



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRIA EN MEDICINA VETERIARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**USO DE FLUIDOS ORALES PARA EL MONITOREO DE LA ENFERMEDAD DE
PRRS EN UN SISTEMA DE PRODUCCIÓN PORCINA COMERCIAL.**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

PRESENTA:

MVZ. ENRIQUE AGUILAR HERNÁNDEZ

**Tutor principal: MVZ MCV Rosalba Carreón Nápoles.
FMVZ UNAM
MVZ Roxana Mendoza Galicia.
Asesora Porcícola Independiente.**

**Comité tutorial: Dra Susana E. Mendoza Elvira.
FES-C UNAM**

**MVZ MCV Roberto Martínez Gamba.
FMVZ UNAM**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mis padres:

Catalina y Mario, que con su esfuerzo, dedicación y enseñanzas han logrado forjar una gran familia, llena de valores y buenas costumbres, que sin duda alguna, me han llevado a ocupar el lugar que hoy tengo. Papas, este logro es de ustedes y para ustedes.

LOS AMO

A mis hermanos:

Sara, Toño, Jorge y Gloria, ustedes fueron siempre mis mejores ejemplos a seguir. Su apoyo y palabras de aliento en los momentos más difíciles me permitieron continuar en este proceso tan importante en mi vida. Carnales este trabajo va por ustedes.

A mis sobrinos:

Enanos saben que forman parte importante en mi día a día ¡los quiero mucho!

A Vero:

Que llegaste a mi vida en el momento justo cuando ambos emprendíamos nuestros proyectos de grado, quiero decirte que eres ya la otra parte de mi vida y que al igual que nos superamos académicamente, lo hagamos en todos los aspectos de la vida.

Chaparrita hermosa TE AMO.

A mi tutora la Dra Rosalba Carreón Nápoles:

Por su paciencia y esmero en la culminación de este trabajo. Doctora: ¡Lo logramos!

A mis amigos Cosme, Jonathan, Yola, Circe:

Que a pesar de estar lejos, siempre los tengo presentes. ¡Son mi otra familia!

A toda mi gente que me ve desde el cielo:

Los llevo en mi corazón y mi pensamiento siempre.

*Cualquier sacrificio vale la pena,
para lograr lo que quieres.
Anonimo.*

AGRADECIMIENTOS.

A Dios por permitirme llegar a este punto donde se ve concluido un sueño más en mi vida profesional. Gracias por permitirme vivir un día a la vez.

A la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México por darme abrigo una vez más en este proceso de formación profesional. Mi corazón es azul y mi piel dorada, SIEMPRE TE QUERRE!!!

A la H. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ya que en sus instalaciones adquirí los conocimientos necesarios para hacer frente a los problemas de la vida profesional.

A la empresa porcícola Granjas Carroll de México S. de R.L. de C.V. por haber facilitado sus instalaciones y haber proporcionado todos los medios necesarios para la realización de este proyecto. Dr Victor Ochoa ¡MUCHAS GRACIAS!

Un especial agradecimiento a la Dra Roxana Mendoza Galicia por haberme dado su voto de confianza y las facilidades para llevar acabo mi maestría, además de fungir como mi asesora externa. Doctora muchas gracias por su apoyo, sin usted no lo hubiese logrado.

A la Dra Rosalba Carreón Nápoles por haber aceptado ser mi tutora principal. Gracias por compartir todos y cada uno de sus conocimientos, pero sobre todo, gracias por su infinita paciencia. Al final LO LOGRAMOS!

A mi comité tutorial la Dra Susana E. Mendoza Elvira.y el MVZ MCV Roberto Martínez Gamba por todos y cada uno de sus valiosas observaciones realizadas durante los tutorales. Sin duda alguna ustedes pusieron ese granito de arena importantísimo en este trabajo. Mil gracias.

A toda la gente que colabora en las unidades de producción por haberme brindado su ayuda incondicional durante la fase de campo, así como a las Químicas Angélica Reynoso y Ana Berta Pensado por su apoyo en laboratorio. De verdad muchas gracias.

INDICE

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN..... | 2 |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| II. JUSTIFICACIÓN..... | 20 |
| III. OBJETIVO GENERAL..... | 21 |
| IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 21 |
| V. HIPÓTESIS..... | 22 |
| VI. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 23 |
| <i>a) Granja a evaluar.....</i> | <i>23</i> |
| <i>b) Método de muestreo.....</i> | <i>25</i> |
| <i>c) Muestras.....</i> | <i>25</i> |
| <i>d) Procesamiento de las muestras.....</i> | <i>29</i> |
| <i>e) Interpretación de resultados.....</i> | <i>29</i> |
| <i>f) Análisis de resultados.....</i> | <i>30</i> |
| VII. RESULTADOS..... | 31 |
| VIII. DISCUSIÓN..... | 38 |
| IX. CONCLUSIONES..... | 42 |
| X. BIBLIOGRAFIA..... | 43 |

RESUMEN

Los fluidos orales (FO), son una mezcla de saliva y trasudado oral compuesto por fluido crevicular ampliamente utilizado en humanos, para realizar el diagnóstico de agentes microbiológicos (virus, bacterias y parásitos). En veterinaria se ha desarrollado una metodología para la colección de FO de cerdos, con los cuales, se ha logrado realizar el diagnóstico de enfermedades causadas por virus tales como PRRS, PCV2, Influenza y Torquetenovirus. El objetivo principal del presente estudio fue Implementar un protocolo de muestreo para la obtención de FO, y con ello detectar anticuerpos contra la enfermedad de PRRS mediante el uso de un Kit comercial de ELISA, comparando la cantidad de resultados positivos contra aquellos obtenidos mediante la técnica serológica convencional. Se tomaron muestras sanguíneas y de FO tanto del pie de cría como de los animales de destete y engorda en una unidad de producción porcina del estado de Veracruz. En el caso del pie de cría, se analizaron 210 animales, de los cuales, se obtuvo el 87.57% de positivos mediante la prueba de ELISA para FO, mientras que con la prueba de ELISA para suero resultó un 81.9%. En la línea de producción, fueron analizados 162 corrales, de los cuales 88.9% fueron positivos mediante FO, mientras que por serología se detectó el 81.4%. La estadística no paramétrica (prueba de Mc Nemars) muestra que en el caso del pie de cría no existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos métodos para realizar la detección de PRRS($p > 0.05$), mientras que en la línea de producción, se tienen datos evidentes que indican una diferencia estadísticamente significativa entre ambas pruebas ($p < 0.05$), que dan ventaja a los FO. En conclusión, se pudo detectar igual o mayor número de muestras positivas a anticuerpos con el uso de FO comparado con los sueros sanguíneos. Es por ello que la muestra y la prueba de ELISA para FO puede ser una herramienta alternativa para los programas de monitoreo de PRRS en hatos porcinos.

Palabras clave: Fluido oral, Cerdos, ELISA, PRRS.

I. INTRODUCCIÓN

El ganado porcino puede considerarse una de las especies ganaderas que ha sufrido una mayor transformación en los últimos años, bien sea en la técnica de manejo, como en los tipos de animales que se utilizan, logrando así importantes avances en los aspectos de crecimiento y eficiencia alimenticia como en calidad de canal.(Roppa, 2005).

La carne de cerdo es la carne de mayor consumo en el mundo. La importancia nutricional, económica y social de esta carne es innegable. En nuestro país, durante 2010, la carne de cerdo fue la segunda carne de mayor consumo, sólo después de la carne de pollo. El cerdo se encuentra hoy entre los animales más eficientemente productores de carne; sus características particulares, como gran precocidad y prolificidad, corto ciclo reproductivo y gran capacidad transformadora de nutrientes, lo hacen especialmente atractivo como fuente de alimentación (Benítez y Sánchez, 2000).

Durante muchos años la carne de porcino fue considerada como un alimento poco nutritivo, “pesado”, y en general, asociado con enfermedades y parásitos. Sin embargo, en los últimos 25 años la carne de cerdo ha reducido 31% el contenido de grasa, 14% en calorías y 10% en colesterol, producto del avance tecnológico en la porcicultura mundial. Además, el control zoonosológico de la carne de cerdo ha incrementado la percepción de salubridad e inocuidad de la carne. Así, la carne de porcino se ha posicionado como una fuente nutricional valiosa, de gran calidad y sabor. Esto se ve traducido en avances en la producción y consumo mundial y nacional de la carne (Benítez y Sánchez, 2000).

La producción mundial de carne de porcino presenta un incremento marcado durante la última década. Así, en el periodo 2001-2011 la producción de carne en el mundo creció a una tasa media anual de 1.7%. Durante 2011, la producción mundial de carne totalizó 101.7 millones de toneladas, que en su relación con 2010

representa una caída del 1.2%. Sin embargo el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés) estima una producción de 104.4 millones de toneladas de carne de porcino, lo que representa un crecimiento del 2.7% en los próximos 5 años (Navarrete, 2012).

El 81.2% de la producción mundial de carne de porcino se concentra en China, la Unión Europea y Estados Unidos. Así, durante 2011, China produjo 49.5 millones de toneladas de carne de cerdo, que representaron 48.7% del total. Para el 2015, las expectativas de producción de China se estiman con un crecimiento anual del 4.2%, que representan 51.6 millones de toneladas. El dinamismo en la producción de China se explica por la adopción de sistemas de producción intensivos, mismos que han permitido incrementos anuales en el peso promedio del ganado. Por otro lado, la producción en la Unión Europea (27 miembros) presenta un crecimiento sostenido durante la última década, aunque en una menor proporción a la presentada por China. Así, durante 2011 la Unión Europea totalizó 22.8 millones de toneladas, que representan 22.4% del total mundial. Para el 2015, el USDA estima una reducción marginal del 0.6% en el volumen producido por Europa (Navarrete, 2012).

Por la magnitud del inventario y la cantidad de carne producida, la porcicultura fue el sistema ganadero más importante de México entre 1975 y 1985, en la década de los sesenta y la mitad de los setenta, la carne de cerdo presentó una alta elasticidad-ingreso y constituía el producto cárnico de mayor consumo en los estratos de la población de menores ingresos (Espejo 1999).

Durante este periodo la porcinocultura presentó las tasas más altas del sector pecuario, los inventarios se incrementaron en promedio por arriba del 4% anual, se pasó de 10 millones de cabezas en 1972, a 15.3 millones de cabezas en 1983. En este periodo la porcinocultura pasó a ser el sistema ganadero más importante del país por volumen de producción. (Espejo 1999).

Entre 2001 y 2011, la producción de carne de porcino ha crecido a una tasa media anual de 1.1% durante el periodo comprendido. Así, en este último año el volumen de producción nacional se ubicó en 1.18 millones de toneladas, lo que en relación a 2010 representa un crecimiento de 0.7%. Para 2015, la estimación de producción de SIAP-SAGARPA se ubica en 1.19 millones de toneladas, es decir, un incremento de 0.9% (Navarrete, 2012).

La concentración de producción de cerdo en México es cada día más evidente, dos entidades, Sonora y Jalisco, concentran alrededor del 40% de la producción nacional. Es importante señalar la marcada diferencia existente las dos principales entidades productoras; mientras Sonora muestra una clara orientación a los procesos de exportación, Jalisco se enfoca al abasto nacional. Si bien la preponderancia la de porcicultura de la zona centro del país se mantiene, esta pierde representatividad por el bajo ritmo de crecimiento cediendo participación a entidades como Sonora, Yucatán y Tamaulipas. Con respecto a Michoacán actualmente se encuentra ubicado en el séptimo lugar en cuanto a producción porcina a nivel nacional (SAGARPA, 2009).

Con base en lo anterior, durante 2011, la producción en Jalisco, de acuerdo al avance mensual de la producción pecuaria al cierre de 2011, totalizó 227.5 mil toneladas de carne en canal producidas, lo que representa 19.2% del total nacional, un incremento del 2.6% en relación al año anterior. Por su parte, la producción en Sonora, segundo productor nacional, se ubicó en el mismo año en 223.1 mil toneladas, 18.9% del total, un crecimiento anual de 4.6% (Navarrete, 2012).

Dadas las condiciones de incremento en la demanda cárnica de origen porcino, durante las últimas décadas, los sistemas de producción porcina han adoptado diversas tecnologías tales como la inseminación artificial intrauterina o la adquisición de hembras con índices genéticos mejorados, los cuales, permiten lograr una mayor cantidad de cerdos para abasto, además de conseguir optimizar los recursos disponibles en la unidad de producción tal es el caso del alimento, logrando así una mejora en diversos parámetros productivos (Yescas 2012).

A pesar de que dichas tecnologías han logrado mejorar dichos parámetros de producción, múltiples enfermedades que modifican el desempeño adecuado de dichas unidades de producción se han manifestado trayendo como consecuencia el incremento de procesos abortivos, disminución en el porcentaje de fertilidad, aumento de mortalidad en la maternidad, destete y engorda, por mencionar algunos, generando graves pérdidas económicas a este sector pecuario, evidenciando de esta manera, que la estabilidad de estos sistemas de producción es muy frágil (Yescas 2012).

Uno de los agentes etiológicos que causa un alto impacto en la producción porcina y que actualmente se ha convertido en todo un reto para la industria porcícola nacional e internacional dada la urgente necesidad en su control, es el Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (por sus siglas en inglés PRRSV) (Center for Epidemiology and Animal health., 1995; Carreón *et al.*, 1999; López *et al.*, 2013).

El Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (de sus siglas en inglés PRRS) es una de las enfermedades infecciosas más importantes por el impacto económico que supone para la industria porcina nacional e internacional (Albina, 1997). Se sabe que es una enfermedad endémica en la mayoría de los países de producción porcina (Arias *et al.*, 2011) y se tienen registros de que tan solo en Estados Unidos, Canadá y Japón, más de 50% de sus hatos se encuentran contaminados con esa enfermedad (National Animal Health Monitoring System, 1995; Yahara *et al.*, 2000). Actualmente, sólo Noruega y Suecia permanecen libres de la enfermedad (Zimmerman, 2003). En México se detectó por primera vez en 1992 (Morilla *et al.*, 2003). Está más frecuentemente asociada a granjas tecnificadas que a granjas de traspatio (Cruz *et al.*, 2006). La infección de una granja por primera vez, puede ocasionar pérdidas significativas que posteriormente pueden reemerger como brote agudo (Straw, 1999). Ocasiona pérdidas de aproximadamente 10 % de la producción anual de lechones (Morilla *et al.*, 2003; Callen, 2006).

Los efectos de este virus fueron descritos por primera vez en 1987 en EEUU, seguidos por Canadá en el otoño del mismo año, Japón en 1989, y posteriormente se detectó en Europa en los países de Alemania, Holanda, España, Francia, Dinamarca y el Reino Unido entre los años 1990 a 1992 (Straw *et al.*, 1999).

El agente causal de PRRS es un virus perteneciente a la familia Arteriviridae (género Arterivirus, orden Nidovirales). Se trata de un virus envuelto con un genoma de ARN de cadena sencilla, con polaridad positiva de aproximadamente 15 Kb con nueve marcos de lectura abierta conocidos (Cavanagh, 1997; Straw *et al.*, 1999).

La vía de entrada es oro-nasal o genital, llega a nódulos linfáticos regionales y se distribuye sistémicamente libre o en los monocitos circulantes, ocasionando leucopenia. Se replica en diferentes órganos y tejidos, pero infecta principalmente a macrófagos alveolares, células dendríticas y monocitos (Flores-Mendoza *et al.*, 2008). Ocasiona fiebre, disnea, enrojecimiento de la piel, edema en los párpados, conjuntivitis, depresión, anorexia, diarrea mediana, inadecuada ganancia de peso; disminuye la calidad del semen, aumenta los índices de repeticiones de celo, abortos (a finales de la gestación), momificaciones, nacimientos prematuros, mortalidad en recién nacidos, nacimiento de lechones débiles, y mortalidad de lactantes (Sierra *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2010; Rovelo-Celorio *et al.*, 2010); aumenta la frecuencia de problemas respiratorios de cerdos en desarrollo solo, asociado con patógenos bacterianos, o incrementando la frecuencia de otras enfermedades respiratorias (Straw, 1999; Morilla *et al.*, 2003; Callen, 2006). El PRRSV es una de muchas posibles etiologías de la enfermedad del complejo respiratorio porcino (CRP)(Hansen *et al.*, 2010). Es posible se presente de manera asintomática o tan solo con una sintomatología general indistinguible de otras enfermedades del aparato reproductor o respiratorio. De acuerdo al tipo de virus de PRRS y a la característica respuesta inmunológica individual, podría destruirlo, desarrollar un proceso crónico con diseminación prolongada del virus, inducir una inmunidad de corto plazo con posible nuevo desarrollo clínico de la enfermedad (Straw 1999; Callen, 2006), o ser portador con baja viremia y títulos bajos en tejidos

limitado a algunos tejidos linfoides, de difícil diagnóstico (Straw 1999; Callen, 2006; Kleiboeker *et al.*, 2005); generándose cerdos en diferentes estados de infección en cambio constante, de lo cual depende la estabilidad de la granja (Straw 1999; Callen, 2006). La viremia varía según la edad y así el tiempo de transmisión del virus (Xiao *et al.*, 2010), siendo de una a dos semanas en adultos y de 10 a 12 semanas a incluso meses en cerdos jóvenes (Straw 1999; Callen, 2006; Thanawongnuwecha *et al.*, 2010), eliminándose por saliva, orina, semen, secreciones mamarias, transplacentar (a partir de la implantación) y quizá excremento (Arias *et al.*, 2011; Flores-Mendoza 2010). Existe la posibilidad de la activación, recombinación (con cepas de campo) y transmisión de virus de vacunas atenuadas (Shi *et al.*, 2010; Thanawongnuwecha *et al.*, 2010). En granjas endémicas con cerdos asintomáticos, el diagnóstico se basa en la combinación de un método serológico como ELISA y una técnica que determine la presencia del virus, su proteína o su ARN y su o sus linajes norteamericano o europeo, para determinar circulación y presencia del virus (Kleiboeker *et al.*, 2005; Arias *et al.*, 2011).

Una característica importante del PRRSV es su alta variabilidad genética. Con base a sus diferencias genéticas, los aislados del PRRSV pueden dividirse en dos: genotipo europeo (prototipo virus Lelystad) y genotipo americano (prototipo virus VR-2332). Estos genotipos tienen una similitud de nucleótidos de 55% a 70% cuando se compara todo el genoma (Wensvoort *et al.*, 1991; Murtaugh *et al.*, 1995).

Se ha informado que en los aislados americanos existe mayor diversidad genética, en comparación con los europeos, que se encuentran genéticamente muy relacionados (Kapur *et al.*, 1996), y que ocasionan sintomatología similar (Kleiboeker *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2010); pudiendo haber una rápida variación o recombinación genética (Goldberg *et al.*, 2010; Thanawongnuwecha *et al.*, 2010).

En la década de los noventa, fue descrita una variante china, de mayor patogenicidad que las otras (Andreyev *et al.*, 1997).

La presencia de más de una cepa de PRRSV en una misma zona geográfica, dedicada a la producción porcina hace que las vacunas que existen en el mercado confieran una protección parcial (Kapur *et al.*, 1996; Flores-Mendoza y Hernández., 2010). Este hecho, junto con la elevada capacidad de infección y transmisión y la tendencia de PRRSV de permanecer latente de manera indefinida (Christopher-Hennings *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 2002) hacen necesaria la aplicación de técnicas de detección temprana y de manejo de las unidades de producción para evitar la propagación del virus.

En México no se ha registrado de manera precisa una cifra aproximada de pérdidas, sin embargo, algunos estudios muestran que éstas varían de \$ 250 a \$500 dólares por hembra (Zimmerman *et al.*, 2003)

Existe actualmente una terminología estandarizada para determinar el estatus de los cerdos frente al virus del PRRS, basada en un conjunto de definiciones que reflejan la biología y la ecología del virus en cuestión, lo cual es una herramienta necesaria para facilitar la comunicación entre veterinarios, productores porcinos, compañías genéticas y otros participantes de la industria, que permite la implementación de esfuerzos nacionales y regionales dirigidos a controlar y eliminar el virus del PRRS (Derald *et al.*, 2011).

El sistema de clasificación de hatos fue desarrollado por un comité de definiciones formado por la Asociación Americana de Médicos Veterinarios especialistas en Cerdos (AASV por sus siglas en ingles), el departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica, veterinarios de la práctica privada y de la industria farmacéutica, así como representantes del Consejo Nacional de Porcicultores (Derald *et al.*, 2011).

Dicha clasificación comprende cuatro categorías que aplican a los hatos reproductivos: Positiva inestable (categoría I), Positiva Estable (categoría II), provisional negativa (categoría III) y Negativa (categoría IV), todo ello basado en la excreción del hato y el estatus de exposición. En cuanto a las granjas de

crecimiento y/o engorda, estas son clasificadas como negativas o positivas (Derald *et al.*, 2011).

De acuerdo con lo anterior, el contar con técnicas diagnósticas eficaces, brinda la oportunidad de conocer el status sanitario de la granja en cuanto al virus de PRRS se refiere y con ello clasificar las granjas de acuerdo a la nomenclatura propuesta para tal fin, lo cual definirá el plan de acción a realizar y lograr una intervención oportuna mediante la aplicación de tratamientos tempranos para el control de enfermedades secundarias, modificación de los protocolos de bioseguridad o la implementación de esquemas de vacunación, logrando así limitar la modificación de parámetros productivos importantes para la granja (Derald *et al.*, 2011).

Es importante recordar que el objetivo de cualquier empresa porcina es el producir de manera eficiente carne de cerdo de la más alta calidad, para lo cual se deben tomar en consideración diversos programas encaminados a una planeación estratégica para alcanzar las metas de volúmenes y calidad, dentro de los que se encuentran los programas genéticos, de alimentación, manejo, construcción y no menos importante los programas de medicina preventiva (IICA, 1999).

Estos últimos son de suma importancia dado que la correcta planeación de programas de medicación, manejo y vacunación derivan del diagnóstico preciso y oportuno de las enfermedades presentes dentro de la piara, tal es el caso de PRRS (IICA, 1999).

Para lograr anteriormente mencionado, debemos de analizar el área de diagnóstico como parte integrada del programa de medicina en producción. Cada decisión de diagnóstico debe fundamentarse tanto para mejorar la producción de la unidad, como para realizar una estimación económica, por lo que realizar un programa integral de diagnóstico, basado en pruebas serológicas y moleculares, de todo el hato productivo es de vital importancia (IICA, 1999)

En este contexto, en los últimos años se ha tratado de desarrollar nuevas estrategias para la detección, control y prevención de la enfermedad.

Dada la importancia y relevancia que esta enfermedad puede tener en una unidad de producción porcícola es necesaria la aplicación oportuna de programas de medicina preventiva que permitan delimitar y/o evitar en lo posible los efectos colaterales producto de la presentación de dichas patologías (Flores-Mendoza y Hernández., 2010).

Para ello, el realizar una vigilancia epidemiológica de las unidades de producción es crucial, razón por la cual, diversas metodologías, como lo es la serología y el uso del PCR han demostrado ser efectivas para tal fin, ya que nos permiten conocer la condición sanitaria (positiva o negativa) de las unidades de producción, confirmar la seroconversión en una piara ante la presencia del virus vacunal o de campo, así como determinar la homogeneidad en lo grupos destetados y alojados en las unidades de crecimiento y/o engorda (Alcántar y Chevez., 2010).

La vigilancia epidemiológica es útil para identificar la influencia de la inmunidad poblacional sobre diferentes patrones epidemiológicos. El chequeo de esta inmunidad a intervalos regulares permite la estimación del impacto sanitario y económico de las enfermedades, así como, la planificación y evaluación de los programas de manejo, control de la enfermedad y medicina preventiva.

La inmunidad poblacional ante un agente biológico en particular es un factor importante a tomar en cuenta para evaluar el comportamiento de una enfermedad infecciosa. Otros factores incluyen la vía de transmisión, el genotipo del agente y su patogenicidad, incluyendo la evasión de los mecanismos inmunes. Por otra parte, la inmunidad depende en gran medida de la composición genética de la población, exposición previa a determinado agente, así como la existencia o no de programas eficaces de vacunación.

La inmunidad poblacional depende en gran medida de la inmunidad de cada individuo, de ahí que sea necesario definir los mecanismos inmunológicos apropiados que se correlacionen con la protección o con la reducción de la infectividad del microorganismo o su transmisión. Para ello, es necesario comprender detalladamente la relación causa–efecto entre los mecanismos de defensa del hospedero y la infección producida por un agente biológico.

En la vigilancia epidemiológica, pueden realizarse estudios transversales o longitudinales; los primeros son útiles para evaluar la inmunidad inducida por vacunación, así como por infecciones bacterianas o virales en las que la presencia de anticuerpos indique una infección pasada y su ulterior recuperación. Los estudios longitudinales pueden ser aplicados en el caso de infecciones donde los agentes etiológicos tienden a ser persistentes, provocan en el hospedero bajos niveles de inmunidad dada la variación antigénica del microorganismo, lo que modifica la respuesta inmune. Los estudios longitudinales son también útiles para la predicción de la duración de la inmunidad inducida de forma natural o artificial.

Mediante la combinación de la inmunología y la epidemiología se puede estimar el papel real de la inmunidad en la prevención de enfermedades, distinguir entre la exposición al agente infeccioso y la enfermedad, así como explicar su comportamiento epidemiológico.

Una minuciosa comprensión de la inmunidad adquirida por vacunas o por la infección, así como de las implicaciones sobre la cadena de transmisión y los mecanismos de resistencia contra mecanismos de respuesta del sistema inmune es importante para la planificación de programas efectivos de control. La decisión de incluir determinadas vacunas en los programas de inmunización depende de una u otra forma de las características inmunes de la población, propiedades del agente infeccioso, su circulación, las probabilidades de diseminación, así como la existencia de medidas que permitan delimitar los efectos colaterales del agente infeccioso en cuestión.

Sin embargo, el estudio de la inmunidad poblacional es imprescindible para evaluar la eficacia de un esquema de vacunación establecido, definir la necesidad de modificar los protocolos primarios de inmunización, incluir refuerzos apropiados, o disminuir la periodicidad de su aplicación.

La vigilancia epidemiológica es útil para el análisis de la emergencia y reemergencia de enfermedades. En la prevención de estas últimas es vital la detección de grupos susceptibles para de esta forma emplear las herramientas inmunoprolácticas pertinentes.

En resumen, la vigilancia epidemiológica no sólo es importante en el diagnóstico puntual de la inmunidad poblacional, sino en la predicción del comportamiento longitudinal de la inmunidad luego de la exposición inmunogénica. Así mismo es necesaria para caracterizar la población blanco del candidato vacunal, detectar oportunamente los grupos susceptibles y con ello definir estrategias de apropiadas de control, así como para una evaluación más objetiva del tamaño muestral.

A pesar de que el diagnóstico de la enfermedad de PRRS puede realizarse mediante la evaluación clínica del hato y signología presente en el mismo (2003 PRRS compendium), sin embargo, debido a la similitud clínica del virus del PRRS con otros virus como circovirus, parvovirus, influenza y la enfermedad de Aujeszky, es importante apoyarse en técnicas de laboratorio.

Dentro de la batería de pruebas diagnósticas disponibles para el diagnóstico de la enfermedad se encuentra el aislamiento viral y detección del antígeno por PCR, las cuales, a pesar de presentar una efectividad alta presentan limitantes como el hecho de la especialización de personal que las realiza, además de contar con equipos especializados, lo cual incrementa los costos por concepto de diagnóstico. (2003 PRRS compendium)

Otro tipo de pruebas disponibles, son las pruebas serológicas encaminada a evaluar la presencia y/o ausencia de anticuerpos en contra del virus del PRRS.

La inmunofluorescencia indirecta (IFA), virus seroneutralización (SVN), la inmunoperoxidasa (IPMA) y el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), han sido usados para la detección de anticuerpos específicos en contra del virus del PRRS. La IFA, SVN y ELISA se encuentran ampliamente disponibles en la mayoría de los laboratorios de Norte América, mientras IPMA, ha sido extensamente usada en Europa (PRRS compendium 2003).

Para la realización de monitoreos serológicos de grandes poblaciones la IFA, IPMA y SVN se vuelven imprácticos dado que no cuentan con la posibilidad de manejar un número grande de muestras, los tiempos de entrega de resultados es muy variable y en caso de llevarlo a cabo, resulta ser muy costoso (PRRS compendium 2003).

En el caso de la ELISA resulta la técnica mayormente utilizada para tal efecto; su sensibilidad y especificidad, la hacen una prueba precisa y exacta con la cual, se puede procesar tanto un número pequeño como grande de muestras, convirtiéndola en la prueba de elección para realizar vigilancias epidemiológicas y diagnóstico del virus de PRRS en grandes poblaciones. (O'conor *et al.*, 2002; Nodelijk *et al.*, 1997)

Estos ensayos que usan como marcador enzimas (técnicas inmunoenzimáticas, inmunoensayos enzimáticos o ensayos inmunoenzimáticos) presentan extraordinarias ventajas aún no superadas, tales como elevada sensibilidad y especificidad estimadas de un 99.3 a un 99.6% (O'conor *et al.*, 2002; Nodelijk *et al.*, 1997), Detectabilidad temprana de anticuerpos y hasta 3 meses post infección (Yoon *et al.*, 2002), equipamiento relativamente barato, procedimientos técnicos rápidos y sencillos, alta precisión y exactitud, así como reactivos relativamente baratos y de larga vida.

Dichos ensayos surgieron a mediados de la década de los 60 para la identificación y localización intracelular de antígenos y han tenido un auge vertiginoso, su uso se ha ampliado para la detección de un diverso número de antígenos y anticuerpos.

Estos ensayos se apoyan en tres características biológicas fundamentales: la extraordinaria especificidad de los anticuerpos, el elevado poder catalítico y la alta especificidad de las enzimas. Mediante la combinación de la reacción inmunológica con un indicador altamente sensible, el débil efecto inmunológico se ve reforzado por la amplificación enzimática, de forma que se consigue una elevada sensibilidad y especificidad lo que le confiere practicidad para su aplicación en el diagnóstico clínico. La reacción antígeno-anticuerpo se detecta generalmente mediante un cambio de color o la emisión de luz producida por un cromógeno, resultado de la interacción de la enzima y su sustrato, mediante el uso de lectores ópticos especializados que permiten una lectura fotométrica. Ambos efectos son cuantificables y proporcionales a la intensidad de la interacción.

En el caso de las pruebas de ELISA para la detección de anticuerpos en contra del PRRS, la prueba mayormente utilizada a nivel mundial para la evaluación inmunológica de las unidades porcícolas, es el PRRS X3 Check Ab (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine), el cual utiliza muestras de suero sanguíneo para la detección de los mismos. (Weissenbacher-Lang *et al.*, 2012; Krualoy *et al.*, 2012; Maeng *et al.*, 2012)

Es bien sabido que por décadas, la muestra mayormente utilizada para el diagnóstico y monitoreo de las enfermedades en las poblaciones porcinas y que hasta la fecha continua vigente es el suero sanguíneo, sin embargo, el avance tecnológico en metodologías diagnósticas también ha permitido el uso de tejidos entre otros. (Carreón *et al.*, 1999; Dufrense *et al.*, 2010; Alcántar y Chevez, 2010; López *et al.*, 2013)

En la actualidad se han buscado otro tipo de muestras que posean un alto valor diagnóstico, que sean fáciles de obtener, y que la metodología aplicada para tal fin, no represente un riesgo para el bienestar animal, siendo los fluidos orales una alternativa viable para realizar un monitoreo efectivo de las principales

enfermedades del cerdo (Prickett *et al.*, 2008, 2009; Zimmerman *et al.*, 2010; Kittawornrat *et al.*, 2008, 2011).

Se entiende por fluidos orales, los líquidos presentes en la cavidad bucal que se encuentran compuestos por saliva (producida por las glándulas salivales) y el fluido crevicular proveniente de los capilares sanguíneos de la mucosa y submucosa oral (conocido también como trasudado oral) (Edgar, 1992) el cual contiene una alta concentración de inmunoglobulinas extra sanguíneas, proteínas plasmáticas, células epiteliales descamadas, células de defensa entre otros. (Humphrey y Williamson, 2001)

En humanos se ha estudiado ampliamente el valor diagnóstico de dichos fluidos para identificar la presencia de agentes etiológicos virales como el virus del VIH, Herpesvirus y Paramyxovirus (Huste y van Hecke, 2010), bacterianos tales como *Bordetella pertusis*, *M. tuberculosis*, *Streptococcus spp*, (Litt *et al.*, 2006; Yih *et al.*, 2000; de Melker *et al.*, 2000; Giammanco *et al.*, 2003.) y parasitarios como lo son *Leishmania spp*, *Echinococcus granulosus*, *Entamoeba histolytica* y *Plasmodium spp*. (Galai *et al.*, 2011; Chidi *et al.*, 2011; Haque y Kabir., 2010; Nwakanmay Gómez-Escobar., 2009) obteniendo resultados favorables en la identificación de dichos patógenos por medio de técnicas diagnósticas moleculares(PCR) y/o serológicas (ELISA).

A pesar de que en décadas pasadas se había planteado la presencia de anticuerpos específicos contra ciertas enfermedades en fluidos orales como la Fiebre Porcina Clásica (Cothyer y Aynaud, 1977), hasta hace poco tiempo, el uso de fluidos orales para el diagnóstico veterinario era mínimo, sin embargo en los últimos años, se han desarrollado técnicas diagnósticas para la detección de ciertos patógenos tales como el virus de la inmunodeficiencia felina (Pistello *et al.*, 1992), *E. coli* O157:H7(Renter *et al.*, 2004) causante de una enteritis hemorrágica y síndrome urémico hemorrágico en bovinos, Diarrea Viral Bovina (Terpstra y Wensvoort G, 1997) y Fiebre Aftosa (Callahan *et al.*, 2002; Alexandersen *et al.*, 2003).

Recientemente se han adaptado técnicas de ELISA y PCR usando como muestra los FO para el diagnóstico de enfermedades de los cerdos, dentro de las que destacan PRRS, PCV2, Influenza y Torquetenovirus (Ramírez *et al.*, 2011). Sin embargo, existen estudios en los cuales se ha logrado mediante el uso de fluidos orales establecer un diagnóstico molecular de agentes patógenos tales como el virus de Aujeszky (Bouma *et al.*, 1996), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Loftager *et al.*, 1993, 1995), la toxina colérica sub unidad B (Hylandy Johnson, 2004), el grupo E de *Streptococcus spp* (Isaki y van Patten, 1973), y la cepa 1261 de *E. coli* (Dubois y De Buysscher, 1978).

La idea de utilizar fluido oral en el diagnóstico veterinario es de reciente introducción al área, por lo cual, aún falta por realizar trabajos que permitan demostrar y alcanzar el valor potencial de la muestra. Sin embargo, los trabajos han demostrado que el fluido oral puede utilizarse para detectar diversas enfermedades que afectan la salud y el rendimiento de las explotaciones comerciales como el virus del PRRS, de la influenza o el PCV2, entre otros. En todo el mundo se sigue trabajando para desarrollar nuevas técnicas diagnósticas y validar las existentes para el uso de muestras de fluido oral de cerdos.

El fluido oral humano ha sido muy estudiado. Se ha establecido que refleja las concentraciones de hormonas, fármacos anticuerpos, virus y otros componentes encontrados en el suero o, localmente, en la cavidad oral. A nivel diagnóstico el fluido oral tiene diversas ventajas sobre el suero. Típicamente las técnicas sobre suero utilizan anticuerpos producidos como respuesta a una infección como IgG. En el fluido oral, también hay altas concentraciones de otros tipos de anticuerpos (IgM e IgA) que son útiles para las pruebas y que revelan información adicional en comparación con IgG. Las IgA proceden de la inmunidad mucosal (secretadas para actuar en las superficies más que en el sistema circulatorio) y pueden ser utilizadas para detectar patologías no sistémicas. Las IgM son los primeros anticuerpos producidos durante una infección y pueden ser indicativos precoces de enfermedad. La capacidad para detectar tres tipos de inmunoglobulinas se añade a la utilidad del

muestreo el fluido oral, por lo que se está convirtiendo en un método práctico para detectar infecciones precozmente.

De un modo parecido al suero, el fluido oral puede emplearse en busca de patógenos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El uso de la PCR requiere pruebas optimizadas para fluido oral. Se están llevando a cabo investigaciones para refinar el uso de PCR en fluido oral y aumentar el número de patógenos detectables. Al enviar muestras al laboratorio de diagnóstico veterinario, hay que asegurarse de identificarlas como "fluido oral" para obtener un resultado más preciso.

Por lo tanto los resultados de los estudios realizados tanto en humanos como en cerdos, sustentan la idea de que las infecciones ubicadas en tejidos distantes a la cavidad oral, generan elementos moleculares y serológicos de alto valor diagnóstico que podrían ser detectados en las muestras de fluidos orales.

En los últimos años el uso de fluidos orales como muestra primaria para realizar diagnóstico de enfermedades de los cerdos ha tomado gran importancia ya que demuestra ser una herramienta útil e innovadora en el diagnóstico de diversos agentes patógenos, entre ellos, los virales. Dado que el método de colección es fácil rápido y poco invasivo, representa un instrumento útil para monitorear el comportamiento de las enfermedades en grandes poblaciones.

En los últimos años, la mayoría de los trabajos en los cuales se han usado los fluidos orales están basados en la detección de antígeno por medio de la técnica de PCR (Murtaugh *et al.*, 1995; Albina, 1997; Alcántar y Chevez, 2010; Chidi *et al.*, 2011), sin embargo, Kittawornrat y Prickett en 2011 realizaron una adaptación de la prueba comercial de ELISA dirigida a suero, para la detección de anticuerpos en fluidos orales, obteniendo resultados positivos en cuanto a la detección de dichos anticuerpos. Sin duda, este hecho sería el predecesor de lo actualmente es la prueba de ELISA específica para fluidos orales.

Cabe señalar que en México, no se cuenta con datos previos que indiquen la efectividad del uso de fluidos orales para la detección de anticuerpos, empleando un kit diseñado específicamente para dicha matriz.

II. JUSTIFICACIÓN

Como una opción distinta a los monitoreos convencionales, el empleo de fluidos orales para la detección de la enfermedad de PRRS en grandes poblaciones, busca reducir de manera considerable el uso de recursos, proporcionando las ventajas de ser rápido y fácil, ya que requiere de un mínimo de personal capacitado, así como de equipo de colección más económico que el utilizado para la toma de muestra sanguínea.

Con ello pueden muestrearse grupos grandes de cerdos en la línea de producción, así como el pie de cría de manera individual, lo que hace de este método una nueva opción para el monitoreo de enfermedades en una unidad de producción.

En México, no se cuenta con datos previos que indiquen la efectividad del uso de fluidos orales para la detección de anticuerpos en contra del virus del PRRS, empleando un kit diseñado específicamente para dicha matriz, razón por la cual es el primer trabajo en su tipo.

III. OBJETIVO GENERAL

Implementar un protocolo de muestreo para la obtención de fluidos orales en una unidad de producción porcina, para la detección de anticuerpos contra la enfermedad de PRRS mediante el uso de un Kit comercial de ELISA.

IV. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer un protocolo de muestreo para la obtención de fluidos orales.
- Usar los fluidos orales como muestra primaria los para realizar monitoreos de la enfermedad PRRS en una unidad de producción comercial.
- Comparar la eficiencia diagnóstica de los fluidos orales contra la muestra sanguínea.

V. HIPOTESIS

En el monitoreo de la enfermedad de PRRS, el uso de la muestra de fluidos orales mostrará una diferencia en la cantidad de muestras positivas con relación al uso de la muestra serológica, ya que se espera obtener un mayor número de muestras positivas.

VI. MATERIAL Y METODOS

a) Granja a evaluar.

El presente trabajo se llevó a cabo en una unidad de producción porcina comercial ubicada en el municipio de Guadalupe Victoria, Puebla, localizado a 19°14'54" latitud norte y 97°15'54" latitud oeste, a una altura de 2380 msnm. Este municipio colinda al norte con el municipio de Tepeyahualco, al oeste con el municipio de San Nicolás Buenos Aires, al sur con el Municipio de Tlacuilotepec y al este con el municipio de La Fragua. Presenta una precipitación pluvial aproximada de 493.6 mm de agua anuales, el clima es frío-seco-regular y las temperatura promedio es de 12°C durante la mayor parte del año. Esta unidad de producción es tecnificada, con múltiples sitios destinados a la producción de cerdos para abasto con un inventario aproximado de 5200 hembras y que los últimos años ha visto modificados parámetros productivos como lo son el porcentaje de fertilidad, lechones nacidos vivos, porcentaje de abortos (en sitio 1) y porcentaje de mortalidad en sitios donde se alojan los animales de destete (sitios dos) y engorda (sitios tres).

Dicha unidad de producción tiene casetas de ambiente controlado mediante sistema automatizado por computadora, la cual controla la entrada de aire, mediante sensores de temperatura y extractores, además de contar con calentadores en las áreas de maternidad y destete. El alimento consumido en esta granja tiene como origen la planta de alimentos propiedad de la empresa. El plan de alimentación es por etapas, contando con diversas dietas según el estado fisiológico del animal. Dicho alimento es distribuido mediante un sistema automático motorizado, el cual permite el llenado de los comederos de manera continua. El agua es extraída de pozos subterráneos propiedad de la empresa porcina y es abastecida mediante chupones de chupón de altura ajustable.

Cabe señalar que en dicha unidad de producción se encuentra establecido un programa estricto de bioseguridad donde se tiene control en el acceso de personal, vehículo e insumos, además de contar con cerco ganadero electrificado, cerco perimetral, duchas para personal y ropa de uso exclusivo de la granja. Dentro de

este programa se encuentra contemplado el control de fauna poco deseable en granja (moscas y roedores), así como programas de lavado de desinfección de instalaciones.

Así mismo, existen programas de medicina preventiva como es la aplicación de medicamentos en alimento a ciertas etapas críticas de producción, además de medicaciones solubles y el uso de tratamientos inyectables en casos de enfermedad aguda.

Posee un esquema de vacunación periódica contra enfermedades bacterianas tales como neumonía enzootica, leptospirosis, erisipelosis, colibacilosis, salmonelosis y pleuroneumonía contagiosa porcina (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) así como contra enfermedades virales como el Parvovirus Porcino, Influenza y Circovirus tipo 2. Cabe mencionar que dicha unidad de producción no ha sido vacunada en contra de la enfermedad de PRRS desde hace más de 2 años.

Desde hace cinco años se realizan pruebas serológicas del hato, muestreando 30 hembras y cinco machos del mismo, procesándolos mediante la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos contra PRRS. Los últimos muestreos arrojaron resultados por encima del punto de corte que maneja la prueba, lo cual indica que existió una infección de dicho virus en el hato. Así mismo, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) esta granja fue diagnosticada como una unidad positiva a dicho virus, además de que ha presentado modificación en ciertos parámetros de producción como lo son lechones nacidos vivos, % de fetos momificados lechones nacidos débiles, fertilidad y mortalidad pre-destete, además de haber presentado episodios graves de abortos.

Así mismo, la granja tiene antecedentes de tener enfermedades como *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis* y *Salmonella spp*, diagnóstico obtenido mediante pruebas de bacteriología.

b) Método de muestreo.

Se realizaron muestreos transversales múltiples los cuales se llevaron a cabo mensualmente por un lapso de 6 meses que comprendieron los meses de agosto del 2013 a enero del 2014, tomando en cuenta tanto al pie de cría así como a la línea de producción de dichas granjas bajo el esquema descrito en la tabla 1

Tabla 1. Esquema de muestreo por etapa de producción.

| ÁREA | EIDADES A MUESTREAR | NÚMERO DE MUESTRAS | | | |
|--------------------|-----------------------|-----------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| | | Suero Sanguíneo | Forma de procesar las muestras | Fluido Oral | Forma de procesar las muestras |
| Montas y Gestación | Hembras (por paridad) | 30 muestras | Individual | 30 muestras | Individual |
| | Sementales | 5 muestras | Individual | 5 muestras | Individual |
| Maternidad | 3 semanas | 30 muestras (5 cerdos/6 corrales) | Individual | 6 muestras (1 cuerda/6 corrales) | Por corral |
| Destete | 10 semanas | 30 muestras (5 cerdos/6 corrales) | Individual | 6 muestras (1 cuerda/6 corrales) | Por corral |
| Engorda | 16 semanas | 30 muestras (5 cerdos/6 corrales) | Individual | 6 muestras (1 cuerda/6 corrales) | Por corral |
| | 22 semanas | 30 muestras (5 cerdos/6 corrales) | Individual | 6 muestras (1 cuerda/6 corrales) | Por corral |

c) Muestras

Muestras de fluidos orales (FO) y suero sanguíneo (SS) fueron obtenidas para este estudio. Los FO se obtuvieron mediante la técnica desarrollada por Zimmerman y Prickett (2008) usando cuerdas de algodón no tratadas de diferentes calibres dependiendo de la etapa de producción a muestrear.

Para obtener la muestra de FO se trabajó con cuerdas de 60 cm de largo con dos grosores diferentes: cuerda de media pulgada para animales de tres a diez semanas de edad y cuerda de tres cuartos de pulgada para animales de dieciséis semanas en adelante. En el caso del pie de cría se usaron cuerdas de tres cuartos de pulgada.

En el caso del pie de cría, las cuerdas se suspendieron en las jaulas de hembras y machos a la altura de la nariz y estas permanecieron en dicho lugar por un lapso de treinta a cuarenta minutos para posteriormente proceder a la recolección (Figura 1).

En la línea de producción se colocó la cuerda suspendida en los corales a la altura del lomo del animal, permaneciendo ahí por un lapso de una hora en el caso de animales de tres semanas edad y de veinte a treinta minutos en el caso de animales mayores a cuatro semanas de edad según lo marca el protocolo de Zimmerman y Prickett (2008)(Figura 2).



Figura 1. Toma de muestra FO en pie de cría



Figura 2. Toma de muestra línea de producción

Posteriormente la colecta de los FO se realizó en bolsas de cierre hermético, estériles, mediante compresión mecánica obteniendo un volumen variable de fluidos que iba desde los cinco a veinte mililitros de muestra por cuerda dependiendo la edad de los animales (Figura 3). A continuación las muestras se colectaron en tubos plásticos con tapón hermético tipo Falcon y fueron remitidas en refrigeración a 4°C al laboratorio de diagnóstico ubicado en las oficinas centrales de la empresa de producción porcina, en la cual, se llevó a cabo el proyecto (Figura 4).



Figura 3. Extracción de muestra FO en bolsa hermética



Figura 4. Colecta de muestra de FO en tubo Falcon

Los FO fueron trasvasados en tubos de polipropileno de 5 ml para posteriormente ser centrifugados a 1500 revoluciones por minuto por tres minutos y lograr con ello sedimentar la mayor cantidad de sólidos contenidos en la muestra primaria (Figura 5 y 6).

Una vez centrifugadas, estas muestras fueron identificadas con un número progresivo y mantenidas en congelación (-10°C) hasta su procesamiento.



Figura 5. Muestra de FO recién trasvasada a tubo de polipropileno



Figura 6. Muestra de FO centrifugada

De manera simultánea se realizó el sangrado de animales de manera individual para la obtención de suero, por medio del sistema Vacutainer® usando tubos al vacío de 7 ml sin anticoagulante y agujas de doble bisel de 16x3" en el caso de pie

de cría, 22x1” para lechones y de 16x1^{1/2}” en cerdos de engorda. Las muestras obtenidas fueron remitidas en refrigeración a 4°C al laboratorio (Figuras 7 y 8).



Figura 7. Extracción de sangre en animales de 3 y 10 semanas de edad



Figura 8. Extracción de sangre en animales adultos (pie de cría, 16 y 22 semanas)

Para tratar de eliminar los efectos propios del ambiente y del material usado, se colocó una cuerda testigo humedecida con solución PBS en medio de la caseta en la cual se obtuvieron los FO y los sueros sanguíneos (Figuras 9 y 10).

Esta muestra fue colectada mediante compresión mecánica obteniendo un volumen variable de solución PBS que iba desde los 5 a los 7 ml de muestra por cuerda, para posteriormente ser trasvasada a tubos tipo Falcon y remitidas junto con los FO y los sangrados al laboratorio de diagnóstico.

Posteriormente dicha muestra fue trasvasada a tubos de polipropileno de 5 ml, centrifugada junto con los FO a 1500 revoluciones por minuto por tres minutos y conservadas en congelación (-10°C) hasta el momento de su proceso.



Figura 9. Cuerda testigo. Área de gestación



Figura 10. Cuerda testigo, Área de engorda

d) Procesamiento de las muestras.

Las muestras fueron remitidas al laboratorio propiedad de la empresa para realizar la detección de anticuerpos mediante la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

Se utilizaron 2 kits comerciales de la marca IDEXX: El IDEXX PRRS Oral Fluids Ab Test para el análisis de fluidos orales y el IDEXX PRRS X3 CheckAb para el caso de las muestras de suero, siguiendo las indicaciones establecidas por parte del fabricante (IDEXX Laboratories Inc).

e) Interpretación de resultados

La interpretación de los resultados se realizó de acuerdo a las especificaciones de cada kit para clasificarlas como positivas o negativas. La presencia o ausencia de anticuerpos frente al virus de PRRS se determinó calculando el coeficiente de muestra sobre positivo (M/P) de cada muestra.

- Si el coeficiente M/P es inferior a 0.40, la muestra se clasifica como NEGATIVA
- Si el coeficiente M/P es superior o igual a 0.40, la muestra se clasifica como POSITIVA

Para que el ensayo sea válido, la media del Control Positivo menos la media del Control Negativo (CPx- CNx) debe de ser mayor o igual a 0.150. Además, la media del Control Negativo (CNx) debe ser menor o igual que 0.150.

Las muestras de sanguíneas obtenidas del pie de cría y de la línea de producción fueron manejadas individualmente por paridad en el caso de las hembras y por edades en el caso del destete y la engorda.

Las muestras de fluido oral se manejaron de forma individual y por paridad en el caso de pie de cría y en la línea de producción se agruparon por edad y por corral.

f) Análisis de resultados

Los resultados obtenidos de la ELISA para fluidos orales se analizaron por corral y por edad, obteniendo los valores finales de la prueba, según lo especifica el fabricante y con ello conocer el número de muestras positivas.

En el caso de los sueros sanguíneos, los resultados obtenidos mediante la ELISA para dicha matriz, se obtuvieron de forma individual y se analizaron de manera conjunta obteniendo el promedio de las cinco muestras del corral, conociendo así la positividad del mismo.

Por edad, se analizaron el total de positivos y negativos obtenidos de cada una de las pruebas para realizar un análisis estadístico descriptivo, así como aplicar la prueba de estadística de Mc Nemars, la cual es una prueba no paramétrica de comparación de proporciones para dos muestras relacionadas.

La prueba de Mc Nemars empleada y se elaboró una tabla de 2x2, siendo el estadístico de prueba es T_1 para muestras >20 y $T_2=b$ para muestras <20 , trabajando siempre con una significancia $\alpha=0.05$.

VII. RESULTADOS

Un total de 354 muestras de fluido oral, 30 controles y 930 sueros fueron procesadas mediante los kits IDEXX PRRS Oral Fluids Ab Test y IDEXX PRRS X3 CheckAb respectivamente, siguiendo las indicaciones establecidas por parte del fabricante (IDEXX laboratorios Inc). Los resultados de las pruebas se obtuvieron realizando los cálculos de acuerdo a las especificaciones establecidas para cada kit y se organizaron de acuerdo al área y la edad de los cerdos.

En el área de montas y gestación de un total de 210 animales muestreados mediante el método de fluidos orales, aproximadamente el 71.9% del pie de cría mordió la cuerda dentro del tiempo preestablecido según lo marca el protocolo (30 a 40 minutos), logrando recolectar volúmenes que oscilaban entre los 15 y 25 ml por cuerda. El 28.1% restante necesitó cerca de 3.5 horas para morder la cuerda y poder realizar la colecta de por lo menos 5 ml por cuerda.

Del grupo que ocupó mayor tiempo en morder la cuerda, 89.7% fueron hembras de diversas paridades; 8.47% fueron hembras de 0 partos, 10.16% hembras de 1ra paridad, 11.86% hembras de 2da paridad, 13.55% hembras de 3ra paridad y 45.76% hembras con una paridad igual o mayor a 4 partos.

El otro 10.2% restante, estuvo representado por machos, en su mayoría con una edad superior a 2.5 años.

Ya en la línea de producción, el tiempo máximo para recolectar una muestra se registró en los animales de tres semanas de edad, los cuales demoraron cerca de una hora para lograr obtener de 5 a 7 ml por corral. Los animales en las áreas de destete y engorada tardaron en promedio de 20 a 35 minutos en depositar su saliva en la cuerda (según se planteó en el protocolo), y la cantidad de fluido obtenido varió desde los 20 hasta 50 ml por corral muestreado.

En los animales de pie de cría, 210 muestras sanguíneas y de FO, fueron procesadas de manera individual, obteniéndose 172 resultados positivos mediante

IDEXX PRRS X3 CheckAb (suero) contra 186 resultados positivos mediante IDEXXPRRS Oral Fluids Ab Test (FO).

Analizados por género, podemos apreciar en el grupo de machos, que la cantidad de animales positivos detectados mediante la prueba de FO fue la misma que la obtenida con suero, observándose una diferencia marcada solamente en el primer muestreo, donde el 100% de los verracos fue detectado positivo mediante FO, mientras que solamente el 60% se detectó con el uso de suero (Figura 11). En los muestreos subsiguientes, podemos observar una tendencia a detectar el 100% de animales positivos con ambas muestras, a excepción del cuarto y quinto muestreo, donde la prueba serológica superó 20% a los FO (Figura 11).

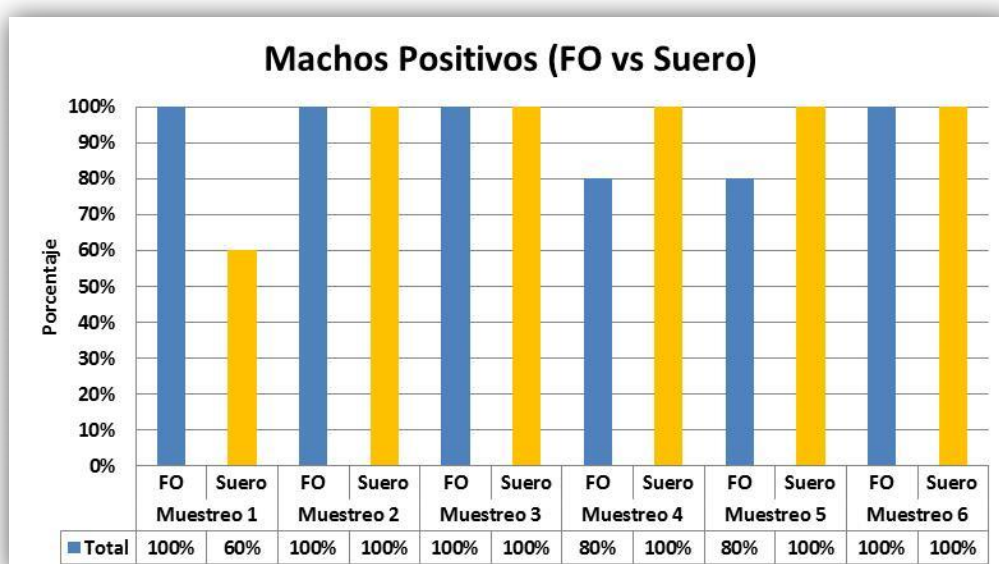


Figura 11. Grafica que muestra el porcentaje de machos positivos con la técnica de FO comparado con la serología por muestreo

El grupo de hembras analizado, exhibió un comportamiento similar a los machos, ya que como se muestra en la figura 12, únicamente el primero y quinto muestreo mostró una diferencia evidente en la cantidad de hembras positivas, siendo los FO la muestra que arrojó el mayor porcentaje de animales positivos en estos dos muestreos. Los tres muestreos restantes mostraron resultados iguales entre ambas pruebas.

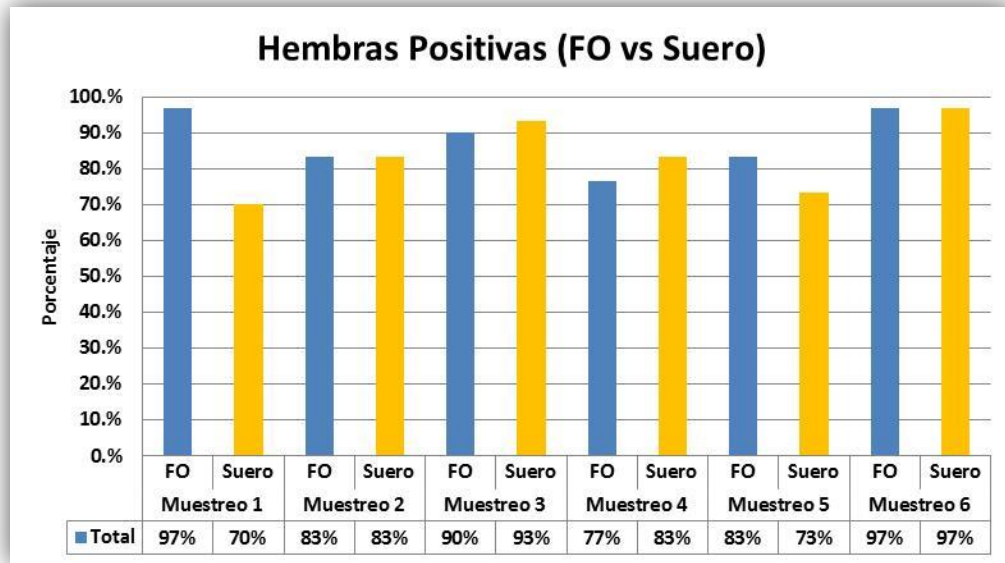


Figura12. Grafica que muestra el porcentaje de hembras positivas con la técnica de FO comparado con la serología por muestreo

La cantidad de muestras del área de pie de cría que mostraron una coincidencia en cuanto al resultado positivo a anticuerpos contra el virus del PRRS obtenidos mediante ambas técnicas fue de 176 muestras (83.9% de las muestras colectadas).

En la línea de producción, para poder comparar los resultados obtenidos por serología contra los FO, cabe recordar que las muestras serológicas fueron procesadas de manera individual, obteniendo valores que nos permitieron sacar un promedio por corral y con ello conocer la positividad del mismo. En este caso, 144 corrales fueron evaluados, obteniendo 133 positivos mediante serología y 144 positivos mediante FO.

Las pruebas realizadas a los animales de tres semanas mostraron una diferencia importante entre ambas muestras. En los seis muestreos realizados a dichos animales, en todos se detectó el 100% de los animales positivos por medio de la prueba de FO, mientras que por serología el mayor porcentaje de animales positivos fue del 83% en 4 de los 6 muestreos (Figura 13).

En los animales de la etapa de destete y engorda (10, 16 y 22 semanas) no se observaron diferencias evidentes, ya que en todos los muestreos se logró detectar el 100% de los animales muestreados como positivos por ambas pruebas (Figura 14).

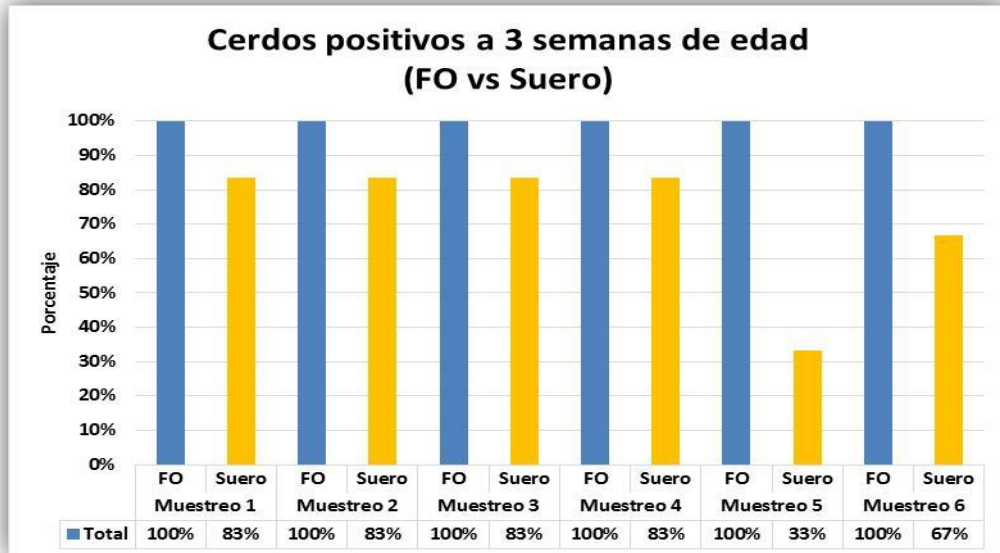


Figura 13. Porcentaje de corrales positivos en animales en la etapa pre-destete.

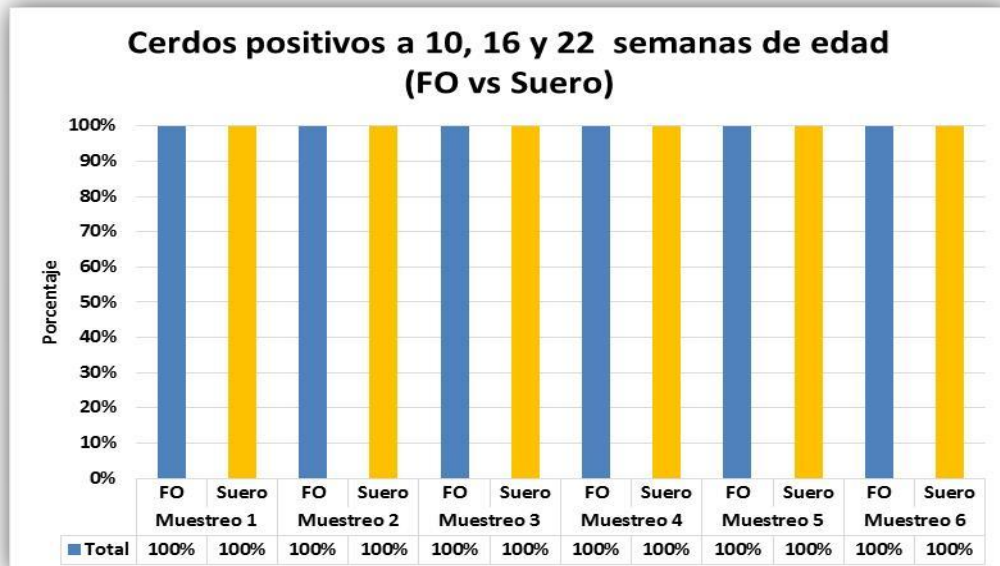


Figura 14. Porcentaje de animales positivos mediante ambas técnicas en las etapas de pre-engorda y engorda

La cantidad de muestras que mostraron una coincidencia en cuanto al resultado positivo a anticuerpos contra el virus del PRRS obtenidos mediante ambas técnicas fue de 133 muestras (92.36%).

Como se mencionó en materiales y métodos, a la par de la toma de muestra tanto de FO como de suero sanguíneo, cuerdas control fueron colocadas en cada uno de los muestreos por área, los cuales, arrojaron resultados negativos en todos los casos (Tabla 2 y 3).

Tabla 2. Valores y resultados obtenidos de las muestras de las cuerdas testigo, del área de pie de cría, las cuales muestran la negatividad de las mismas.

| Muestreo | D.O. Suero | M/P Suero | Res Suero | D.O. FO | M/P FO | Res FO |
|----------|------------|-----------|-----------|---------|--------|--------|
| 1 | 0.078 | 0.036 | Neg | 0.145 | 0.041 | Neg |
| 2 | 0.067 | 0.023 | Neg | 0.099 | 0 | Neg |
| 3 | 0.071 | 0.029 | Neg | 0.102 | 0 | Neg |
| 4 | 0.066 | 0.016 | Neg | 0.093 | 0 | Neg |
| 5 | 0.052 | 0.016 | Neg | 0.121 | 0 | Neg |
| 6 | 0.053 | 0.0778 | Neg | 0.133 | 0 | Neg |

Tabla 3. Valores y resultados de las muestras extraídas de la cuerda testigo de la línea de producción, las cuales muestran la negatividad.

| Edad | Muestreo | D.O. Suero | S/P Suero | Res Suero | D.O. FO | S/P FO | Res FO |
|------|----------|------------|-----------|-----------|---------|--------|--------|
| 3 s | 1 | 0.064 | 0.023 | Neg | 0.21 | 0.106 | Neg |
| | 2 | 0.06 | 0.015 | Neg | 0.146 | 0 | Neg |
| | 3 | 0.063 | 0.018 | Neg | 0.104 | 0 | Neg |
| | 4 | 0.069 | 0.019 | Neg | 0.112 | 0 | Neg |
| | 5 | 0.055 | 0.084 | Neg | 0.132 | 0 | Neg |
| | 6 | 0.054 | 0.079 | Neg | 0.123 | 0 | Neg |
| 10 s | 1 | 0.064 | 0.023 | Neg | 0.095 | 0 | Neg |
| | 2 | 0.06 | 0.015 | Neg | 0.104 | 0 | Neg |
| | 3 | 0.063 | 0.018 | Neg | 0.111 | 0 | Neg |
| | 4 | 0.069 | 0.019 | Neg | 0.105 | 0 | Neg |
| | 5 | 0.053 | 0.082 | Neg | 0.137 | 0 | Neg |
| | 6 | 0.052 | 0.077 | Neg | 0.123 | 0 | Neg |
| 16 s | 1 | 0.064 | 0.023 | Neg | 0.129 | 0 | Neg |
| | 2 | 0.06 | 0.015 | Neg | 0.092 | 0 | Neg |
| | 3 | 0.063 | 0.018 | Neg | 0.098 | 0 | Neg |
| | 4 | 0.069 | 0.019 | Neg | 0.106 | 0 | Neg |
| | 5 | 0.051 | 0.074 | Neg | 0.144 | 0 | Neg |
| | 6 | 0.05 | 0.081 | Neg | 0.114 | 0 | Neg |
| 22 s | 1 | 0.064 | 0.023 | Neg | 0.108 | 0 | Neg |
| | 2 | 0.06 | 0.015 | Neg | 0.105 | 0 | Neg |
| | 3 | 0.063 | 0.018 | Neg | 0.106 | 0 | Neg |
| | 4 | 0.069 | 0.019 | Neg | 0.106 | 0 | Neg |
| | 5 | 0.069 | 0.094 | Neg | 0.137 | 0 | Neg |
| | 6 | 0.052 | 0.08 | Neg | 0.144 | 0 | Neg |

En el presente trabajo se modeló la prueba de estadística no paramétrica de Mc Nemars para identificar diferencias significativas entre las dos muestras bajo estudio.

Las condiciones para realizar dicha prueba son que la escala de medición sea nominal, de dos categorías.

$$T_1 = \frac{(|b - c| - 1)^2}{b + c}$$

$$T_2 = b$$

Para este trabajo el valor de $X^2 = 3.84$ a un nivel de significancia de 0.05; si el valor de T_1 es mayor a 3.84, se considera que hay diferencias estadísticamente significativas a un nivel de 0.05, es decir $p < 0.05$; si es menor T_1 a 3.84 a un nivel de significancia de 0.05, no hay diferencias estadísticamente significativas, es decir $p > 0.05$, expresando que no hay información suficiente para rechazar H_0 .

En la tabla 4, se colocan los valores obtenidos en el área de pie de cría, con los cuales se realizó la tabla de contingencia para aplicar dicha prueba estadística.

Tabla 4. Tabla de contingencia (2X2) para la aplicación de la prueba de Mc Nemars en el pie de cría

| | | PIE DE CRÍA | |
|--|----------|-------------|----------|
| | | POSITIVO | NEGATIVO |
| SUERO | POSITIVO | 165 | 13 |
| | NEGATIVO | 17 | 21 |
| T1= 0.3 | | | |
| T1 < 3.84, No hay diferencias estadísticamente significativas a un nivel de 0.05 | | | |

Aplicando la prueba de Mc Nemars, se obtuvo que los resultados obtenidos en estos sitios, no son significativos con un $\alpha = 0.05$. No se tienen resultados

significativos para decir que existen diferencias significativas entre los dos métodos para realizar la prueba de detección del PRRS.

En la tabla 5, se muestran los resultados obtenidos en la línea de producción (3, 10.16 y 22 semanas de edad).

Tabla 5.Tabla de contingencia (2X2) para la aplicación de la prueba de Mc Nemars en la línea de producción.

| | | LINEA DE PRODUCCION | |
|-------|----------|---|----------|
| | | POSITIVO | NEGATIVO |
| SUERO | POSITIVO | 133 | 0 |
| | NEGATIVO | 11 | 24 |
| | | T1= 9.09090909 | |
| | | T1>3.84, Hay diferencias estadísticamente significativas a un nivel de 0.05 | |

Aplicando la prueba de Mc Nemars, se obtuvo que los resultados obtenidos en estos sitios, son significativos con un $\alpha=0.05$. Es decir que se tienen resultados significativos para decir que existen diferencias significativas entre los dos métodos para realizar la prueba de detección del PRRS.

VIII. DISCUSIÓN

Desde hace aproximadamente seis años, los fluidos orales han representado una alternativa para la detección de anticuerpos en contra del virus del PRRS (Zimmerman y Prickett, 2010), sin embargo la mayor parte de los trabajos realizados usando esta matriz se encuentran dirigido a la detección del antígeno principalmente por medio de la técnica de PCR (Alcántar y Chevez, 2011; Kittawornrat *et al.*, 2008; Prickett *et al.*, 2008, 2010; Parker *et al.*, 2013; Graham *et al.*, 2013).

Una de las cuestiones más importantes del estudio fue lograr detectar animales positivos a la enfermedad de PRRS mediante el uso de FO, tal como lo menciona la bibliografía citada (Kittawornrat *et al.*, 2008, 20011; Hoffman *et al.*, 2008)

Aunque algunos autores habían reportado el uso de los fluidos orales para la detección de anticuerpos, estos hablan de modificaciones en las técnicas de procesamiento de los kits usados para evaluar suero, tal como la dilución de muestra, el tipo de conjugado y los tiempos de incubación (Kittawornrat *et al.*, 20011; Martell *et al.*, 2013; Olsen 2013) por lo que el presente estudio representa uno de los primeros trabajos realizados en el país mediante un kit específicamente diseñado para trabajar con esta matriz.

El análisis y la comparación entre los resultados obtenidos por medio de ambas pruebas de ELISA, mostró que el kit desarrollado para la matriz de FO resulta ser más sensible que la desarrollada para suero, ya que se pueden observar en el total de muestra procesadas, una mayor cantidad de muestras positivas mediante el Kit IDEXX PRRS Oral Fluids Ab Test (FO), que mediante el kit IDEXX PRRS X3 Check Ab (suero). Lo anterior demostró en el primer y quinto muestreo del área de montas y gestación, donde se obtuvieron el 88.57% de los animales positivos por fluidos orales comparado con el suero donde solo se pudieron detectar el 80.9% de los mismos. En el caso de los animales pre-destete (tres semanas), dicha situación es más evidente ya que se muestra cómo en todos los muestreos hay mayor detección

de corrales positivos con FO (36 positivos, 100%) comparado con suero (26 corrales positivos, 72.22%).

Así mismo se observó que a partir de las 10 semanas de vida en adelante, ambas pruebas presentan una sensibilidad similar por lo que no se aprecian diferencias en cuanto a la cantidad de positivos en las áreas de pre-engorda y engorda. Alcántar *et al* (2011) al igual que Ramírez *et al* (2012) mencionan este mismo comportamiento en el área de destete y engorda usando la matriz de FO, mediante la técnica de PCR.

A diferencia de los animales de pie de cría, en la línea de producción no se apreció ninguna dificultad para poder obtener volúmenes considerables de fluido oral de todos los corrales evaluados, por lo que se infiere que la técnica es viable en estas etapas (Prickett *et al.*, 2008, 2010; Alcántar y Chevez, 2011).

El uso de controles dentro de las casetas permitió conocer que los resultados negativos obtenidos del análisis de las cuerdas control son independientes al material y a factores ambientales propios de la caseta como lo son el polvo y los aerosoles presentes en el interior de la instalación, lo que nos brinda una mayor certeza y confiabilidad para detectar PRRSv mediante esta matriz descartando así la probabilidad de obtener algún resultado que pusiera en duda la especificidad del kit efecto.

Una vez aplicada la prueba estadística de Mc Nemars, se infirió que existe evidencia estadísticamente significativa para afirmar que en los resultados obtenidos del pie de cría, no existen diferencias importantes entre los dos métodos para realizar la prueba de detección del PRRS, no así en el caso de la línea de producción, donde la diferencia entre el método de detección de PRRS mediante FO y suero presenta diferencias estadísticamente significativas.

De lo anterior se logró inferir que en animales de pie de cría se observa una similitud en cuanto a la cantidad de animales positivos detectados mediante FO

comparado con el suero, y al no existir una diferencia estadística significativa entre ambas nos muestra que es indistinto el método empleado para detección de anticuerpos en contra de la enfermedad, sin embargo, durante la prueba se pudo apreciar que los animales sufren un menor estrés al manejarlos en menor cantidad, ya que al realizar los sangrados no solo estresamos al animal en cuestión sino que también a los animales aledaños al mismo debido a las fuertes vocalizaciones que resultan de sujetar al cerdo con laza trompas y extraer la sangre.

En el caso de la línea de producción, los resultados muestran que es un método sumamente efectivo para el monitoreo del virus del PRRS, ya que es bien sabido que conforme aumenta la población de cerdos es más difícil establecer la condición del virus mediante un muestreo individual, además de que en esta área no se observó ningún contratiempo en la toma de muestra, dado que el total de los cerdos alojados en corral interactúan con la cuerda de manera alternante, incrementando así la probabilidad de aportar anticuerpos a la muestra que puedan ser detectables mediante la prueba de ELISA (Prickett *et al.*, 2008, 2010; Alcántar y Chevez, 2011; Graham *et al.*, 2013).

Así mismo, este método puede eliminar el efecto de selección inapropiada de animales a muestrear que no se encuentren cursando con la enfermedad y obtener con ello resultados falsos negativos, tal como se observó en los animales de tres semanas de edad. Lo anterior es de suma importancia, dado que la etapa de destete es una de las más críticas para la presentación de la enfermedad, y el hecho de no detectar a los animales positivos da lugar a la formación de subpoblaciones trayendo como resultado el perpetuar la infección con la subsiguiente presentación clínica de la enfermedad (Albina, 1997; Straw, 1999; Prickett *et al.*, 2008, 2010; Alcántar y Chevez, 2011; Graham *et al.*, 2013).

Tomando en cuenta lo anterior, se tiene que, si no se logra detectar a tiempo dichos animales, se corre el riesgo estar formando subpoblaciones de animales susceptibles con animales enfermos lo cual nos va a dar como resultado la perpetuidad del virus dentro del sistema, lo que trae como consecuencia rebrotes

que afectan de manera significativa el desempeño de la piara, incrementando mortalidades, abortos y bajos niveles de crecimiento que impactan directamente en el aspecto económico de cualquier sistema de producción (National Animal Health Monitoring System, 1995; Albina, 1997; Willis, 1997; Zimmerman *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 2004; Martaugh *et al.*, 2005).

Dentro de la piara se observaron diferencias de comportamiento entre individuos, es decir, que no todos los cerdos atendieron a la presencia de la cuerda en sus jaulas al mismo tiempo y de la misma forma, siendo los más jóvenes aquellos que presentaron mayor interés por la cuerda de algodón (hembras de 0 a 3 partos y machos jóvenes). Lo anterior es de suma importancia ya que los animales que tardaron en acumular FO en la cuerda son aquellos que salieron negativos por la prueba de FO y positivos por serología, lo que da lugar a pensar que el tiempo de exposición fue inversamente proporcional a la cantidad de fluido oral colectado y por ende menor cantidad de inmunoglobulinas detectables en saliva. Esto deja lugar a futuras investigaciones que permitan conocer si la edad del animal es un factor determinante para la implementación exitosa del método de fluidos orales en animales adultos y si cabe la posibilidad de implementar técnicas de condicionamiento que permitan una mayor exposición de estos animales a la cuerda y con ello obtener una cantidad representativa de muestra (White *et al.*, 2013)

IX. CONCLUSIONES

El programa de muestreo de fluidos orales fue implementado exitosamente en los tres sitios de producción de la granja en cuestión, los cuales comprenden las áreas de montas y gestación, maternidad, destete y engorda de acuerdo a lo establecido previamente en el protocolo, logrando obtener volúmenes suficientes de FO para llevar a cabo análisis de laboratorio para detectar anticuerpos en contra del virus del PRRS.

De acuerdo a los resultados obtenidos de este estudio se deduce que podemos detectar igual o mayor número de muestras positivas con el uso de fluidos orales comparado con los sueros sanguíneos. Todo lo anterior fue posible gracias al uso de un kit comercial de ELISA desarrollado específicamente para dicha matriz.

Así mismo los resultados del estudio sugieren que la muestra y la prueba de ELISA para fluido oral puede ser una herramienta alternativa para los programas de monitoreo de PRRS en hatos porcinos ya que esta muestra puede usarse como una muestra primaria en los programas de vigilancia epidemiológica de la enfermedad.

En el pie de cría resulta complicada la obtención de la muestra de FO debido a que el animal no puede ser inmovilizado o contenido para la obtención de la misma, por lo que hay que asegurarse de que los animales muerdan dicha cuerda con la finalidad de obtener una muestra adecuada en el área de montas y gestación, evitando con ello la obtención de resultados falsos negativos. No obstante en esta área puede seguirse considerando la muestra sanguínea como una opción en el monitoreo de PRRS.

Sin embargo, cabe señalar, que una vez estandarizada la técnica de colección de FO, resulta una herramienta alternativa con la cual podemos realizar diagnóstico y/o vigilancia de la enfermedad de PRRS en grandes poblaciones.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Benítez W, Sánchez M. **Aspectos generales de la producción porcina tradicional.** FAO 2000.
2. Navarrete PJR. **Panorama Agroalimentario: Carne de porcino 2012.** Dirección de investigación económica y sectorial. FIRA 2012.
3. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. **Situación actual y perspectiva de la producción de carne de porcino en México.** México (DF) SAGARPA, 2009.
4. Espejo PR. **Porcinocultura intensiva y medio ambiente en México.** Revista mundial de Zootecnia. 1999; 92:15-25.
5. Roppa L. **Producción mundial de cerdo: situación actual y perspectivas.** Los porcicultores y su entorno. 2005; (7) 47:26-35.
6. Pesado A. **Producción y consumo de la porcicultura mexicana.** *Los porcicultores y su entorno.* 2006; 49:4-14.
7. Yescas CJ. **Manejo de la hembra de reemplazo en granjas positivas a PRRS.** Los porcicultores y su entorno 2012; 86: 62-70.
8. Edgar WM. **Saliva: its secretion, composition and functions.** Br Dent J 1992; 172: 305-12.
9. Flores-Mendoza L, Hernández J. **Vacunas contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV): escribiendo una historia.** Vet Méx. 2010; 41:139-159.

10. Humphrey S, Russell T. **A review of saliva: Normal composition, flow, and function.** Journal of Prosthetic Dentistry. 2001; 85:162-169.
11. Chang C, Yoon KJ, Zimmerman JJ, Harmon KM. **Evolution of porcine an respiratory syndrome virus during sequential passages in pigs** J. Virol 2002; 76: 4750-4763
12. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. **Actualidades en la producción porcina y en el diagnóstico de enfermedades.** IICA-UNAM 1999; 65 pp
13. Christopher-Hennings J, Nelson E, Hines R, Zimmerman J. **Persistence of reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars.** J Vet Diagn Invest 1995; 7: 456-464.
14. Derald J. Polson D, Torremorell M. **Terminology for classifying swine herds by porcine reproductive and respiratory syndrome virus status.** J Swine health and production. 2011; 19: 44-50
15. Dufrense L, Polson D, Holck J. **Serological monitoring in negative and low prevalence populations.** 2003 PRRS compendium. 2 ed. Iowa 2010 National Pork Board 87-101
16. Nodelijk G, van Leengoed LAMG, Schoevers EJ, et al. **Seroprevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Dutch weaning pigs.** Vet Microbiol 1997; 56: 21-32.
17. O'Connor M, Fallon M, O'Reilly PJ. **Detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: reduction of cut-off value of an ELISA, with confirmation by immunoperoxidase monolayers assay.** Irish Vet J. 2002; 55: 73-75.

18. Albina E. **Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview**, Vet. Microbiol., 1997; 55: 309-316.
19. National Animal Health Monitoring System. **Prevalence of PRRS virus on the United States**. Centers of Epidemiology and Animal Health. United States Department of agriculture: Animal health inspection service. Fort Collins, Colorado, United States of America: Center for Epidemiology and Animal health, [serial online] 1995 [cited:2004 June 10] Available from: <http://aphisweb.aphis.usda.gov/ceah/cahm/swine/sw95pr2.htm>.
20. Hurnik D. **The prevalence of transmissible gastroenteritis virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus antibodies on Prince Edward Island**. The 16th Veterinary Society Congress; 2000 september 17-20; Melbourne Australia. Melbourne (Australia): International Pig Veterinary Society 2000:7
21. Yahara Y, Yamaguchi T, Wenson M. **Porcine reproductive and respiratory syndrome in Japan a field force survey in 45 farms**. The 16th Veterinary Society Congress; 2000 September 17-20; Melbourne Australia. Melbourne (Australia): International Pig Veterinary Society, 2000:74.
22. Zimmerman J, Stevenson G, Dee SA. **The 1998 PRRS compendium**. 1998:1-128.

23. Carreón NR, Ramirez MH, Mercado GC, Soto M. **Detección de anticuerpos contra el virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio de Cerdos en diferentes estados de la República Mexicana.** Memorias XXXIV Congreso Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos; 1999 Julio 28-31; Mérida (Yucatán) México. México (DF): Asociación Mexicana de Veterinarios especialista en Cerdos, 1999:168-169.
24. Straw, B. E., Allaire, S. D., Mengeling, W. L., & Taylor, D. J. (1999). **Disease of swine.** 8th ed. Iowa State University Press. USA. p239
25. Cavanagh D. **NIDOVIRALES: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae.** Arch Virol 1997; 142: 629-632.
26. Murtaugh MP, Elam MR, KakachLT. **Comparison of the structural protein coding sequences of the VR- 2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus.** Arch Virol 1995; 140: 1451-1460.
27. Wensvoort G, Terpstra C, Pol JM, TerLaak EA, Bloemraad M, de Kluyver EP et al. **Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus.** Vet Q 1991; 13: 121-130.
28. Kapur V, Elam MR, Pawlovich TM, Murtaugh MP. **Genetic variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the midwestern United States.** J Gen Virol 1996; 77: 1271-1276
29. Andreyev MD, Wesley RD, Mengeling WL, Vorwald AC. and Lager KM. **Genetic variation and phylogenetic relationships of 22 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) field strains based on sequence analysis of open reading frame 5,** Arch. Virol., 1997; 142: 993-1001.

30. Alcántar P, Chevez JC. **Medición de Prevalencia del virus del PRRS a través de Fluidos Orales en Destete.** Memorias del XLVI Congreso Nacional de ANVEC A C. pp 138. Pto Vallarta Jal.
31. Benabid M (2010) **ELISA on saliva Samples for detection of anti-hydatid cyst antibodies.** Clin. Lab. 56: 543-546
32. Chidi A, Chishimba S, Kobayashi T. **Validation of oral fluids samples to monitor serological changes to *Plasmodium falciparum*:** An observational study in southern Zambia. Malaria Journal. 2011; 10: 162-165.
33. Detmer S, Patnayak D, Jiang Y. **Detection of Influenza A virus in porcine oral fluids samples.** J Vet Diagn Invest 2011; 23: 241-247.
34. Galai Y, Chabchoub N, Ben-Abid M. **Diagnosis of Mediterranean Visceral Leishmaniasis by Detection of Leishmania Antibodies and Leishmania DNA in Oral Fluids Samples Collected Using an Oracle Device.** Journal of Clinical Microbiology. 2011; 49: 3150-3153.
35. Hutse V, Van Hecke K, De Bruyn R. **Oral fluid for the serological and molecular diagnosis of measles.** International Journal of infectious diseases. 2010; 14: 991-997.
36. Hoffman P, Prickett J, Zimmerman J. **Implementation and validation of swine oral fluids collection into a commercial system.** Proceedings of American Association of Swine Veterinarians. 2008; Pp 301-302.
37. Haque R, Kabir M, Noor Z. **Diagnosis of Amebic Liver Absces and Amebic Colitis by Detection of *Entamoeba histolytica* DNA in blood, urine, and salive by a Real-Time PCR Assay.** Journal of Clinical Microbiology. 2010; 48: 2798-2801.

38. Kittawornrat A, Engle M, Johnson J. **Use of oral fluids samples to detect PRRSV infeccion in individual boars.** Proceedings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada. 2008; Pp 201.
39. Kittawornrat A, Prickett J. **Comportamiento Diagnóstico de una ELISA Comercial para Detectar Anticuerpos contra PRRS en Suero Adaptada a Muestras de Fluidos Orales: Estudios Experimentales y de Campo.** Memorias del XLVI Congreso Nacional de AMVEC A C. 2011, 107-108. Pto Vallarta Jal.
40. Litt d, Samuel D , Duncan J. **Detection of anti-pertussiss toxin IgG in oral fluids for use in diagnosis and surveillance of *Bordetella pertussiss_infection* in children and young adult.**Journal of Medical Microbiology, 2006; 55: 1223-1228.
41. Nawakanma D, Gomez-Escobar N, Walther M. **Quantitative Detection of *Plasmodium falciparum* DNA in saliva, blood and urine.** Journal of Infectious Disease 2009; 199 (1): 1567-1573.
42. Prickett J, Opriessnig T, Johnson J. **Surveillance using oral fluid samples- PRRSV and PCV2 experimental data.** Proceedings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada. 2008; Pp 924
43. Prickett J, Simer R, Christipher-Hennings J. **Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infeccion in porcine oral fluids samples: a longitudinal study under experimental conditions.** J Vet Diagn Invest. 2008; 20: 156-163.

44. Prickett J, Wang C, Hoogland M, Zimmerman J **Pen-based oral fluid sampling for PRRSV using an improved PRRSV PCR assay is highly effective for the detection of virus in low prevalence populations.** Proceedings of American Association of Swine Veterinarians. 2010; Pp 131.
45. Prickett J, Hoffman P, Main R, Zimmerman J. **Cost effective PRRSV surveillance.** Proceedings of American Association of Swine Veterinarians. 2009; Pp 467-469.
46. Zimmerman J, Prickett J. () **Nuevos Manejos y Técnicas de Diagnóstico en PRRS.** Memorias del XLV Congreso Nacional de ANVEC A C 2010. Acapulco Gro. 54-56
47. Martell A, Pierdon M, Parsons T. **Oral Fluids collection in loose housed gestations sows.** Proceedings of American Association of Swine Veterinarians. 2013 ; Pp 235-236.
48. Parker S, Scheidt A, Polson D, Robbins R. **Oral fluids sample collection and post collection processing to enhance porcine reproductive and respiratory syndrome virus sequencing.** Proceedings of American Association of Swine Veterinarians. 2013; Pp 279-280.
49. Olsen C, Wang C, Zimmerman J. **Probability of detecting PRRSV infection using pen-based swine oral fluid specimens as a function of within-pen prevalence.** Proceedings of American Association of Swine Veterinarians. 2013; Pp 109-110
50. White D. Hoogland M, Kittawornrat A, Main R. **Oral fluid sampling: Recomendación for trained vs untrained pigs.** Proceedings of American Association of Swine Veterinarians. 2013; Pp 361.

51. Graham J, Rademacher C, Swalla R. . **Use of oral fluids sampling in suckling pigs for PRRSV monitoring.** Proceedings of American Association of Swine Veterinarians. 2013; Pp 83.
52. Karriker L, Kittawornrat A, Lizano S, Main R. **Effect of sample collection material on the detection of PRRSV in oral fluids.** Proceedings of American Association of Swine Veterinarians. 2013; Pp 63.
53. Rovira A, Cano JP, Muñoz-Zanzi C. **Feasibility of pooled-sample testing for the detection of porcine reproductive and respiratory síndrome virus antibodies on serum samples by ELISA.** Veterinary Microbiology 2008; 130: 60-68.
54. DiGiacomo RF, Koepsell TD. **Sampling for detection of infection disease in animal populations.** Journal of American Veterinary Medicine Association 1986; 189: 22-23.
55. Baysinger AK. **Use of descriptive stadistics in interpretation of population serology.** Proceedings of American Association of Swine Veterinarians. 1999; Pp 345-355.
56. Ramirez A, Wang C. **Efficient surveillance of pig populations using oral fluids.** Preventiva Veterinary Medicine 2012; 104: 292-300.
57. Johnson W. Roof M, Martaugh MP. **Pathogenic and humoral immune responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) are related to viral load in acute infection.** Veterinary Immunology and Immuno pathology. 2004; 102: 233-247

58. Martaugh MP, Genzow M. **Immunological solutions for treatment and prevention of PRRSV.** BoehringerIngelheim Animal Health publication. 2005.16 Pp
59. Wills RW, Zimmerman JJ. **Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome. A persistent Infection.** Veterinary Microbiology 1997; 55: 231-240.