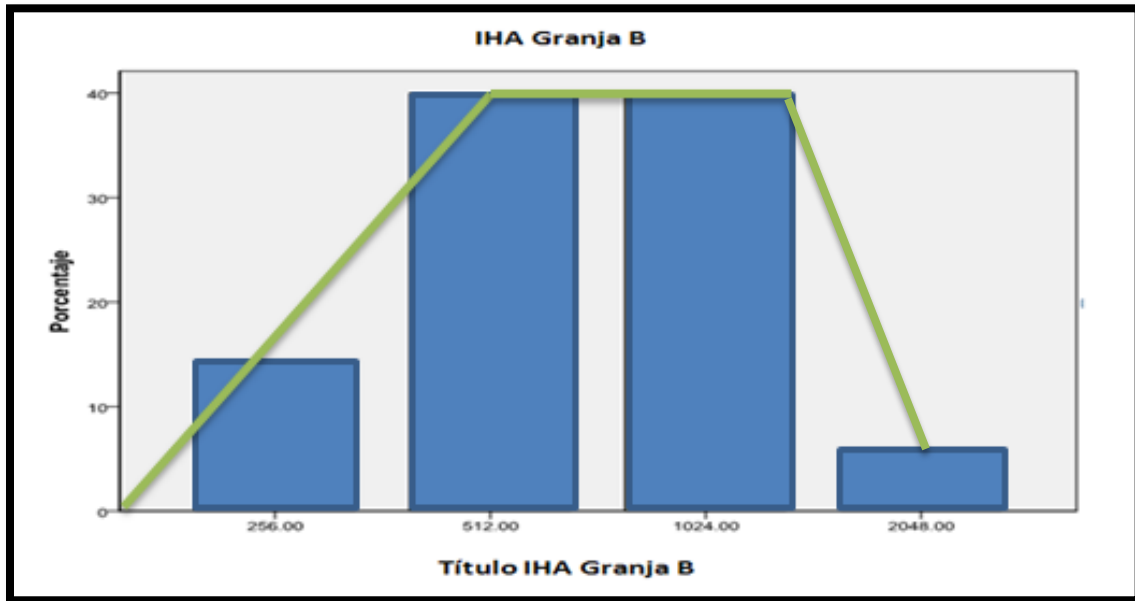
Se analizaron estadísticamente los anteriores resultados, obteniendo una media poblacional de 768, y una desviación estándar de 434.62, con un 40.0% para los títulos de 512, y para los títulos de 1024, con un error de $P > 0.05$ (Cuadro 6, Grafica 8). Con una prevalencia del 85%.

Cuadro 6.- Promedio de los títulos de IHA de la granja B.

| | |
|---------------------|----------|
| Media | 768 |
| Mediana | 512 |
| Moda | 512 |
| Desviación estándar | 434.62 |
| Varianza | 16889.78 |
| Rango | 1792 |

| Título IHA | frecuencia | Porcentaje |
|------------|------------|------------|
| 256 | 5 | 14.3% |
| 512 | 14 | 40.0% |
| 1024 | 14 | 40.0% |
| 2048 | 2 | 5.7% |

Grafica 8.- Promedio de los títulos de IHA de la granja B.



La granja C, obtuvo títulos de anticuerpos hacia PP, desde 256 hasta 1024. El análisis estadístico muestra una media poblacional de 738.74 y una desviación estándar de 610.78, el porcentaje de 37.1% fue para los títulos de 256, el menor porcentaje fue de 14.3% para las muestras que obtuvieron títulos de 2048, con un error de $P > 0.05$, mediante un gráfico de barra se representan los porcentajes para los títulos de anticuerpos, (Cuadro 7 y Grafica 9). Mediante la fórmula matemática anterior, se pudo estimar la prevalencia de esta granja, obteniendo un 54% de prevalencia

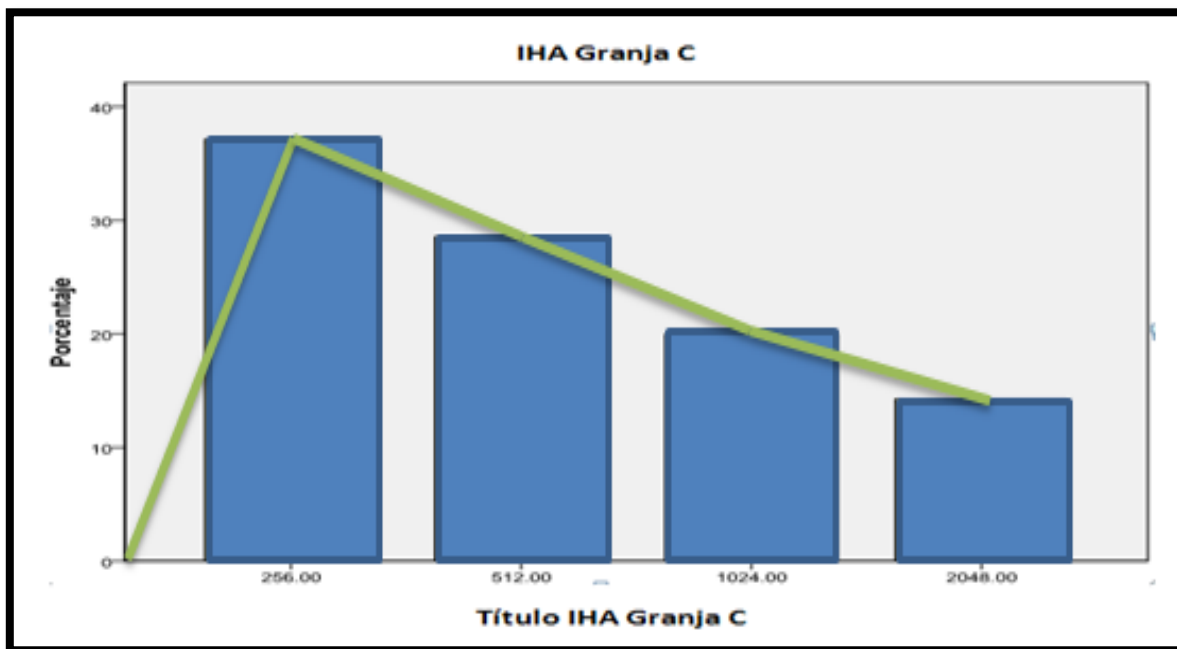
Al hacer una relación de los fetos momificados se puede corroborar que solo un 20% de lechones nacidos muertos, con una edad fetal mayor a 70 días, provenientes de cerdas de primer parto

Cuadro 7.- Promedio de los Títulos de IHA de la granja C.

| | |
|---------------------|----------|
| Media | 738 |
| Mediana | 512 |
| Moda | 256 |
| Desviación estándar | 610.78 |
| Varianza | 37305.95 |
| Rango | 1792 |

| Título IHA | frecuencia | Porcentaje |
|------------|------------|------------|
| 256 | 13 | 37.1% |
| 512 | 10 | 28.6% |
| 1024 | 7 | 20.0% |
| 2048 | 5 | 14.3% |

Grafica 9 Promedio de los Títulos de IHA de la granja C



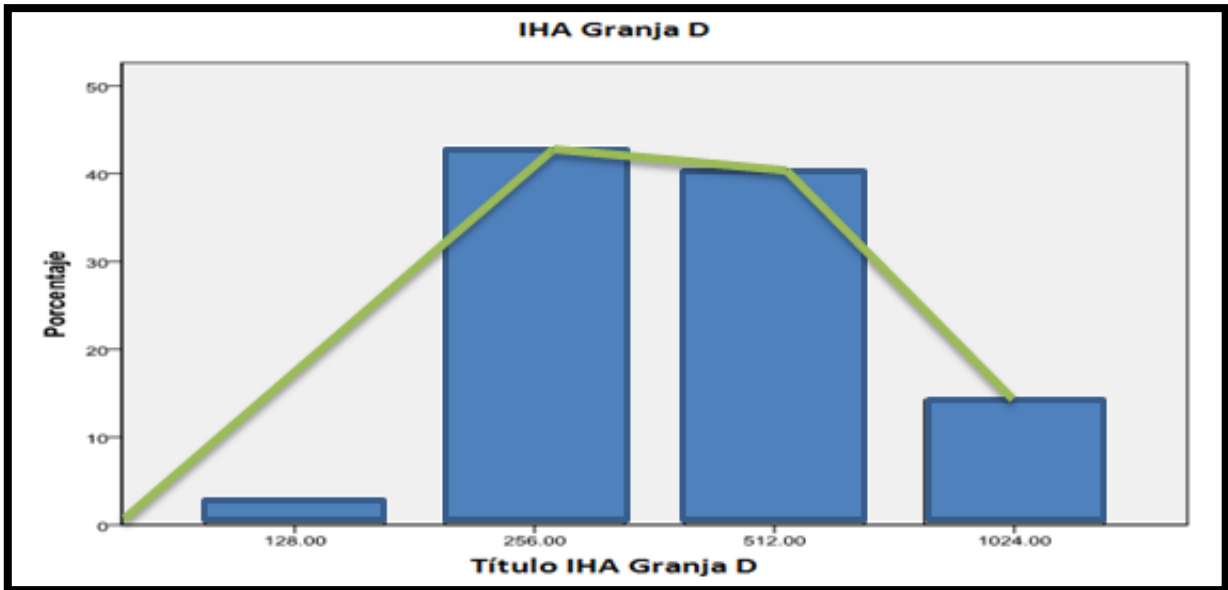
La granja D, al analizar estadísticamente los resultados, se obtuvo una media poblacional de 464.45, y una desviación estándar de 263.57, con un porcentaje de 15 % para los títulos de 256, y 14% para el título de 512, con un error de $P > 0.05$ (Cuadro 8, Grafica 10). Con una prevalencia de 62% al hacer una relación de los fetos momificados se puede corroborar que un 32% del total de los fetos momificados y lechones nacidos muertos proveniente de cerdas primerizas.

Cuadro 8.- Promedio de los Títulos de IHA de la granja D.

| | |
|---------------------|----------|
| Media | 464.45 |
| Mediana | 512 |
| Moda | 256 |
| Desviación estándar | 263.57 |
| Varianza | 69477.36 |
| Rango | 896 |

| Título IHA | frecuencia | Porcentaje |
|------------|------------|------------|
| 128 | 1 | 2.9% |
| 256 | 15 | 42.9% |
| 512 | 14 | 40.0% |
| 1024 | 5 | 14.3% |

Grafica 10 Promedio de los Títulos de IHA de la granja D



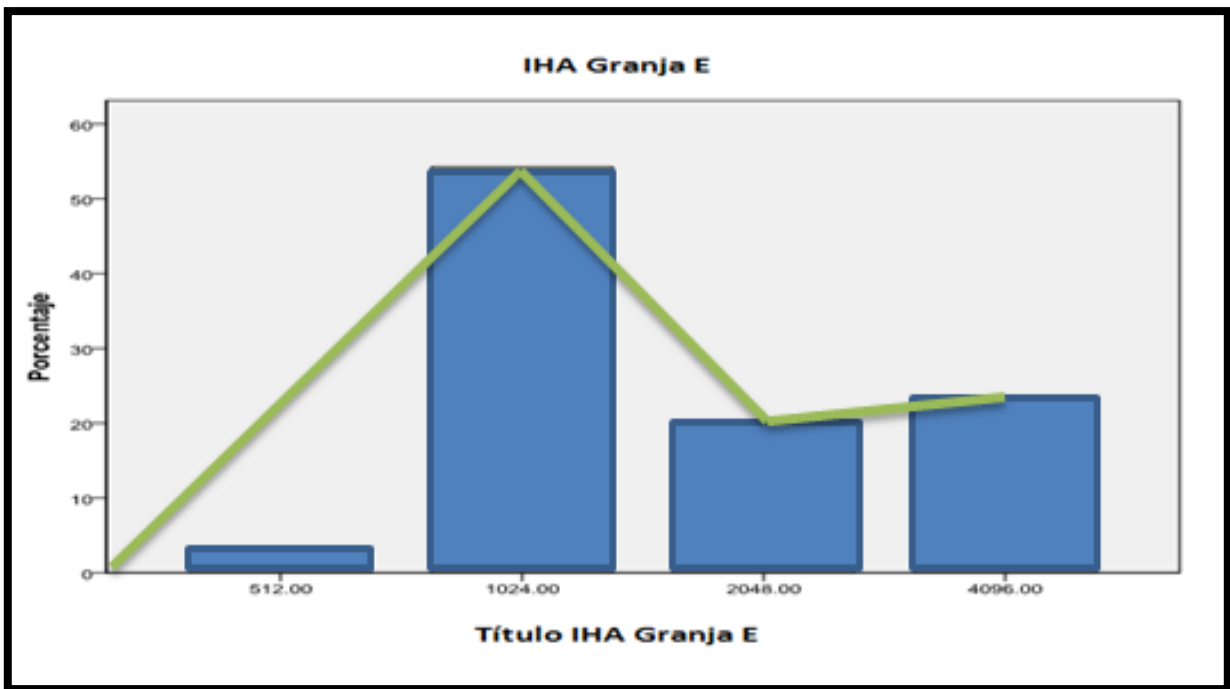
El análisis estadístico de la granja E muestra una media poblacional de 1916.34 y una desviación estándar de 1274.52, el porcentaje de 54.3% fue para los títulos de 1024, con un error de $P > 0.05$, (Cuadro 9 y Grafica 11). Mediante la ecuación anterior, se pudo estimar la prevalencia de esta granja, obteniendo un 100% de prevalencia, al hacer una relación de los fetos momificados se puede corroborar que solo un 12% del total de los fetos momificados proveniente de cerdas de segundo y tercer parto.

Cuadro 9.- Promedio de los Títulos de IHA de la granja E.

| | |
|---------------------|-----------|
| Media | 1916.34 |
| Mediana | 1024 |
| Moda | 1024 |
| Desviación estándar | 1274.54 |
| Varianza | 162441.16 |
| Rango | 3584 |

| Título IHA | frecuencia | Porcentaje |
|------------|------------|------------|
| 512 | 1 | 2.9% |
| 1024 | 19 | 54.3% |
| 2048 | 7 | 20.0% |
| 4098 | 8 | 22.9% |

Grafica 11. Promedio de los Títulos de IHA de la granja E



Como prueba confirmatoria para el presente trabajo se mandó analizar a un laboratorio externo el sobrenadante de los órganos macerados de fetos momificados menores de 160 mm de largo dorsal, mediante la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Resultando positivos al antígeno viral de Parvovirus Porcino (Datos no mostrados).

5.- DISCUSIÓN

Mediante la prueba serológica de HA, en el presente trabajo se pudo demostrar la positividad de antígeno viral de PP en fetos momificados menores de 70 día de gestación Lester *et al.*, (2012), menciona que la prueba de HA e IHA, son esenciales para la prevención de la enfermedad de PP en sistemas de producción Porcina ya que la IHA es una prueba rápida, y confiable que permite detectar los niveles de anticuerpos contra PPV presentes en las cerdas reproductoras de cada piara, pudiendo establecer la medida de manejo específicas para poder prevenir la enfermedad en cualquier región del mundo.

Ramírez *et al.* (1998), Obtuvieron resultados similares a los que encontrados en esta investigación, los títulos de HA (64) en fetos momificados menores a 160 mm de largo dorsal y la estimación de la edad fetal coincidió que los fetos que miden 160 mm de largo dorsal tiene 70 días de gestación, además que la concentración de PP en el feto es alta una semana después de que ha tenido contacto con el virus y disminuye en forma progresiva a las 3 y 10 semanas postinfección. Con base a los resultados sería interesante en posteriores investigaciones se analicen además de los fetos momificados, los úteros de cerdas gestantes y se realicen el aislamiento a partir de cultivos celulares de testículo o riñón de cerdo.

La patogenicidad del PPV al provocar la muerte de los fetos menores de 160 mm de largo dorsal, Pan et al., (2008), reiteran la ubicuidad del virus con la posible intervención de múltiples infecciones virales tales como PCV2. Mengeling *et al.*, (2000) e Yonghou *et al.*, (2010), también demuestran la relación del PPV con PRRS enfatizando con el presente trabajo en el cual al recolectar las muestras y al revisar la historia clínica de las cerdas, las 5 granjas en estudios previos realizados son positivas a PRRS, pudiendo generar daños más severas en los fetos y las cerdas, provocando una pérdida económica mayor.

La prevalencia del PP en las 5 granjas de La Piedad Michoacán es alta, esto pudo ser debido a que la aplicación de la vacuna no es la indicada en tiempo, ya que en la historia clínica de las 5 granjas se aplica una vacuna trivalente Parvo Leptoriseripela de Pfizer (Farrow sure) a los 10 días post-parto. Sin embargo no se lleva un registro adecuado de la historia clínica ni de los parámetros reproductivos de cada cerda, siendo de gran importancia, ya que la falla reproductiva descrita al inicio de la presente investigación puede presentarse a causa de muchos agentes infecciosos.

Spadaro *et al.*, (2010). Demostraron que cuando las hembras primerizas no reciben una adecuada inmunización, ya sea por infección natural o artificial contra PPV, la seronegatividad de las cerdas de primer y segundo parto denota la ausencia de una infección natural así como también de protección vacunal. La vacunación contra PPV evita la infección clínica pero no la circulación del virus, si no se vacuna o no se sigue un protocolo de vacunación adecuado, entonces pueden producirse olas de fetos momificados en hembras de 1 o 2 partos.

En el presente estudio al realizar la técnica de IHA a partir de fluidos corporales de lechones nacidos muertos, de más de 70 días de gestación se obtuvieron títulos de 512; a 4096, demostrando que la infección en la cerda se presentó en el último tercio de gestación ya que de no ser así se hubiera presentado una muerte fetal y

por consiguiente la momificación del feto, datos que concuerdan con los estudios realizados por Wilhelm *et al.*, (2006).

En el estudio de Rosales *et al.*, (2004). En cerdas de reemplazo mencionan que los títulos de anticuerpos por la infección en cerdas reproductoras en el cual consideran positivas las muestras con un título mayor o igual a 480, por lo cual sugieren la posibilidad que se introduzca el agente viral a la granja por la continua demanda de reemplazos sin cuarentena, estos títulos muestran que los anticuerpos fueron inducidos por virus de campo; ya que con la vacunación no se alcanzan estos título. Además mismos resultados se confrontaron con el trabajo realizado por Shen *et al.*, (2010), resultados similares obtenidos en el presente.

Spadaro *et al.*, (2010) en su trabajo mencionan que las cerdas de primer a tercer parto resultaron negativos al analizar los títulos de Ac mediante la prueba de IHA, datos que concuerdan con el estudio de Morilla, (2011) en el cual menciona que los títulos de Ac no provienen por contacto con el PPV sino que son Ac vacunales y no son detectados por la prueba de IHA debido al punto de corte en la prueba, diferencias evidentes con el resultado del presente estudio en el cual se encontraron títulos positivos y elevados en cerdas de primer a tercer parto, que tuvieron contacto en el PPV ya que los fetos momificados fueron predominantes de cerdas con números de partos antes mencionados, lo cual indica que las cerdas han tenido contacto con el PPV, y por consiguiente deben tener títulos de Ac positivos. Rosales *et al.*, (2004). Señala que la variación de los resultados obtenidos en los diversos estudios, se deben a que el PPV ha modificado su difusión natural en sistemas de producción en sitios múltiples posiblemente debido a que las rutinas de manejo sanitario actuales, son diferentes en cada granja de donde se obtuvieron las muestras.

Antonis *et al.*, (2006) revelan una seroprevalencia de muestras seropositivas de un 45.3%, resultados concluyentes con el estudio de Carrera *et al.*, (2011), los cuales

muestra una seropositividad del 45.3% y 54.7% negativos, dicho estudio, fue realizado en granjas con una baja densidad de cerdos, discrepancias notorias con el resultado del presente estudio donde se observó una seroprevalencia positiva del 80% en donde la densidad de población porcina de las 5 granjas es alta, probablemente esta variación en los resultados esté relacionado a que el virus está presente en las cerdas y en constante movimiento debido al manejo sanitario de cada granja, y a la densidad de población de cada granja muestreada.

Xiao et al., (2012), menciona que los títulos de Ac positivos (512) son debidos al contacto de PPV con los lechones nacidos muertos, y no a la respuesta inmunitaria de la vacunación, resultados similares al presente estudio sin embargo sería importante realizar estudios posteriores, en cada semana de gestación de la cerda para observar en que semana se observan títulos más altos de Ac contra PPV y poder relacionar los títulos de Ac de los lechones nacidos muertos con los de la madre, empleando el paquete SSPS Statistics versión 18. 0.

6.- CONCLUSIONES

Concluyo que los objetivos del presente trabajo, se cumplieron aunque el tamaño de la muestra de los fetos momificados como de los lechones nacidos muertos no es representativo estadísticamente, es un tamaño de muestra que los médicos de granjas emplean para conocer e interpretar el perfil de antígeno de PPV.

La variación en los títulos de anticuerpos en las cerdas reproductoras provenientes de las 5 granjas se debe al contacto con el antígeno de PPV, y al manejo sanitario inadecuado de la inmunización de cada cerda, además de que no se lleva un estricto control de los registros tanto de la historia clínica como de los parámetros reproductivos de la cerda.

Es importante conocer la prevalencia de Parvovirus Porcino en las granjas porcícolas, así como los títulos de anticuerpos de las cerdas reproductoras, y lechones mediante técnicas de diagnóstico seguras y económicas, para poder implementar las medidas necesarias de manejo y prevención contra PPV en cada granja.

7.- REFERENCIA BIBLIOGRAFÍA

- Antonis FG, Brusckke JM, Rueda P, Maranga L. A novel recombinant virus-like particle vaccine for prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure. *Vaccine* 2006; 24:5481–5490.
- Brecher ME. Technical Manual AABB Press 2003 URL: <http://www.medmol.es/tecnicas28/htm>
- Cabrera BM. Manual de exploración física aplicada en la clínica porcina (tesis de licenciatura). México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Universidad Nacional Autónoma de México, 2008.
- Cadar D, Dán A, Tombácz K, Lorincz M, Becskei Z, Spînu M, Tuboly T, Cságola A. Phylogeny and evolutionary genetics of porcine parvovirus in wild boars, *Infection. Genetics and Evolution* 2012; 12:1163–1171.
- Candelo AN, Hidalgo MY. Serologic Study of Three Pathologies of the Reproductive Tract of Sows in Farms of Aragua State, Venezuela. *Revista Científica* 2002; 2:108-112.
- Carrera V, Mercado C, Carreón R, Haro M. Seroprevalencia y frecuencia de títulos de anticuerpos contra Parvovirus Porcino en cerdos de traspatio del Distrito Federal en el periodo 2000-2009. *Memorias del XLVI Congreso Nacional*; 2011 julio 20-23; Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (DF): Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2011:172.

- Caryn LH, Hernandez R, Usharani M. A colorimetric assay for viral agents that produce cytopathic effects. *Journal of Virological Methods* 2006; 35: 56–65.
- Chen HY, Xiao KL, Cui BA, Yong ZW. A TaqMan-based real-time polymerase chain reaction for the detection of porcine parvovirus. *Journal of Virological Methods* 2009; 156:84–88.
- Choi C, Chae C. Distribution of Porcine Parvovirus in Porcine Circovirus 2-infected Pigs with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome as shown by In-situ Hybridization. *Journal Comp Path* 2000; 123:302–305.
- Díaz DA. Porcine Parvovirus Infections in Cuba. *Rev. Salud Animal*. 2009 URL:<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010106.html>.2009.
- Falceto CD. Variaciones fisiológicas de la funcionalidad ovárica en la cerda. 2nd ed. Zaragoza España: Acribia, 2006.
- Fenati M, Armaroli E, Corrain R, Guberti V. Indirect estimation of porcine parvovirus maternal immunity decay in free-living wild boar (*Sus scrofa*) piglets by capture recapture data. *The Veterinary Journal* 2009; 180: 262–264.
- Flores VA. Influencia de la edad a la primera monta fértil en cerdas York-Landrace primerizas (Tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Estudios Superiores Cuatitlán: Universidad Nacional Autónoma de México, 2008.
- Fuentes CM, Pérez GL, Suarez H. Características reproductivas de la cerda, influencia de algunos factores ambientales y nutricionales URL:<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010106.html>.2006.
- García PB, Rodríguez RA, Vargas CV, Mercado PM, Batalla CD, Quintero RV. Estandarización de la técnica de PCR para diagnóstico de Circovirus Porcino tipo 2. Memorias de XIL Congreso Nacional de AMVEC; 2004 junio 26-28; Mazatlán (Sinaloa) México. México (DF): Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdo, AC, 2004:153.

- García VZ., *Epidemiología Veterinaria y Salud Animal*. Zaragoza España: Limusa, 1990.
- Gavadea EL., Transmission of porcine circovirus 2 (PCV2) by semen and viral distribution in differen piglet tissues. *Vaccine* 2008;28: 70-76.
- Grigori G, Prikhodk O, Reyes H, Vasilyeva I, Busby T. Establishment of a porcine parvovirus (PPV) DNA standard andevaluation of a new LightCycler nested-PCR assay for detection of PPV. *Journal of Virological Methods* 2003; 111:13-19.
- Hao TC, Jie Z, Sheng-hai Y, Li-na MA, Yan-ping M. Detection of porcine parvovirus DNA by sensitive loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods* 2009; 158:100-103.
- Huang CU, Hung JJ, Wu CY. Multiplex PCR for rapid detection of pseudorabies virus, porcine parvovirus and porcine circoviruses. *Veterinary Microbiology* 2004; 101:209–214.
- Kennedy SD, Moffett F, McNeilly B, Meehan J, KrakowkaAllan GA. Reproduction of Lesions of PostweaningMultisystemic Wasting Syndrome by Infection of Conventional Pigs with Porcine Circovirus Type 2 Alone or in Combination with Porcine Parvovirus. *Journal Comp. Path* 2000; 122:9-24.
- Kim J, Chae C. A Comparison of the Lymphocyte Subpopulations of Pigs Experimentally Infected with Porcine Circovirus 2 and/or Parvovirus, *The Veterinary Journal* 2003; 165:325-329.
- Kim J, Han D, Choi C, Chae C. Simultaneous detection and differentiation between porcine circovirus and porcine parvovirus in boar semen by multiplex seminested polymerase chain reaction. *Journal Vet Med Sci* 2003; 65:741-744.
- Lee RP, Macbaty K. Detection of porcine parvovirus in the follicular fluid of abattoir pig. *Journal of Swine Healt and Production* 2008; 16:244-246.

- Leman AD, Barbara S, Glock RD. Diseases of Swine, 6ta ed. Iowa State University Press, 1986.
- Lester JP, Perera CP, Frías MT, Nunez J, Ganges L, Díaz H. A multiple SYBR Green I-based real-time PCR system for the simultaneous detection of porcine circovirus type 2, porcine parvovirus, pseudorabies virus and Torque tenosus virus 1 and 2 in pigs. *Journal of Virological Methods* 2012; 179:233-241.
- Lui D, Wang GJ, Songmei L. Comparison of the immune responses induced by oral immunization of mice with *Lactobacillus casei* expressing porcine parvovirus VP2 and VP2 fused to *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit protein. *Journal of Virological* 2011; 34:73-81.
- Mendoza SE, Alvarado JN, Hernández EB, Ciprián AC. Manual de Diagnóstico Viroológico Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán: Universidad Nacional Autónoma de México, México (D.F). 2008.
- Mengeling WL, Lager KM, Vorwald AC. The effect of porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive performance. *Animal Reproduction Science* 2000; 60:199-210.
- Mesonero JA, Maldonado GJ, Perea RP. Una visión acerca de un viejo conocido: Parvovirus Porcino (Parte II), publicación mensual/no 75/AñoVIII/Enero 2011.
- Mateusen B, Maes D, Van Soom A, Lefebvre D, Nauwynck H. Effect of a porcine circovirus type 2 infections on embryos during early pregnancy. *Journal of Virological Methods* 2007; 68:896-901.
- Morilla GA. Los perfiles serológicos y microbiológicos para evaluar el estado sanitario de las granjas porcina. *Ciencia Veterinaria* 1996;7:293.
- Morilla GA. Interpretación de la Serología en Producción Porcina: Parvovirus Rev Desarrollo Porcícola 2011; 23-24.

- Mota DR, Nava AO, Villanueva DG, Alonso M.S. Perinatología Animal enfoques clínicos y experimentales 1era ed México BM editores, 2006.
- Notomi, T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 2000; 28:63.
- Opriessnig T, Fenaux M, Yu S, Evans R.B, Gallup J.M, Pallares FJ. Effect of porcine parvovirus vaccination on the development of PMWS in segregated early weaned pigs coinfecting with type 2 porcine circovirus and porcine parvovirus. Veterinary Microbiology 2004; 98:209-220.
- Osnaya GF, Actividad reproductiva de la hembra reproducción animal e inseminación artificial. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, 2006.
- Ostanello FA, Caprioli AA, Francesco DA, Battilani MA. Experimental infection of 3-week-old conventional colostrum-fed pigs with porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus. Veterinary Microbiology 2005; 108: 179-186.
- Pan QX, Hekong WK, Wang HH. Development of recombinant porcine parvovirus –like particles as an antigen carrier formed by the hybrid VP2 protein carrying immunoreactive epitope of porcine circovirus type 2: Vaccine 2008; 26:2119-2126.
- Pazos NS, Pérez MF, Pérez TO, Ruiz TA. Manual de Virología; Microbiología Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 2002.
- Pérez LJ, Perera CL, Frías MT, Gangesb L. A multiple SYBR Green I-based real-time PCR system for the simultaneous detection of porcine circovirus type 2, porcine parvovirus, pseudorabies virus and Torque tenosus virus 1 and 2 in pigs. Journal of Virological Methods 2012; 179:233-241.
- Perea RO. Trastornos reproductivos porcinos de origen infeccioso URL: http://aacporcinos.com.ar/sanidad_porcina/parvovirosisporcina.htm.

- Peter GC. Manual de Medicina Porcina, 2do ed. España INTERAMERICANA. 2009.
- Ramirez MH, Trigo TF, Correa GH, Castillo JH, Mercado GM. Determinación de anticuerpos y antígeno contra Parvovirus Porcino en fetos colectados en rastro. *Veterinaria México* 1998; 29:337-343.
- Rico SM. Detección y aislamiento del Parvovirus Porcino en Medellín Colombia. *Rev Col Cienc Pec* 2003; 16:12-15.
- Rivera E, Daggfeldt MD. Ginseg extract in aluminium hydroxide adjuvante vaccines improves the antibody response of pigs to porcine parvovirus and *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Veterinary Immunologic and Immunopathology* 2003; 91:19-27.
- Rosales EF, Ferreo S, Lasorella R, Leoni G. Serología Longitudinal en Cerdas de Reemplazo contra Parvovirus Porcino (PPV), Memorias del XII Congreso Nacional de AMVEC, 2004 Mazatlán (Sinaloa) México. México (DF): Asociación de Médicos Especialistas en Cerdos, AC, 2004:154.
- Rose NP, Blanchard RC, Grasland BN. Vaccination of Porcine Circovirus type 2(PCV2)-infected Sows against Porcine Parvovirus (PPV) and Erysipelas: Effect on Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) and on PCV2 Genome Load in the Offspring. *Journal Comp. Path* 2007; 136:133-144.
- Rueda PA, Fominaya JA, Jan PM, Langeveld B. Effect of different baculovirus inactivation procedures on the integrity and immunogenicity of porcine parvovirus-like particles. *Vaccine* 2001; 19:726-734.
- Sánchez JM. Enfermedades de la reproducción Parvovirus Porcino. Facultad de Veterinaria: [URL:http://www.veterinaria.org/n012398.html](http://www.veterinaria.org/n012398.html). 2008.
- Sandoval VE. Obtención de albúmina sérica bovina y ovoalbúmina. Memoria de Veranos de la Investigación Científica. Universidad de Guanajuato, 2011.

- Savón VC, Goyenechea AH, Oropesa SF. Manual de procedimientos para el diagnóstico de laboratorio de las infecciones agudas de etiología viral, Instituto de Medicina “Pedro Kouri”. Habana Cuba.2003; 667-678.
- Segalés JC. Circovirus Porcina Más de 10 años Después. Memorias de XLII Congreso Nacional de AMVEC; 2007 julio 25-28; Querétaro, (Querétaro) México. México (DF): Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2007:67-70.
- Segalés JC. Enfermedades Emergentes: Circovirus Porcinos, Memorias del 1er Diplomado Internacional: “Biotecnología en la Producción Porcina y Gestión Ambiental” Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, 2012.
- Simpson AA, Heabert BM. The Structure of Porcine Parvovirus: Comparison with Related Viruses. Journal Mol. Biol. 2002; 315:1189-1198.
- Sungseok L, Jeongyeon S, Chiyong K, Young SL. Comparison of Torque Tenosus Virus (TTSuV) viral load in Porcine Circovirus type 2 vaccinated and non-vaccinated pig herds. Research in Veterinary Science 2012; 93:1039-1041.
- Shangjin C, Cortey M, Segalés J. Phylogeny and evolution of the *NS1* and *VP1/VP2* gene sequences from porcine parvovirus. Virus Research 2009; 140:209-215.
- Shen HG, Beach NM, Huang YM, Halbur PG, Meng XJ. Comparison of commercial and experimental porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines using a triple challenge with PCV2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), and porcine parvovirus (PPV). Vaccine 2010; 28:5960-5966.
- Spadaro M, Pereyra N, Biscia M, Dibarbora M, Cane F, Sarradell J. Descripción de un caso de Parvovirus Porcino con baja prevalencia serológica, Memorias del X Congreso Nacional de Producción Porcina 2010 agosto 24-26; Mendoza (Argentina), 2010.

- Straw EJ, Zimmerman J. Diseases of swine. 9th ed. Blackwell publishing, 2006
- Tijssen P, Agbandje-M K, Almendral JM, Bergoin M, Flegel TW, Hedman K, Kleinschmidt MJ, Pintel DJ, Tattersall P. Family Parvoviridae <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.038>.
- Ting QI, Shang-jin C. Expression, purification, and characterization of recombinant NS-1, the porcine parvovirus non-structural protein. Journal of Virological Methods 2009; 157:93-97.
- Venosa PF, Mendoza EZ, González RE. Comparación de Títulos vs PPV mediante la Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación, Memorias de XXXXII Congreso Nacional AMVEC; 2007 julio 25-28; Querétaro, (Querétaro) México. México (DF): Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2007:226.
- Wang RN, Ya-bin W, Geng JW, Guo DH, Fang Liub Chenb HY. Enhancing immune responses to inactivated porcine parvovirus oil emulsion vaccine by co-inoculating porcine transfer factor in mice. Vaccine 2012; 30:5246-5252.
- Wilhelm SA, Zimmermann P, Joachim HS. Real-time PCR protocol for the detection of porcine parvovirus in field samples. Journal of Virological Methods 2006; 134:257-260.
- Xia MA, Zhenhuan GU, Zhiqiang SH, Jinliang WA, Deyun WA. The immune enhancement of propolis adjuvant on inactivated porcine parvovirus vaccine in guinea pig. Journal virology 2011; 270:13-18.
- Xiao CT, Gerber PF, Gimenez LG, Halbur PG, Opriessnig T. Characterization of porcine parvovirus type 2 (PPV2) which is highly prevalent in the USA. 2012 <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.038>.
- Yonghou JA, Hanwu SB, Hui XC, Liangjun ZA, Weijie CC. Simultaneous detection of porcine circovirus type 2, classical swine fever virus, porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs

by multiplex polymerase chain reaction. The Veterinary Journal 2010; 183:172-175.

- Zimmermann P, Ritzmann M, Selbitz HJ, Heinritzi K, Truyen U. VP1 sequences of German porcine parvovirus isolates defines two genetic lineages. Journal Gen Virol 2006; 87:495-501.
- Zhang CF, Shangiin CU. Characterization of a porcine parvovirus cell culture-adaoten strain, Chinese. Journal of Preventive Veterinary 2008; 30:362-366.
- Zheng LL, Wangb YB, Chenb YM, Guob XB, Genga JW. Simultaneous detection of porcine parvovirus and porcine Circovirus type 2 by duplex real-time PCR and Amplicon melting curve analysis using SYBR Green, Journal of Virological Methods 2012; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.06.024>