



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS DEL SÍNDROME RESPIRATORIO Y
REPRODUCTIVO PORCINO (PRRS), EN GRANJAS PORCINAS DE
DIFERENTES ESTADOS DEL PAÍS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A:

ROXANA PASTRANA UNZUETA

ASESOR DE TESIS:

M en C. ATALO CANDIDO MARTINEZ LARA

COASESOR DE TESIS:

M en C. ANGEL JIMENEZ GARCÍA DE LEÓN

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ASUNTO: **VOTO APROBATORIO**



**M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

Identificación del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), en granjas porcinas de diferentes estados del país

Que presenta la pasante: **Roxana Pastrana Unzueta**

Con número de cuenta: **303229843** para obtener el Título de: **Química Farmacéutica Bióloga**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 22 de Octubre de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira</u>	
VOCAL	<u>M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez</u>	
SECRETARIO	<u>M. en C. Angel Jiménez García de León</u>	
1er. SUPLENTE	<u>M. en C. Ma. Guadalupe Avilés Robles</u>	
2do. SUPLENTE	<u>M. en C. Socorro Sandra Martínez Robles</u>	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de virología del CENID-MA, INIFAP, en Palo Alto, D.F., México., y Financiado por el proyecto denominado "ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO PARA DETERMINAR LA CIRCULACIÓN DEL VIRUS DEL SINDROME DISGENÉSICO RESPIRATORIO PORCINO (PRRS) EN CERDOS DE GRANJAS PORCINAS DE DIFERENTES ESTADOS DEL PAÍS"., con número de SIGI 16412319573, con recursos fiscales del INIFAP.

Después de un largo y tedioso, pero a la vez desafiante, periodo para culminar este trabajo, uno no se da cuenta de que las palabras más importantes y sinceras que va a escribir pertenecen a este apartado.woow..... por fin

comenzare x agradecer infinitamente a Dios por haberme permitido vivir hasta este momento tan increíble, por otorgarme la bendición de nacer dentro de esta familia y vivir la vida q me ha prestado.

A la UNAM, desde la prepa me sentí muy orgullosa de pertenecer a la máxima casa de estudios, estaré eternamente agradecida por haber recibido tan valiosa formación académica dentro de sus aulas, mi segunda casa, y en donde por fin después de un largo camino recorrido concluyo la etapa más importante de mi vida como *Química Farmacéutica Bióloga*

Gracias a mi familia con la que siempre he podido contar , a mi padre q toda la vida fue un triunfador, visionario y me llena de orgullo saberme su hija mi a mi madre por ser el gran ser humano q es, x ser esa gran armadura q ha sostenido siempre a sus pequeños "pollitos" , desarrollando su gran capacidad de amor incondicional, entereza, coraje y sabiduría necesaria para ser la proa q guía este barco cada día mas solido contra viento y marea a pesar de las adversidades q la vida nos ha puesto en el camino, indudablemente mi ejemplo a seguir, a quien cada día observo con gran admiración gracias por darme la vida, quererme mucho, creer en mí y porque siempre me apoyaste. Mamá gracias por darme una carrera para mi futuro, todo esto te lo debo a ti. A mi hermano por su gran valentía ante la vida, demostrando ser un gran guerrero q no sabe darse por vencido, quitando la palabra derrota de su vocabulario y pelear esta dura batalla diaria contra el cáncer permitiéndose disfrutar más y mejor la vida, aprovechando cada momento. Ustedes.. mi gran modelo a seguir en la vida.

A toda la familia Unzueta por su gran apoyo y unión ante esta enfermedad q nos tomo por sorpresa dejándonos sin palabras, gracias x solidarizarse, hacerse presentes y hacer este dolor suyo, si mi abuela viviera estaría muy orgullosa.

Gracias Noemí Arceo y Juan de Dios por estos más de 15 años de amistad x ser unos excelentes compañeros de vida y almas gemelas en este camino, los amo infinitamente, no me imagino sin ustedes.

A la familia Pizaña Cosio por su apoyo y siempre abrirme las puertas de su corazón y de su hogar, los amo, siempre serán mi familia. Gracias infinitas Emmanuel por cruzarte en mi camino, te adoro.

Gracias a mi otra familia esa que no es de sangre pero no menos importante, ya q de igual manera te hace sentir un amor entrañable y la forman todos mis amigos Wendy por todos esos momentos compartidos, por ser mi cómplice y compañera de vida transmitiéndome siempre esa energía alegría y ganas de vivir, a Lola la gran mujercita que siempre puede ver a través de mí y me lee como a un libro abierto, siempre con esa exactitud en su pensar, y siempre con las palabras claves para mover al mundo, a Xiomara por ser única y siempre estar ahí con la palabra sabia, a la wera por siempre sacarme una sonrisa... mujeres sabias... soy afortunada de tenerlas en mi vida, las amo. Al Ing. Luis Manuel por siempre escucharme y centrarme o intentar centrarme. Al Dr. Juan Enrique Figueroa porque el siempre creyó en mí y ha sido motivación en mi vida.

A mis amigos entrañables de la Preparatoria No. 4 Paola, Ale, Lily, Edgar, Marco, Burbu, Miguel, P al cuadrado, Fercho, Fanny, Bambi

A todos y cada uno de las personas que la FES CUAUTITLAN me permitió conocer y con las que a través de estos años se ha logrado forjar una amistad inquebrantable, Jessy, Montserrat, Paulina, Toño, Caro, Miguel, gracias por ser un gran equipo en mi vida y sobre todo en Análisis,

Gracias a los maestros que durante todo este proceso invirtieron esfuerzo y tiempo para poder transmitir siempre sus conocimientos.

En fin, a todas las personas que tuve la fortuna de conocer en esta maravillosa institución, compañeros, laboratoristas, maestros, mencionarlos a todos me llevaría un tomo mas... pero los adoro y me llevo un pedacito de cada uno, gracias por existir.

Definitivamente la UNAM, me dio vida en todos los aspectos, pero sobre todo me dio la oportunidad de vivir los mejores años de mi vida y conocer a las personas que han dejado huella para siempre, y viviré eternamente agradecida por eso.

A la Dra. Tony, Dr. Atalo y Dr. Fernando por su tiempo y dedicación para la realización de este proyecto.

“POR MI RAZA, HABLARA EL ESPIRITU”

“El científico no tiene por objeto un resultado inmediato. Él no espera que sus ideas avanzadas sean fácilmente aceptadas. Su deber es sentar las bases para aquellos que están por venir, y señalar el camino.”

Nikola Tesla

“Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un **niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan** como un cuento de hadas.”

Marie Curie

“No te rindas, aún estás a tiempo	Destrabar el tiempo,
De alcanzar y comenzar de nuevo,	Correr los escombros,
Aceptar tus sombras,	Y destapar el cielo.
Enterrar tus miedos,	No te rindas, por favor no cedas,
Liberar el lastre,	Aunque el frío queme,
Retomar el vuelo.	Aunque el miedo muerda,
No te rindas que la vida es eso,	Aunque el sol se esconda,
Continuar el viaje,	Y se calle el viento,
Perseguir tus sueños,	Aún hay fuego en tu alma”

Aún hay vida en tus sueños.

Mario-Benedetti

Índice general 1

Lista de abreviaturas.....	4
Resumen	6
Tabla de contenido	
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 HISTORIA DE LA ENFERMEDAD	11
1.2 IMPORTANCIA ECONÓMICA	13
1.3 ETIOLOGÍA.....	16
1.4 MORFOLOGÍA VIRAL	16
1.5 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS	17
1.6 ORGANIZACIÓN GENÓMICA	17
1.7 PROTEÍNAS ESTRUCTURALES	19
1.8 VARIABILIDAD GENÉTICA	21
1.9 REPLICACIÓN VIRAL.....	25
1.10 TRANSMISIÓN	27
1.11 PATOGENIA	30
1.12 FORMAS CLÍNICAS.....	32
1.12.1 Signos clínicos	33
1.12.2 Lesiones macroscópicas.....	36
1.12.3 Lesiones microscópicas.....	37
1.13 INTERACCIÓN CON OTROS PATÓGENOS RESPIRATORIOS.....	38
1.14 INMUNOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD.....	39
1.14.1 Respuesta innata frente al VPRRS.....	40
1.14.2 Respuesta humoral	40
1.14.3 Respuesta celular	41

1.15 PROFILAXIS Y MEDIDAS PREVENTIVAS.....	42
1.16 VACUNAS.....	43
1.17 DIAGNÓSTICO	45
1.17.1 Diagnóstico clínico	45
1.17.2 Diagnóstico de laboratorio.....	46
1.17.3 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	46
1.17.4 Immunoperoxidase monolayer assay (IPMA).....	47
1.17.5 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	48
1.17.6 Seroneutralización (SN).....	48
1.17.7 Aislamiento viral (AV).....	49
1.17.8 Inmunofluorescencia directa (IFD).....	50
1.17.9 Inmunohistoquímica	51
1.18 DETECCIÓN DEL ÁCIDO NUCLEICO VIRAL.....	51
2. JUSTIFICACIÓN	53
3. HIPÓTESIS.....	54
4. OBJETIVO GENERAL:	55
4.1. OBJETIVOS PARTICULARES:.....	55
5. METODOLOGÍA	56
5.1 GRANJAS.....	56
5.2 MUESTRAS.....	56
5.3 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.....	56
Aislamiento viral.-	56
Línea celular.-	57
Inoculación de cultivo celular	57
5.4 CONSERVACIÓN DE LOS ESPECÍMENES	58

5.5 IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS	58
PCR para el VPRRS. Extracción de ARN	58
ADNc y Amplificación	61
Técnica de inmunofluorescencia.-	64
PCR para la detección del circovirus tipo 2	66
PCR para la detección del virus de la enfermedad del ojo azul (EOA).....	66
6. RESULTADOS	67
7. DISCUSIÓN	86
CONCLUSIONES.....	94
BIBLIOGRAFÍA.....	95
ANEXOS	131

ABREVIATURAS

aa	aminoácido
ag-ac	antígeno- anticuerpo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APP	<i>Actinobacillus pleureopneumoniae</i>
ARN	Ácido ribonucleico
AV	Aislamiento viral
CC	Cultivo Celular
ECP	Efecto citopático
EOA	Enfermedad de Ojo Azul
Fc	Fracción cristalizable
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IFD	Inmunofluorescencia directa
IFN- γ	Interferón gamma
IgG	Inmunoglobulina G
IPMA	Inmunoperoxidasa en monocapa
LDV	Virus Láctico Deshidrogenasa del ratón
MAP's	Macrófagos Alveolares Pulmonares
NSP	Proteína no estructural

ORF	Open reading frame
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
PCV2	Circovirus Porcino Tipo 2
PRRS	Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino
VEOA	Virus de la Enfermedad de Ojo Azul
VPRRS	Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción en reversa
SFB	Suero Fetal Bovino
SHFV	Virus de la Enfermedad Hemorrágica del simio
SIV	Swine influenza virus
SN	Seroneutralización
UV	Ultra Violeta
EAV	Virus de la Arteritis viral Equina
FTIC	Conjugado con isotiocianato de fluoresceína

RESUMEN. El Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) es una infección viral, que se encuentra distribuida ampliamente en el mundo y es de gran impacto en la industria porcina debido a las pérdidas económicas que provoca. La enfermedad se caracteriza por provocar un cuadro respiratorio en lechones y cerdos en crecimiento, mientras que en los sementales y vientres ocasiona trastornos reproductivos. El agente etiológico de esta enfermedad, conocido como virus (V) del PRRS, es un virus envuelto, compuesto de ARN de cadena sencilla, de polaridad positiva, perteneciente a la familia *Arteriviridae* del género *Arterivirus*. Se caracteriza por tener una elevada variabilidad genética, por lo cual en el campo existen variaciones en la agresividad del virus, por las diferentes cepas que existen. Se han descrito dos genotipos, el americano ATCC-VR-2332 y el europeo Lelystad. El objetivo de esta tesis es identificar la presencia del virus, en diferentes estados del país, utilizando aislamiento viral (AV), la técnica de la transcriptasa reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y la de inmunofluorescencia directa (IFD). Para lo anterior, se muestrearon cerdos con retraso de crecimiento y problemas respiratorios pertenecientes a 23 granjas de cinco estados. Se muestrearon 46 cerdos correspondientes a: catorce de Guanajuato, dos de Michoacán, cuatro de Veracruz, cinco de Puebla y veintiuno de Querétaro. En total se trabajaron 118 muestras, de las que se tomó una alícuota que fue macerada y en seguida se le hizo RT-PCR; obteniéndose en total 42 muestras positivas a VPRRS. Posteriormente, se tomaron otras alícuotas, de las que resultaron positivas, que fueron maceradas, con las que se infectaron células MARC-145, dándoseles tres pases ciegos. Al primer pase se hizo RT-PCR e IFD y al tercero RT-PCR para corroborar la presencia del virus. En el primer pase se detectó al virus en un total de nueve muestras, en tejidos como: tonsila, linfonodos y pulmón; siete de Guanajuato, una de Veracruz y una de Michoacán. En el tercer resultado resultaron tres muestras positivas. Se detectaron muestras que a pesar de un resultado negativo en la RT-PCR, presentaban ECP, por lo que se hizo RT-PCR para buscar al virus de la enfermedad de ojo azul (VEOA) y PCR para el circovirus porcino tipo 2 (PCV2). Lo anterior arrojó datos interesantes, ya que en primer lugar no hay reportes en México de haber aislado estos virus en células MARC-145. También corroboramos la presencia de coinfecciones en las muestras. PCV2 se encontró en 34 del total de las muestras mientras que VEOA se aisló en 23 muestras; resultados obtenidos a partir del tercer pase. Como podemos observar el VPRRS se encuentra diseminado en varias granjas, en las que se diagnosticó mediante tres técnicas. Estos resultados mostraron que el AV y la IFD fueron menos sensibles que la RT-PCR para la detección del VPRRS, no obstante las tres técnicas son complementarias y contribuyen al diagnóstico del VPRRS. También pudimos observar que existen coinfecciones entre los virus mencionados. Es posible realizar el AV de VPRRS, VEOA y PCV2 en células MARC-145.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 HISTORIA DE LA ENFERMEDAD

El Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS) fue reportado por primera vez en 1987 en Carolina del Norte, ya que se presentó la epidemia de una nueva enfermedad que afectaba al cerdo (Hill, 1990). A raíz de los brotes inicialmente se sospechó, equivocadamente, que esta enfermedad era causada por diversos microorganismos que se sabía eran capaces de causar signos respiratorios y/o reproductivos, por lo que clínicamente se le confundió con otras enfermedades y/o agentes etiológicos (Prieto, 1997).

Al inicio, de su descubrimiento, la etiología era desconocida por lo que fue denominada de diversas maneras, uno de ellos fue el virus del Aborto Epizoótico y el virus del Síndrome Respiratorio de los cerdos (PEARS), que se utilizó en Europa para describir la forma en que se presentaba al llegar a zonas que hasta esos momentos estaban libres de PEARS (Terpstra *et al.* 1991); plaga porcina del 89; Enfermedad Misteriosa del Cerdo y; Enfermedad de las Orejas Azules, (Dial *et al.*, 1990; Hill, 1990). En el primer Simposio internacional de la enfermedad, celebrado en Minnesota en 1992, se aceptó como denominación más idónea el nombre de PRRS (Collins, 1992) que ha sido adoptado internacionalmente.

Desde su aparición solo bastaron tres años para que la enfermedad se presentara en 11 estados de los Estados Unidos de América (EUA), al igual que los primeros indicios en Europa; y en mayo de 1991 se presentaron más de 3000 brotes diseminándose rápidamente por todo el continente Europeo. Desde entonces, la infección se extendió rápidamente por Europa, detectándose en diversos países como Alemania en 1990, Holanda en 1991, Reino Unido en 1991, Bélgica en 1991, España en 1991, Francia en 1991, un caso sospechoso en la entonces URSS, Dinamarca en 1992 (Weimersheimer *et al.*, 1997). Posteriormente, en Japón en 1993 y Corea en 1994. Se detectó también en Italia, Polonia, Malta y en las Filipinas así como en Asia (Kang, *et al.* 1994, Kawashima *et al.* 1994, Meredith J. 1992), lo cual indicó que la infección abarcó a cerdos de muchos países. (Imagen No. 1).



Imagen No. 1. Países y año donde se describió por vez primera la enfermedad de PRRS. (Sánchez-Vizcaino, JM. 2000)

Dos grandes incidencias de VPRRS (tipo americano) se registraron en China desde mediados de la década de 1990. De Junio a Septiembre de 2006, una forma atípica de PRRS afectó a más de un millón de cerdos, de los cuales 400.000 murieron, en 16 provincias de China (Tian *et al.*, 2007). A comienzos de 2007, la enfermedad reapareció y desde entonces, al parecer, se han infectado 310,000 cerdos, de los cuales más de 81,000 han muerto en 26 provincias (ProMED, 2007b).

Desde la aparición clínica de la enfermedad, transcurrieron cuatro años para determinar al agente causal de la enfermedad (Suárez, 1995).

El agente etiológico responsable fue identificado en 1991, y aislado por primera vez en cultivos de macrófagos alveolares pulmonares (MAP's), a partir de muestras de animales enfermos por PRRS, que incluían macerados de pulmón, cerebro, linfonodos y otros órganos de lechones de 2 a 10 días de edad; así como de plasma y suero de cerdas afectadas. Además se consiguió transmitir y reproducir experimentalmente la enfermedad (Terpstra *et al.*, 1991), por Wensvoort *et al.*, en 1991, en Holanda, conociéndose esta cepa europea como Virus Lelystad. En 1992, en los EUA, el agente reconocido como VR-2332, fue aislado por Benfield *et al.* (Méndez, 1996), para entonces se descubrió ya una diferencia antigénica considerable entre ambos virus (americano y europeo) mediante la técnica de inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA) (Wensvoort *et al.*, 1992).

1.2 IMPORTANCIA ECONÓMICA

El PRRS es una de las enfermedades infecciosas más importantes debido al impacto económico que ocasiona a la industria porcina nacional e internacional (Sánchez-Vizcaíno *et al.*, 2000).

Por ello es evidente el intenso trabajo que se ha realizado para el desarrollo de la investigación de esta enfermedad, todo esto motivado por las graves pérdidas económicas que se han originado en las granjas porcinas. (Suárez, 1995).

En ocasiones, es difícil atribuir el gran quebranto económico a esta enfermedad, ya que presenta diferentes cuadros clínicos, debido a un sinergismo con otros virus y bacterias. Sin embargo se puede definir el impacto económico directo realizando una comparación antes, durante y después de la aparición de un brote en una granja. (Suárez, 1995)

De lo anterior se considera que la enfermedad produce pérdidas económicas importantes al llegar por primera vez a zonas porcinas con alta densidad poblacional y susceptible. Los problemas más importantes se producen en las cerdas gestantes y en los lechones lactantes. (Shin *et al.*, 1997)

Las pérdidas atribuibles a la enfermedad se fundamentan principalmente en un aumento de la tasa de lechones nacidos muertos, del número de momificaciones y de la mortalidad en lactación, junto con otros parámetros como retraso en el retorno a celo, acortamiento del periodo de gestación (5-7 días), y en cerdos destetados aumento de infecciones respiratorias, de la mortalidad, y de infecciones secundarias que causan disminución de la ganancia de peso y del consumo de alimento, con el consiguiente aumento del índice de conversión (Polson *et al.*, 1990). La infección en los vientres puede resultar en anorexia, pirexia, fallas reproductivas así como constantes retrasos en el estro, repeticiones, abortos, camadas de lechones débiles al nacimiento; por lo que se incrementa la mortalidad perinatal (Shin *et al.*, 1997). Otras pérdidas se dan por el costo de tratamientos, gastos de mano de obra adicional, costos derivados de políticas de control y/o erradicación, investigación etc. (Plana *et al.*, 1992).

Se han realizado estudios que intentan determinar cuál es el costo aproximado que ocasiona esta enfermedad en la industria, ya que a pesar de que han pasado más de 25 años de investigación y experiencia en este tema, sigue siendo costosa prácticamente en todos los países que enfrentan este problema (Holtkamp *et al.*, 2013).

El Departamento de Agricultura de los EUA realizó un estudio mediante el análisis de los resultados de una encuesta realizada por veterinarios sobre la incidencia e impacto del VPRRS, así como a partir de los registros productivos de granjas comerciales con un estatus conocido de VPRRS entre los años 2005 y 2010, donde se evaluaron el impacto económico a nivel de animal, debido a las pérdidas de productividad y otros costos atribuidos al VPRRS. El costo total de las pérdidas de productividad debidas al VPRRS en las explotaciones de madres y de engorda se calculó en \$664 millones de dólares anuales (Holtkamp *et al.*, 2013); esto representa un ligero incremento respecto a los \$560 millones de dólares de pérdidas estimadas en otro análisis, publicado en 2005, (Neumann *et al.*, 2005). La principal diferencia en los resultados obtenidos en el estudio de 2005-2010 comparado con los publicados en el 2005 es la localización de las pérdidas; mientras que en el 2005 las reproductoras eran responsables del 12% del total de pérdidas por PRRS, en el periodo 2005-2010 lo fueron de un 45% (Holtkamp *et al.*, 2013).

Otro punto que tiene que ser considerado y de gran importancia es la dificultad en el control de esta enfermedad debida, principalmente, a los múltiples factores implicados en la patogenia, en el genotipo del virus y en la susceptibilidad del hospedador frente al PRRS (Darwich *et al.*, 2010). Desde la aparición de la enfermedad, hace más de 20 años, los genotipos I y II del VPRRS se han diseminado geográficamente, ganando diversidad genética y, probablemente, aumentado su virulencia (Murtaugh *et al.*, 2010).

Tal como se detectó en 2006 la aparición de una cepa del VPRRS altamente virulenta en China, la que tuvo un efecto devastador en la industria porcina, y demostró la habilidad del virus de mutar y evolucionar rápidamente (Tian *et al.*, 2007).

Además, el riesgo de transmisión intercontinental de los aislados altamente patógenos del VPRRS, detectados en Asia, también es real. Al mismo tiempo, en otras partes del mundo como Australia, la mayor parte de América del sur y Escandinavia, la introducción de cualquier virus

de PRRS podría ser catastrófica para las industrias locales (Imagen No. 2). Esta situación global indica que el virus de PRRS por sí mismo, así como el riesgo y potenciales consecuencias de su transmisión entre regiones, no debe ser subestimado. (Cano, 2012).

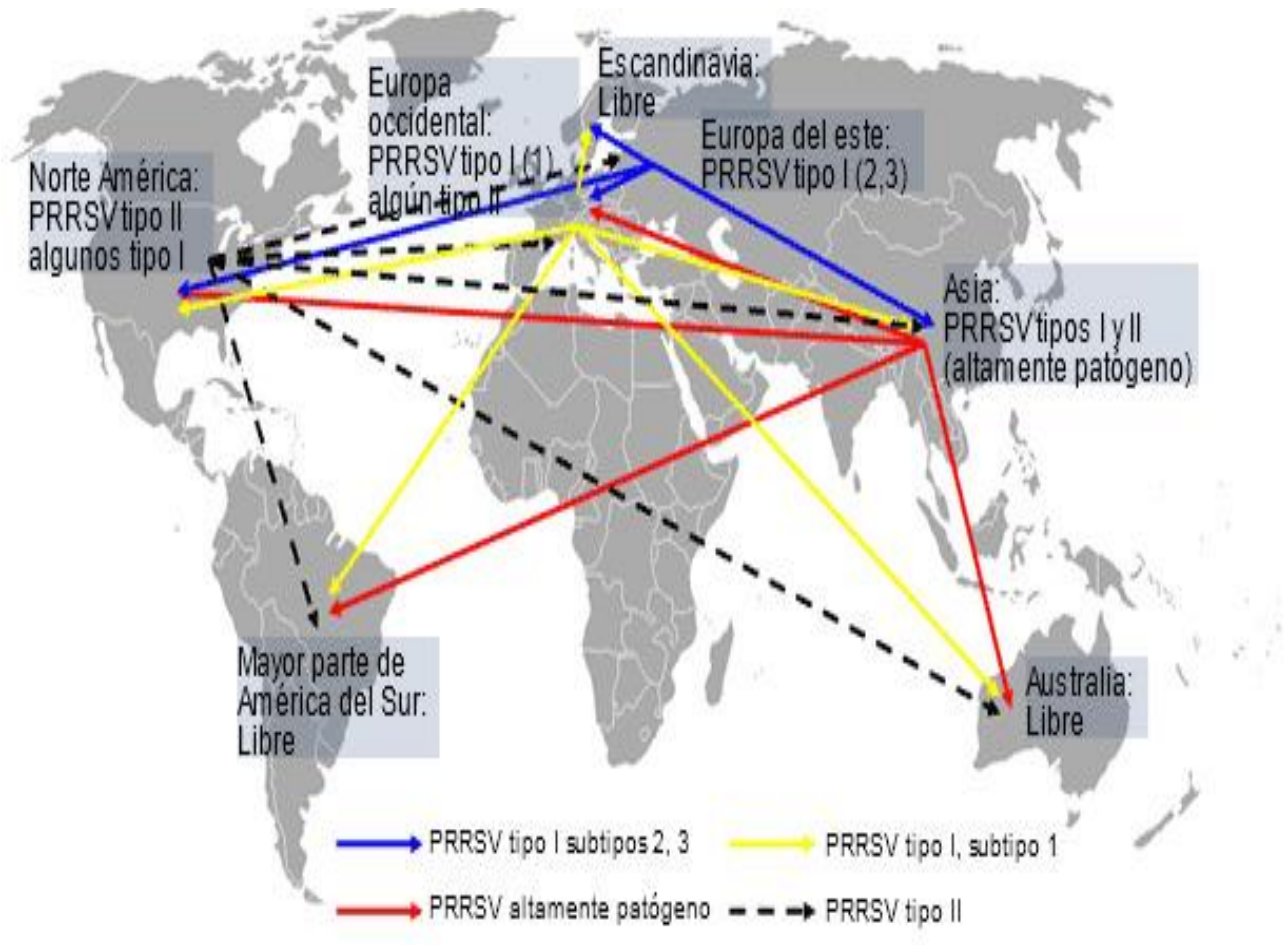


Imagen No. 2. Distribución global del virus de PRRS e hipotética transmisión intercontinental (Cano, 2012)

1.3 ETIOLOGÍA

El agente etiológico del PRRS es un virus ARN, miembro del orden *Nidovirales*, familia *Arteriviridae*, género *Arterivirus* (Brinton, *et. al.*, 2000).

Hay dos cepas relacionadas pero antigénica y genéticamente distinguibles: i) el genotipo 1 con el virus prototipo Lelystad, representando los virus predominantes en Europa; ii) el genotipo 2, aislado e identificado en EUA, el cual es antigénica y estructuralmente relacionado con el virus Lelystad como agente productor de la enfermedad. El virus, identificado en EUA, aislado en la línea celular CL-2621, se ha considerado cepa de referencia, recibiendo la denominación ATCC VR-2332 (Collins *et al.*, 1992; Prieto, 1997), el prototipo de cepas mayormente encontradas en Norteamérica y recientemente una variante del genotipo 2 es la causa de una enfermedad severa en Asia. (OIE. 2008). Esta forma del VPRRS fue más virulenta y muchos cerdos adultos y las cerdas gestantes murieron (Tian *et al.*, 2007).

Dentro de esta misma familia se incluyen otros virus, tales como son el Virus de la Arteritis viral Equina (EAV), Virus Láctico Deshidrogenasa del ratón (LDV) y Virus de la Enfermedad Hemorrágica del simio (SHFV), los cuales comparten propiedades biológicas y moleculares únicas: organización del genoma, gran variabilidad genética, estrategia de replicación, secuencia de transcripción, composición proteica, morfología de virión, especificidad celular muy restringida (replicación primaria en macrófagos) y capacidad de provocar desde infecciones asintomáticas, asintomáticas persistentes, o hasta casos clínicos desde leves hasta incluso fatales (Snijder y Meulenbergh, 1998; Balasuriya y MacLachlan, 2004)

1.4 MORFOLOGÍA VIRAL

Propiedades de la partícula viral

El VPRRS, es un virus pequeño, esférico, con envoltura y con un tamaño medio de 62 nm que puede oscilar entre 45 y 80 nm. Con una nucleocápside central isométrica de forma icosaédrica de 25-30 nm, formado por una cadena simple de ARN de polaridad positiva de 13-15 Kb (Benfield *et al.*, 1992-a; Dea *et al.*, 1995; Diaz L., 2006; Barranco, 2011).

1.5 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

El virus es estable a temperaturas de -70°C . Su infectividad se reduce lentamente cuando se almacena a 4°C hasta un mes, y puede permanecer inalterable, pero por otro lado, es termolábil ya que se inactiva por completo tras 48 hrs de incubación a 37°C ó 45 min a 56°C , en cuanto a su *densidad*: se observa una banda opalescente ente 1,18-1,19 g/ml en cloruro de cesio (ClCs) y de 1,13-1,15 g/ml en gradiente de sacarosa (Benfield *et al.*, 1992-a). Es estable a pH 6,5-7,5. La infectividad del virus disminuye drásticamente a $\text{pH} < 6$ y $> 7,5$, es sensible al tratamiento con cloroformo y éter, debido a la presencia de una envoltura lipídica. Este virus no hemaglutina glóbulos rojos de pollo, cobayo, cerdo, oveja ó humano (tipo O) (Wensvoort *et al.*, 1991). No se detectan anticuerpos neutralizantes en sueros de animales positivos mediante la técnica de ensayo de inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA) en macrófagos alveolares (MAP) infectados con el virus, no así cuando como sustrato se utilizan líneas celulares. (Suárez, 1995).

1.6 ORGANIZACIÓN GENÓMICA

El genoma del VPRRS es una molécula de ARN lineal de banda única, poliadenilada, no segmentada y polaridad positiva, de aproximadamente 15,100 bases de longitud variable con un máximo de 20 adeninas en su extremo 3' y en el interior del ARN genómico (Meulenber *et al.*, 1993; Conzelmann *et al.*, 1993). Esta cadena, está compuesta en el extremo 5' de una región corta no traducida (UTR, por sus siglas en inglés, *untranslated region*) seguida por nueve fragmentos de lectura abierta del inglés *Open Reading frame* (ORFs), llamados ORF1a,

ORF1b, ORF2a, ORF2b, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6, ORF7 que se traslapan entre sí (Conzelmann *et al.*, 1993; Meulenber *et al.*, 1993; Allende *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2000; Wu WH, *et al.*, 2001).

Los 2 ORF's largos (ORF1a y ORF1b) se encuentran situados en el extremo 5' del genoma. Representan aproximadamente un 80% del genoma del virus, y codifican para proteínas no estructurales con actividad en la replicación del RNA y en la transcripción, incluyendo la poliproteína con actividad de RNA polimerasa (pp1a), y los 7 cortos (ORF2-ORF7) que se encuentran en el extremo 3', que codifican para las glicoproteínas estructurales del virus, (GP) 2a, GP3, GP4, GP5, y las proteínas no glicosiladas 2b, la proteína M de membrana y la N de la

nucleocápside, y también hay una región no traducida seguida de una cola de poli A (Nielsen *et al.*, 2001; Stadejek *et al.*, 2002; Meulenberg, 1993; Abe, *et al.*, 2001) del ORF2-ORF6 son solapantes y codifican para una serie de polipéptidos, con características típicas de proteínas de membrana. El ORF7 codifica para la proteína de la nucleocápside, que encapsida al ARN. (Proteína N). La expresión y replicación del VPRRS requiere la producción de al menos 6 fragmentos subgenómicos de ARNm, cada uno de los cuales codifica para una proteína viral (Sánchez-Vizcaino *et al.*, 2000) (Imagen No. 3)

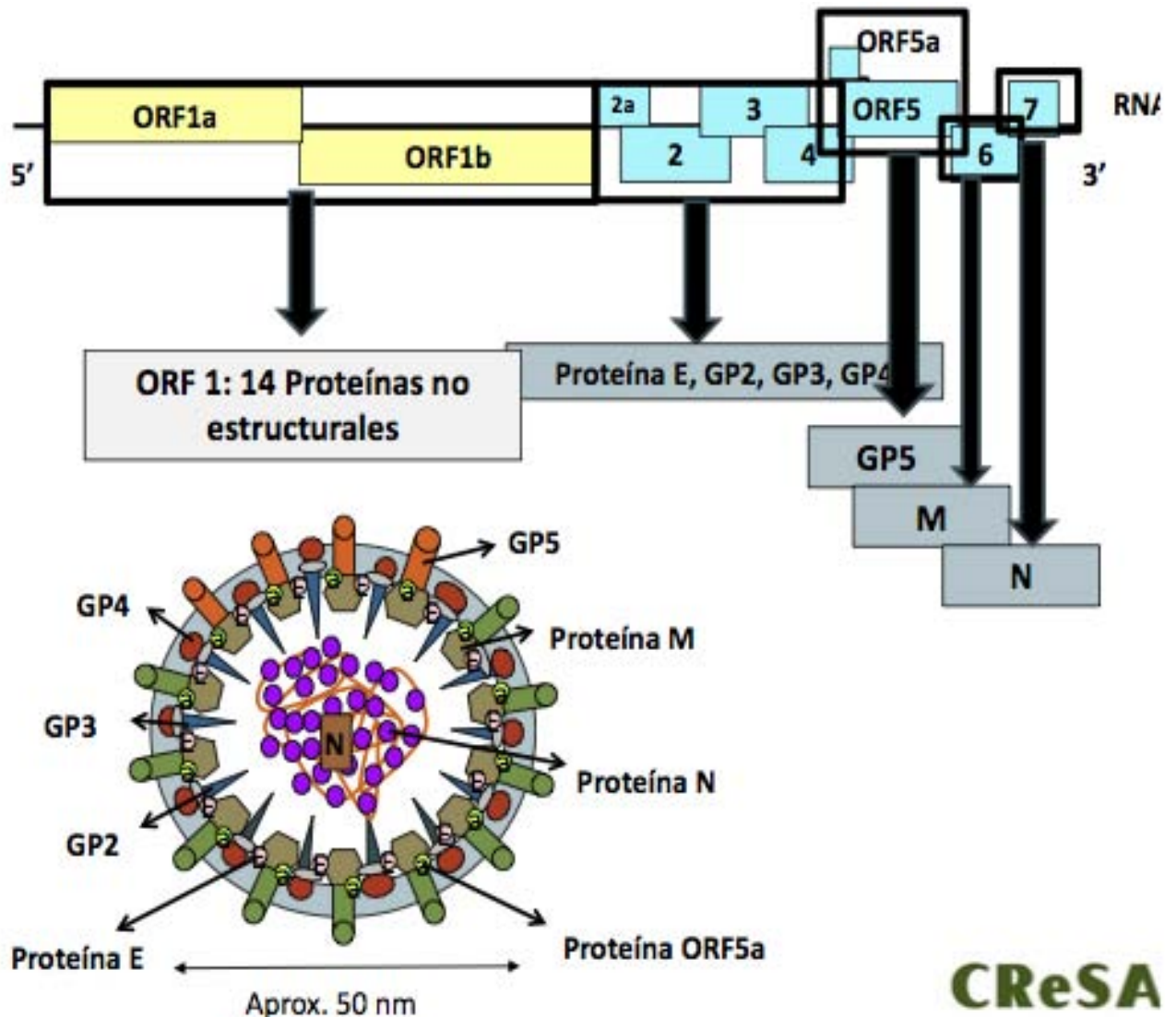


Imagen No. 3. Estructura del VPRRS mostrando los ORF's, proteínas estructurales y no estructurales. (Díaz, 2012).

1.7 PROTEÍNAS ESTRUCTURALES

Proteína N. Fue la primera en reconocerse y es una proteína de 15 kDa, codificada por el ORF7. La proteína de la nucleocápside, constituye entre 20%-40% del contenido proteico del virión, contiene 26% de residuos básicos en el extremo N terminal, lo cual puede facilitar su interacción con el ARN del genoma (Meulenberg, 2000; Meulenberg *et al.*, 1995; Mardassi, 1996).

La proteína N es altamente antigénica y la más abundante en la partícula viral, con una región conservada en todos los aislados europeos y americanos, lo que la convierte en candidata para el diagnóstico general de todos los aislados (Sánchez -Vizcaíno *et al.*, 2003).

Proteína M. Una proteína de membrana no glicosilada de 18 kDa que es codificada por el ORF6, es la más conservada con similitud de 94% y 100% a nivel de aminoácidos dentro del mismo genotipo (europeo o americano). Sin embargo entre ambos genotipos solo hay 63% de identidad de aminoácidos (Murtaugh, 1995).

Glicoproteína GP5. La glicoproteína de envoltura mayor, de 25kDa codificada por el ORF5, es una proteína transmembranal glicosilada que se puede dividir en varios dominios: un péptido señal, un ectodominio (con un número variable de sitios potenciales de glicosilación), una región transmembranal y un endodominio. En el ectodominio se han detectado dos epítomos que inducen la producción de anticuerpos, de los cuales sólo un tipo es neutralizante. Estos epítomos se denominan A y B (el epítomo B es el neutralizante). Este último es conservado entre los aislamientos del VPRRS; sin embargo, no es inmunodominante, contrario al epítomo A, el cual es inmunodominante e hipervariable. Estos epítomos se encuentran separados por siete aminoácidos. Los cerdos infectados con VPRRS primeramente desarrollan anticuerpos no neutralizantes contra el epítomo A y tiempo después (cuatro semanas aproximadamente) aparecen los anticuerpos neutralizantes (AN) contra el epítomo B. En tal contexto, el epítomo A funciona como señuelo del virus, distrayendo de manera momentánea la respuesta neutralizante. Se ha observado que la GP5 forma heterodímeros con la proteína M en las partículas virales. Estos heterodímeros también se han relacionado con la infección celular por su unión a moléculas de heparán sulfato y sialoadesina, principalmente en macrófagos.

La GP5 es la proteína más heterogénea con 88%-99% de identidad de aminoácidos entre cepas del mismo continente y 52%-55% de identidad entre genotipos. (Flores., 2010).

La proteína GP5 se encarga de reconocer el receptor celular en las células, inducir apoptosis y anticuerpos neutralizantes importantes en el control de la enfermedad (Macías *et al.*, 2006). Glicoproteína GP4. Por su parte, la GP4 de 31 kDa tiene cuatro sitios de N-glicosilación y se han identificado anticuerpos neutralizantes (AN) anti-GP4; sin embargo, éstos son menos efectivos que los inducidos por GP5 (Weiland *et al.*, 1999).

Glicoproteína GP3. Es una proteína de 42 kDa, es la más glicosilada del VPRRS con siete sitios de N-glicosilación (Meulenberg *et al.*, 1995). Ésta ha sido detectada en el virión de algunas cepas europeas; sin embargo, en cepas americanas su presencia aún se cuestiona. (Mardassi *et al.*, 1998; Nieuwstadt A. *et al.*, (1995); Gonin *et al.*, 1998).

Proteína E no glicosilada. El ORF2 contiene un marco de lectura interno que codifica para una proteína no glicosilada conocida como 2b o E que está en la envoltura. Se ha identificado la presencia de esta proteína en células infectadas, así como una respuesta anti-2b en cerdos infectados con VPRRS (Wu WH. *et al.*, 2001) Recientemente se demostró que la proteína 2b es un componente integral del virión del PRRS (Wu WH. *et al.*, 2005) (Imagen No. 4).

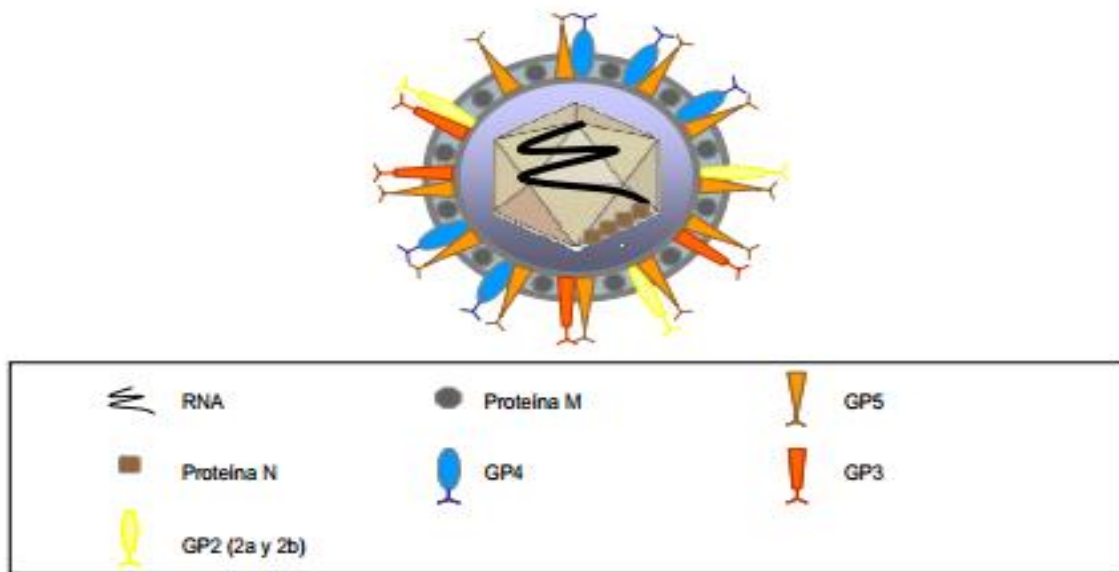


Imagen No. 4. Representación esquemática de la estructura de una partícula de VPRRS y situación de las proteínas estructurales (Díaz L.I., 2006)

Cada proteína estructural posee determinantes antigénicos comunes y de tipo específico, que posibilitan la diferenciación entre aislados europeos y americanos. Las GP5 y GP4, inducen AN en los animales infectados (Sánchez – Vizcaino *et al.*, 2003).

En el virión, la GP5 y la proteína M forman un heterodímero con uniones de puentes disulfuro que podría estar involucrado en la unión al receptor celular (Mardassi *et al.*, 1996).

La proteína N contiene el epítipo inmunodominante (Yoon *et al.*, 1995; Plana-Duran *et al.*, 1997b) mientras que la GP5 contiene el epítipo neutralizante más importante (Pirzadeh y Dea, 1997; Weiland *et al.*, 1999; Plagemann, 2003).

1.8 VARIABILIDAD GENÉTICA

Una de los aspectos más importantes que caracteriza a este virus corresponde a la gran variabilidad genética y antigénica de las cepas, pero los genotipos actualmente reconocidos del VPRRS se resumen en dos tipos, el genotipo I europeo que fue denominado virus Lelystad, y el genotipo II, siendo la cepa prototipo la ATCC VR2332 el genotipo norteamericano; éstos fueron clasificados de acuerdo a sus diferencias clínicas, antigénicas, patológicas y moleculares, y presentan solo un 55-65% de similitud genética a nivel aminoácido debido a su alta tasa de mutación (Murtaugh *et al.*, 1995; Meulenberg *et al.*, 1997; Meng 2000; Goldberg *et al.*, 2000; Mateu *et al.*, 2006).

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)

Las mutaciones encontradas en el VPRRS, son muy dinámicas, así por ejemplo en un informe del 2006 se mencionó que trece aislamientos del VPRRS de diferentes provincias de China fueron estudiados y comparados con varios aislados de VPRRS de otros países. El análisis filogenético muestra que todos los aislamientos de VPRRS chinos en ese estudio pertenecen al genotipo americano, a excepción de una cepa, la B13, que agrupan como un genotipo europeo.

El análisis de secuencias reveló que los aislamientos de VPRRS chinas del genotipo americano eran muy similares en la secuencia de ORF5 y se pueden clasificar en dos subclases; uno contiene los aislamientos de VPRRS que están más estrechamente relacionados con la cepa de la vacuna estadounidense MLV y su cepa parental VR-2332, y el otro contiene sólo los lejanamente relacionados a ellas. Dentro de los aislados chinos se produjo una ligera variación genética, y algunas cepas pueden proceder directamente del virus de la vacuna. (Chen. 2006).

Esta diversidad genómica del tipo II del VPRRS ha aumentado cuando en los estudios de secuenciación se han incluido aislados procedentes de Asia, especialmente de China, Vietnam, Tailandia y Japón. En un estudio, secuenciaron la ORF5 de un total de 42 aislados obtenidos entre el año 1996 y el año 2006 en diferentes regiones de China, y aunque todos ellos pertenecían al tipo II, pudieron establecer dos subgrupos claramente diferenciados. El primero de ellos engloba aislados que presentaban una variabilidad muy alta en la secuencia correspondiente al epítipo neutralizante de la GP5, y el segundo lo constituyen aislados con una alta similitud de secuencia con la cepa de referencia VR-2332. Parece que el primer subgrupo es el causante de los brotes de enfermedad con elevada mortalidad ocurridos en el sureste de China, y que son los aislados pertenecientes a este subgrupo los que más prevalecieron a fines del primer lustro de este siglo en las explotaciones porcinas del sureste del país asiático (An *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2009).

En cuanto a los brotes de China hubo uno que se extendió a más de 10 provincias (ciudades autónomas o regiones) y afectó a más de 2.000.000 cerdos con aproximadamente 400.000 casos fatales. A diferencia del PRRS típico, numerosas cerdas adultas también estaban infectadas, lo destacado de un estudio, fue que se observó un único sello molecular en estos aislamientos virales, es decir una delección discontinua de 30 aminoácidos en la proteína no estructural (NSP2), esto aparentemente es un factor determinante para virulencia que puede estar implicado en la alta patogenicidad de VPRRS (Tian *et al.*, 2007).

Lo cual concuerda con quien afirma que en lo que respecta a las proteínas no estructurales (NSP, por sus siglas en inglés), codificadas por el ORF1a y ORF1b, la NSP2 presenta una región de alta variabilidad (en las posiciones de aminoácidos 324 a 814) solamente con 40% de

similitud de aminoácidos entre genotipos europeos y americanos, lo que representa el gen con la mayor tasa de variabilidad del VPRRS (Flores, 2010; Allende, 1999).

Esta elevada variabilidad puede estar asociada a dos fenómenos. En primer lugar las RNA polimerasas del virus no poseen la capacidad de corrección de los errores que se producen en el proceso de duplicación del RNA; se considera que pueden aparecer de 2 a 15 mutaciones aleatorias por cada nuevo virus producido (Domingo y Holland, 1997).

En segundo lugar, podría existir cierta capacidad de recombinación entre cepas parecidas (Van Vugt *et al.*, 2001; Murtaugh *et al.*, 2001). Por otro lado, numerosos estudios han demostrado que en el curso de una infección se producen miles de variantes que coexisten dentro de un mismo animal y que dan lugar a la aparición de “cuasiespecies” (Kapur *et al.* 1996.; Rowland *et al.*, 1999; Goldberg *et al.*, 2003).

Los genes que presentan mayor tasa de variabilidad son ORF5, ORF3 y ORF4, mientras que los genes de ORF2, ORF6 y ORF7 son los más conservados (Murtaugh, 1995).

Se han realizado infecciones experimentales en las cuales se observó que los genes que codifican para las proteínas estructurales presentan mayores tasas de mutación que la ORF 1, esto quiere decir, que ORF 3, 4 y 5 mutan más que las ORF 2, 6 y 7, y se ha sugerido que esto se presenta debido a la presión del sistema inmunitario, y que las proteínas internas casi no presentan cambios (Le Gall *et al.* 1998; Allende *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2002; Wissink *et al.*, 2003; Diaz, 2006). Las proteínas estructurales M y P2b son las más conservadas (74-81%) y hablando de la GP5 se conserva solo un 51-58% entre diferentes aislados (Meng *et al.*, 1994; Kapur *et al.*, 1996).

Tomando en cuenta que el ORF 5 es la más variable de todas, se ha hablado de que podría presentar seis sitios potencialmente antigénicos (Andreyev *et al.*, 1997; Pirzadeh *et al.*, 1998), y esto implicaría que gracias a la variabilidad que presenta, podría suceder la pérdida o alteración de algún epítipo provocando el enmascaramiento de epítipos neutralizantes (Weiland *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2002; Plagemann, 2004), con esto, se provocarían cambios en el reconocimiento de los mismos por parte de la respuesta inmune.

También se han descrito, aunque no tan marcadas, las diferencias significativas entre aislados de un mismo genotipo, inicialmente en el norteamericano, y se ha demostrado que en el europeo igualmente pueden existir diferencias de más del 18% dando lugar a 4 subtipos diferentes (Drew *et al.*, 1997; Indik *et al.*, 2000; Forsberg *et al.*, 2001, 2002; Bignotti *et al.*, 2002; Stadejek *et al.*, 2002, 2006).

La variabilidad genética del VPRRS, está determinada por una evolución local y temporal a nivel de granja y debería ser considerada en la prevención. Por otra parte, la asociación entre los patrones de glicosilación del VPRRS y su virulencia, podría ser de interés para el desarrollo de vacunas (Badaoui *et al.*, 2013).

La alta variabilidad genética del VPRRS complica el desarrollo de una respuesta inmune efectiva entre las cepas heterólogas; constituye una de las principales limitantes en el desarrollo de vacunas, pues se ha observado que tras la vacunación no existe protección cruzada de 100% entre cepas heterólogas (Flores, 2010), esto sugiere la necesidad de desarrollar diferentes medidas de control frente al PRRS dependiendo del genotipo con el que nos encontremos.

El mantener bajo control la enfermedad, se vuelve muy complicado debido a esta diversidad y al elevado número de cepas junto con los demás factores que influyen, de ahí que surge la necesidad de desarrollar el conocimiento de su relación genética y al genotipo y en su caso subtipo al que nos estemos enfrentando.

1.9 REPLICACIÓN VIRAL

El virus, ingresa a la célula blanco por endocitosis mediada por una proteína receptora de la membrana plasmática (Suárez, 2000), observándose ya a las 3 horas post-infección (hpi) degeneración celular, y a las 6 hpi partículas virales envueltas dentro de la célula, las cuales son eliminadas por exocitosis o lisis celular (Pol *et al.*, 1997a) (Fig. 5)

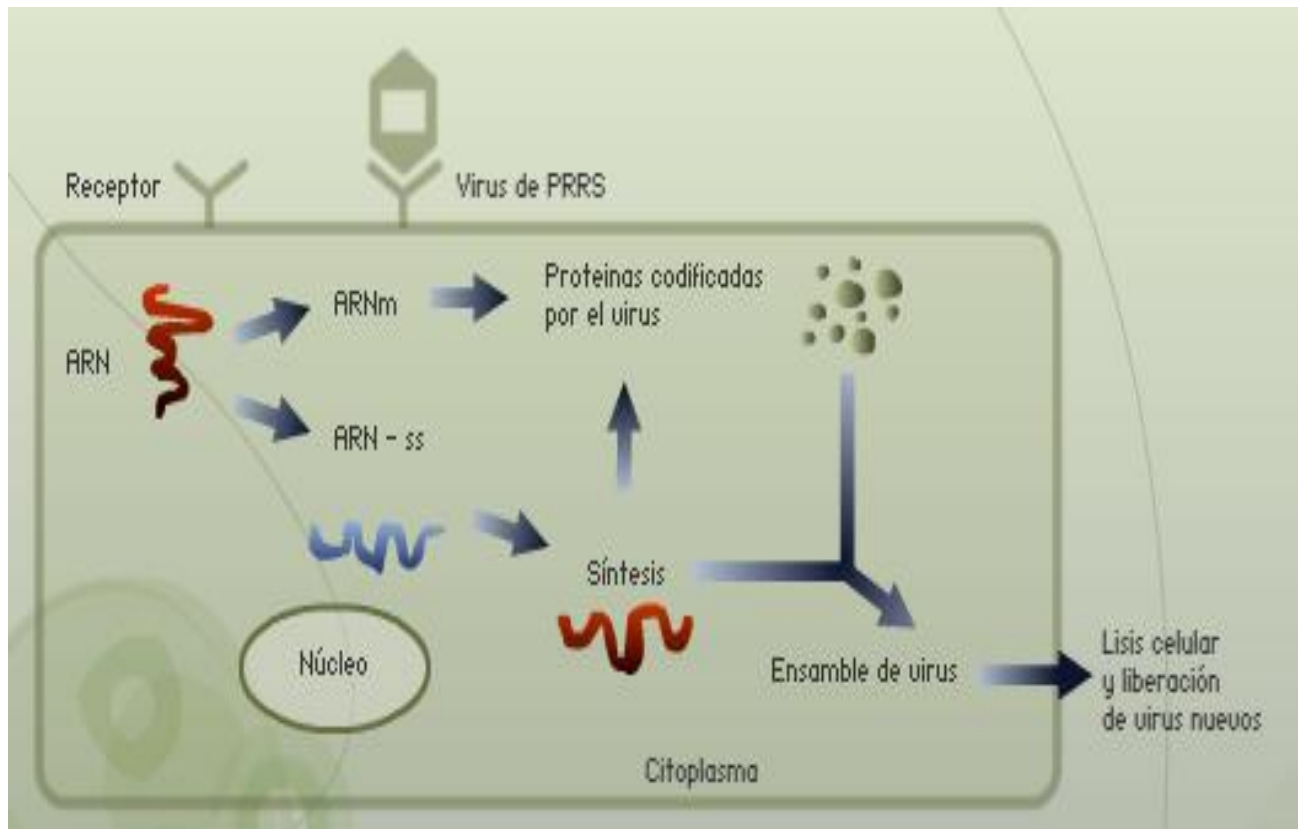


Imagen No. 5. Mecanismo de replicación viral del VPRRS (Boehringer Ingelheim Vetmedica, México 2012)

Durante la replicación viral, según se ha observado en las células infectadas, se produce la formación de 6 ARNs mensajeros subgenómicos que contienen en su extremo 3' una cola de adeninas y en el extremo 5' una secuencia líder idéntica para todos ellos que deriva del extremo 5' del genoma del virus y que se une a las zonas 3' mediante un sitio de unión que precede a cada ORF el cual contiene la secuencia AACC (Conzelman *et al.*, 1993; Meulenberg *et al.*, 1993b; Meng *et al.*, 1994). En un estudio reciente se ha puesto de manifiesto que los ARNs mensajeros subgenómicos son polimórficos y que el número (6 ó 7) y el tamaño exacto de los mismos depende del aislado que se estudie (Meng *et al.*, 1994).

Estos ARNs mensajeros expresan las proteínas codificadas por las ORFs del genoma. De ellas las más estudiadas son las proteínas E, My N. La primera sufre una disminución de PM durante su maduración debido a la pérdida de hidratos de carbono ricos en manosa. Esto sucede en el retículo endoplasmático, donde también sufre un proceso de glicosilación y plegamiento, el cual es necesario para su transporte al aparato de Golgi. La pérdida de hidratos de carbono continúa en la cisterna proximal del aparato de Golgi. La proteína M y la proteína N no sufren cambios de PM durante su maduración. Se ha observado que la incorporación de la proteína M y la proteína E al virión es en forma de heterodímeros unidos por puentes disulfuro. Sin embargo, la proteína E se incorpora de forma más eficiente a estos complejos que la proteína M, la cual lo hace más lentamente. Este fenómeno se podría explicar por el hecho de que la proteína M tiende a formar dímeros unidos por puentes disulfuros en las células durante la replicación viral, mientras que no se presenta de esta forma en las partículas virales, por lo cual se tiene que producir una disociación de estos dímeros para que se pueda ensamblar con la proteína E. Parece ser que la interacción entre estas dos proteínas precede al ensamblaje del virus, aunque no está confirmado. Es probable que el ensamblaje del virus empiece en el retículo endoplasmático, donde están las proteínas E y M unidas por puentes disulfuro. Posteriormente estos dímeros interaccionan con la proteína N que permanece en el citosol, fundamentalmente en la región perinuclear. Las vesículas que contienen la nucleocápside se han observado en el retículo endoplasmático liso a las 6 hpi y desde aquí son transportadas al aparato de Golgi.

A las 9 hpi ya se observan partículas virales en la luz del retículo endoplasmático liso y en la región de Golgi, liberándose la primera progenie del virus por exocitosis entre las 9 y las 12 hpi (Pol *et al.*, 1992). Al final del tránsito del retículo endoplasmático al aparato de Golgi la proteína E adquiere su estructura madura (Mardassi *et al.*, 1996). La replicación del virus se limita al citoplasma (Pol *et al.*, 1992).

La replicación del virus de PRRS ha sido establecido en algunas líneas celulares, incluyendo la línea celular de riñón de mono verde africano, MARC-145 y la CRL11171 que son utilizadas para la propagación del virus “*in vitro*” (Collins *et al.*, 1992).

1.10 TRANSMISIÓN

Los verracos infectados con VPRRS pueden eliminar el virus a través del semen durante intervalos prolongados (Prieto and Castro, 2005). Las granjas afectadas permanecen infectadas durante largo tiempo. Esta persistencia de la enfermedad se consigue a través de varios mecanismos como son la eliminación de virus por animales aislados, viremia persistente o aislada, introducción continua de cerdos de reposición susceptibles, replicación del virus en animales destetados susceptibles (Sánchez-Vizcaíno *et al.*, 2000).

Experimentalmente Hermann *et al.*, (2005) evaluaron mediante curvas de dosis-respuesta varias vías de exposición al virus. La dosis infectiva para la vía oral fue superior que para la intranasal (dosis infectiva de cultivo celular $10^{5.3}$, versus $10^{4.0}$ respectivamente). Se requieren cantidades bajas de virus para producir la infección en cerdos, lo cual nos indica que es altamente infeccioso, de hecho se ha logrado infectar animales inoculándolos con 10 viriones por vía intranasal o intramuscular. Sin embargo, se requieren de 1.000 a 100.000 partículas virales para conseguir la infección a través de cualquier otra mucosa (ocular, vaginal u oral). Dependiendo de su localización anatómica específica (Cafruny y Honiven, 1988) son susceptibles al virus por un gran número de vías incluyendo la vía intranasal, oral, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, y vaginal; siendo diferente la dosis infectante mínima en cada una.

El método primario de transmisión del virus es a través del contacto directo animal-animal por secreción oro-nasal.

El VPRRS tiene la habilidad de transmitirse rápidamente dentro de las poblaciones y entre poblaciones, lo que explica su rápida distribución mundial. El virus se difunde rápidamente dentro de una granja ya que la principal ruta de transmisión de VPRRS es por contacto directo entre cerdos enfermos y sanos (Albina, 1997), aunque el movimiento de cerdos entre granjas, los aerosoles y los fomites juegan también un papel importante en la transmisión horizontal de la enfermedad (De Jong *et al.*, 1991; Le Potier *et al.*, 1995; Albina, 1997; Torremorell *et al.*, 1997; Lager and Mengeling, 2000; Kristensen *et al.*, 2002; Otake *et al.*, 2002).

Los cerdos pueden transmitir la enfermedad por contacto hasta 14 semanas después de la inoculación. El virus se puede eliminar por distintas vías, siendo posible aislarlo de las fosas

nasales, saliva, orina y secreciones prepuciales, leche y el calostro. (Prieto y Castro, 1998^a; Robertson, 1992; Swenson *et al.*, 1994). También existen evidencias de que el virus puede diseminarse por medio de inseminación artificial, cuando se usa semen obtenido en la fase aguda de la infección. (Swenson *et al.*, 1994; Prieto *et al.*, 1996; Prieto *et al.*, 1997). El virus puede ser secretado en el semen desde la segunda semana hasta 43-92 días pi (Mortensen *et al.*, 2002). Las diferencias que se observan en la calidad del semen colectado de verracos después de la infección experimental, es un deterioro significativo en la motilidad espermática y en la normalidad de los acrosomas (Bouma, 2000).

1.10.1 Transmisión vertical. Otra forma importante de transmisión, es la vertical, definida como la transmisión de una generación a otra a través de la infección embrional o fetal *in útero*. Si la hembra se encuentra en el último tercio de la gestación el virus es capaz de atravesar la barrera placentaria e infectar a los fetos en el útero, lo que da lugar a la aparición de lechones virémicos y presentar anticuerpos frente al virus o ambas cosas, al nacimiento. Se considera que la infección de las cerdas cerca de la concepción puede provocar la infección transplacentaria de los lechones. En el caso de una infección *in útero*, los lechones pueden morir durante la gestación, dando lugar a nacidos muertos o a fetos momificados, nacer débiles o incluso no presentar ningún tipo de sintomatología, lo que da lugar al nacimiento de animales aparentemente sanos pero persistentemente infectados (Albina *et al.*, 1994; Wills *et al.*, 1995).

Posiblemente los embriones pueden infectarse durante las fases tempranas de la gestación, sin embargo los cuadros clínicos más graves han sido descritos cuando la infección ocurre en el último tercio (Terpstra *et al.*, 1991; Chistianson *et al.*, 1992; Mengeling *et al.*, 1994; Lager *et al.*, 1996; Prieto *et al.*, 1996 y 1997).

1.10.2 Transmisión horizontal. La transmisión directa incluye la transferencia de un agente infeccioso por contacto físico o por contacto con material contaminado de un animal infectado.

La forma más común de transmisión del virus ocurre por la transmisión directa, es decir por el contacto entre animales (nariz con nariz) o por la exposición a fluidos corporales contaminados (semen, sangre, o incluso secreciones mamarias) (Riveroll, 2013).

Por tanto, las prácticas realizadas en la manipulación habitual de los cerdos en la granja, cortado de orejas, cortes de colas y colmillos o la inoculación de medicamentos, así como las mordeduras y otras lesiones provocadas por la interacción entre cerdos, facilitaría la entrada del virus al comprometer todas estas situaciones la integridad de la piel. En consecuencia, la transmisión entre cerdos suele ocurrir por contacto directo entre animal infectado y animal susceptible (Díaz, 2006).

1.10.3. Transmisión indirecta (fomites, aerosoles). La transmisión indirecta significa que es a través de un vehículo intermediario incluidos objetos inanimados o sustancias (agua, comida), o aerosoles. Los fomites pueden transmitir el virus a cerdos susceptibles; sin embargo el lavado y desinfección de estos implementos así como el lavado de manos y cuerpo disminuyen la diseminación del virus (Henry *et al.*, 2002).

Concretamente las botas y manos han sido identificadas como fuentes potenciales de VPRRS en cerdos no infectados. El riesgo de transmisión a través de estas vías puede reducirse mediante el uso de protocolos como el cambio de botas y ropa, la limpieza de manos, las duchas y un periodo entre contactos con cerdos de 12 h (Dee, 2006).

El papel de los fomites en la transmisión del virus ha sido descrito y pueden ser potenciales transmisores de la enfermedad. Debido a la tendencia del VPRRS a circular y replicarse en la circulación sanguínea, las agujas para inyecciones han sido también reconocidas como medios indirectos de transmisión del VPRRS entre cerdos (Dee, 2006). Otake *et al.*, (2004) demostraron que el uso de agujas de inyección sin cambio y contaminadas con sangre pueden ser de las principales fuentes de infección y transmitir eficientemente el virus de PRRS (Riveroll, 2013).

Los vehículos de transporte de animales, han sido investigados recientemente como vías potenciales en la transmisión mecánica del VPRRS, también podrían actuar como una fuente importante (Dee *et al.*, 2002, 2003, 2005; Dee 2006).

No se ha demostrado que se transmita al humano por vectores artrópodos; también, no se ha conseguido reproducir la enfermedad en ratones o ratas, por lo que no parecen actuar como

reservorios de la misma; sin embargo ha aislado el virus de heces de patos migratorios expuestos al virus en el agua de bebida. (Benfield *et al.*, 1999; Zimmerman *et al.*, 1997).

1.11 PATOGENIA

El virus causa una infección persistente en los animales infectados. Los animales aparentemente sanos, recuperados clínicamente de la infección pueden todavía mantener infecciones de tipo subclínico durante varios meses, actuando como fuente de infección para otros animales sanos. Estos animales portadores del virus juegan un papel muy importante en el control de la enfermedad (Sánchez-Vizcaíno *et al.*, 2000).

Se considera, que una de las vías de entrada más importantes de este virus es la oro-nasal, ya que penetra por vía de las mucosas a través del epitelio nasal y oral.

El lugar primario de replicación del virus se limita solamente a células pertenecientes al linaje monocito/macrófagos en el organismo de cerdos infectados, y como es de esperar el pulmón es un sitio predominante de la replicación viral (Ramírez, 2005), para luego ser transportado de forma intracelular o libre a través de la linfa, hasta los linfonodos regionales, donde puede replicar en macrófagos residentes (sito de replicación secundaria). Tras la infección de éstos, el virus puede distribuirse a través de la sangre, asociados con los leucocitos o los monocitos y replicar en distintas poblaciones de monocitos o macrófagos, diseminándose por todo el organismo (Rossow *et al.*, 1995; Rossow *et al.*, 1996; Rossow *et al.*, 1998).

El virus es inmunosupresor debido a su predilección por las células mieloides, estas células son extremadamente importantes en un gran número de respuestas inmunológicas y además causan la muerte de los macrófagos alveolares pulmonares (MAPs). El efecto del VPRRS causa una baja respuesta protectora del animal infectado, por lo que aumentan los problemas respiratorios y/o fallas reproductivas que se presentan en granjas (Done, 1995).

Los MAPs, juegan un papel muy importante tanto en la respuesta inmune innata como en la adquirida, ya que llevan a cabo una serie de funciones que incluyen: fagocitosis, inactivación de microorganismos, búsqueda de sitios en los que hay un daño tisular, procesamiento y presentación de antígenos a los linfocitos y producción de citoquinas.

Se ha descrito una destrucción masiva de MAPs que se produce en la primera semana pi, que puede oscilar entre el 50% y el 65%, disminuyendo su número considerablemente y por lo tanto disminuyendo también su función (Molitor *et al.*, 1992; Zhou *et al.*, 1992; Molitor, 1993; Barranco, 2011) evitando que se produzca una efectiva respuesta inmune respiratoria.

La destrucción de MAPs se acompaña de una disfunción de los mismos, consistente en una alteración en su capacidad de liberación del ión superóxido y una supresión del NADPH en los macrófagos infectados, reducción en la cantidad de los macrófagos alveolares a los 7 días después de adquirir la infección, cambios de corta duración en la sangre circulante en relación a la disminución en los linfocitos, monocitos y neutrófilos sanguíneos hasta por 4 días después de la infección. (Done, 1995).

En el recuadro A se muestra un MAP normal que aún no ha sido afectado por el virus y sigue viable antes de la infección, contrario del recuadro B en el cual se observa un MAP que ya tuvo contacto con el virus 48 horas pi y se encuentra dañado en estructura y función (Imagen No. 6)

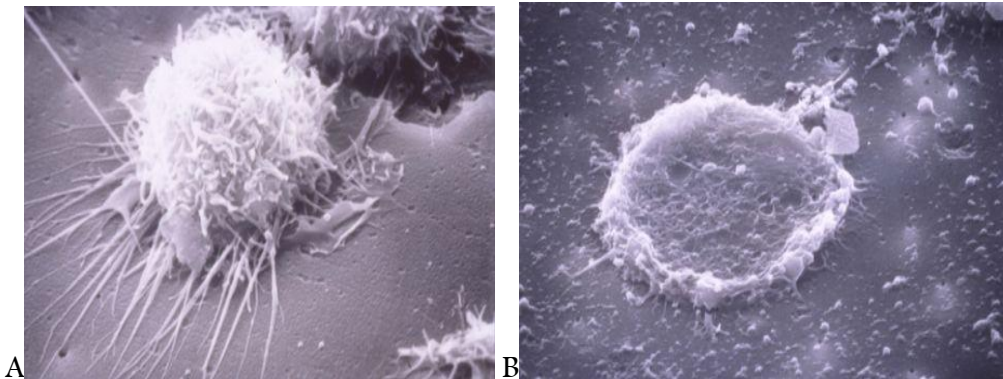


Imagen No. 6. A. MAP normal, B. MAP 48 hrs. pi (Bavera., 2006)

El virus infecta naturalmente a cerdos de todas las edades, replicando en el citoplasma de células del sistema mononuclear fagocítico y en los monocitos y macrófagos porcinos que es en donde origina un efecto citopático.

Los viriones maduros son liberados, de la célula infectada, por exocitosis a partir de las 9-12 horas de la infección celular (Sánchez-Vizcaíno *et al.*, 2000) el estado de viremia se inicia después de ese tiempo, detectándose hasta 2-4 semanas post-infección en animales adultos y

hasta 3 meses en los lechones (Benfield *et al.*, 1997; Van der Linden *et al.*, 2003; Zimmerman *et al.*, 2003b).

La duración de la viremia depende de varios factores tales como la edad del cerdo, en el momento de la infección, y la dosis infectante; la viremia puede durar de 2 a 3 semanas postinfección llegando a ser de 6 a 7 semanas.

En los animales jóvenes puede durar más de un mes, pudiendo llegar el virus a distintos órganos, como corazón, hígado, riñones, cerebro, pulmón, nódulos linfáticos peribronquiales, timo, médula ósea y especialmente bazo, en cuyos macrófagos se replica activamente (Van Reeth, 1997). En las hembras gestantes atraviesa la barrera placentaria e infecta a los fetos, provocando aborto al final de la gestación o nacimientos de lechones débiles o muertos. En los machos el virus puede eliminarse por semen, afectando la cantidad y la calidad del eyaculado (Done *et al.*, 1995).

1.12 FORMAS CLÍNICAS

Se han descrito tres formas clínicas de la enfermedad.

Forma epidémica, aguda o reproductiva. En granjas libres de PRRS todas las hembras pueden llegar a infectarse y sufrir una viremia de unas 3 semanas de duración. Si la hembra se encuentra en el último tercio de la gestación, el virus atraviesa la barrera placentaria y produce el nacimiento de fetos momificados, lechones muertos o débiles junto con animales normales.

Forma endémica, respiratoria o crónica. Aparece cuando la granja se ha recuperado de la forma aguda. Con frecuencia los problemas se detectan en las áreas de destete y engorda, ya sea en sistemas de flujo continuo o sistemas de sitios múltiples.

Los lechones sufrirán un periodo de viremia de 6-8 semanas, excretan durante largo tiempo el virus, infectando a los lechones o cerdos que recién ingresan a las diferentes áreas de producción; momento en el cual pierden la protección materna con que contaban.

Por lo tanto, es frecuente observar signos respiratorios, edema en párpados y aumento de tamaño generalizado de los ganglios linfáticos. Las lesiones presentes son comunes a las observadas para otras neumonías de origen viral. Es común que los cerdos virémicos sufran

infecciones bacterianas secundarias que agravan los síntomas, complicando así el diagnóstico clínico y morfológico.

Forma subclínica. Se trata de granjas que presentan serología positiva al PRRS sin haberse detectado ninguna de las formas anteriores. Puede relacionarse con la infección de cepas de baja patogenicidad, en granjas con excelentes prácticas de manejo o a la inexistencia de cerdas en gestación avanzada, de tal forma que el brote pasa desapercibido (Boehringer Ingelheim Vetmedica 2014).

1.12.1 Signos clínicos

Los signos clínicos de la enfermedad son muy variables. Dependen básicamente del nivel de inmunidad de la granja, la cepa del virus y los factores de manejo reproductivo, incluyendo diferencias en la susceptibilidad de la piara, los factores ambientales; así como su combinación con otros virus que afecten a los cerdos (Done, 1995).

Los dos grupos principales de signos clínicos que son asociados con la presencia de PRRS son el reproductivo y el respiratorio (White, 1991). El primero, incluye nacimientos prematuros, abortos de periodos retrasados, cerdos que nacen débiles y aumenta el número de lechones muertos en los nacimientos y momificados (Terpstra *et al.*, 1991; Chirstianson *et al.*, 1992; Rossow, 1998)

En el segundo, las afecciones respiratorias, tienen gran importancia; sobre todo en cerdos neonatales, en los que existe disnea como mayor característica, es usualmente que ocurra en cerdos de 3 semanas de edad pero, también puede ocurrir en cualquier edad, hiperapnea, edema periocular, conjuntivitis y aumento de tamaño de los linfonodos (Collins *et al.*, 1992; Rossow *et al.*, 1995; Done y Paton, 1995).

Lechones. Durante la fase de 1-4 meses de contratiempos reproductivos se observa elevada mortalidad 10-60%, presentan disnea, quemosis grave que se refiere a hinchazón característica de párpados y conjuntiva ocular (lesión patognomónica de PRRS cuando aparece en lechones de < 3 semanas). Apatía, emaciación, diarrea constante que no responde a los tratamientos. Ocasionalmente: temblores, abombamiento de la frente, trombocitopenia causando hemorragia en el ombligo. Aumento de infecciones por bacterias secundarias.

poliartritis, epidermitis exudativa (Sánchez-Vizcaíno *et al.*, 2000), capa de pelo áspera, baja tasa de crecimiento, conjuntivitis, edema periorbital, temblores de músculos, que se pueden observar en ocasiones cuando están parados, se observan como estatuas o extienden las piernas e incluso muestran parálisis posterior, antes del inicio de la debilidad. El sangrado del ombligo puede también ser una característica y puede haber sangrado severo después del corte de cola. (Done S., 1995).

Presentación respiratoria en lechones. En los lechones la forma respiratoria se presenta y es más difícil de valorar clínicamente, ya que el cuadro, aunque puede ser grave es bastante inespecífico. Los animales presentan tos y disnea, acompañada de fiebre y pérdida de apetito, lo que conlleva a una reducción en el crecimiento. La mortalidad es elevada en cerdos de engorde, de entre las 4 y 10 semanas de edad, y en cerdos neonatales puede ser del 100% (Rossow, 1998). (Imagen No. 7)

A



B



Imagen No. 7. A. Lechones momificados a causa de VPRRS B. Lechones nacidos muertos con PRRS (2000 - 2014. 5m Publishing)

En la Imagen No. 7, recuadro A, se muestra un lechón que está en estado de momificación, debido a la infección del VPRRS, y en el recuadro B, se muestran lechones que nacieron muertos, por causa de la infección con el virus, en ambos casos se debió a una transmisión vertical.

Cerdos destetados y en crecimiento. En cerdos destetados y en crecimiento, se ha observado fiebre, neumonía, defectos en el desarrollo y un incremento en la mortalidad por infecciones bacterianas simultáneas. Las infecciones subclínicas son más comunes en cerdos en fase de acabado, verracos y cerdas de reposición.

Frecuentemente se complica con Enfermedad de Glasser, meningitis estreptocócica, epidermitis exudativa, rinitis atrófica, colibacilosis posdestete, poliartritis, sarna y salmonelosis (Sánchez-Vizcaino *et al.*, 2000).

Animales adultos. Los signos clínicos que se observan con más frecuencia en los animales adultos incluyen anorexia transitoria, fiebre moderada y letargia (Keffaber, 1989; Loula, 1991), sufren pérdida de la libido en los machos y se producen alteraciones importantes en la calidad seminal (Prieto *et al.*, 1996).

Cerdas gestantes. En las cerdas gestantes se ha observado durante la primera fase: anorexia, fiebre, agalactia, incoordinación, abortos. Y en la segunda fase como, consecuencia de la transmisión transplacentaria del virus, el 5-80% de las cerdas pueden presentar contratiempos reproductivos entre los 100-118 días de gestación, aparecen las fallas reproductivas, incrementos en el tiempo de retorno al celo, descenso en la intensidad de los celos, abortos tempranos, partos prematuros, muertes de las cerdas en periodos alrededor del parto (1-4%) (keffaber, 1989; Loula T., 1991).

Ocasionalmente muestran cianosis en orejas, vulva y cola (Imagen No. 8A) (Done, 1995). Los problemas reproductivos, se manifiestan en abortos, mortinatos y un aumento en el número de lechones débiles.

Las cerdas infectadas en el segundo tercio de la gestación, generalmente presentan abortos, momias e infertilidad generalizada (Imagen No. 8 B); que pueden durar de 2 a 3 meses (Albina *et al.*, 1992), afectando algunos parámetros como porcentaje de fecundación, número de lechones vivos al nacimiento y mortalidad antes del destete (Méndez, 1996).

En los verracos, la infección puede provocar un descenso de la libido durante una semana (Hopper *et al.*, 1992; Feitsma *et al.*, 1992). Se han descrito alteraciones en la calidad del semen, como descenso en la motilidad de los espermatozoides y del porcentaje de espermatozoides con

el acrosoma normal e incremento de las anomalías morfológicas (De Jong *et al* 1991; Prieto *et al.*, 1996).

A



B



Imagen No. 8 Cianosis en orejas

Lechones en proceso de momificación

(Universo Porcino 2005)

1.12.2 Lesiones macroscópicas

En la mayoría de las infecciones por el VPRRS no complicadas con otros agentes, no se observan lesiones macroscópicas significativas.

Algunos autores han citado la presencia de edema subcutáneo (anasarca), exceso de exudado abdominal sanguinolento, pleuritis, riñones congestivos, y ocasionalmente hemorragia del miocardio, con engrosamiento y moteado blanco del corazón (Hoeffling, 1990). También se han reseñado lesiones en pulmón con consolidación moderada, particularmente en los lóbulos craneales, y a veces presencia de fluido pericárdico o torácico, con frecuente enmascaramiento de las mismas por infecciones secundarias (Done S., *et al.*, 1992).

En infecciones experimentales realizadas con una cepa española, en cerdos de 2 meses de edad, se encontraron múltiples focos de consolidación en pulmón, ganglios linfáticos mandibulares congestivos, así como ligeras hemorragias en la serosa del intestino delgado. En animales nacidos de madres infectadas, y sacrificados a los 8 o 12 días de edad se observaron focos pequeños de consolidación de color grisáceo (Plana *et al.*, 1992).

La presencia de áreas de consolidación en pulmón también es notificada por diversos autores en lóbulos contiguos, más pronunciadas en las caras ventrales de los lóbulos medios y accesorios, parte craneal del lóbulo caudal y a veces el apical (Ramos *et al.*, 1992).

1.12.3 Lesiones microscópicas

A nivel microscópico se han señalado lesiones en el aparato respiratorio, cerebro y aparato circulatorio principalmente (Hoeffling, 1990).

Aparato respiratorio. En el epitelio nasal se ha señalado metaplasia, degeneración de las células epiteliales de la mucosa nasal con pérdida del epitelio ciliado y degeneración hidrópica de las células epiteliales (Collins *et al.*, 1992). En pulmón, se observa la lesión más consistentemente asociada a la infección por VPRRS; la presencia de una neumonía intersticial con engrosamiento del septo alveolar de células mononucleares (monocitos, células plasmáticas, linfocitos y neutrófilos) (Hoeffling, 1990; Pol *et al.*, 1991; Ramos *et al.*, 1992; Collins *et al.*, 1992). Se pueden observar abundantes células degeneradas y necróticas en el infiltrado intersticial, así como hiperplasia de neumocitos tipo II (Ramos *et al.*, 1992). En mucosa nasal y tejido pulmonar se observan abundantes células epiteliales con elevada vacuolización del citoplasma (Pol *et al.*, 1991).

Aparato circulatorio. En el sistema vascular aparece una marcada hinchazón de las células endoteliales de capilares y venas pequeñas con alteración de la integridad endotelial y disfunción de las proteínas plasmáticas en la capa subendotelial. Secundariamente se produce la adhesión al endotelio de fibrina, plaquetas y células rojas. También se dan pequeños trombos celulares unidos a la pared de las venas pulmonares, que pueden causar una completa oclusión del lumen provocando una pronunciada congestión del lóbulo pulmonar correspondiente. Los macrófagos aparecen aumentados de tamaño, hinchados y la pared celular de los vasos sanguíneos dañados (Goovaerts *et al.*, 1992). Esta lesión de daño endotelial seguido de depósitos de fibrina y plaquetas y trombosis vascular, pudiera ser de interés en la aparición de determinados signos clínicos como cianosis de vulva, extremidades y orejas.

1.13 INTERACCIÓN CON OTROS PATÓGENOS RESPIRATORIOS

Como se conoce el virus en los cerdos de engorda suele afectar el tracto respiratorio y al sistema inmune. El virus se replica en los macrófagos pulmonares y en varias células del sistema linfóide. Cuando los pulmones y el sistema inmunitario están afectados por el virus, los cerdos son más susceptibles a otros patógenos respiratorios y septicémicos. Por lo que generalmente se podrían encontrar otros patógenos involucrados en un brote, y como lo menciona Opriessnig, 2013, directamente relacionados al complejo respiratorio porcino (PRDC) mencionando que puede haber coinfecciones.

El término PRDC se suele utilizar para describir la interacción de varios agentes patógenos (tanto virales como bacterianos), factores ambientales, sistema de producción, calidad del manejo y factores específicos del cerdo (genética, edad, estatus inmunológico). El VPRRS se considera un patógeno principal, y quizá el más importante, del PRDC.

De acuerdo a lo anterior el VPRRS presenta coinfecciones por virus en el sistema respiratorio, las cuales son:

Coronavirus respiratorio porcino (PRC). El cual se replica principalmente en el epitelio del tracto respiratorio inferior y los cerdos coinfectados por PRC y VPRRS presentan una patología respiratoria más severa y más lesiones pulmonares.

Virus de Aujeszky . Que replica en los macrófagos alveolares y en los monocitos y a menudo se relaciona con rinitis necrotizante y traqueítis. En cerdos infectados simultáneamente por Aujeszky y PRRS se observó un aumento de la gravedad y de la duración de la enfermedad respiratoria.

Circovirus porcino tipo 2 (PCV2). La concurrencia de infecciones por VPRRS y PCV2 se produce con frecuencia en condiciones de campo y es bien sabido que potencia la enfermedad respiratoria y la gravedad de las lesiones pulmonares y linfoides

Los estudios realizados han mostrado, también una asociación con las siguientes bacterias en el sistema respiratorio

Streptococcus suis. Esta bacteria puede alcanzar los pulmones desde las vías respiratorias altas o a través de una septicemia. Los pulmones afectados a menudo están cubiertos por fibrina. En condiciones experimentales, la infección por VPRRS aumenta la susceptibilidad de los cerdos a *Streptococcus suis* y los investigadores han demostrado que el VPRRS daña los macrófagos pulmonares intravasculares que son importantes para la eliminación de la bacteria del torrente sanguíneo.

Bordetella bronchiseptica. Macroscópicamente se aprecian zonas consolidadas bien delimitadas de color rojo oscuro o púrpura con una pleuritis leve que puede detectarse especialmente en las porciones craneales y ventrales del pulmón. En cerdos coinfectados con VPRRS experimentalmente se ha observado una exacerbación de la enfermedad.

Mycoplasma hyopneumoniae. La infección causa pérdida de cilios, muerte de células epiteliales y reducción de la función del aparato mucociliar. Se ha mostrado una clara relación entre *M. hyopneumoniae* y VPRRS y se suele asumir que la infección por VPRRS, la carga viral y las lesiones son potenciadas por esta bacteria.

Actinobacillus pleuropneumoniae (APP). Los pulmones afectados tienen diversos grados de consolidación de color rojo oscuro-violeta con fibrina en la superficie pleural. Las evidencias de campo sugieren que los brotes de APP son más graves y frecuentes en las granjas infectadas por VPRRS.

Las evidencias de los estudios experimentales en cerdos infectados únicamente por VPRRS sugieren que por sí mismo puede inducir una patología respiratoria leve o grave pero que raramente conlleva mortalidad. La morbilidad es más severa y se produce mortalidad cuando es concomitante con otras infecciones. (Opriessnig, 2013).

1.14 INMUNOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD

Los responsables de las principales respuestas de defensa frente a los microorganismos y sus antígenos son los sistemas inmunes innato y adquirido, que utilizan mecanismos para controlar la invasión de agentes ajenos, ambos interactúan muy estrechamente.

1.14.1 Respuesta innata frente al VPRRS

Esta respuesta innata constituye la barrera primaria frente a una infección, es inmediata y el nivel de respuesta que presenta no aumenta frente a una re-infección, y aunque carece de especificidad, para reconocer a los antígenos, es de vital importancia para el segundo sistema, creando un ambiente adecuado y que estimula y facilita la funcionalidad de las células que participaran.

Al presentarse la infección por VPRRS la respuesta innata es débil, en cuanto a la liberación de citoquinas (Van Reeth *et al.*, 1999, 2002; Royae *et al.*, 2004) y de la acción citotóxica de las células NK (Samson *et al.*, 2000; Lamontagne *et al.*, 2003).

1.14.2 Respuesta humoral

Tras la infección por el VPRRS, la respuesta humoral aparece aproximadamente 5-7 días pi, los anticuerpos pueden observarse ya en los primeros 10-14 días pi. Estos anticuerpos se encuentran dirigidos a las proteínas N y M del virus pero no tienen la capacidad de neutralizar al virus, por lo tanto no colaboran para la eliminación del VPRRS ni en la protección frente a infecciones (Muelenberg *et al.*, 1993; Magar *et al.*, 1997; Cancel-Tirado *et al.*, 2004). De hecho en un estudio Yoon *et al.*, (1996) hablan de la posibilidad de que la presencia de estos anticuerpos no neutralizantes puede ser contraproducente pues hablan de que la unión de los complejos Ag-Ac con el receptor Fc del macrófago permitiría la entrada del virus a modo de caballo de Troya (Choi *et al.*, 1992; Christianson *et al.*, 1993; Díaz, 2006).

Los anticuerpos neutralizantes (AN) aparecen a partir de las 4 semanas pi, se mantienen durante meses, pero a niveles bajos. El epitopo de neutralización se encuentra en la GP5 (Pirzadeh and Dea, 1998; Wissink *et al.*, 2003) y también están dirigidos hacia la GP4 y la proteína M (Weiland *et al.*, 1999; Bastos *et al.*, 2004).

Los AN juegan un papel preponderante en la protección frente al VPRRS. Estudios *in vitro* han demostrado que dichos anticuerpos son capaces de bloquear la infección o disminuir el título viral en cultivos de MAPs (Delputte *et al.*, 2004).

1.14.3 Respuesta celular

La respuesta inmune de base celular tras la infección por el VPRRS se caracteriza por periodos de leucopenia y linfopenia, después de esta fase existe un desequilibrio en los porcentajes de las poblaciones de linfocitos circulantes y una respuesta linfoproliferativa que comienza alrededor de la cuarta semana pi, (Christianson *et al.*, 1993; Nielsen y Botner, 1997; Díaz, 2006).

La respuesta celular está regulada por diferentes subtipos de linfocitos que dan lugar a la producción de IFN- γ a partir de la tercera semana pi, que en estudios *in vitro* demostró que inhibió la replicación viral y disminuyó el número de macrófagos que permitían la replicación y protegería frente a la falla reproductiva y la mortalidad fetal en reproductoras y frente a la infección en lechones, sin embargo se ha demostrado que también la respuesta del IFN- γ es baja e insuficiente. (Trinchieri, 1995; Bautista y Molitor, 1997; López Fuertes *et al.*, 1999; Meier *et al.*, 2003; Lowe *et al.*, 2005; Díaz *et al.*, 2006; Bautista y Molitor, 1999; Rowland *et al.*, 2001).

En el cerdo, las tonsilas del paladar blando comprenden la mayor parte del tejido tonsilar (Trautmann and Fiebiger, 1957). Histológicamente, las tonsilas son tejidos linfoepiteliales compuestos por criptas, linfoepitelio, folículos linfoides, regiones parafoliculares, tejido conectivo, células linfoides (linfocitos T y B), células dendríticas y macrófagos. Todos estos componentes proporcionan al cerdo, inmunidad innata, celular y humoral tanto a nivel local como a nivel sistémico.

Tanto la localización física de la tonsila como su organización histológica, hace que este tejido juegue un papel importante en la respuesta inmune del hospedador. A pesar de esto, hay microorganismos capaces de evadir las defensas inmunológicas y utilizar las tonsilas como una puerta de entrada en el organismo, un sitio de replicación primaria e incluso un lugar de persistencia.

En tonsila se ha descrito la persistencia del VPRRS hasta los 151 dpi (Wills *et al.*, 2003), jugando este órgano un papel fundamental como barrera primaria en la replicación y diseminación del virus (Albina *et al.*, 1994; Wills *et al.*, 1997; Allende *et al.*, 2000; Lamontagne *et al.*, 2001; Horter *et al.*, 2002).

Evidentemente la interacción del virus y la respuesta inmune del hospedador es muy compleja, ya que hay evidencia de que los dos sistemas inmunitarios no son realmente efectivos porque la infección puede tanto inducir la activación como la subversión de la respuesta inmune (Murtaugh *et al.*, 2002) y esta inmunosupresión inducida por el virus no solo es capaz de prolongar la persistencia sino también incrementar la posibilidad y gravedad de otras infecciones secundarias (Mateu and Diaz, 2008).

Como se ha observado, la inmunología no es verdaderamente eficaz frente a esta enfermedad, ya que intervienen diversos factores como lo son animales con viremias largas, infecciones persistentes que no permiten eliminarlo de la circulación, y sobre todo la ineficacia parcial o total frente a re-infecciones heterólogas (van Woensel *et al.*, 1998; Meng, 2000), lo que es una consecuencia de su diversidad genética, ya que aunque hayan desarrollado una protección casi completa para re-infecciones homólogas, esta protección es parcial o inexistente frente a re-infecciones heterólogas.

En un estudio mencionan que tanto la severidad de la infección como la intensidad de la respuesta inmune son menores en las infecciones por VPRRS tipo 1 que en las de tipo 2. Como consecuencia, la inmunidad contra reinfecciones es más difícil de estudiar en los modelos de infección por tipo 1 ya que la enfermedad puede ser más difícil de demostrar al poder producirse una infección asintomática. A causa de este problema la mayoría de las investigaciones sobre inmunidad y vacunaciones se centran en el tipo 2, en el que la enfermedad clínica puede reproducirse y demostrarse tanto en los modelos respiratorios como en los reproductivos. Esta limitación es relevante ya que el tipo 1 es el que predomina en Europa, mientras que en Asia y Norteamérica es más frecuente el tipo 2 (Murtaugh, 2013).

1.15 PROFILAXIS Y MEDIDAS PREVENTIVAS

El principal objetivo es continuar manteniendo la explotación libre, el origen primario en la transmisión de la enfermedad es el cerdo infectado, por ello es esencial realizar las medidas de prevención adecuadas (Sánchez-Vizcaino *et al.*, 2000).

A lo largo del tiempo se han desarrollado numerosas medidas de control y prevención frente al VPRRS, debido a su extensión y a su repercusión económica en las principales áreas productivas de porcino de todo el mundo. A pesar de los esfuerzos realizados, las medidas

higienicosanitarias no han conseguido por sí solas prevenir la infección por parte del VSRRP, especialmente en zonas con una gran prevalencia de la enfermedad, con elevadas densidades de animales y con condiciones atmosféricas favorables para la diseminación del virus.

Además, las infecciones persistentes características del VPRRS facilitan la circulación del virus en las explotaciones infectadas (Martínez, 2010).

Para evitar la entrada del virus en una granja, hay que extremar las precauciones, respetando los periodos de cuarentena, restringiendo el acceso de visitantes a la granja, imponiendo un lavado de manos, un cambio de ropa obligatorio a la entrada de las instalaciones y evitando la entrada de vehículos dentro del perímetro de las mismas así como también lavarlos y desinfectarlos después de realizar el transporte de los animales, no introducir animales, y si así fuera es recomendable introducir animales procedentes de una explotación negativa, en caso de que los animales fueran positivos, todos deben ser retirados. (Prieto, 1997; Sánchez-Vizcaíno *et al.*, 2000)

1.16 VACUNAS

El fracaso de dichas medidas ha dirigido los esfuerzos en la prevención y el control de la enfermedad hacia la profilaxis médica, intentando obtener productos vacunales seguros y eficaces (Martínez, 2010).

El gran impacto económico en la producción porcina y su rápida expansión, por todos los países productores, generó desde el inicio un elevado interés en la producción de vacunas que controlaran la enfermedad.

Hasta ahora hay dos tipos de vacunas que se comercializan: inactivadas o atenuadas. La primera vacuna inactivada (Cyblue®, Cyanamid) se creó en España comercializándose en 1993, con adyuvante oleoso que contiene $10^{5.5}$ DICCT₅₀ %, de una cepa española del VPRRS obtenida en cultivos de MAP. Y a nivel mundial la vacuna que hasta la actualidad ha tenido mayor difusión es una vacuna atenuada, la cual obtuvo licencia por primera vez en EEUU en 1994 (Inglevac PRRS® Boehringer Ingelheim); está preparada con la cepa de referencia americana del VPRRS ATCC VR-2332. Aunque el uso de éstas se ha extendido, su efectividad solo es parcial (Labarque *et al.*, 2004; Díaz, 2006).

Se considera que las vacunas atenuadas son más eficaces que las inactivadas porque inducen una respuesta celular y humoral mayor . A pesar de ello, las respuestas inmunes inducidas por las vacunas atenuadas parecen ser aun insuficientes para proteger de la infección (Meier *et al.*, 2003; Labarque *et al.*, 2004; Díaz L. 2006)

Comparadas con las vacunas atenuadas, la principal ventaja de las vacunas inactivadas es su incapacidad de diseminarse y de revertir a la virulencia, por lo que en algunos países son las únicas permitidas para la vacunación de las cerdas reproductoras. Tras la vacunación no es posible detectar el RNA del virus ni en sangre ni en muestras orofaríngeas (Nilubol *et al.*, 2004).

Por el contrario, las vacunas inactivadas inducen una estimulación de la respuesta inmune más pobre que las atenuadas, si bien algunos autores han demostrado una eficacia parcial tanto en condiciones experimentales como en condiciones de campo (Swenson *et al.*, 1995; Plana-Durán *et al.*, 1997) son ineficaces en prevenir la infección y la eliminación vía semen en verracos (Nielsen *et al.*, 1997) y en prevenir la infección en hembras gestantes, ya que se detectó viremia e infección transplacentaria de los fetos independientemente del momento de aplicación de la vacuna (Prieto *et al.*, 1997b). A pesar de ello la vacunación con una vacuna inactivada de genotipo europeo redujo la mortalidad pre-destete y mejoró los parámetros productivos de las cerdas vacunadas (Scotti *et al.*, 2007).

Respecto a la respuesta humoral inducida, las vacunas inactivadas no son capaces de estimular la creación de AN (Meier *et al.*, 2003). Tal y como ocurre con las vacunas atenuadas la producción de AN no mejora con la administración de un coadyuvante convencional.

Ante este escenario se han instrumentado estrategias de control en las granjas, que se basan en el uso de sueros virémicos durante la aclimatación de las cerdas, en el pie de cría o en el simple contacto de animales enfermos con los animales que se pretende inmunizar (Dee., *et al.*, 1997; Fano *et al.*, 2005). Shibata *et al.*, 2000 mostraron que la exposición al virus de campo que circulaba en la granja, prevenía los signos clínicos de la enfermedad y observó la disminución en los títulos de infección, así como su duración al integrar estos animales inmunizados con el resto (Shibata., *et al.*, 2000). Esta estrategia se sigue utilizando y ayuda a controlar la

diseminación de reinfección en la granja, sin embargo este método de exposición conlleva algunos riesgos; si en la explotación se ha realizado recientemente un programa de vacunación con vacunas vivas, la posibilidad de que los animales vacunados puedan permanecer virémicos durante semanas debe ser considerada.

La diferenciación entre el virus vacunal y el virus de campo es compleja y no siempre los estudios de caracterización son concluyentes, por ejemplo el suero utilizado para la aclimatación puede contener algún otro patógeno, por lo que el lugar donde se lleva a cabo la aclimatación debe estar lo suficientemente lejos para prevenir reinfecciones en la granja o la inducción de nuevas cepas (Flores, *et al.*, 2010).

1.17 DIAGNÓSTICO

Realizar un diagnóstico puede ser complejo porque los síntomas que produce son compatibles con muchas otras enfermedades. Se puede emitir un diagnóstico presuntivo a base de los signos clínicos como son falla reproductiva en las cerdas y enfermedad respiratoria en los cerdos en crecimiento (Done, 1995).

Para realizar un diagnóstico confiable, esta enfermedad se fundamenta en un diagnóstico clínico y un diagnóstico de laboratorio.

1.17.1 Diagnóstico clínico

Es de gran importancia dada la diversidad en la presentación de la enfermedad. Se debe considerar el historial de la granja, los signos clínicos y lesiones, entre otras cosas, así como un diagnóstico diferencial (Sánchez-Vizcaíno *et al.*, 2000).

La forma subclínica de la enfermedad (endémica) es frecuente en las explotaciones no existiendo, a menudo, claros síntomas clínicos que aseguren la ausencia de enfermedad. En el diagnóstico de esta enfermedad deben de considerarse los siguientes factores: el historial de la explotación, signos clínicos y lesiones y los registros de producción, serología y detección del virus. En general se debe sospechar de la enfermedad cuando existen signos clínicos de enfermedad respiratoria y/o insuficiencia reproductiva y/o bajo rendimiento productivo (Sánchez-Vizcaíno *et al.*, 2000)

El diagnóstico de la enfermedad en las explotaciones que poseen un historial previo de serología positiva debe basarse en la evaluación conjunta de distintos parámetros, como los índices de producción, la presencia de sintomatología, cuadro clínico, lesiones y la detección del virus. Una ausencia de síntomas clínicos en los animales no es significativa de que la explotación esté libre del virus. La severidad de los síntomas clínicos está influenciada no solo por la cepa de virus circulante, sino también por los procedimientos de manejo y el sistema de producción de cada explotación particular (Sánchez-Vizcaíno *et al.*, 2000).

1.17.2 Diagnóstico de laboratorio

Tendrá que estar basado en diferentes pruebas para confirmar la enfermedad y la identificación del agente. Las pruebas a seguir pueden ser muy variadas, sin embargo, se consideran las pruebas serológicas que son: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA, acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Ensayo de Inmunoperoxidasa en Monocapa (IPMA) e inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y las pruebas virológicas que son el aislamiento viral (AV), y las pruebas de Inmunofluorescencia Directa (IFD) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para la identificación del virus.

Las muestras para diagnóstico deben ser obtenidas preferiblemente de animales jóvenes, donde el virus se encuentra en mayor cantidad y durante periodos de tiempo más largos.

Pruebas serológicas

1.17.3 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Son las técnicas de elección para los análisis serológicos de rutina por la posibilidad de obtener en pocas horas un resultado del estado sanitario de la explotación de manera rápida, sencilla y económica.

Varios laboratorios han desarrollado ELISAs (indirecto o de bloqueo) para pruebas serológicas. Se ha descrito un sistema ELISA doble-de bloqueo (Sorensen, 1997) que permite distinguir entre reacciones serológicas frente a los tipos antigénicos europeo y americano (Sorensen, 1998; OIE, 2004). Se dispone de estuches comerciales de ELISA para determinar el estado serológico de los cerdos frente al VPRRS. Estos estuches emplean los tipos para el VPRRS americano o europeo separadamente o bien ambos antígenos combinados. La principal ventaja

es el manejo rápido de gran número de muestras. También se han desarrollado y están disponibles comercialmente ELISAs que utilizan proteínas recombinantes de ambos tipos de VPRRS como antígenos.

Los ELISAs comerciales están generalmente dirigidos hacia la proteína N. Una recomendación que debe hacerse a la hora de interpretar los resultados es que un resultado positivo no puede relacionarse directamente con una infección reciente. Los anticuerpos pueden detectarse durante un periodo de tiempo muy largo, a partir de los 7-14 días pi y desaparecen generalmente antes de los 12 meses o hasta los 600 días (Vezina *et al.*, 1996; Labarque *et al.*, 2000; Desrosiers y Boutin, 2002; Meier *et al.*, 2003).

Recientemente se ha demostrado una muy elevada variabilidad de sensibilidad y especificidad de diferentes ELISAs comerciales y por tanto en la aparición de falsos positivos y falsos negativos (Mieli *et al.*, 2002; Yoon *et al.*, 2003). Por tanto es recomendable confirmar por medio de otras pruebas, ya que las propiedades inherentes de cada ELISA determinaría una sensibilidad diferente en cada uno por los antígenos usados en el tapizado de la placa (Díaz, 2006).

1.17.4 Immunoperoxidase monolayer assay (IPMA)

Está basada en la detección de antígenos virales sobre cultivos de macrófagos alveolares (o subclones de la línea MA-104 en el caso de aislados americanos) infectados con la muestra sospechosa (generalmente macerados de órganos), empleando un anticuerpo monoclonal específico o policlonal marcado con peroxidasa. Es una técnica muy específica, aunque de sensibilidad limitada y de cierta complejidad, y su interpretación puede ser en ocasiones problemática ya que al realizar la lectura por visualización al microscopio óptico no está exenta de subjetividad, no pudiendo ser por ello automatizada. Entre sus ventajas destaca la posibilidad de cuantificar el título de anticuerpos específicos presentes en el suero. Mediante esta técnica es posible la detección de anticuerpos a partir del día 6-7 pi y hasta un año después (Wensvoort *et al.*, 1991; Sánchez-Vizcaino *et al.*, 2000).

La técnica se fundamenta básicamente en que la peroxidasa es capaz de catalizar la oxidación de un reactivo, el 3-amino-9-etilcarbazol, por el agua oxigenada formándose un producto rojo

insoluble que puede ser visualizado al microscopio óptico (Graham *et al.*, 1965). Además de MAPs, también pueden ser utilizados como sustrato cultivos de las líneas celulares ya señaladas, detectándose anticuerpos frente a la enfermedad a partir del sexto día pi (Ohlinger *et al.*, 1991). Estos anticuerpos parecen persistir durante al menos 12 meses, aunque algunos cerdos se convierten en seronegativos tras 4 ó 6 meses.

1.17.5 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Esta prueba detecta IgGs, las que aparecen de 7 a 11 días pi, con una producción máxima a los 30-50 días y declinan hasta ser detectable alrededor de 4 a 6 meses pi.

Esta técnica consiste en poner la muestra del suero sospechoso en contacto con células infectadas por VPRRS, para posteriormente buscar evidencia de la reacción antígeno-anticuerpo mediante la utilización de un anticuerpo contra VPRRS conjugado con fluoresceína. Es una prueba rápida, económica y específica (99.5% de especificidad). La prueba de IFI sólo puede detectar anticuerpos producidos contra las cepas que se encuentren altamente relacionadas con la cepa que es utilizada en la prueba.

En forma general, es necesario realizar dos pruebas simultáneas, una con la cepa norteamericana y otra con la cepa europea (Chávez, 2006). La inmunoreacción se manifiesta con un conjugado marcado con fluoresceína que en los casos positivos se caracteriza por una intensa inmunofluorescencia intracitoplasmática. Es una técnica sensible y específica que permite en pocas horas la obtención de un resultado (Sánchez-Vizcaino *et al.*, 2000).

.Esta técnica permite la detección diferenciada de inmunoglobulinas M y de inmunoglobulinas G. las primeras se detectan desde los 5 hasta los 28 días pi y las segundas desde los 10 hasta los 120 días pi (Joo *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2002). La sensibilidad de esta técnica está muy asociada a la diferencia antigénica entre la cepa usada en la IFI y la cepa de VPRRS que indujo los anticuerpos a detectar en la muestra problema.

1.17.6 Seroneutralización (SN)

Otro método diagnóstico es la seroneutralización (SN) *in vitro*. Esta prueba valora en el suero sospechoso la presencia de anticuerpos específicos con capacidad para neutralizar el virus "*in vitro*". Los sueros deben ser inactivados previamente.

Es una técnica muy específica, y permite la detección de anticuerpos neutralizantes a partir de la segunda semana de la infección. Al igual que el IPMA, es una técnica más compleja que el ELISA, que no permite el análisis de un gran número de sueros a la vez. No está indicada para la detección de infecciones agudas (Sánchez-Vizcaíno *et al.*, 2000).

Sin embargo, esta sólo tiene utilidad cuando se utilizan como sustrato células diferentes a cultivos primarios de macrófagos alveolares porcinos, ya que se ha observado que los anticuerpos son importantes en el mantenimiento de la infección por el VPRRS y que la formación de inmunocomplejos favorece la endocitosis de los mismos por los macrófagos (Choi *et al.*, 1992). Mediante el uso de una línea celular, la MA-104, los anticuerpos neutralizantes son además de aparición tardía (6-8 semanas pi) (Christoffer-Hennings *et al.*, 1992).

1.17.7 Aislamiento viral (AV)

El Aislamiento viral se realiza sobre cultivos de macrófagos alveolares porcinos, aunque su sensibilidad no es constante. Para aislados americanos también se utilizan las líneas celulares MA-104 y sus derivadas MARC-145 y CL-2621. En los cultivos infectados se desarrolla un efecto citopático (ECP) visible entre los 2-7 días de la inoculación, siendo en ocasiones necesario realizar pases adicionales del cultivo. Aunque ha habido reportes de que el ECP se presentó entre las 24 y 48 horas post-inoculación; el ECP ha sido descrito por Pol *et al.* (1992) y Paton *et al.* (1992a) y consiste en un redondeamiento y agrupamiento de las células, seguido del desprendimiento del soporte en que se cultivan como consecuencia de la muerte celular, mostrando picnosis, vacuolización y cariorrexis (Sierra, *et al.*, 2000) mencionando también redondeamiento, y agrupamiento en racimos, mismo efecto que es característico del virus (Macías MJ *et al.*, 2006). (Figura 9)

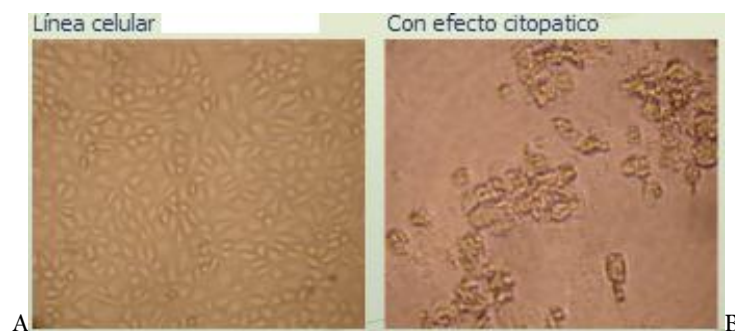


Imagen No. 9. Muestra el monoestrato celular con y sin ECP. (Boehringer Ingelheim Vetmedica, México 2012)

En la figura 9, se puede observar en la imagen A un monoestrato intacto de la línea celular MARC-145, en la imagen B se observa un monoestrato destruido y con presencia de ECP característico a la infección con VPRRS en la misma línea.

La identificación del virus en los cultivos infectados puede ser confirmada por técnicas de detección antigénica o del ácido nucleico viral (PCR) (Sánchez-Vizcaino *et al.*, 2000).

El aislamiento viral es la prueba utilizada con mayor frecuencia para detectar virus. El aislamiento viral se realiza utilizando macrófagos alveolares porcinos (MAPs), o una de las dos líneas celulares CL2621 y MARC-145 (Collins *et al.*, 1992).

El virus puede ser aislado de varias muestras de tejidos; sin embargo, los resultados más exitosos se obtienen de suero y tejido pulmonar (Nodelijk, 2002). Es una técnica laboriosa y costosa, aunque altamente sensible y específica (Nodelijk, 2002).

1.17.8 Inmunofluorescencia directa (IFD)

Con la prueba de Inmunofluorescencia directa (IFD), la detección del virus, en tejidos de cerdos infectados, ha sido descrita como una técnica diagnóstica que puede ser considerada útil en cuanto a la practicidad, costos y especificidad, pero exceptuando la sensibilidad (Halbur *et al.*, 1994). La prueba en cortes de tejidos congelados es rápida, de bajo costo y específica; sin embargo, no siempre muy sensible (Yoon *et al.*, 2003). La IFD es una variedad de la IPMA y presenta alta especificidad (más del 99 %) pero se desconoce su sensibilidad al analizar animales individualmente. (Nodelijk, 2002). Es una prueba rápida y económica, se utiliza tejido fresco, preferentemente pulmón, el cual se congela a -70°C y se hacen cortes finos. Se utiliza un anticuerpo monoclonal contra VPRRS conjugado con fluoresceína. La lectura se realiza en un microscopio de inmunofluorescencia. Como ya se mencionó es una prueba específica pero no es altamente sensible, sobre todo si el tejido ha sufrido algo de autólisis. Por otra parte, se pueden utilizar anticuerpos monoclonales específicos para detectar antígenos altamente conservados entre aislados norteamericanos y europeos, o se pueden utilizar anticuerpos monoclonales contra epítomos menos conservados, para evaluar las diferencias antigénicas existentes entre los distintos aislados del VPRRS. (Nelson *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1999).

El anticuerpo SDOW 17 ha sido ampliamente utilizado para estos fines y se ha demostrado su capacidad de reaccionar con aislados norteamericanos y europeos del VPRRS. (Nelson *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1999; Malinarich *et al.*, 2004).

1.17.9 Inmunohistoquímica

En Canadá se han aplicado técnicas inmunohistoquímicas para la detección directa del virus a partir de monocapas de macrófagos o directamente de tejidos. Esta técnica se vio muy favorecida por la existencia de un anticuerpo monoclonal que es capaz de reconocer una de las proteínas del virus, concretamente la que migra a la altura de 15 KD en geles de poliacrilamida, y que corresponde posiblemente a la nucleocápside vírica.

La reacción se visualiza con el uso de un segundo anticuerpo frente a la IgG de ratón marcada con oro cuyo efecto se incrementa con plata. Cuando en vez del monoclonal se usa un policlonal, sin embargo, el grado de inespecificidad se incrementa considerablemente (Magar *et al.*, 1993; Suárez, 1995).

1.18 DETECCIÓN DEL ÁCIDO NUCLEICO VIRAL

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica molecular altamente sensible y específica utilizada para el diagnóstico de muchas enfermedades infecciosas. Hay numerosos estudios que señalan el uso de la transcriptasa reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para la identificación del ácido nucleico del VPRRS en muestras de tejidos, suero y semen (Rovira *et al.*, 2007).

Las variantes de la RT-PCR más utilizadas para la identificación del VPRRS son el RT-PCR anidado, el RT-PCR multiplex y el RT-PCR (qRT-PCR) en tiempo real. (Ramírez, 2011). Los ensayos basados en la RT-PCR son los que en general tienen una alta sensibilidad, especificidad y rapidez para detectar el VPRRS y presenta ventajas en cuanto a que se puede utilizar en muestras que resultan citotóxicas para la detección por aislamiento viral en cultivos celulares. Este método indica la presencia del material genético del virus, pero no necesariamente indica la capacidad infecciosa de éste. La RT-PCR detecta el virus a través de la amplificación de un segmento de ácido nucleico, utilizando la enzima transcriptasa reversa (RT) para convertir el ARN viral extraído, en ADN complementario, el cual es posteriormente

amplificado utilizando una polimerasa (Taq polimerasa) y “primers” o iniciadores específicos para determinados segmentos del genoma viral. (Suárez *et al.*, 1994).

En 1997, Gilbert *et al.* Describieron la técnica de la RT-PCR multiplex y de la RT-PCR anidada multiplex para la diferenciación de genotipos europeos y americanos del VPRRS, con el fin de determinar el límite más bajo de detección viral por la RT-PCR. Ellos mostraron que la prueba de la RT-PCR anidada multiplex es capaz de detectar 10 dosis infectivas en Cultivo de Tejido₅₀ (TCID₅₀) en comparación con 10³TCID₅₀ que pudo detectar la PCR multiplex en muestras de suero de animales experimentalmente infectados. La más alta sensibilidad de la RT-PCR anidada multiplex tiene como ventaja la genotipificación directa del VPRRS.

Guarino *et al.*, 1999, analizaron 24 diferentes aislados de campo del VPRRS por una RT-PCR convencional y RT-PCR anidada usando 6 pares de “primers” de diferentes regiones del genoma viral, con el objetivo de identificar primers universales que permitan amplificar el genoma de todos o de la mayoría de los aislados del VPRRS. Ellos demostraron que el ORF 7 es un blanco exitoso para el diagnóstico del virus y que permitió la amplificación de los fragmentos correspondientes en todos los aislados probados. Otra variante de la RT-PCR empleada para la detección del VPRRS es la PCR en tiempo real (qRT-PCR) que tiene la ventaja, sobre el RT-PCR convencional, de consumir menos tiempo durante su desarrollo y disminuir la probabilidad de contaminación de los amplificadores de ADN. El uso de una técnica como el qRT-PCR ofrece la oportunidad de detectar fácil y rápidamente ARN viral, además de cuantificarlo. Asimismo, puede monitorear amplicones acumulados directamente, durante el proceso de amplificación del ADN (Yang *et al.*, 2006).

2. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de PRRS es una de las principales patologías que ocasionan un fuerte impacto a la producción porcina nacional y mundial. Afecta a cerdos de diferentes etapas de producción, ocasionando trastornos reproductivos y respiratorios, principalmente. Los trastornos respiratorios más frecuentes se dan en cerdos después del destete y en crecimiento, en donde el virus del PRRS (VPRRS) participa en el complejo respiratorio porcino (CRP) junto con otras patologías bacterianas y virales; entre las que se encuentran al virus de la enfermedad del ojo azul (VEOA) y al circovirus porcino tipo 2 (PCV-2), entre otros agentes virales. La información publicada en México con relación al aislamiento del VPRRS, aun resulta insuficiente y su asociación con el VEOA y el PCV-2 no es bien conocida; además de que se trata de un virus que muta con facilidad. Debido a esto, es necesario conocer su situación en el país y contribuir con herramientas que coadyuven a su control. De acuerdo a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue aislar e identificar al VPRRS en tejidos de cerdos, de diferentes estados, con problemas respiratorios y retraso del crecimiento, además buscar la posible asociación con otros virus que participan en el CRP, con la finalidad de obtener aislados que contribuyan con el arsenal biológico para un mejor diagnóstico y control de la enfermedad.

3. HIPÓTESIS

Mediante el aislamiento viral en cultivos celulares y el uso de otras técnicas como la PCR y la inmunofluorescencia directa, podremos identificar la presencia del virus del VPRRS y de otros virus a partir de tejidos de cerdos retrasados y con problemas respiratorios, de diferentes granjas porcinas del país, contribuyendo con ello al cepario nacional.

4. OBJETIVO GENERAL.

Aislar al virus del PRRS a partir de tejidos de cerdos de diferentes estados del país.

4.1. OBJETIVOS PARTICULARES.

- a) Aislar al VPRRS en cultivo celular (CC) a partir de tejidos de animales de granjas ubicadas en diferentes estados del país,
- b) Confirmar la presencia del VPRRS en cultivo celular por medio de las técnicas de RT-PCR e IFD.
- c) Identificar coinfección con virus de la enfermedad del ojo azul (VEOA) y el circovirus porcino tipo 2 (PCV-2).
- d) Contar con los virus aislados del VPRRS para contribuir con un cepario nacional.

5. METODOLOGÍA

5.1 GRANJAS

Se muestrearon 23 granjas de ciclo completo de los siguientes estados: i) diez de Querétaro, ii) ocho de Guanajuato, iii) una de Michoacán, iv) una de Veracruz y v) tres de Puebla.

5.2 MUESTRAS

La selección de los cerdos para la toma de muestras se basó en aquellos que presentaron signos respiratorios y retraso del crecimiento. Los tejidos colectados de cada cerdo se transportaron en nitrógeno líquido (-196°C) y se guardaron en congelación a -70°C , en el Laboratorio de Virología del CENID-MA, INIFAP, hasta su utilización.

5.3 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Aislamiento viral.- Con las muestras de tejidos se procedió a realizar un macerado utilizando aproximadamente 1 g de tejido congelado. El tejido se cortó finamente con ayuda de un bisturí en un mortero frío; después se agregó arena estéril para favorecer la trituración y 2 ml de medio de cultivo y se maceró. Posteriormente se homogenizó con 2 ml más de medio de cultivo y se vació a un tubo de centrifuga. El macerado se centrifugó por 20 min a 3,000 rpm en refrigeración. El sobrenadante se colectó con una jeringa de 5 ml y se filtró empleando un filtro de $0.45\ \mu\text{m}$. La muestra se colocó en un criovial de 1.8 ml, se identificó y se congeló a -70°C .

Con todos los macerados obtenidos se procedió a inocular la línea celular MARC-145,

preparada en microplacas de cultivo de 24 pozos¹

¹ (Nunclon Brand Products Cat. 14398)

Línea celular.– Se utilizó la línea celular MARC-145 porque es una de las líneas susceptibles para el aislamiento del VPRRS (OIE, 2008). La línea celular se mantuvo utilizando el medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham, adicionado con el 10% de suero fetal bovino (SFB) y 250 UI/mg/mL de una mezcla de antibiótico de penicilina-estreptomicina². Para los pases de las células se utilizó tripsina-verseno comercial (Tripsina al 0.05 %: Verseno al 0.05% en solución salina de fosfatos sin calcio ni magnesio³). El pH del medio de cultivo se ajustó con una solución estéril de bicarbonato de sodio al 8 %. Las células se mantuvieron a 37°C con una atmosfera de 5% de CO₂.

Inoculación de cultivo celular.– Para este propósito se prepararon microplacas de 24 pozos con las células MARC-145, con una confluencia de 60–70%, se retiró el medio de cultivo, excepto en los pozos de los controles negativos, por cada espécimen se inocularon dos pozos, añadiendo 200µL /pozo. Se inocularon dos pozos con VPRRS de referencia (control +) y se dejaron dos sin inocular (control -), se dejó incubar 1 h a 37°C con 5% de CO₂, al término de este tiempo, se retiró el medio de todos los pozos iniciando con los del control negativo y posteriormente se colocaron de nuevo 200 µL de medio fresco, adicionado con 2% de SFB y 250 UI/mg/mL de una mezcla de antibiótico de penicilina-estreptomicina; los monoestratos se incubaron a 37°C con 5% de CO₂, por 7 días. Al término de los 7 días de incubación, se realizó una cosecha de las muestras; se revisó el estado de las células y después se hizo un raspado con ayuda de una puntilla de micropipeta en toda la superficie del pozo que contenía a las células, después se homogenizó y se retiró el medio de cada pozo junto con las células ya desprendidas para colectarlo en un tubo Eppendorf ya identificado. Posteriormente se congelaron a -70 °C los tubos de cada muestra y se guardaron para realizar el siguiente pase. A todas las muestras se les dieron 3 pases ciegos, de la misma forma mencionada anteriormente. Al tercer pase, se inocularon dos pozos adicionales con virus de la enfermedad del ojo azul de referencia y otros dos pozos con virus silvestre de PCV2, previamente aislado en CC e identificado por PCR.

²(10,000 U/mg/L en solución salina de NaCl al 0.85% marca In Vitro catalogo A-01)

³(Marca IN-VITRO, Cat. EN-005).

5.4 CONSERVACIÓN DE LOS ESPECÍMENES

De cada pozo se hicieron alicuotas de 1 ml, que fueron depositadas en un criovial y congeladas a -70°C y/o en nitrógeno líquido hasta su uso.

5.5 IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS

Identificación por RT-PCR, IFD y PCR. Para la identificación del VPRRS, primero se descongelaron todas las muestras de tejido a las que se les hizo la prueba de RT-PCR; las muestras positivas se inocularon en células MARC-145, como ya se mencionó, en donde se les dieron tres pases ciegos; al tercer pase se hicieron las técnicas de RT-PCR para identificar al VPRRS, RT-PCR para el virus de la enfermedad del ojo azul (VEOA) y PCR para el circovirus porcino tipo 2 (PCV-2). Por separado se inocularon, con macerados de tejidos positivos por RT-PCR al VPRRS, monoestratos de células MARC-145 contenidas en cámaras Labtek; las laminillas inoculadas se tiñeron para identificar al virus por IFD.

RT-PCR para la identificación del VPRRS.

Extracción de ARN. En el caso de muestras de tejido, aproximadamente 1 g de una mezcla de tonsila, pulmón y linfonodo (inguinal, submaxilar y/o retrofaringeo) se maceraron con 5 mL de solución salina fisiológica estéril. Enseguida se centrifugaron a 16,000 xg por 5 minutos y se tomaron 200 μL de sobrenadante para realizar la extracción. Se utilizó el “kit” comercial “High Pure PCR Template” (Roche) y se siguió el protocolo descrito por el fabricante (ver Imagen No. 10), con la excepción de que en el último paso el ARN fue eluido en 50 μl de agua libre de ADNasas y ARNasas en lugar del “*Elution Buffer*”.

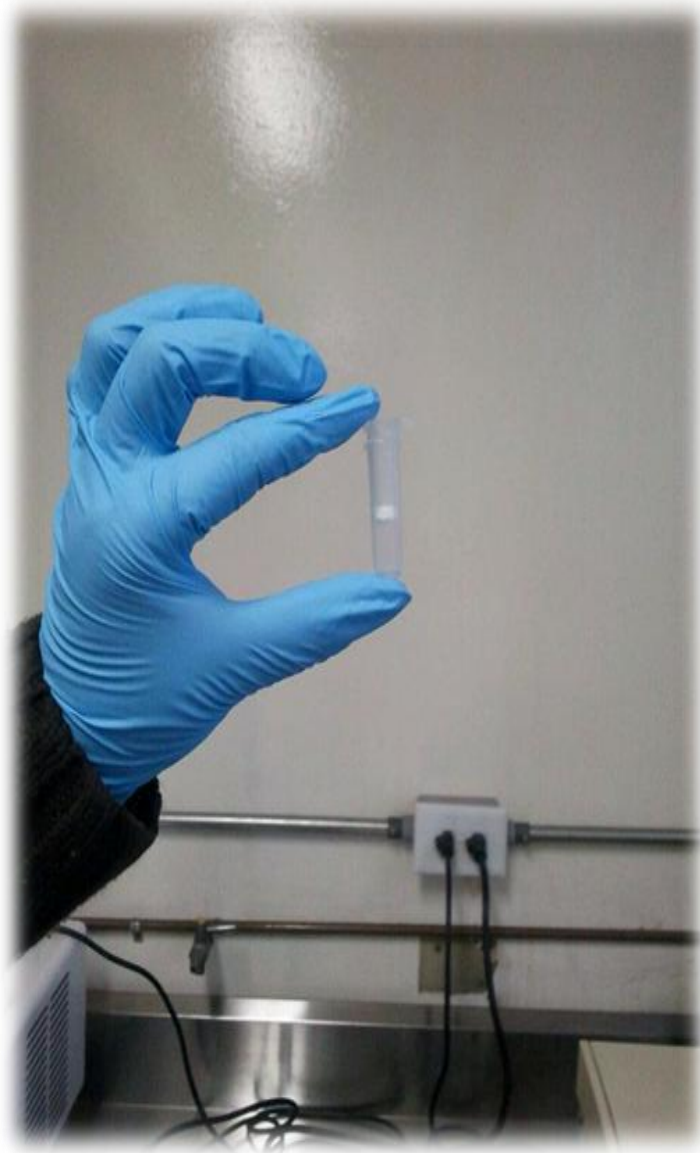


Imagen No. 10. Columnas de extraccion

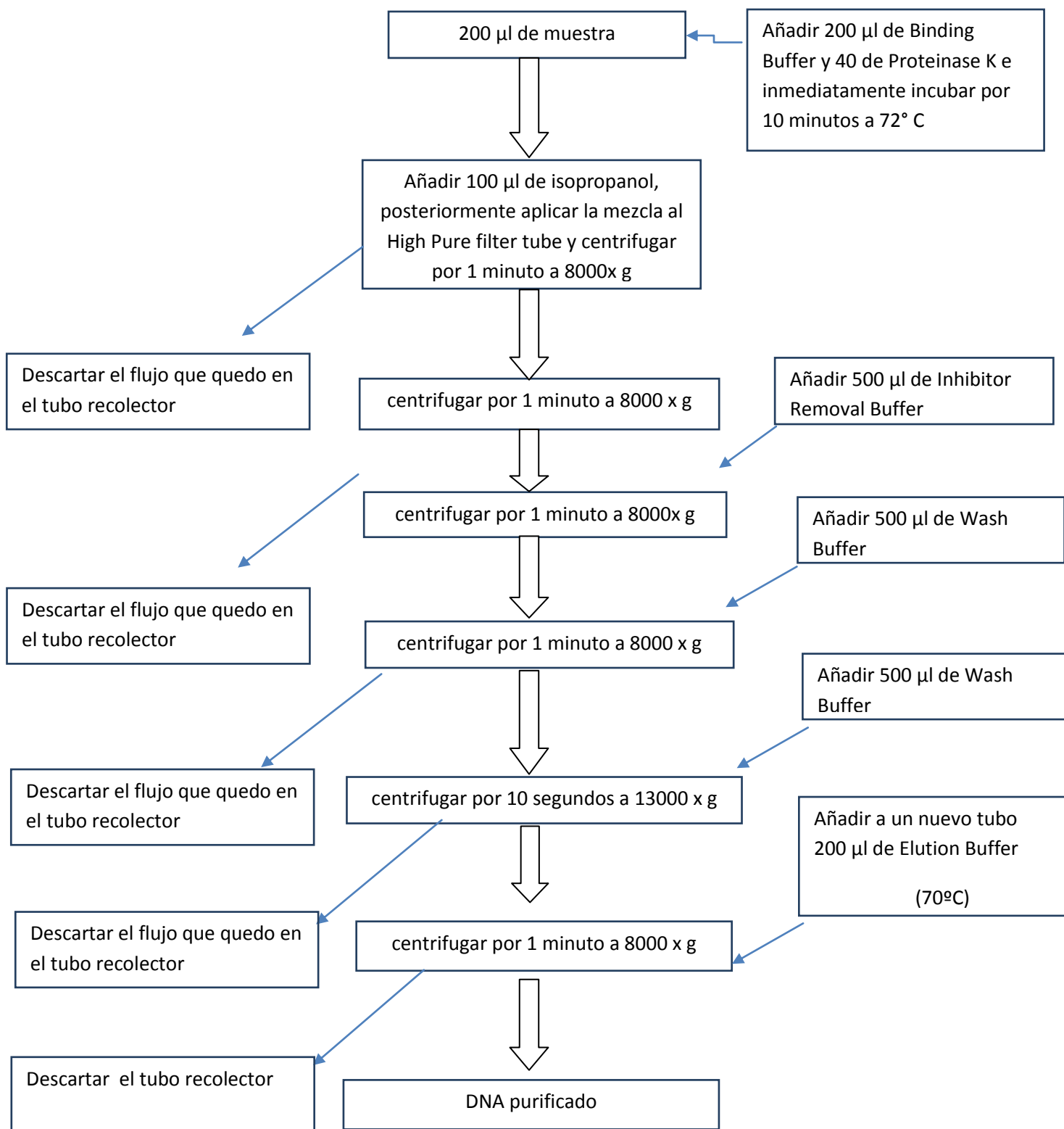


Imagen No. 11. Diagrama de procedimiento suministrado por el fabricante del kit comercial High Pure PCR Template (Roche) para obtención de RNA.

ADNc y Amplificación. La transcripción reversa y la amplificación se llevó a cabo en un solo tubo. Para la identificación del virus en las diferentes muestras se realizó un primer RT-PCR. Para este fin se utilizó un par de oligonucleótidos que amplifican un fragmento aproximado de 300 pb, del ORF 7 con los iniciadores: 5'-CCAGCCAGTCAATCARCTGTG-3' y 5'-GCGAATCAGGCGCACWGTATG-3' (Donadeu *et al.*, 1999). Las condiciones para la mezcla fueron de 1X de Buffer, 2.5 mM de MgCl₂, 0.4 mM de una mezcla de desoxinucleótidos, 20 pmol de cada iniciador, 1.25 U de Taq polimerasa, 3 µg de albúmina sérica bovina y 1 µl de ARN molde para un volumen final de 25 µl. El programa de amplificación consistió de un ciclo a 48 °C 30 min, seguido de 94 °C 10 min; 35 ciclos a 94 °C 1 min, 58 °C 1 min y 72 °C 1 min; y un ciclo final a 72 °C 7min, utilizando un termociclador de la marca Labnet International, Inc. Multigene (Imagen No. 12).



Imagen No. 12 Termociclador marca Labnet International, Inc. Multigene.

De cada producto de amplificación 8 μ L fueron mezclados con 1 μ L de buffer de muestra y analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % en buffer de Tris-ácido acético-EDTA (TAE), teñido con GelRed™ como agente intercalante revelador. El corrimiento se llevó a cabo a 80 volts durante 40 minutos aproximadamente (Imagen No. 13). Posteriormente el gel fue observado bajo luz ultravioleta con un fotodocumentador de la Marca GeL Logic 1500 Imaging System (Imagen No. 14).

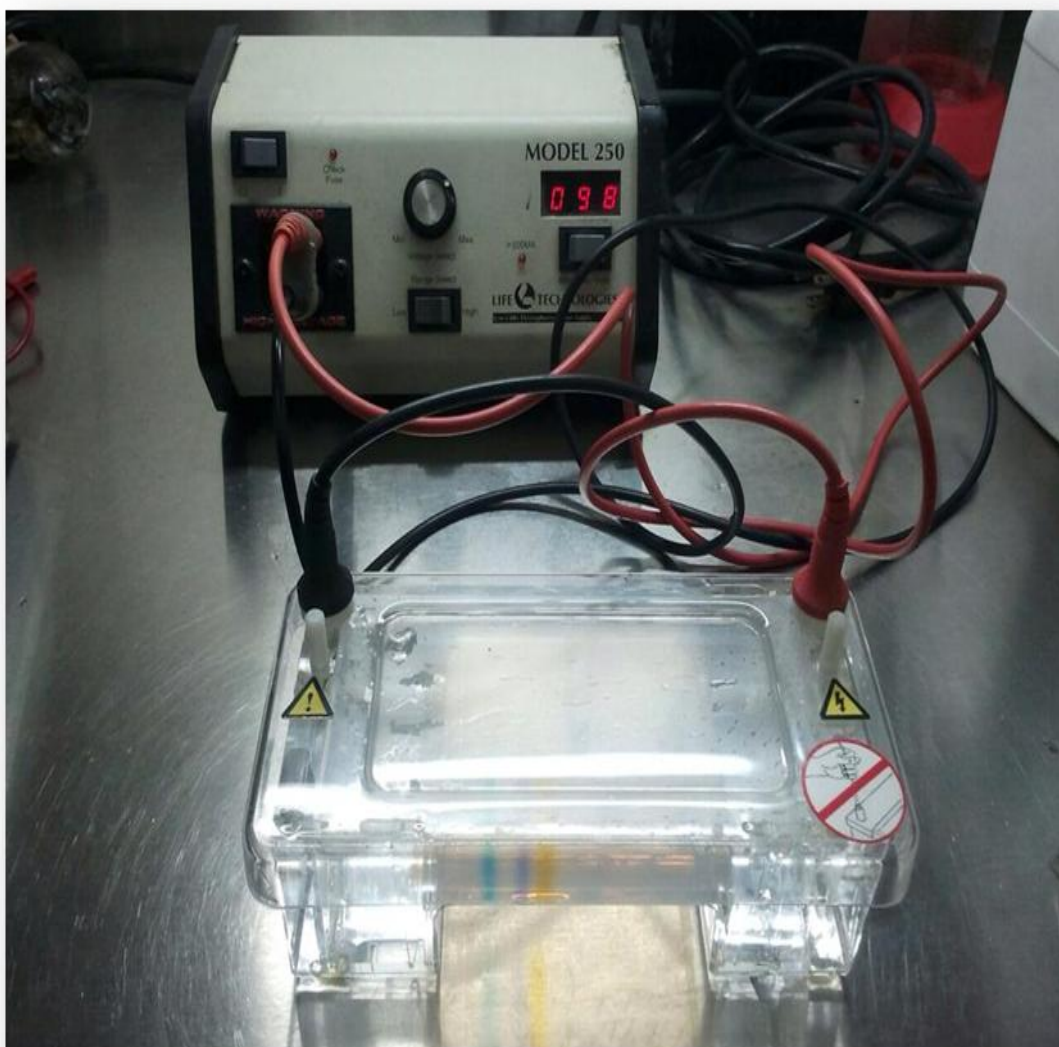


Imagen No. 13 Fuente de poder marca Life Technologies modelo 250. Y la Cámara de electroforesis marca C.B.S. Scientific Co., Modelo MGU-202T.



Imagen No. 14 .Fotodocumentador Marca GeL Logic 1500 Imaging System

Técnica de inmunofluorescencia.– Se prepararon cámaras de 8 pozos con la línea celular MARC-145 con una confluencia del 50 %, se inocularon con las muestras positivas al VPRRS identificadas por PCR (Imágenes No. 15 y 16). Se inocularon dos pozos con las muestras positivas y dos pozos con un control positivo a PRRS y se dejaron dos pozos sin inocular como control negativo. Las muestras se incubaron 1 h a 37°C con 5% de CO₂, al término de este tiempo, se retiró el medio de todos los pozos iniciando con los del control negativo y posteriormente se adicionó medio nuevo con 2% de SFB y 250 UI/mg/mL de antibiótico; los monoestratos se incubaron a 37°C con 5% de CO₂, por 3 días, para ver la presencia o ausencia del ECP. Al cabo de estos días se retiró el medio de cultivo y se separó la cuadrícula de las laminillas, y posteriormente cada laminilla se fijó en acetona a temperatura ambiente durante 10 min, posterior a este tiempo se dejaron secar las laminillas para proceder a su tinción.

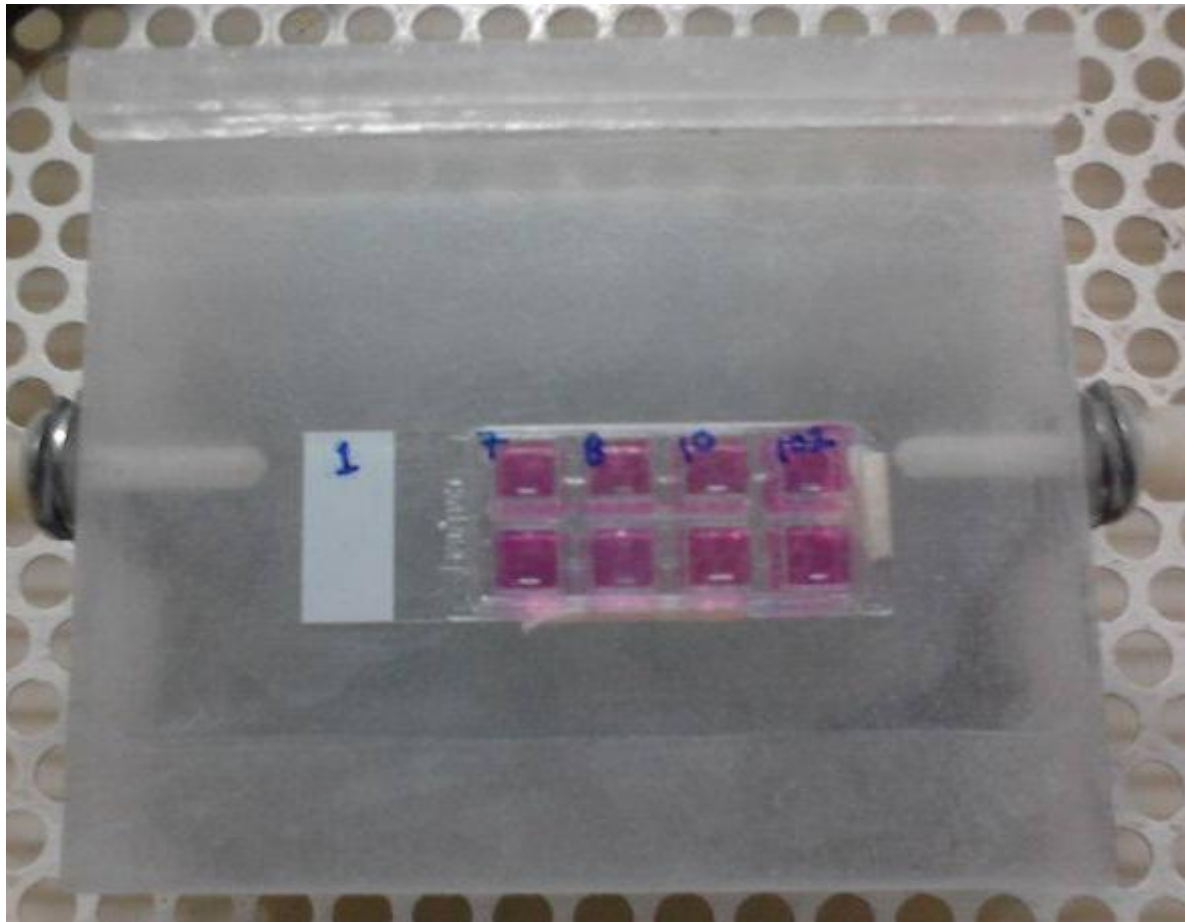


Imagen No. 15 Cámaras de cultivo celular, de 8 pozos Marca Lab-Tek (Lab-Tek-Products)



Imagen No. 16. Cámaras de cultivo celular, de 8 pozos Marca Lab-Tek (Lab-Tek-Products)

Para teñir las laminillas, se utilizó un conjugado monoclonal comercial SDOW 17, utilizado comúnmente en las pruebas de diagnóstico para el VPRRS que está dirigido contra una proteína de la nucleocápside viral (Rossow, 1998; Sierra *et al.*, 2000). Se depositó en cada pozo de la laminilla de 0.05 a 0.1 ml del conjugado previamente diluido 1:100, amablemente donado por un laboratorio privado, las laminillas se incubaron a 37°C durante 30 min, dentro de una cámara húmeda. Al termino de este tiempo, se eliminó el exceso de conjugado, y se realizó un enjuague con una solución buffer de fosfatos (PBS), sumergiéndolas 10 veces en el mismo, posteriormente se colocaron en PBS nuevo, a temperatura ambiente, durante 10 min y se les dio un enjuague final con agua destilada, para quitar el exceso de PBS.

Se dejaron secar y se les colocó una solución de glicerina con PBS (50 % - 50 %) y un cubreobjetos. Se procedió a hacer la observación al microscopio invertido con lámpara de mercurio Xenón para fluorescencia, marca Olympus modelo IX70.

PCR para la detección del circovirus tipo 2. La extracción del ADN total se realizó de la misma forma que para la detección del virus del PRRS. La secuencia de los iniciadores usados fueron: CAGCAACATGCCAGCAAGAAGAAT y TCGATCACACAGTCTCAGTAG (1), fragmento que flanquean: ORF V1. El tamaño del producto de amplificación fue de 703 pb. Las condiciones de la reacción de PCR fueron: Buffer de PCR 1X, 1.5 mM de MgCl₂, 200 μM de dNTP's, 20 pmol de cada iniciador, 1.25 U de Taq polimerasa Gold y 2 μl de ADN, para un volumen final de 25 μl. El programa de amplificación fue: Un ciclo a 94 °C 4 min, 35 ciclos a 94 °C 30 seg, 54 °C 30 seg y 68 °C 90 seg, y un ciclo de extensión final a 68 °C 3 min.

PCR para la detección del virus de la enfermedad del ojo azul (EOA). La extracción del ARN total se realizó de la misma forma que para la detección del virus del PRRS. La Secuencia de los iniciadores empleada fue: TCCCCCGATGCGATTATTGAG y CCCCCTTCGAGCTGGATTCTG (2). Fragmentos que flanquean al Gen NP. El tamaño del producto de amplificación es de 375 pb.

Condiciones de la reacción de RT-PCR. Se llevó a cabo en un solo paso bajo las siguientes condiciones: Buffer de PCR 1X, 2.5 mM de MgCl₂, 200 μM de dNTP's, 20 pmol de cada iniciador, 5 U de inhibidor de ARNasas, 2.5 U de Taq polimerasa Gold, 12 U de transcriptasa reversa, 3 μg de albúmina sérica bovina y 2 μl de ARN, para un volumen final de 25 μl.

Programa de amplificación: Un ciclo a 48 °C 30 min y 95 °C, 35 ciclos a 94 °C 1 min, 58 °C 1 min y 72 °C 1 min, y un ciclo de extensión final a 72 °C 7 min.

6. RESULTADOS

De acuerdo a la metodología establecida, se realizó el muestreo en granjas ubicadas en los estados de Querétaro, Guanajuato, Michoacán, Veracruz y Puebla. Al respecto se obtuvieron 118 macerados de las mismas. En cuanto al aislamiento viral, los resultados del primero y tercer pase se muestran en la tabla 1. En algunas muestras se observó ECP, el cual consistió en células refringentes, redondeamiento, y se agruparon en racimos, mismo efecto que es característico del VPRRS (Macías, *et al.*, 2006) en algunas se presentaron vacuolas y pérdida de la confluencia con respecto al control negativo.

En la Tabla No. 1, se observa el número de granjas y de muestras obtenidas en cada una de ellas, mostrando también los resultados finales en cuanto al ECP que se detectó en las muestras trabajadas en CC. En el estado de Querétaro, hubo ECP en 2 de 61 muestras en el primer pase y solo en 1 de 61 en el tercer pase. En Guanajuato, hubo ECP en 8 de 37 tanto en el primer como en el tercer pase. En Puebla el ECP se presentó en 5 de 10 en el primer pase y una en el tercer pase. De Veracruz el ECP se presentó en 1 de 4, del primer pase y en 2 de 4 en el tercer pase. Y de Michoacán el ECP fue observado en 1 de 6 en el primer pase y en 3 de 6 en el tercer pase. Dando un total de 17 (14.4 %) muestras positivas, de 118, en el primer pase y 15 (12.7 %), de 118, en el tercero.

Tabla No. 1. Resultados de la relación entre el primer y tercer pase celular, del ECP observado en las 118 muestras obtenidas de las 23 granjas muestreadas de Querétaro, Guanajuato, Michoacán, Veracruz y Puebla.

Estado	Número de granjas y total de muestras	ECP en el 1 ^{er} Pase en CC	%	ECP en el 3 ^{er} Pase en CC	%
Querétaro	10 Granjas (61 Muestras)	2/61	3.27	1/61	1.6

Guanajuato	8 Granjas (37 Muestras)	8/37	21.62	8/37	21.62
Puebla	3 Granjas (10 Muestras)	5/10	50	1/10	10
Veracruz	1 Granja (4 Muestras)	1/4	25	2/4	50
Michoacán	1 Granja (6 Muestras)	1/6	16.66	3/6	50

En el presente estudio, los monoestratos controles negativos se mostraron viables, con su estructura intacta, renfringentes, sin ningún daño, lo que indicó que no sufrieron ningún cambio alguno y por lo tanto se encontraron en óptimo estado, como se muestra en la Imagen No. 17.

En cuanto al control positivo, se puede observar que el monoestrato se encontró desprendido, las células muertas, alargadas, y en algunas se observaron vacuolas, y también redondeamiento lo cual, es característico de la presencia de una infección causada por un virus con capacidad citopática, como el virus en cuestión; este daño en las células refleja muy probablemente la presencia del agente, como se observa en la Imagen No. 18.

Al enfrentar las células a las muestras, se observaron cambios notables que indican la presencia del virus como en la Imagen No. 19, la cual fue una de las muestras obtenidas, en la que se identifica un ECP positivo; se observan células alargadas, redondas, agrupadas y también se muestra un claro desprendimiento del monoestrato, lo cual concuerda con el control positivo.

En la Imagen No. 20, se observa una muestra que tiene el ECP característico ya que presentó células agrupadas, muertas, redondas, hay desprendimiento del monoestrato, algunas células se encuentran alargadas y también hay vacuolización.

Lo anterior muestra, como tal, las características de unas células que se encuentran infectadas debido a la presencia del virus, provocando un ECP muy singular y característico. Pero cada muestra reacciona de diferente manera, por lo cual, en la Imagen No. 21 podemos observar pérdida casi total del monoestrato, los islotes de células que se observan son muy pocas y ya se encuentran redondeadas y agrupadas en racimos, lo cual es un ECP característico que nos indica que estas células ya no se encuentran viables.

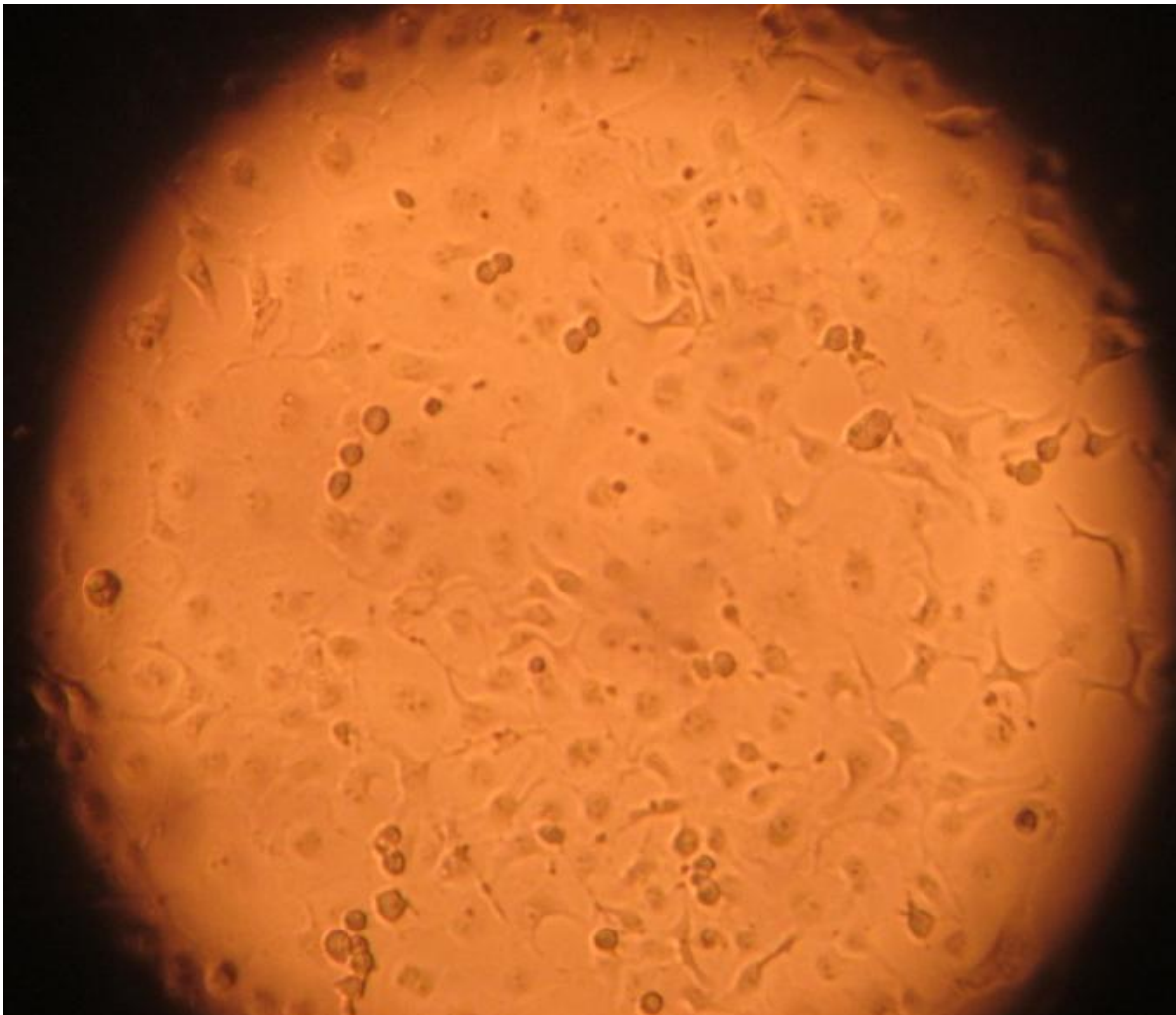


Imagen No. 17. Células MARC-145, control negativas. El monoestrato está intacto y viable, con algunas células redondas y desprendidas, Microscopía óptica 20x.

En la Imagen No. 18, se observa el monoestrato desprendido casi en su totalidad (flecha roja), redondeamiento de células (flecha azul) y el cambio en la forma de las células, se observan alargadas (flecha negra).

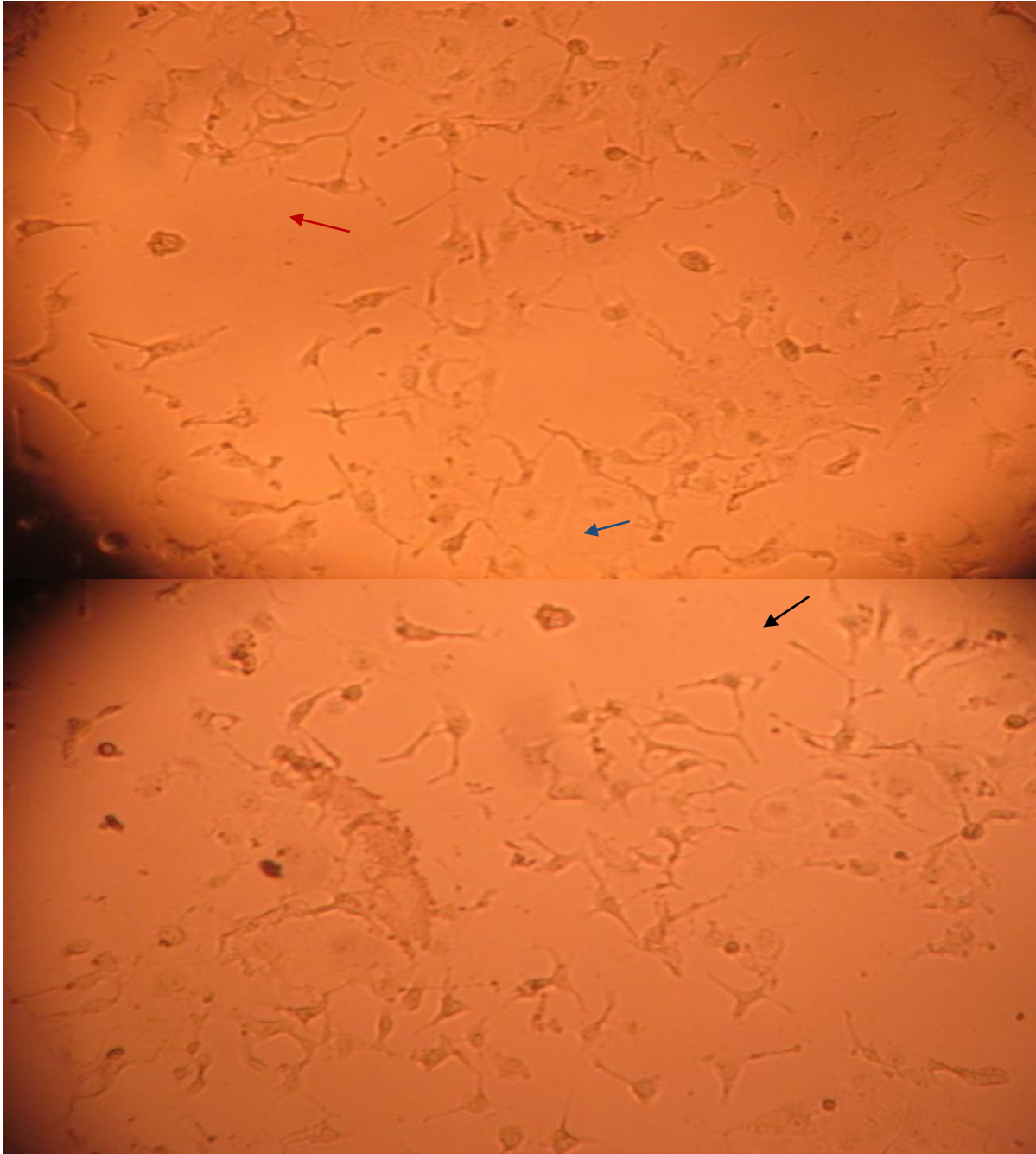


Imagen No. 18. Control positivo por duplicado utilizando células infectadas con VPRRS, línea celular MARC-145. Microscopía óptica 20x.

En la Imagen No. 19, es posible observar pérdida del monoestrato (flecha en rojo), redondeamiento de células (flecha en azul) y el alargamiento de las mismas que denota su pérdida de viabilidad (flecha en negro).



Imagen No. 19. Muestra de tonsila, lechón 3 de Guanajuato, AV positiva línea celular MARC-145. Microscopía óptica 10x.

En la Imagen No. 20, es posible ver mayor cantidad de células redondeadas, algunas de ellas con presencia de vacuolas (flecha azul) también se puede observar aunque en menor cantidad, la pérdida de monoestrato que presenta esta muestra solo en algunas zonas (flecha roja), de igual manera , el alargamiento de células es notorio (flecha negra).

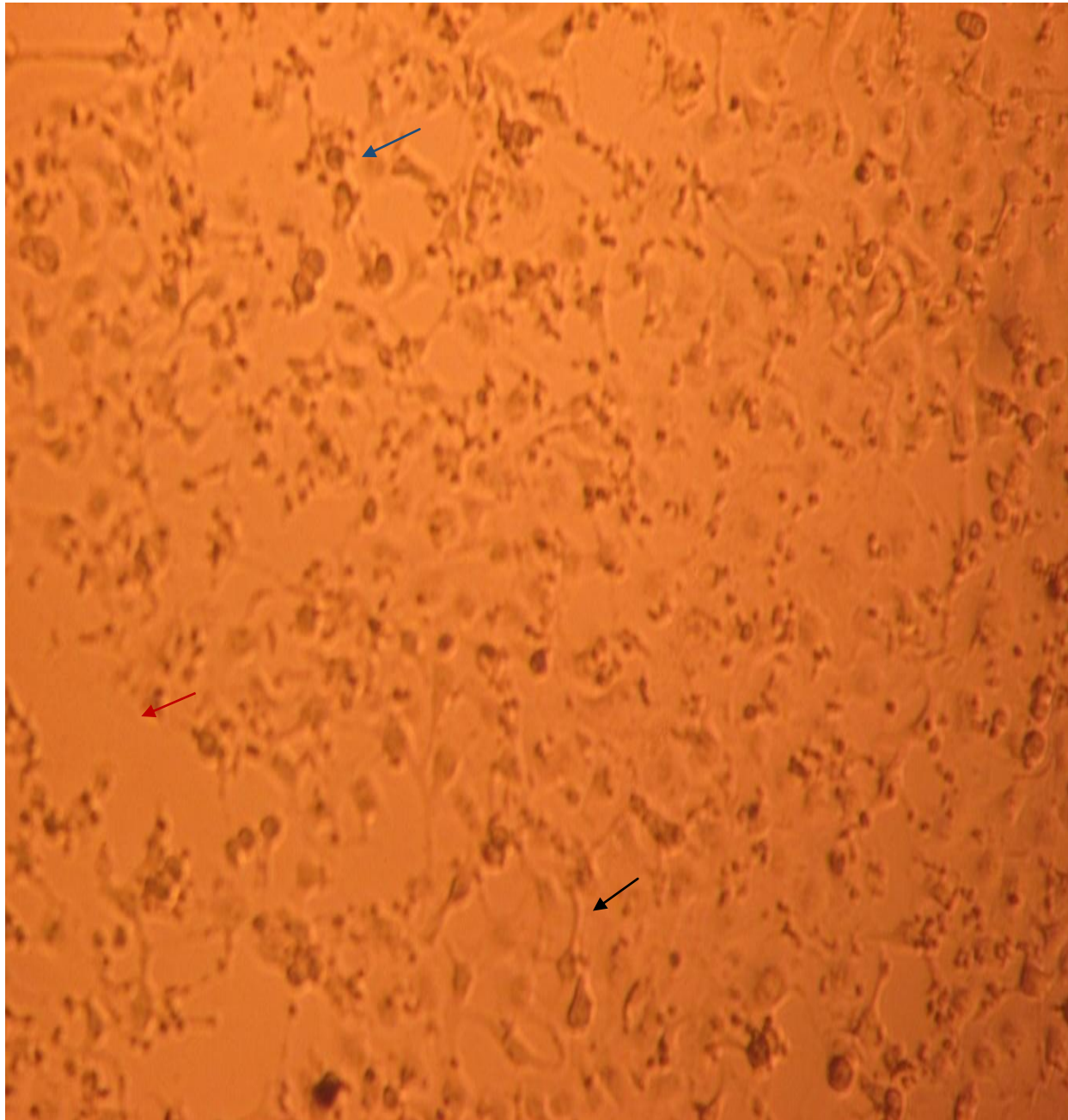


Imagen No. 20. . Muestra de ganglio retrofaríngeo, Lechón 3 del estado de Veracruz, AV positiva línea celular MARC-145. Microscopía óptica 20x.

En la Imagen No. 21 es posible ver un daño casi total en la población de células, que ya se encuentran casi en su totalidad desprendidas, el monoestrato se perdió casi por completo (rojo) y solo quedaron algunos islotes de células, las cuales, en su mayoría presentan redondeamiento y daño en su estructura (negro).

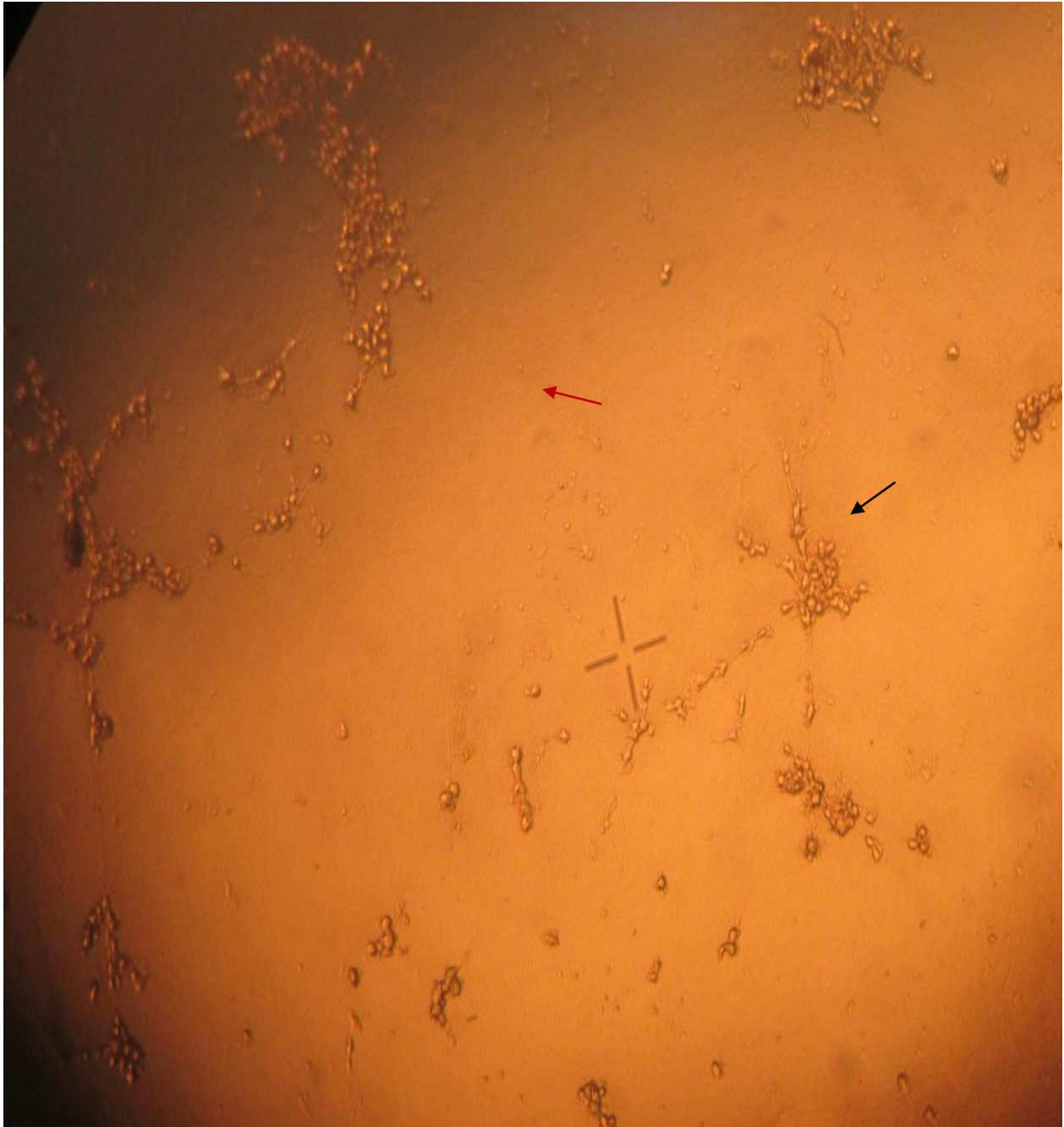


Imagen No. 21. Muestra de tonsila, lechon 1 del estado de Gauanajuato, AV positiva línea celular MARC-145.
Microscopía óptica 10x.

En la Tabla No. 2, observamos que en cuanto al RT-PCR en tejidos, el virus se encontró en: 3 de 61 muestras de Querétaro, 26 de 37 en Guanajuato, 8 de 10 en Puebla, 4 de 4 de Veracruz, y 4 de 6 en el estado de Michoacán. En cuanto al aislamiento, en el primer pase se obtuvieron 7 de 37 en Guanajuato, 1 de 4 en Veracruz y 1 de 6 para el estado de Michoacán. En el tercer pase 2 de 37 positivas en el estado de Guanajuato y 1 de 4 en el estado de Veracruz. La IFD se realizó solo en siete de las 9 muestras positivas del primer pase; seis de Guanajuato y una de Veracruz, las dos faltantes no se hicieron debido a que los monoestratos se desprendieron totalmente en el proceso de tinción. La IFD se hizo en el primer pase, ya que fue en éste en donde se obtuvo mayor número de casos positivos en comparación con el tercer pase.

En la Tabla No. 3, se observa el número de muestras positivas al VEOA y al VPRRS por RT-PCR y al PCV-2 por PCR. En relación al VEOA, del tercer pase en CC, fueron positivas: 15 de 61 en Querétaro, 5 de 37 en Guanajuato, y 3 de 6 en Michoacán, respectivamente. Para el PCV2, también del tercer pase en CC, el número de muestras positivas fue de: 15 de 61 en Querétaro, 10 de 37 en Guanajuato, 4 de 10 en Puebla, 2 de 4 en Veracruz y 3 de 6 en Michoacán, respectivamente. En el caso del VPRRS el número de muestras positivas, a partir de primer pase de CC, se obtuvieron 7 de 37 en el estado de Guanajuato, 1 de 4 en el de Veracruz y 1 de 6 para el estado de Michoacán, respectivamente.

En la Tabla No. 4, se muestra que, en el primer pase, nueve muestras que mostraron ECP fueron positivas al AV, lo que se confirmó por RT-PCR para VPRRS. De las nueve muestras positivas, sólo se trabajaron 7 para IFD, dado que el monoestrato de las otras dos se desprendieron totalmente. En el tercer pase las muestras 7 y 8 mostraron ECP y además fueron positivas para el VPRRS por RT-PCR, y también para el AV, la muestra 102, 138 y 143 mostraron ECP pero fueron negativas a las otras pruebas, la muestra 139, no presentó ECP, pero fue positiva por RT-PCR a la EOA, la muestra 140 presentó ECP y fue positiva a la RT-PCR para EOA, en la muestra 10 de Veracruz ya no se observó ECP sin embargo también se mantuvo el aislamiento del VPRRS y la muestra 148 mostró ECP y fue positiva a los tres virus.

Tabla No. 2. Resultados de la identificación del VPRRS, por RT-PCR, en muestras de tejido y en CC; así como resultados por IFD.

Estado	Número de granjas y total de muestras/ Tejidos	Resultado RT-PCR/VPRRS en tejido (+)	%	Resultado RT-PCR/VPRRS S 1 ^{er} Pase en CC (+)	%	IFD VPRRS 1 ^{er} Pase (+)	%	Resultado RT-PCR/VPRRS 3 ^{er} Pase en CC (+)	%
Querétaro	10 Granjas (61 muestras)	3/61	4.9	0/61	0	0/0	NSH	0/61	0
Guanajuato	8 Granjas (37 muestras)	26/37	70.2	7/37*	18.9	6/37	16.2	2/37	5.4
Puebla	3 Granjas (10 muestras)	8/10	80	0/10	0	0/0	NSH	0/10	0
Veracruz	1 Granja (4 muestras)	4/4	100	1/4	25	¼	25	¼	25
Michoacán	1 Granja (6 muestras)	4/6	66.6	1/6*	16.6	0/0	NSH	0/6	0

NSH: NO SE HIZO.

*Una de las muestras de Guanajuato y Michoacán, se desprendió el monoestrato, por lo que no se pudo hacer la IFD.

En la Imagen No. 22 se observan los resultados de la prueba de RT-PCR para la detección del virus del PRRS a partir de tejidos de cerdos. Tamaño del producto de amplificación: 300 pb. Estado de Querétaro granja 5: carril 1, marcador de tamaño; carril 2, tonsila; carril 3, linfonodo; carril 4, pulmón; carril 5, tonsila; carril 6, control positivo; carril 7, control negativo.

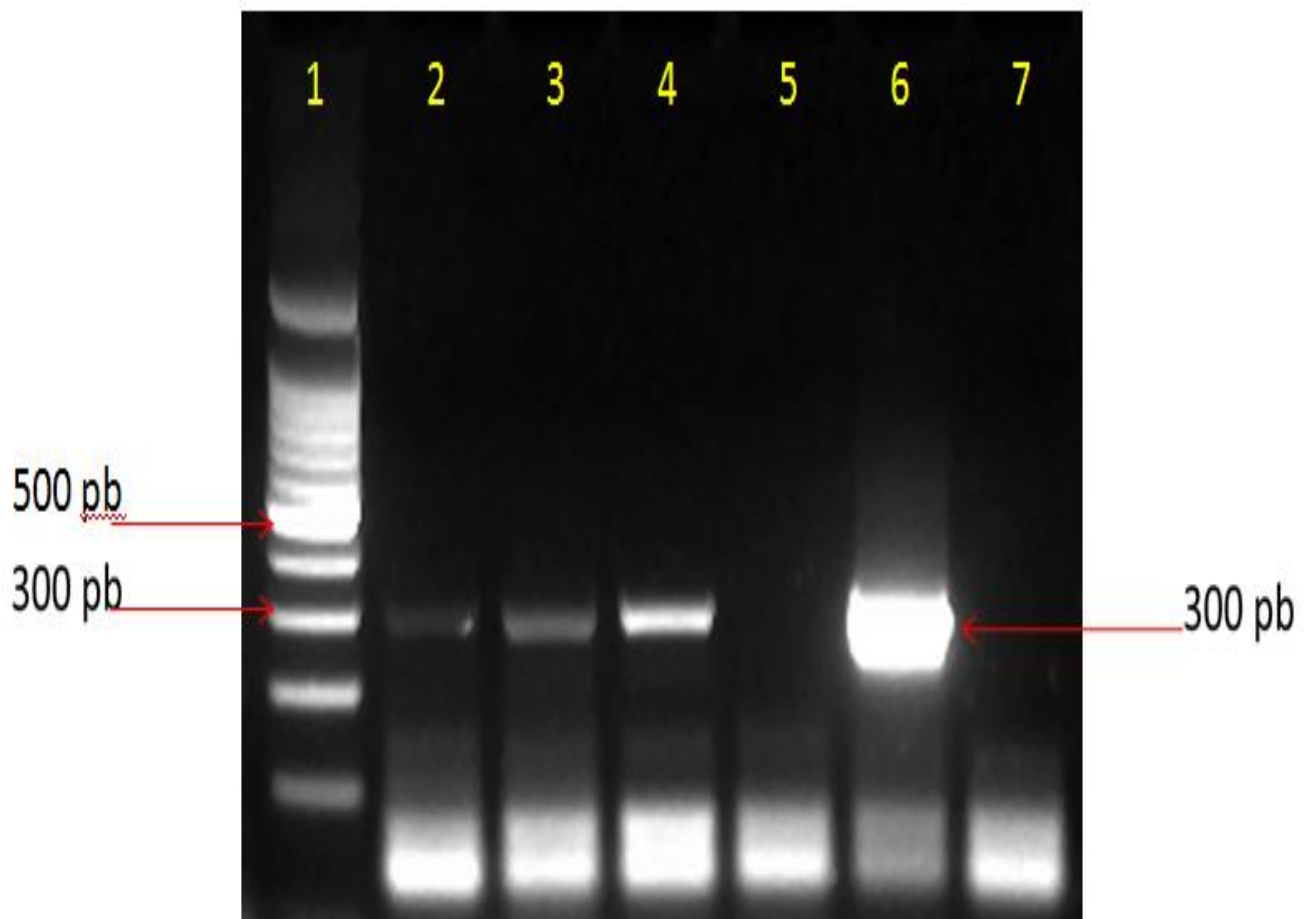


Imagen No. 22. RT- PCR para la detección del VPRRS. Tamaño del producto de amplificación 300 pb.

Respecto a la técnica de inmunofluorescencia se evidenciaron los islotes de células que se encontraban infectadas, resaltando la tinción del citoplasma.

En la Imagen No. 23, se observan las células que quedaron fijas en la laminilla y que muestran fluorescencia negativa., utilizando el conjugado SDOW-17.

En la Imagen No. 24, se observan islotes de células que muestran fluorescencia alrededor del citoplasma (40x)

En Imagen No. 25, se puede observar mayor confluencia de células que se encuentran teñidas por el conjugado y gracias a ello muestran fluorescencia.

En las imágenes Nos. 26 y 27, se observa buena confluencia de células, las cuales en su mayoría se encuentran teñidas con el conjugado mostrando la fluorescencia positiva alrededor del núcleo.

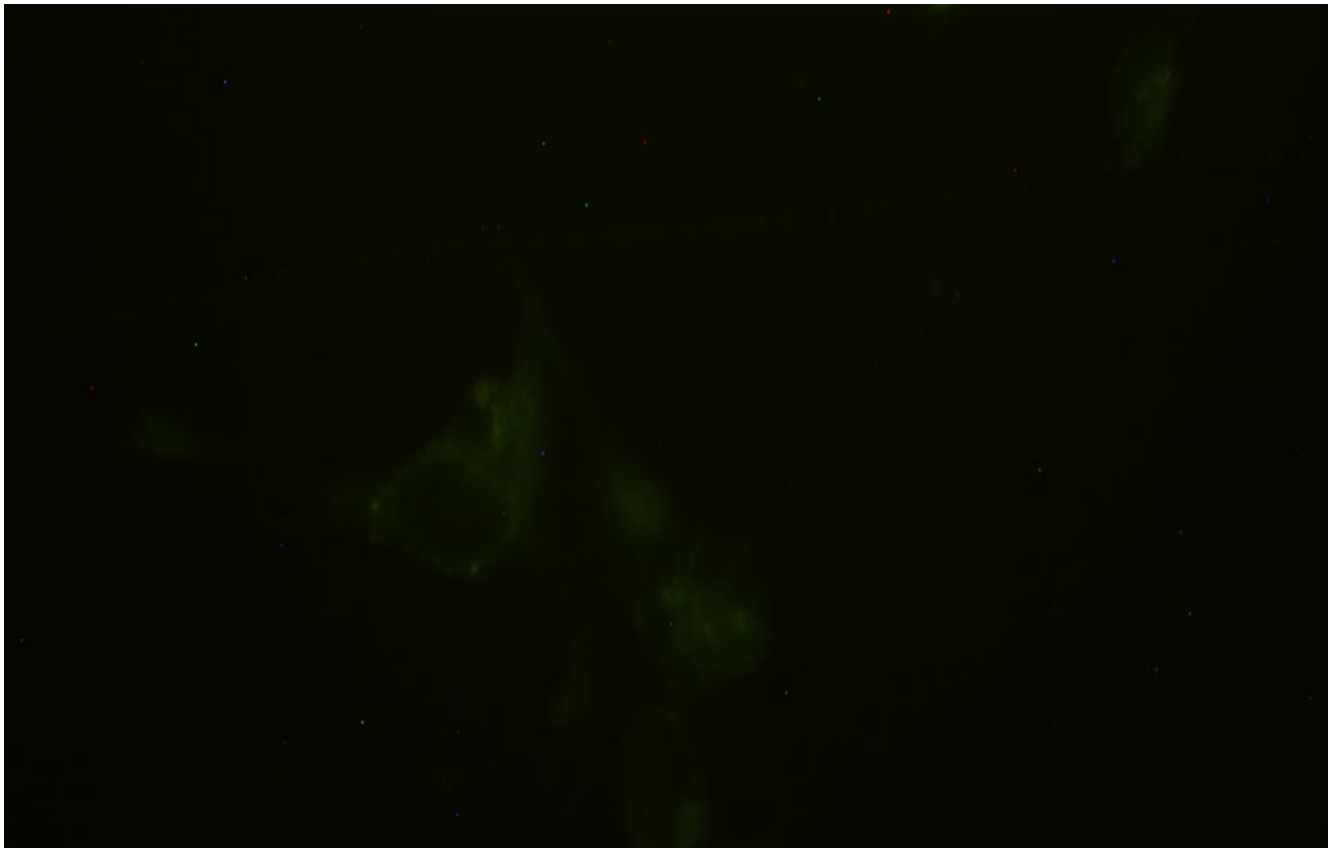


Imagen No. 23. Imagen del control negativo para la técnica de IFD. Microscopía óptica 40x.

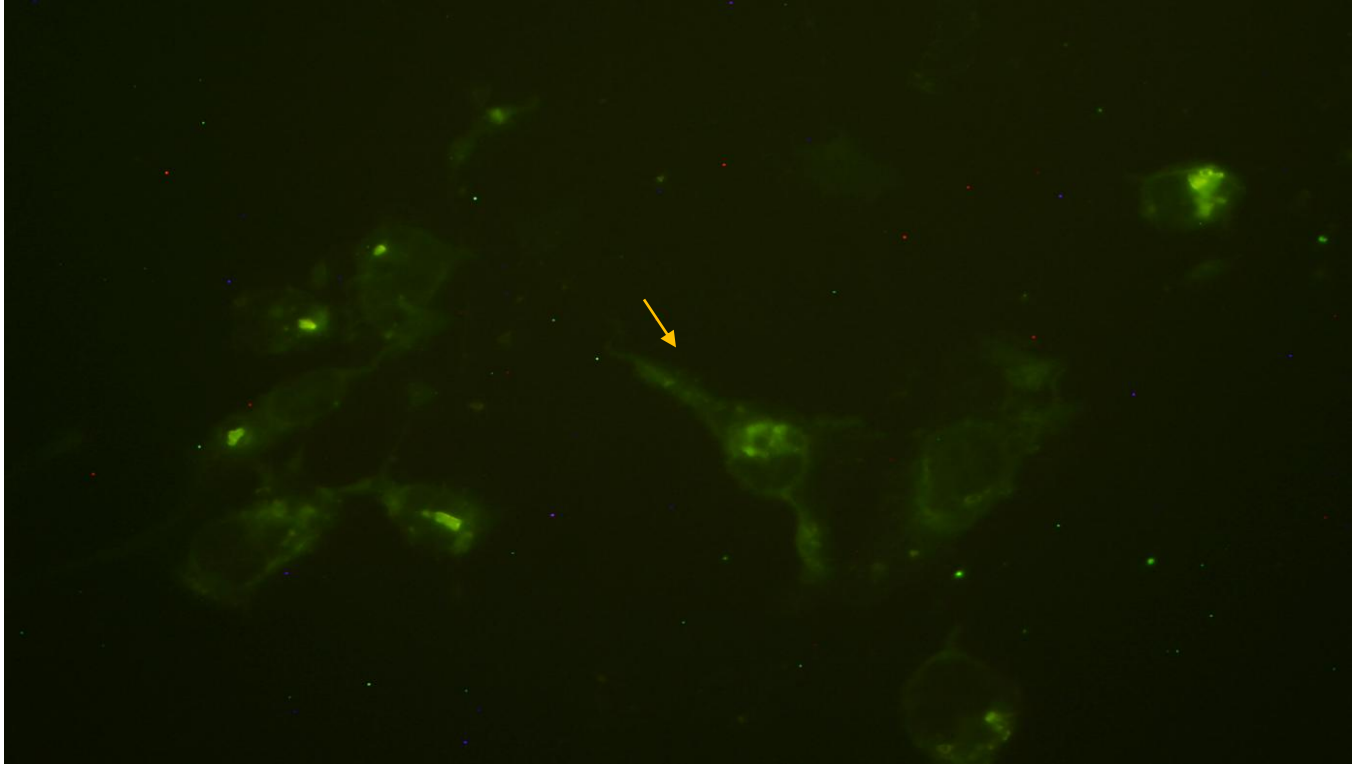


Imagen No. 24. Imagen de IFD positiva en células MARC-145. Microscopía óptica 40x, (Flecha amarila)

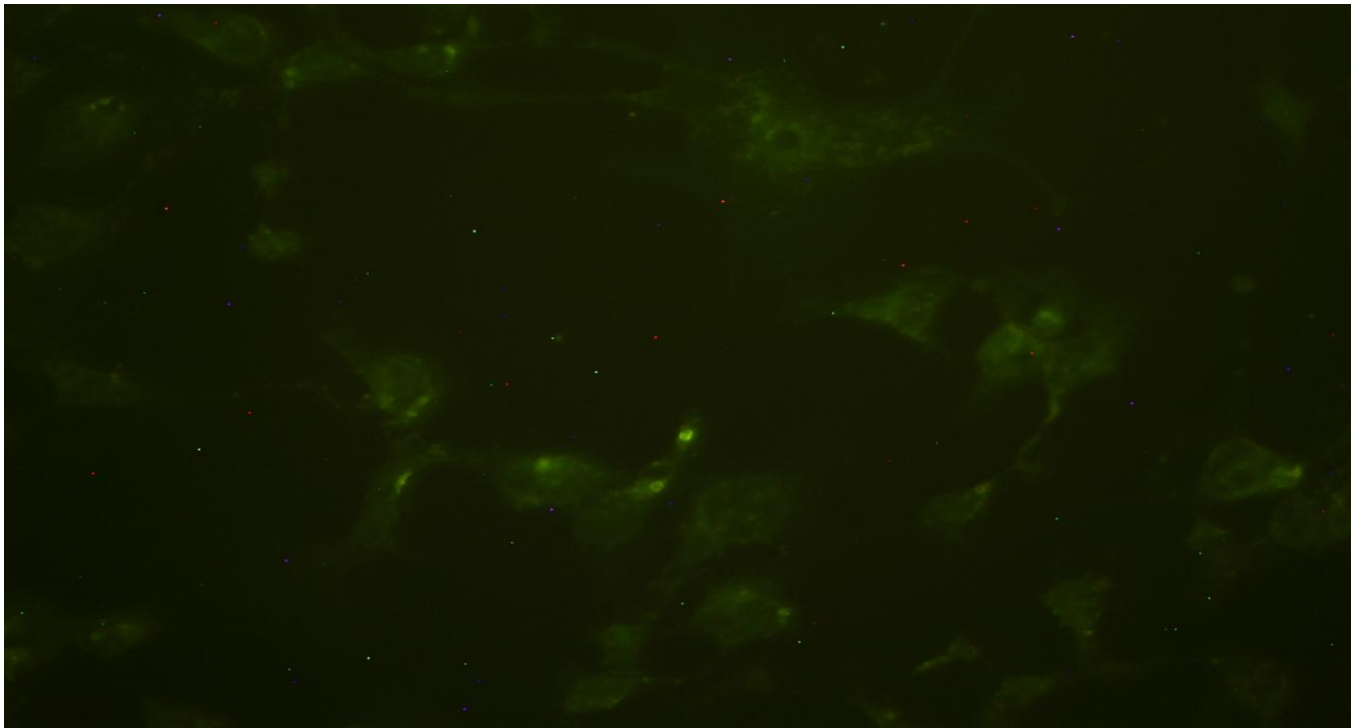


Imagen No. 25. Islotes de células MARC-145 infectadas con VPRRS y evidenciadas por IFD. Microscopía óptica 40x.

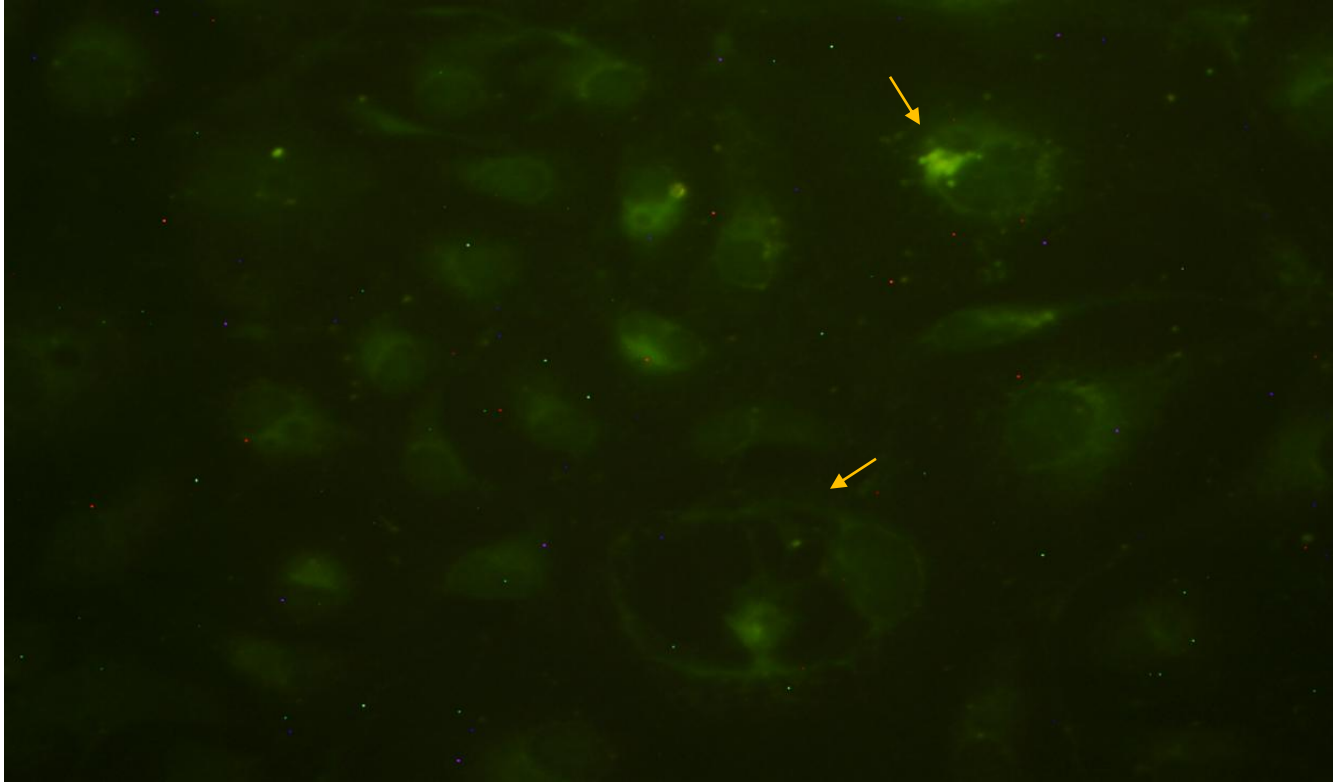


Imagen No. 26. Imagen de IFD positiva. Microscopía óptica 40x. Islotes de células (flecha amarilla)

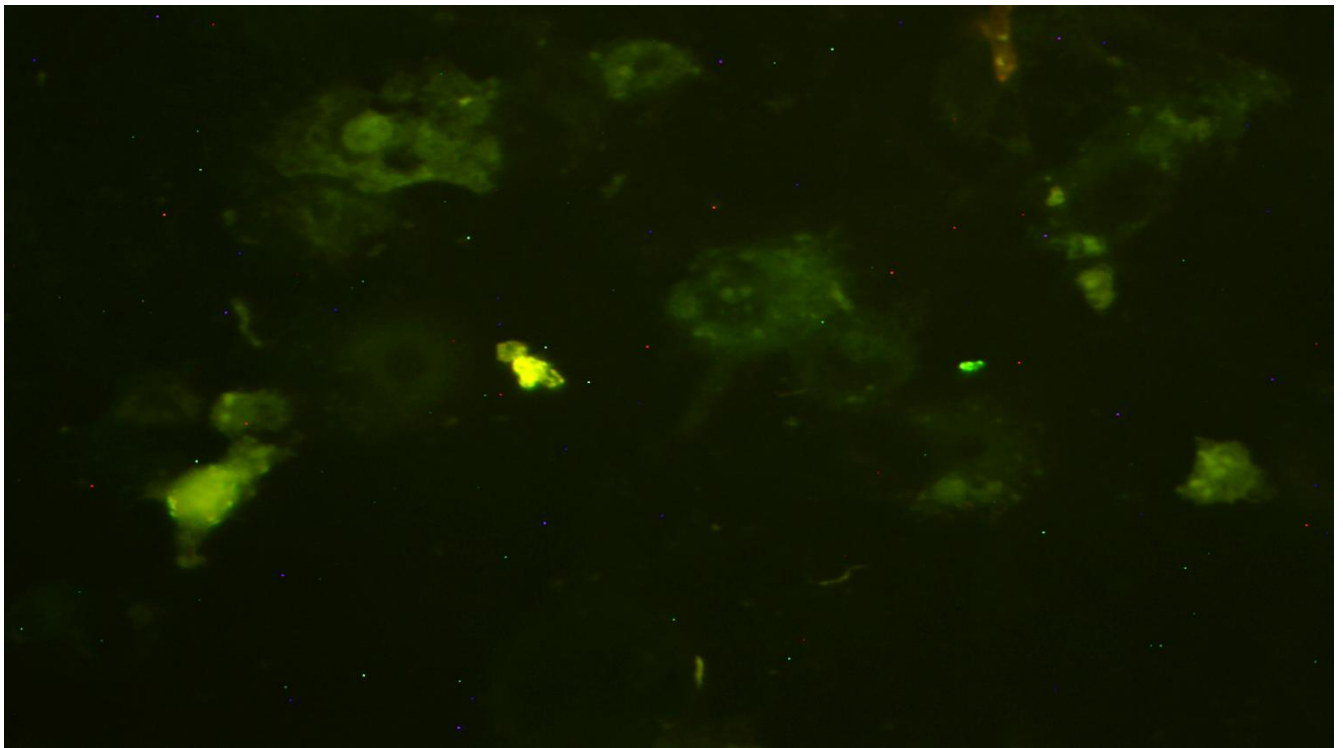


Imagen No. 27. Imagen de IFD positiva. Microscopía óptica 40x.

Tabla No. 3. Resultados de la identificación mediante la técnica de RT-PCR para los virus de PRRS y EOA, primer y tercer pase en CC, respectivamente; y la identificación mediante PCR del PCV2, tercer pase en CC.

Estado	Número de granjas y total de muestras	RT-PCR PARA VEOA, tercer pase	%	PCR PARA PCV 2, tercer pase	%	RT-PCR PARA VPRRS, primer pase	%
Querétaro	10 Granjas (61 muestras)	15/61	24.6	15/61	24.6	0/61	0
Guanajuato	8 Granjas (37 muestras)	5/37	13.5	10 /37	27	7/37	18.9
Puebla	3 Granjas (10 muestras)	0/10	0	4/10	40	0/10	0
Veracruz	1 Granja (4 muestras)	0/4	0	2/4	50	1/4	25
Michoacán	1 Granja (6 muestras)	3/6	50	3/6	50	1/6	16.6

En la Imagen No. 28, se muestra la banda de amplificación de la prueba de RT-PCR para la detección del virus del PRRS a partir de sobrenadantes de CC de tejidos de cerdos. Estado de Guanajuato, granja 8: Carril 1, tonsila lechón 1; Carril 2, pulmón lechón 1; Carril 3, linfonodo lechón 1; Carril 4, pulmón lechón 2; Carril 5, Control positivo; Carril 6, Control negativo; Carril 7, marcador de tamaño.

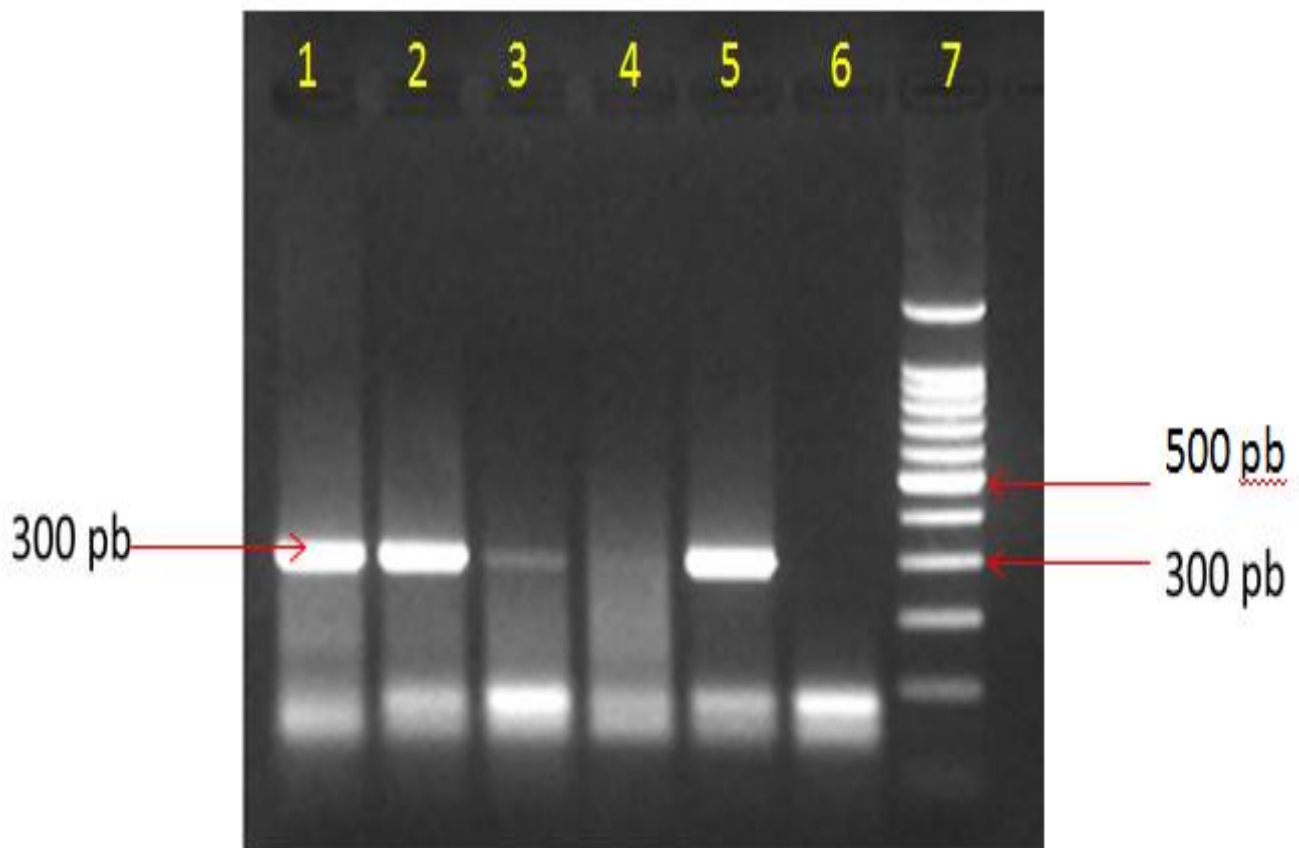


Imagen No. 28. RT-PCR para la detección del virus del PRRS. Tamaño del producto de amplificación: 300 pb

Debido a que en algunas muestras se presentó ECP y dieron un resultado negativo a VPRRS por RT-PCR, se determinó realizar la identificación de otros virus que actualmente se encuentran afectando a las pjaras. Los resultados del diagnóstico se muestran en la tabla 3.

En la Imagen No. 29, observamos la banda de amplificación de la prueba de RT-PCR para la detección del VEOA a partir de sobrenadantes de CC del tercer pase de tejidos porcinos. Estado de Michoacán, granja 1: carril 1, control positivo; carril 2 tonsila lechón 1.; carril 3, pulmón lechón 1; carril 4, linfonodo submaxilar lechón 1; carril 5, tonsila lechón 2; carril 6, pulmón lechón 2; carril 7, linfonodo submaxilar lechón 2; carril 8, control negativo; carril 9, marcador de tamaño. Producto de amplificación, 375 pb.

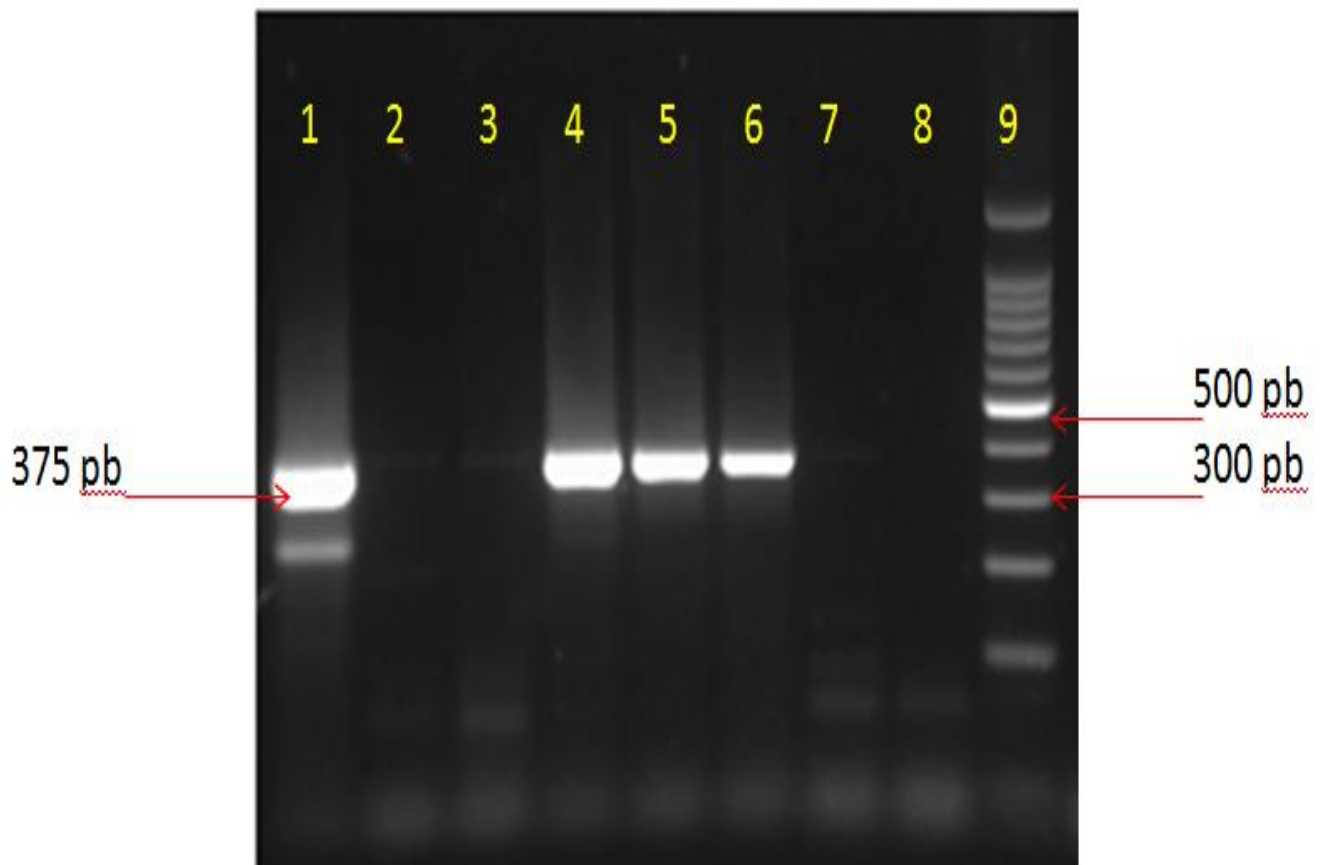


Imagen No. 29. RT- PCR para la detección del virus de la EOA. Tamaño del producto de amplificación, 375 pb.

En la Imagen No. 30, se muestra la banda de amplificación por PCR para la detección del PCV2 a partir de sobrenadantes de CC, tercer pase, de tejidos de cerdos. Estado de Querétaro, granja 2: carril 1, marcador de tamaño; carril 2, linfonodo retrofaríngeo lechón 1; carril 3, tonsila lechón 1; carril 4, pulmón lechón 2; carril 5, linfonodo retrofaríngeo lechón 2; carril 6, control positivo; carril 7, control negativo. Tamaño del producto de amplificación: 703 pb.

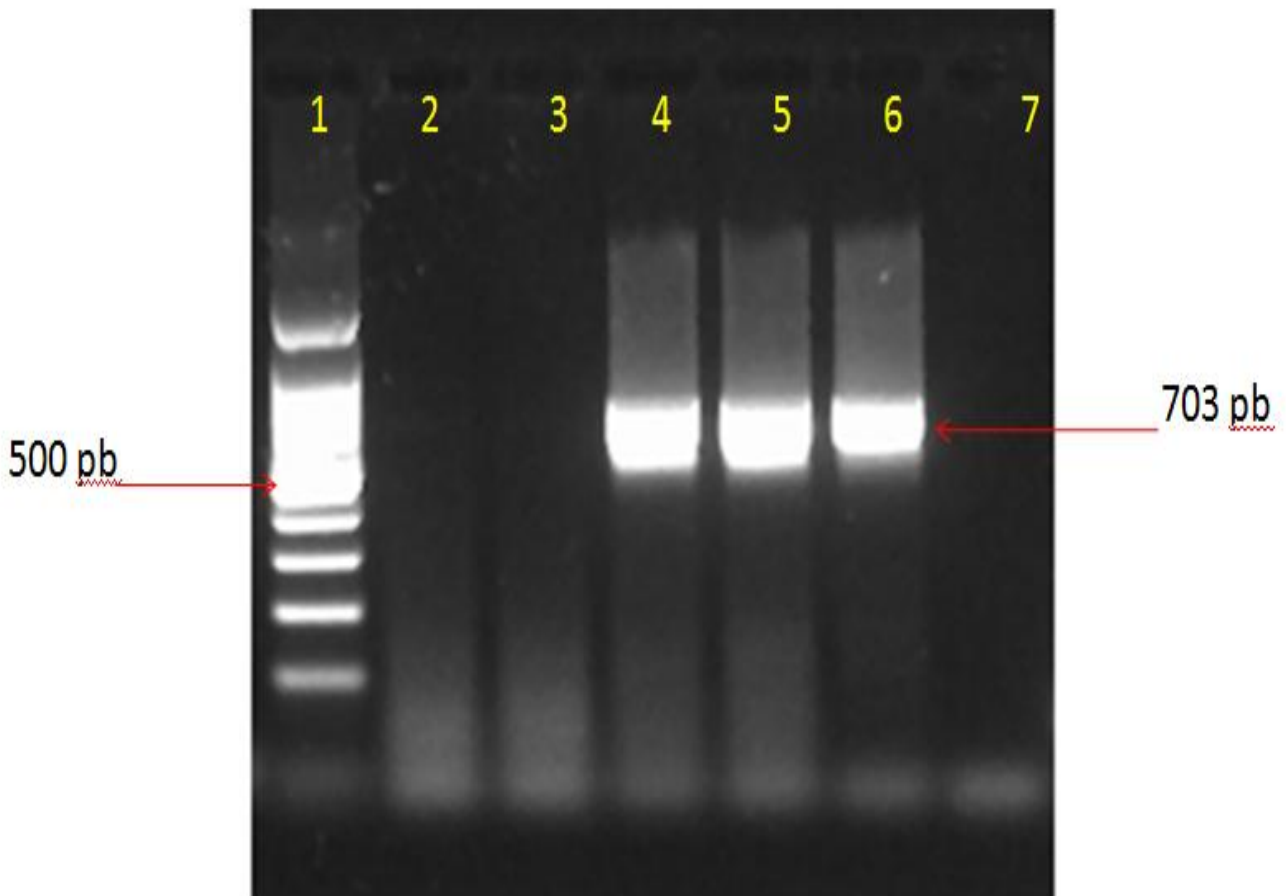


Imagen No. 30. PCR para la detección del circovirus porcino tipo 2. Tamaño del producto de amplificación: 703 pb.

En la Imagen No. 31, se muestran dos fotografías con monoestratos de células MARC-145. En la imagen A, se puede observar un sincitio localizado en la parte central del campo (microscopía óptica 5x, flecha azul). En la imagen B, se observa el mismo sincitio, pero con mayor aumento (microscopía óptica 20x flecha azul). Este ECP, una de las características del VEOA, indica la posible presencia del VEOA; el cual se confirmó más tarde por RT-PCR.

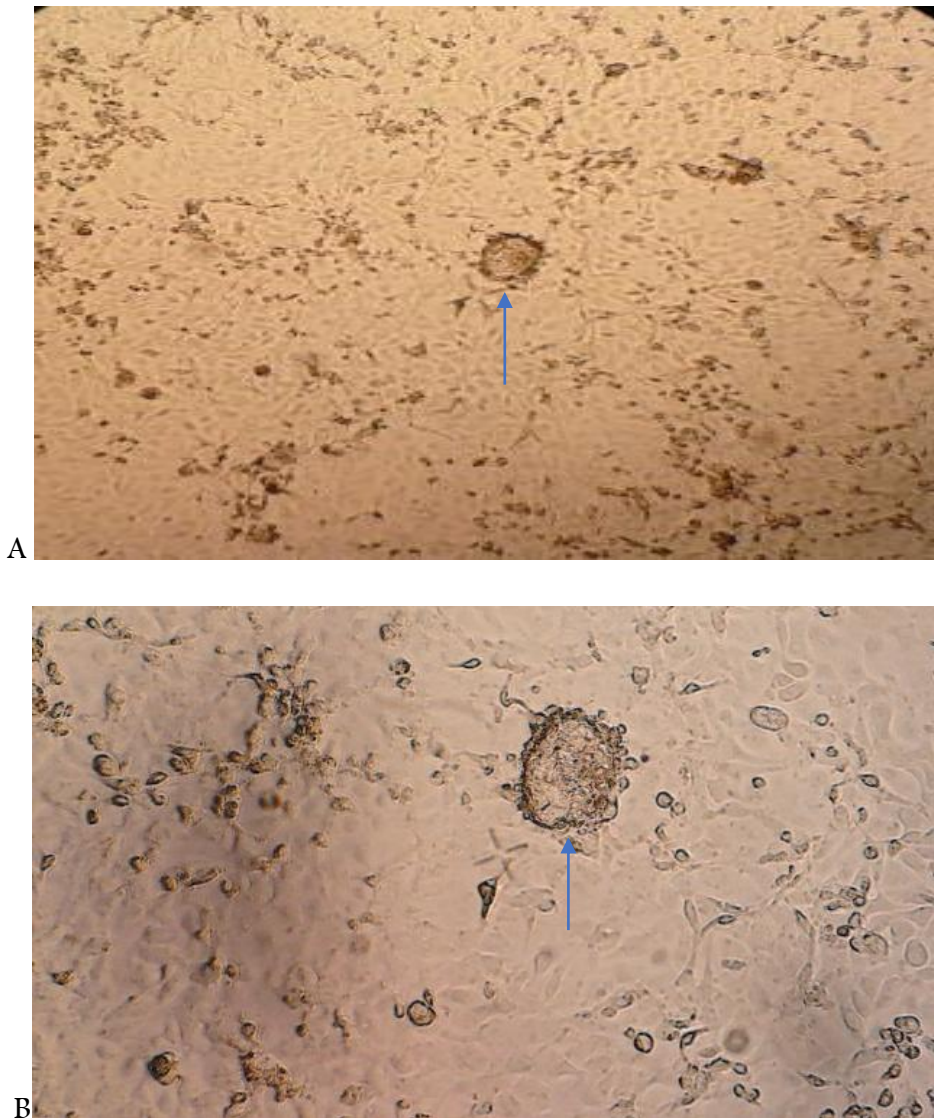


Imagen No. 31. Línea celular MARC-145, evidenciando un ECP característico de algunos paramixovirus y del VEOA.

Tabla No. 4. Se muestran los siguientes resultados de: i) ECP, RT-PCR, AV e IFD, para VPRRS, de sobrenadantes de CC-MARC-145 inoculadas con macerados de tejidos porcinos (primer pase); ii) AV, ECP, RT-PCR (PRRS Y EOA), PCR (PCV2) de sobrenadante de CC, pertenecientes al tercer pase del espécimen, en células MARC-145.

Estado	Número de muestra	PRIMER PASE				TERCER PASE				
		ECP	RT-PCR PRRS	AV PRRS	IFD PRRS	ECP	AV	RT-PCR PRRS	RT-PCR EOA	PCR PCV2
Guanajuato	7	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	8	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	102	+	+	+	-	+	-	-	-	-
	138	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	139	+	+	+	+	-	-	-	+	-
	140	+	+	+	+	+	-	-	+	-
	143	+	+	+	NSH	+	-	-	-	-
Veracruz	10	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Michoacán	148	+	+	+	NSH	+	-	+	+	+

NSH: NO SE HIZO

7. DISCUSIÓN

Actualmente la enfermedad del PRRS es considerada como una de las más importantes debido a que causa grandes pérdidas económicas a la porcicultura mundial y nacional. La detección oportuna de esta enfermedad, ayuda a implementar medidas de control para disminuir el impacto de la misma en las granjas.

En México, los estudios serológicos realizados desde 1995, han indicado que el PRRS se encuentra ampliamente distribuido y es común encontrar cerdos con anticuerpos en la mayoría de las granjas tecnificadas (Weirmersheimer, *et al.* 1997; Morilla *et al.*, 2003; Riveroll, 2013)

Sin embargo, en pocos estudios se enfoca a llevar a cabo la detección del VPRRS, empleando el aislamiento viral y corroborándolo con RT-PCR ya que en la práctica clínica no es muy costoso.

En este estudio, el objetivo fue aislar en cultivo celular al VPRRS a partir de muestras de tejidos y corroborar su presencia empleando las técnicas de RT-PCR e IFD.

El aislamiento viral constituye una técnica de diagnóstico muy importante, pero poco utilizada debido a la infraestructura necesaria para llevarla a cabo. Es posible aislar el virus de varios órganos y tejidos incluyendo el pulmón, la médula ósea, el bazo, el timo, las amígdalas palatinas (tonsilas), los ganglios linfáticos, el corazón, el cerebro, el hígado y el riñón (van Alstineei *et al.*, 1993).

En el laboratorio el virus puede cultivarse en MAPs obtenidos por lavado pulmonar (Wensvoort *et al.*, 1991) o en líneas celulares establecidas procedentes de riñón de mono (CL-2621 y MA-104) (Benfield *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1993). Se ha descrito que aunque para el aislamiento se recomienda el uso de MAPs, existe variabilidad entre grupos de macrófagos en cuanto a su susceptibilidad frente al virus, ya que hay cepas de las cuales no se logra el aislamiento como sucedió en el estudio de M. Ramírez *et al.*, 2013, por tanto es necesario identificar a un grupo de MAPs con elevada afinidad al virus, por lo que se utilizan las líneas celulares susceptibles al virus para su replicación (OIE, 2008).

En el presente trabajo, se empleó para el aislamiento viral, la línea celular MARC-145, porque es una de las líneas susceptibles reportadas para el aislamiento (OIE, 2008).

Inicialmente, para este estudio todas las muestras de tejido se analizaron por la técnica de RT-PCR punto final, para detectar el producto del ORF 7 que amplifica un tamaño de 300 pb.

En el estado de Veracruz y Michoacán sólo fue posible muestrear una granja de cada estado. Por medio de la técnica de RT-PCR en tejido, se logró detectar al virus en el 100 % (4/4) de las muestras de Veracruz, y en un 66 % (4/6) de las de Michoacán (Tabla No. 2).

Como se observa en la Tabla No. 1, al realizar el cultivo celular, en el primer pase de las muestras de estos dos estados, se observó ECP en un 16.66 % (1/6) en las muestras de Michoacán. En Veracruz, en un 25 % (1/4) del primer pase; al llevar a cabo un tercer pase se pudo observar en el 50 % (2/4) de las muestras en el estado de Veracruz, y en el de Michoacán se observó en un 50 % (3/6). Posteriormente, a estas muestras a partir de cultivo celular se les realizó la prueba de RT-PCR, tanto al primer como al tercer pase, y fue posible detectar al virus en una muestra del primer pase de cultivo celular correspondiente al estado de Michoacán y una muestra de Veracruz se detectó en tanto en el primer como en tercer pase (Tabla No. 2), no obstante que presentaban ECP en ambos pases (primero y tercer pase) esto pudo deberse a que estaban presentes los demás virus, principalmente VEOA, ya que PCV2 no produce ECP.

Con relación al estado de Querétaro de igual manera, al realizar el RT-PCR a partir de las muestras de tejido, se detectó el virus en un 4.9% (3/61) (Tabla No. 2). Se observó ECP sugerente del VPRRS en un primer pase de CC en el 3.27 % (2/61) muestras, observándose posteriormente en un tercer pase el ECP solo en un 1.6% (1/61) (Tabla No. 1), pero al realizar una prueba de RT-PCR, a partir de éstos, ya no se detectó presencia del VPRRS en ninguna de las muestras, sin embargo las muestras en general mostraron un ECP que pudiera ser sospechoso, ya que fueron negativas a VPRRS por RT-PCR, esto indica que los daños observados en las células no correspondieron a este virus, lo que pudiera ser consecuencia de otro (Tablas Nos. 1 y 2).

En el caso de las 3 granjas muestreadas en Puebla, se detectó al virus a partir de tejido, por la técnica de RT-PCR en un 80% (8/10) (Tabla No. 2). Con relación al CC, se observó ECP, en el 50% (5/10) de las muestras, en un primer pase, sin embargo al llevar a cabo el tercer pase, se mantuvo solo en una de las muestras (1/10) (Tabla No. 1). Posteriormente, al realizar la prueba de RT-PCR a partir del primer y tercer pase del CC, ya no se detectó presencia del virus en ninguna de las muestras. (Tabla No. 2).

En cuanto al estado de Guanajuato, los resultados de RT-PCR a partir de las muestras de tejido, se detectó al virus en un 70.2 % de las muestras (26/37) y con relación al AV tanto en el primer como en el tercer pase fue posible observar ECP en (8/37), cabe mencionar, que aunque es el mismo número de muestras no en todos los casos suelen ser las mismas (Ver Tabla No. 1 en anexos).

Al confirmar la presencia del virus por RT-PCR, en primer y tercer pase a partir de CC, se detectó, la presencia del virus en un 18.9 % (7/37) y 5.4 % (2/37) respectivamente (Tabla No. 2).

Cabe aclarar que la técnica apropiada para realizar el aislamiento viral, indica que la rutina es dar tres pases ciegos, que fue lo que se realizó en este estudio. Sin embargo, al término del tercer pase, solo se pudo detectar al virus en tres de las muestras por RT-PCR, por lo cual se procedió a aplicar esta misma técnica también al primer pase, obteniendo con ello nueve muestras positivas, es por esto que se realizó a estos dos pases y no al segundo. En cuanto al ECP, se observó el mismo comportamiento en las células en los tres pases, ya que no hubo una variación significativa.

Como lo menciona Ramírez M *et al.*, (2013) esto puede deberse a que la prueba de RT-PCR es más sensible que el aislamiento viral para identificar cerdos infectados con VPRRS (Wills *et al.*, 2003; OIE, 2008; Ruiz *et al.*, 2009); ya que la primera puede detectar no solo al virus sino también sólo una parte de su genoma, aunque no se encuentre viable, por lo cual, al ser analizadas las muestras de tejido por esta técnica, se logra realizar la detección del virus en mayor porcentaje de positivos con relación al AV, pues éste requiere la presencia del virus viable para que pueda replicarse, y además la sensibilidad de la prueba puede estar afectada

por el proceso de toma de muestras, incluyendo la temperatura a la que son conservadas y el intervalo transcurrido desde la recogida (Dee, 2006).

También podría considerarse que en el manejo experimental en el laboratorio pudo haberse inactivado ya que es un virus muy susceptible a las condiciones de temperatura y pH.

Aparte de realizar RT-PCR a las muestras que salieron positivas, también se les hizo la prueba de IFD, como técnica de diagnóstico alterna, ya que es otra opción para la corroboración del VPRRS, tanto en cortes de tejido como en células infectadas utilizando anticuerpos monoclonales conjugados con fluoresceína (Benfield *et al.*, 1992; Nelson *et al.*, 1992; Yoon *et al.*, 1992b; OIE, 2008).

En este trabajo se utilizó el anticuerpo monoclonal SDOW-17, conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) el cual reacciona con un epítipo de proteína de la nucleocápside específica al virus de PRRS y con un alto grado de especificidad para cepas tanto europeas como americanas (Sierra *et al.*, 2000).

En las muestras donde se logró aislar con éxito el virus, fue posible llevar a cabo la IFD, a partir del primer pase del CC, detectándose la presencia del virus en un 77.7% (7/9) 6 muestras del estado de Guanajuato y una del estado de Veracruz. En este caso, el conjugado utilizado fue donado, y ya se encontraba en una dilución adecuada según las especificaciones de donde se realizó la titulación por lo tanto, no se tuvo la oportunidad de titularlo nuevamente y se usó como tal. Esto puede explicar la tinción un poco difusa de las muestras, aunado a que muy posiblemente los virus aislados, hayan sufrido algún grado de mutación y el AC monoclonal SDOW-17, no haya sido muy sensible para la detección de la proteína de la nucleocápside, ya que si bien la técnica de IF posee 99.5% de especificidad, tiene baja sensibilidad (Collins *et al.*, 1996; Ramírez, 2013). Además, no obstante que el ORF-7 que codifica para la nucleoproteína es la más conservada, hay estudios donde se ha encontrado variabilidad (Macías *et al.*, 2006).

Por tal motivo la fluorescencia observada en las muestras positivas a la RT-PCR, fue débil o poco clara, a pesar de que si fue posible observar un ECP compatible al descrito al VPRRS en todas las muestras.

Con respecto a la detección de otros virus en las muestras de tejidos trabajadas, la literatura describe que existen trabajos que han encontrado la asociación de éste virus con otros agentes patógenos tales como el virus de influenza porcina, coronavirus respiratorio porcino, virus de Aujeszky y rubulavirus porcino en animales de granjas de ciclo completo y nuestro (Opriessnig, 2013).

En este estudio, en algunas muestras de CC, se observó ECP, con sincitios sugerentes al causado por el virus del EOA, con resultado negativo al RT-PCR para PRRS. Por lo que se llevó a cabo la técnica de RT-PCR para la detección del VEOA, con el objeto de poder detectar la presencia de otros virus que pudieran estar involucrados, considerando que se podría esperar un resultado negativo, ya que en la literatura no está reportado que los virus trabajados repliquen en la línea celular utilizada, ya que se han utilizado principalmente para el aislamiento del VPRRS.

Hasta la fecha, es la primera vez que se detecta la presencia del VEOA en muestras trabajadas con células MARC-145 ya que diferentes autores han mencionado que el VEOA replica en una amplia variedad de cultivos celulares sin incluir a las MARC-145 (Martínez *et al.*, 1985; Moreno-López *et al.*, 1986; Stephano, 1985; Stephano, 1988).

En el caso de PCV2, encontramos, que se pudo aislar en las células MARC-145, en donde no se observó ECP, pero si fueron positivas por PCR; de acuerdo a la literatura, éstas células no son las apropiadas para aislar a PCV2. En este sentido nuestros hallazgos, concuerdan con lo que refiere Sánchez-Vizcaíno *et al.*, 2000, ya que también menciona, que el PCV2 no produce ECP por lo que es necesario identificarlo por medio de otras técnicas de detección viral, principalmente inmunohistoquímica o PCR.

Recientemente se ha observado y demostrado experimentalmente coinfección en la infección del virus del PRRS con el PCV2 (Peihu et al., 2013). Señalando que la infección concurrente con PRRS y PCV2 produce una neumonía más severa. (Drolet *et al.*, 2003, Peihu *et al.*, 2013).

Como se observa en la tabla 3, Con respecto a la EOA, se logró aislar e identificar mediante RT-PCR a partir del tercer pase y se puede mostrar que se encuentra en los estados de Querétaro, Michoacán y Guanajuato. Esto es un resultado esperado, ya que Michoacán y Guanajuato, son estados endémicos de esa enfermedad (Martínez *et al.*, 2012).

En el caso de Querétaro, no es endémica, pero se puede encontrar presente también, debido a que es un estado vecino de Guanajuato, y por ende hay paso obligado de camiones con cerdos vivos, provenientes de la zona occidente, hacia la zona metropolitana del Distrito Federal. Por otra parte, muy posiblemente, existe intercambio genético, mediante cerdos vivos, de la zona porcícola de occidente, hacia el estado de Querétaro; en cuanto a Veracruz y Puebla, no estuvo presente, ya que no son estados endémicos de esta enfermedad. Referente a PCV2, igualmente, se aisló a partir del tercer pase y se identificó por medio de la técnica de PCR. Esta es una enfermedad que se encuentra diseminada no sólo en todo el país sino a nivel mundial, por lo cual los resultados mostrados en la tabla coinciden con la situación actual, ya que se puede observar que se encuentra en todos los estados muestreados.

El VPRRS logró aislarse a partir del primer pase, solo en los estados de Guanajuato Veracruz y Michoacán y en cuanto al tercer pase, se mantuvieron solo 4 aislados, dos de Guanajuato , uno de Veracruz y uno de Michoacán.

La enfermedad más común que encontramos en su mayoría fue PCV2, ya que estuvo presente en todos los estados donde realizamos el monitoreo. Veracruz fue uno de los estados con más incidencia de esta enfermedad con un 50% (2/4) de muestras positivas, tomando en cuenta también que se logró obtener un aislado del VPRRS, en un 25 %, una de las cuatro muestras que en un principio dieron positivas para el RT-PCR en tejido lo cual indica la presencia de coinfección con estas dos enfermedades.

El segundo estado con un porcentaje del 50% es Michoacán el cual en este caso, también presenta la misma incidencia de la enfermedad de EOA, con un 50%, y también se identificó al VPRRS con un 16.6%, lo cual nos habla de que en este estado, se encuentran las 3 enfermedades en el ganado porcino de las granjas muestreadas.

En cuanto a Puebla, es el estado con la tercera incidencia mayor a PCV2, con un porcentaje del 40% al aislamiento. Si observamos en la Tabla No. 2, al realizar el RT-PCR al tejido, también presenta un 60% de incidencia para el VPRRS; pero aunque presento un ECP del 50%, ya no se corroboró en el aislamiento.

Hablando de Guanajuato, en este estado, fue posible identificar los tres virus presentes en las granjas.

El virus con mayor incidencia fue PCV2 con un 27% de muestras positivas, pero además también fue el estado con mayor presencia del VPRRS, ya que tuvo una incidencia del 70.2 % en muestras de tejido, y además fue posible su aislamiento en un 18.9 % en muestras del primer pase del CC, observando un ECP en 7 de las 37 muestras trabajadas. En el caso específico de EOA, también se presentó en un 13.5 %; es el segundo estado en el cual se encuentran presentes las tres enfermedades en las granjas porcinas muestreadas.

Querétaro, fue el estado con menos presencia en el caso de la enfermedad de PRRS ya que solo se presentó en tejido en un 4.9%, pero ya no estuvo presente en la prueba del AV en el CC; las causas pudieron ser las mismas mencionadas anteriormente, sin embargo hablando sobre las otras dos enfermedades, EOA y PCV2, tuvieron la misma incidencia en las muestras con un 24.6% en ambas, por lo cual este estado aunque podría decirse que es casi libre de PRRS, las otras dos enfermedades si están presentes. Y esto explica de alguna manera, porque en el caso de la prueba de aislamiento viral, se observa en la mayoría de las muestras, un ECP, que se denominó como posible sospechoso (ver anexo tabla 1), ya que no era exactamente un ECP que esperábamos en el caso de PRRS, pero sí se presentó en algunas de las muestras, así como sincitios, singular ECP de la EOA (Imagen 31 A y B); es por esto que la presencia de este virus puede ser la principal causa del ECP.

Esto concuerda con Opriessnig (2013) mismo que menciona que cuando los pulmones y el sistema inmunitario están afectados por el virus, los cerdos son más susceptibles a otros patógenos respiratorios y septicémicos. Por lo que generalmente se podrían encontrar otros patógenos involucrados en un brote, como sucedió en este caso.

Respecto a la Tabla No. 4 podemos observar que en cuanto al primer pase, siete muestras de Guanajuato, una de Veracruz y la de Michoacán presentaron ECP y también dieron un resultado positivo para la técnica de RT-PCR logrando así su aislamiento, y siete de ellas pudieron ser corroboradas por IFD, ya que en el caso de las otras dos muestras las células se desprendieron de la laminilla y no pudo ser posible observar nada.

En el caso del tercer pase solamente en 4 de las muestras, dos procedentes de Guanajuato una de Veracruz y una de Michoacán se detectó al virus por la técnica de RT-PCR, esto quiere decir que se mantuvo el aislamiento del VPRRS, sin embargo en una de ellas (muestra 10) ya no se observó ECP en el tercer pase, esto nos puede indicar que posiblemente en el primer pase hubo un efecto tóxico del macerado, o también que esta cepa no lo produce ya que en la literatura se han descrito aislados que no producen ECP, de tal manera que es necesario realizar tinciones inmunológicas para determinar su presencia. Entre las tinciones utilizadas están la inmunofluorescencia directa (IFD) (Yoon *et al.*, 1992b) y la IPMA (Wensvoort *et al.*, 1991; Prieto C 1997.), sin embargo fue positivo para PRRS como lo mencionado por Ramírez *et al* 2013 en donde El 70% (7/10) de los aislados no presentaron lesión celular o ECP en las células pero a pesar de ello si hubo replicación.

Como podemos ver, hay un aislado que mostro ECP pero fue negativo al VEOA y otro que fue positivo al ECP y positivo a la EOA y una muestra no mostró ECP pero fue positiva a la EOA. Lo Anterior nos indica que hay VEOA, que causan un ECP claro y otros aparentemente no. (Comunicado Personal, Rivera-Benítez, 2014).

Además de observar en una de las muestras de CC, del estado de Michoacán que existe una coinfección entre los tres virus, sin embargo al llevar a cabo el tercer pase, solo se detectaron VEOA y PCV2 y el VPRRS ya no, y en tres casos a pesar del ECP positivo ya no pudimos detectar a ningún virus, esto pudo deberse muy probablemente al manejo no muy apropiado en el laboratorio, en cuanto a temperatura y pH ya que es un virus muy lábil.

CONCLUSIONES

- ✓ Se identificó mediante la técnica de RT-PCR al VPRRS en las muestras de órganos de cerdos pertenecientes a los estados de Veracruz, Michoacán, Guanajuato, Puebla y Querétaro.

- ✓ Se realizó el AV del VPRRS en muestras de cerdos pertenecientes a los estados de Guanajuato, Veracruz y Michoacán, en células MARC-145.

- ✓ Se logró identificar al VPRRS por medio de las técnicas de diagnóstico ya mencionadas, reforzando así la efectividad del diagnóstico utilizándose en conjunto en lugar de una sola técnica.

- ✓ De acuerdo a este trabajo, se observó una coinfección de VPRRS con PCV2 y EOA en cualquiera de sus combinaciones, en los animales muestreados.

- ✓ Se replicaron en la línea celular MARC-145 los virus del PCV2 y EOA, aunque inicialmente solo se buscaba aislar VPRRS, esto permite ampliar nuestras herramientas para el diagnóstico por AV.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abe JI, Che W, Yoshizumi M, Huang Q, Glassman M, Ohta S et al. Bcr in vascular smooth muscle cells involvement of Ras and Raf-1 activation by Bcr. *Ann N Y Acad Sci* (2001);947:341-343.
2. Albina E (1997). Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview. *Veterinary Microbiology*, 55, 309-316.
3. Albina E; Leforban Y; Baron T. and Vainner P. 1992 An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Ann. Rech. Veteriary* 23(2):167-176.
4. Albina E, Madec F, Cariolet R, Torrison J (1994) Immune response and persistence of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infected pigs and farm units. *The Veterinary record*, 134, 567-573.
5. Allende R, Lewis TL, Lu Z, Rock DL, Kutish GF, Ali A et al. (1999) North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. *J Gen Virol*; 80:307-315.
6. Allende R, Kutish G.F., Laegreid W., Lu Z., Lewis T.L., Rock D.L., Friesen J., Galeota J.A., Doster A.R., Osorio F.A. (2000) Mutations in the genome of porcine reproductive and respiratory syndrome virus responsible for the attenuation phenotype. *Arch Virol*. 145:1149-61.

7. Andreyev V.G., Wesley R.D., Mengeling W.L., Vorwald A.C., Lager K.M., (1997) 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* 142:993-1001.
8. An, TQ., Zhou, YJ., Liu, GQ., Tian, ZJ., Li, J., Qiu, HJ., Tong, GZ. (2007). Genetic diversity and phylogenetic analysis of glycoprotein 5 of PRRSV isolates in mainland China from 1996 to 2006: coexistence of two NA-subgenotypes with great diversity. *Vet Microbiol.* 123, 43-52.
9. Badaoui B., Grande R., S.Calza, M.Cecere, M.Luini, A.Stella and S.Botti. (2013) Impact of genetic variation and geographic distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on infectivity and pig growth. *BMC Veterinary Research*, 9:58 doi:10.1186/1746-6148-9-58.
10. Balasuriya UB y MacLachlan NJ (2004) The immune response to equine arteritis virus: potential lessons for other arteriviruses. *Vet Immunol Immunopathol* 102: 107-29.
11. Barranco I.C. (2011) "Patogenia del síndrome reproductivo y respiratorio porcino: evaluación de la expresión de citoquinas y fenómenos de apoptosis en órganos linfoides y su papel en la respuesta inmune." Servicio de publicaciones de la Universidad de Cordova.
12. Bastos R G., Dellagostin O A, Barletta R G., Doster A R., Nelson E., Zuckermann F., Osorio F A., (2004) Immune response of pigs inoculated with *Mycobacterium bovis* BCG expressing a truncated form of GP5 and M protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* 22:467-74.

13. Bautista, EM., Molitor, TW. (1997). Cell-mediated immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine. *Viral Immunol.* 10, 83-94.
14. Bautista EM and Molitor TW (1999) IFN gamma inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in macrophages. *Archives of virology*, 144, 1191-1200.
15. Benfield, D.A.; Nelson, E; Collins, J.E; Harris, L; Goyal, S.M; Robinson, D; Christianson, W.T.; Morrison, R.B; Gorcyca, D; Chladek, D. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332) (1992). *J Vet Diagn Invest*; 4 127-133.
16. Benfield, DA., Chridtopher-Hennings, J., Nelson, EA., Rowland, RRR., Nelson, JK., Chase, CCL., Rossow, KD. (1997). Persistent fetal infection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. En: *Proc.28 th Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.*, Québec, Canadá. pp. 455-458.
17. Benfield D.A., Collins J.E., DEE S.A., Hallbur P.G., Joo H.S., Lager K.M., Mengeling W.L., Murtaugh M.P., Rossow K.D., Stevenson G.W. & Zimmerman J.J. (1999). Porcine reproductive and respiratory syndrome. In: *Diseases of Swine, Eight Edition*, Straw B.E., D'Allaire S., Mengeling W.L. & Taylor D.J., eds. Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA, 201-232.
18. Bignotti E, Ferrari M, Nicoloso L, Faccini S, Ajmone-Marsan P, Nigrelli A, Moratti R. (2002) Tipizzazione molecolare di virus della PRRS isolati in campo. In: *Proceedings of the Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini*, 28, 161-166.

19. Brinton M.A., Godeny E.K., Horzinek M.C., Meulenber J.J.M., Murtaugh M.P., Plagemann P.G.W. & Snijder E.J. (2000). Arteriviridae. En: Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Maniloff J., Mayo M.A., McGeoch D.J., Pringle C.R. & Wickner R.B., eds. Academic Press, San Diego, USA, 851–857.

20. Bouma A. (2000). Transmissible virus disease in porcine reproduction. *Reproduction in Domestic Animals* 35 (6): 243–246.

21. Cafruny, W.A. and Honiven, D.E., (1988) The relationship between route of infection and minimum infectious dose: Studies with lactate dehydrogenase-elevating virus, *J. Virol. Methods*, 20, 265–268.

22. Cancel-Tirado SM., Evans RB., Yoon KJ., (2004) Monoclonal antibody analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus epitopes associated with antibody-dependent enhancement and neutralization of virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 8:249–62.

23. Cano JP.. Introduccion, diseminacion y perpetuacion del virus de PRRS en una región. (2012). La pagina del cerdo, <http://www.3tres3.com>.

24. Chang C.C., Yoon K.J., Zimmerman J.J., Harmon K.M., Dixon P.M., Dvorak C.M., Murtaugh M.P. (2002) Evolution of porcine reproductive and respiratory síndrome virus during sequential passages in pigs. *J Virol* 76:4750–63.

25. Chávez E. "Técnicas diagnósticas para el Síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS): Interpretación" Departamento Técnico - PIC México. 2006
26. Chen J., Liu T., Zhu C.G, J Y.F. "Genetic Variation of Chinese PRRSV Strains Based on ORF5 Sequence" *Biochemical Genetics* October (2006), Volume 44, Issue 9-10, pp 421-431.
27. Choi C., Christianson W., Collins J., Joo HS., Molitor T., (1992) Antibody dependent enhancement of SIRS virus replication. In *American Association of Swine Practitioners Newsletter* 4:30.
28. Christianson W T., Collins J E., Benfield D.A., Harris L.,Gorcycya DE., Chladek DW , Morrison R B., Joo HS.(1992) Experimental reproduction of swine infertility and respiratory syndrome in pregnant sows. *Am J Vet Res* 53: 485-8.
29. Christianson W T., Choi C S., Collins J E., Molitor T W., Morrison R B., Joo HS. (1993) Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses. *Can J Vet Res* 57:262-8.
30. Christopher-Hennings, J; Nelson, E.A; Benfield, D.A. (1992). Evaluation of the antibody response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRAS) by indirect fluorescent antibody (IFA), virus neutralization (VN) and immunoblotting. *73 Con Res Work Ani Dis. Chicago.* 11/9-10; 166.

31. Collins J.E., Benfield D.A., Christianson W.T., Harris L., Hennings J.C., Shaw D.P., Goyal S.M., Mccullough S., Morrison R.B., Joo H.S., Gorcyca D. & Chladek D. (1992). Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 4, 117–126.
32. Collins, J.E.; Rossow, K.D. (1996). Porcine reproductive and respiratory syndrome in the boar and sow. *Proc. Swine Reproduc. Synzpz.*, Pp. 61–70.
33. Conzelmann K.-K., Visser N., Van Woensel P. & Thiel H.J. (1993). Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group. *Virology*, 193, 329–339.
34. Darwich L, Díaz I, Mateu E (2010) Certainties, doubts and hypotheses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunobiology. *Virus Research*, 154, 123–132.
35. Dea S, Sawyer N, Alain R, Athanassious R (1995) Ultrastructural characteristics and morphogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus propagated in the highly permissive MARC-145 cell clone. *Adv Exp Med Biol* 380: 95–8.
36. Dee S, Deen J, Rossow K, Wiese C, Otake S, Joo HS, Pijoan C. (2002). Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus throughout a coordinated sequence of events during cold weather. *Can J Vet Res* 66:232–239.

37. Dee S, Deen J, Rossow K, Weise C, Eliason R, Otake S, Joo HS, Pijoan C. (2003). Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus throughout a coordinated sequence of events during warm weather. *Can J Vet Res* 67:12-19.
38. Dee S, Deen J, Burns D, Douthit G, Pijoan C. (2005). An evaluation of disinfectants for the sanitation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-contaminated transport vehicles at cold temperatures. *Can J Vet Res* 69:64-70.
39. Dee S. (2006) Vias de transmission directas e indirectas (fómites y vehículos de transporte) <http://www.3tres3.com/print/1421>.
40. Dee SA, Deen J. (2006a). Evaluation of an industry-based sanitation protocol for full-size transport vehicles contaminated with porcine reproductive and respiratory syndrome virus." *J Swine Health Prod* 14:307-311.
41. Dee SA, Joo H. (1997) Strategies to control PRRS: a summary of field and research experiences. *Vet Microbiol* 1997;55:347-353.
42. Desrosiers y Boutin, (2002) An attempt to eradicate porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) after an outbreak in a breeding herd: eradication strategy and persistence of antibody titers in sows. *Swine Health Prod* 10:23-5.
43. De Jong MF, Cromwijk W, Van't Veld P (1991). The "new" pig disease: epidemiology and production losses in the Netherlands. In: Report of a seminar/workshop on the new pig disease (PRRS), European Commission, Brussels, Belgium, pp. 9-19.

44. Delputte, PL., Meerts, P., Costers, S., Nauwynck, HJ. (2004). Effect of virus-specific antibodies on attachment, internalization and infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in primary macrophages. *Vet Immunol Immunopathol.* 102, 179-88.
45. Dial, G. D.; Hull R.D.; Olson, C.L.; Hill, H.T.; Erickson, G.A. (1990). Mystery swine disease: implications and needs of the North American swine industry. In: *MSD Comm. Meet.* Denver, USA. Pp 3-6.
46. Diaz LI, (2006) "Caracterización de la respuesta inmune de lechones durante la infección y tras la vacunación con el virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino" Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona. 5-30.
47. Díaz, I., Darwich, L., Pappaterra, G., Pujols, J., Mateu, E. (2006) Different European-type vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus have different immunological properties and confer different protection to pigs. *Virology* 351, 249-259.
48. Domingo E and Holland JJ (1997) RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol* 51: 151-78.
49. Done S. H. (1995). Síndrome Reproductivo y Respiratorio del porcino (PRRS). *Pigs-Misset* pag.12-15.

50. Done, S; Lanz, I; Paton, O; Brown, I; Higgins, R; Hannam, D. (1992). Comparative pathology of viral respiratory infections in pigs. *American Assoc Swine Pract News*: 4. 26-27.
51. Done S.H., Paton D.J. (1995) Porcine reproductive and respiratory syndrome: Clinical disease, pathology and immunosuppression. *Vet. Rec.* 136: 32-35.
52. Donadeu, M., Arias, M., Gomez-Tejedor, C., Agüero, M., Romero, L.J., Christianson, W.T., Sanchez-Vizcaino, J.M., 1999. Using polymerase chain reaction to obtain PRRSV-free piglets from epidemically infected herds. *Swine Health Prod.* 7, 225-261.
53. Drew TW, Lowings JP, Yapp F (1997). Variation in open reading frames 3, 4 and 7 among porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the UK. *Veterinary Microbiology*, 55, 209-221.
54. Drolet R, Larochelle R, Morin M., Delisle B., AND Magar R. (2003) Detection Rates of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, Porcine Circovirus Type 2, and Swine Influenza Virus in Porcine Proliferative and Necrotizing Pneumonia. *Vet Pathol* 40:143-148.
55. Fano E, Olea L, Pijoan C. (2005) Eradication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by serum inoculation of naive gilts. *Can J Vet Res* 2005;69:71-74.
56. Flores ML, Hernández J. (2010) "Vacunas contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV): escribiendo una historia" *Vet. Méx* v.41 n.2 México.

57. Forsberg R, Oleksiewicz MB, Petersen AM, Hein J, Bøtner A, Storgaard T (2001) A molecular clock dates the common ancestor of European type porcine reproductive and respiratory syndrome virus at more than 10 years before the emergence of disease. *Virology*, 289, 174-179.
58. Forsberg R, Storgaard T, Nielsen HS, Oleksiewicz MB, Cordioli P, Sala G, Hein J, Bøtner A (2002). The genetic diversity of European type PRRSV is similar to that of the North American type but is geographically skewed within Europe. *Virology*, 299, 38-47.
59. Gilbert SA, Laroche R, Magar R, Cho HJ, Deregt D. (1997). Typing of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses by a multiplex PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 35: 264-267.
60. Goldberg TL, Hahn EC, Weigel RM, Scherba G (2000) Genetic, geographical and temporal variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in illinois. *J Gen Virol* 81: 171-9.
61. Goldberg TL, Lowe JF, Milburn SM, Firkins LD, (2003) Quasispecies variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during natural infection. *Virology* 317:197-207.
62. Gonin P, Mardassi H, Gagnon CA, Massie B, Dea S. A nonstructural and antigenic glycoprotein is encoded by ORF3 of the IAF-Klop strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol* (1998) ;143:1927-1940.

63. Graham, R.C; Lundholm, U; Karnovsiky, M.J. (1965). Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-9-ethylcarbazole. 3.1. Histoche Cytoche. 13. 150-152.
64. Guarino H, Goyal SM, Murtaugh MP, Morrison RB, Kapur V. (1999). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by reverse transcription-polymerase chain reaction using different regions of the viral genome. J vet Invest 11: 27-33.
65. Goovaerts, D; Visser, N. (1992). Vascular lesions in pigs infected with PRRS. 12 Int Pig Vet Soc. The Hague. 8/17-20; 129.
66. Halbur P.G., Andrews J.J. Huffman E.L., Paul P.S., Meng X.-J. & Niyo Y. (1994). Development of a streptavidinbiotin immunoperoxidase procedure for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen in porcine lung. J. Vet. Diagn. Invest., 6, 254-257.
67. Henry S. (2002). Bioseguridad, estrategias de control y erradicación de PRRS y enfermedad de Aujeszky. Memorias del XXXVII Congreso Nacional de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos. Pto. Vallarta (Jalisco) México. 40-42.
68. Hermann JR, Muñoz-Zanzi CA, Roof MB, Burkhart K, Zimmerman JJ. 2005. Probability of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection as a function of exposure route and dose. Vet Microbiol 110:7-16.

69. Hill H. (1990) Overview and history of Mystery Swine Disease (Swine infertility/respiratory syndrome). Proc Mystery Swine Disease Committee Meeting. Livestock Conservation Institute, Denver, Colorado, pp. 29-31.
70. Hoefling, D.C. (1990). Pathology and pathogenesis of mystery disease. MSD Com Mtg. Denver; Livestock Conservation Institute. 10; 50-51.
71. Holtkamp DJ, Kliebenstein JB, Neumann EJ, et al. (2013) Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. *J Swine Health Prod.*; 21(2):72-84.
72. Horter DC, Pogranichniy RM, Chang CC, Evans RB, Yoon KJ and Zimmerman JJ (2002) Characterization of the carrier state in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Veterinary Microbiology*, 86, 213-228.
73. Hu, H., Li, X., Zhang, Z., Shuai, J., Chen, N., Liu, G., Fang, W. (2009). Porcine reproductive and respiratory syndrome viruses predominant in southeastern China from 2004 to 2007 were from a common source and underwent further divergence. *Arch Virol*. 154, 391-398.
74. Indik S, Valíček L, Klein D, Klánová J (2000). Variations in the major envelope glycoprotein GP5 of Czech strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of General Virology*, 81, 2497-2502.

75. Joo HS, Park BK, Dee SA, Piojan C (1997) Indirect fluorescent IgM antibody response of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* 55:303-7.
76. Kang, G.B., Shin, J.H., and Kim YJ. (1994) PRRS: Seroepidemiology of indirect fluorescent antibodies in selected pig Breeding farms in Korea. *Proceedings of the 13th IPVS Congress, Bangkok, Thailand, 26-30 June* p. 57.
77. Kapur V, Elam MR, Pawlovich TM, Murtaugh MP (1996) Genetic variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the midwestern United States. *J Gen Virol* 77:1271-6.
78. Kawashima, N., Maruyama, K., and Joo, H.S. (1994) Herd Investigation and Control Management of Porcine Epidemic Abortion and Respiratory Syndrome (PEARS) outbreak in a Japanese farm. *Proceedings of The 13th IPVS Congress, Bangkok, Thailand, 26-30 June, 1994* p. 54.
79. Keffaber KK., (1989) Reproductive failure of unknown etiology. *American Association of Swine Practitioners Newsletter* 1:1-10.
80. Kim, H.S.; Kwang, J.; Yoon, I.J.; Joo, H.S.; Frey, M.L. (1993). Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch. Virol.*, 133: 477-483.
81. Kristensen CS, Bøtner A, Angen Ø, Sørensen V, Jorsal SE, Takai H, Barfod K, Nielsen JP (2002) Airborne transmission of *A. pleuropneumoniae* and PRRS virus between pig

units. In: Proceedings of the 17th Congress of the International Pig Veterinary Society , p. 272.

82. Labarque G, Nauwynck HJ, Van Reeth K, Pensaert MB (2000) Effect of cellular changes and onset of humoral immunity on the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lungs of pigs. *J Gen Virol* 81:1327-34.
83. Labarque, G., van Reeth, KV., Nauwynck, H., Drexler, C., van Gucht, S., Pensaert, M. (2004). Impact of genetic diversity of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain on vaccine efficacy. *Vaccine* 22, 4183-4190.
84. Lager K. M; Mengeling W. L. and Brookmeir S. L. (1996) Effect of post coital intrauterine inoculation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on caonception gilts. *Veterinary Record* 138(9):227-228.
85. Lager KM and Mengeling WL (2000) Experimental aerosol transmission of pseudorabies virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. In: Proceedings of the American Association of Swine Practitioners, pp.409-410.
86. Lamontagne L, Page C, Laroche R, Longtin D and Magar R (2001) Polyclonal activation of B cells occurs in lymphoid organs from porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infected pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 82,165-182.
87. Lamontagne L., Page C., Laroche R., Magar R., (2003) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus persistence in blood, spleen, lymph nodes, and tonsils of

experimentally infected pigs depends on the level of CD8^{high} T cells. *Viral Immunol* 16:395–406.

88. Le Gall, A., Legeay, O., Bourhy, H., Arnauld, C., Albina, E. & Jestin, A. (1998). Molecular variation in the nucleoprotein gene (ORF7) of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Virus Res* 54, 9–2.
89. Le Potier MF, Blanquefort P, Morvan E, Albina E (1995) Results of a control program for PRRS in the French area 'Pays de Loire'. In: *Proceedings of the 2nd International Symposium on PRRS*, p.34.
90. López-Fuertes, L., Domenech, N., Álvarez, B., Ezquerro, A., Domínguez, J., Castro, JM., Alonso, F. (1999). Analysis of cellular immune response of pigs recovered from porcine respiratory and reproductive syndrome infection. *Virus Res.* 64, 33–42.
91. Loula T., (1991) Mystery pig disease. *Agri Prac* 12:23–34.
92. Lowe, JE., Husmann, R., Firkins, LD., Zuckermann, FA., Goldberg, TL. (2005). Correlation of cell-mediated immunity against porcine reproductive and respiratory syndrome virus with protection against reproductive failure in sows during outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome in commercial herds. *J Am Vet Med Assoc.* 226, 1707–1711.
93. Macías M.J., Plascencia G., Osorio F., Pinelli-Saavedra A., Reyes-Leyva J., Hernández J. (2006). Aislamiento y caracterización del gen ORF 5 del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) en México. *Vet. Mex.*, 37 (2).

94. Magar, R; Larochele, A; Robinson, Y; Dubuc, C. (1993). Immunochemical Detection of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Using Colloidal Gold. *Can J Vet Res.* 57, 300-304.
95. Magar R., Larochele R., Nelson EA., Charreyre C. (1997) Differential reactivity of a monoclonal antibody directed to the membrane protein of porcine reproductive and respiratory síndrome virus. *Can J Vet Res* 61:69-71.
96. Malinarich F., C. Lecocq, F. Osorio, A. Ruiz, M. Quezada. (2004) Comportamiento de los macrófagos pulmonares en cerdos inoculados con el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino. IV Reunion Argentina de Patologia Veterinaria, La Plata, Argentina.
97. Mardassi H, Massie B, Dea S (1996) Intracellular synthesis, processing, and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 221: 98-112.
98. Mardassi H, Gonin P, Gagnon CA, Massie B, Dea S. A subset of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP3 glycoprotein is released into the culture medium of cells as a non-virion-associated and membrane-free (soluble) form. *J Virol* (1998);72:6298-6306.
99. Martínez LA, Correa GP, Fajardo MR, Garibay SM. (1985) Aislamiento y estudio de un virus porcino parecido a los paramyxovirus. En: Correa, P. y Morilla, A. (eds.). Encuentro Sobre Enfermedades Infecciosas del Cerdo. México, D.F.,:15-21.

100. Martínez L.A., Carrillo G., Diosdado F., Córdova L. , Solis H., (2012) Búsqueda de anticuerpos contra la enfermedad del ojo azul en porcinos del sureste y de centro occidente de México. Congreso internacional en ciencias veterinarias y zootecnia. Puebla. p 30-33.
101. Martínez F.J. (2010) Variabilidad antigénica y patogénica del virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de veterinaria, Departamento de Sanidad Animal. Madrid, 2010.
102. Mateu E, Diaz I, Darwich L, Casal J, Martin M, Pujols J, (2006) Evolution of ORF5 of Spanish porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains from 1991 to 2005. *Virus Res* 115: 198-206.
103. Mateu E and Díaz I (2008) The challenge of PRRS immunology. *The Veterinary Journal*, 177, 345-351.
104. Meier, WA., Galeota, J., Osorio, FA., Husmann, RJ., Schnitzlein, WM., Zuckermann, FA. (2003). Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology*. 309, 18-31.
105. Méndez T.A. (1996). Diagnóstico del síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino. Memorias de la II Jornada de Producción Porcina UNAM-FMVZ, Depto. de Prod. en cerdos. Pág. 12-17.

106. Meng XJ, Paul PS, Halbur PG (1994) Molecular cloning and nucleotide sequencing of the 3'-terminal genomic RNA of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 75: 1795-801.
107. Meng XJ (2000) Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet Microbiol* 74: 309-29.
108. Mengeling W L., Lager K M., Vorwald A C., (1994) Temporal characterization of transplacental infection of porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Am J Vet Res* 55:1391-8.
109. Meredith J., (1992) Review Paper on "Blue Ear" disease/Mystery Pig Disease/S.I.R.S/P.R.R.S/P.E.A.R.S. Revised: 2nd April 1992. Pig Disease Information Center, Dept. of Veterinary Medicine, University of Cambridge pp 1-19.
110. Meulenber JJ, De Meijer EJ Moormann RJ. (1993) Subgenomic RNAs of Lelystad virus contain a conserved leader-body junction sequence. *J Gen Virol*; 74:1697-1701.
111. Meulenber J.J.M., Hulst M.M., DE Meijer E.J., Moonen P.J.L.M., Den Besten A., De Kluyver E.P., Wensvoort G. & Moormann R.J.M. (1993). Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology*, 192, 62-72.

112. Meulenber g JJ, Petersen–Den Besten A, De Kluyver EP, Moormann RJ, Schaaper WM, Wensvoort G.(1995) Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology*; 206:155–163.
113. Meulenber g JJ, Petersen–Den Besten A, De Kluyver E, van Nieuwstadt A, Wensvoort G, Moormann R.J. (1997) Molecular characterization of Lelystad virus. *Vet. Microbiol* 55:197–202.
114. Meulenber g JJ. PRRSV, the virus. *Vet Res* (2000 ;31:11–21.
115. Mieli L, Chenoufi N, Lamanda P, Charreyre C, (2002) Evaluation of different commercial elisa kits for detecting antibodies against prrs virus in Europe. In: *Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress*, p 358.
116. Molitor T., Leitner G.,Choi C, Risdahi J, Rossoe K, Collins J., (1992) Modulation of host immune response by SIRS virus. *American Assoc Swine Pract News*: 4, 27–28.
117. Molitor, TW. (1993). Immune response to PRRS virus. In: *A.D. Leman Swine Conf.*, St.Paul, USA. Pp. 49–50.
118. Morilla A, Gonzá les–Vega D, Diosdado F, Estrada E. (2003) Seroepidemiology of PRRS in Méx ico. *PRRS Compendium Producer Edition*. National Pork Board. Des Moines, Iowa, USA, section 6.12.
119. Moreno–López J, Correa–Girón P, Martínez A, Ericsson A. (1986) Characterization of a paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in Mexico. *Arch Virol* (91):221–231.

120. Mortensen S., Stryhn H., Sogaard R., Boklund A., Stark K.D., Christensen J., Willeberg P (2002) Risk factors for infection of sow herds with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Prev Vet Med* 53:83-101.
121. Murtaugh MP, Yuan S, Faaberg KS (2001) Appearance of novel PRRSV isolates by recombination in the natural environment. *Adv Exp Med Biol* 494:31-6.
122. Murtaugh MP, Xiao Z, Zuckermann F (2002) Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Viral Immunology*, 15, 533-547.
123. Murtaugh MP, Elam MR, Kakach LT. (1995) 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.
124. Murtaugh, M.P., T. Stadejek, J.E. Abrahante, T.T. Lam, and F.C. Leung. (2010). The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res.* 154:18-30.
125. Murtaugh, M.P (2013) PRRS Immunology http://www.pig333.com/prrs/prrs-immunology_7270/.
126. Nelson, E.A., J. Christopher-Hennings, T. Drew, G. Wens-voort, J.E. Collins, D.A. Benfield. (1993). Differentiation of US and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 31: 3184-3189.

127. Nelson, E.A.; Christopher-Hennings, J.; Harris, L.L.; Collins, J.E.; Chladek, O.W.; Gorcyca, D.E.; Benfield, D.A. (1992). Preliminary characterization of monoclonal antibodies to a United States isolate (ATCC VR-2332) of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome virus. In: Proc. 12th IPVS Congress.~, LaHaya, Holanda. Pp. 121-122.
128. Neumann EJ, Kliebenstein JB, Johnson CD, Mabry JW, Bush E, Seitzinger AH, Green A, Zimmerman JJ. 2005. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 227:385-392.
129. Nielsen HS, Oleksiewicz MB, Forsberg R, Stadejek T, Botner A, Storgaard T (2001) Reversion of a live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine investigated by parallel mutations . *Journal of general virology*, 82, 1263-1272.
130. Nielsen J; Botner A., (1997) Hematological and immunological parameters of 4 ½-month old pigs infected with PRRS. *Vet Microbiol* 55:289-94.
131. Nieuwstadt, A.; Meulenber, J.; van Essen-Zandbergen, A.; den Besten, A.P.; Bende, R.; Moormann, R.; Wensvoort, C. (1995). Monoclonal antibodies specific for Lelystad virus recognize two additional structural viral proteins, encoded by ORF-3 and ORF-4 of the viral genome. In: 2nd Internl. Symp. on PRRS, Copenhagen, Dinamarca. p. 5.
132. Nodelijk G. (2002). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) with special reference to clinical aspects and diagnosis: a review. *Vet. Q.* 24 (2): 95-100.

133. Nulibol D, Platt KB, Halbur PG, Torremorell M, Harris DL, (2004) The effect of a killed porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine treatment on virus shedding in previously PRRSV infected pigs, *Vet Microbiol* 102:11-8.
134. Ohrlinger V.H; Ahí, A; Haas, B; Mettenleiter, T.C; Fiziha, H.J; Straub, O.C; Weiland, F. (1991). PRAS laboratory studies at Tübingen and other German laboratories. European Comm Seminar on PRRS. Brussels. 1 1; 4-5.
135. OIE (2004). Porcine reproductive and respiratory syndrome. In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Part 2, Section 2.6., Chapter 2.6.5.* https://www.oie.int/eng/normes/MANUAL/A_00099.htm.
136. OIE Organización Mundial de Sanidad Animal. (2008). PRRS: the disease, its diagnosis, prevention and control. Annex 4-5 of the Report of the OIE Ad hoc Group on PRRS. Paris. 7 p.
137. Opriessnig T., 2013 http://www.3tres3.com/prrs/prrsv-interaccion-con-otros-patogenos-respiratorios_32585/ <http://www.3tres3.com>
138. Otake S, Dee SA, Rossow KD, Deen J, Joo HS, Molitor TW, Pijoan C (2002) Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by fomites (boots and coveralls). *Journal of Swine Health and Production*, 10, 59-65.
139. Otake,S., A. Dee, M. R. D., K. D. Rossow C. Trincado, C. Pijoan. (2004). Studies on the carriage and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by individual houseflies (*Musca domestica*). *Vet Rec.* 154:80-85.

140. Paton, D.J.; Brown, I.H.; Scott, A.C.; Done, S.H.; Edwards, S. (1992). Isolation of a Lelystad virus-like agent from British pigs and scanning electron microscopy of infected macrophages. *Vet. Microbiol.*, 33: 195-201.
141. Peihu F., Yanwu W., Longjun G., Hongli W., Liping H., Jianbo L., and Changming L. (2013) Synergistic effects of sequential infection with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *Virology Journal* 2013, 10:265.
142. Pirzadeh B y Dea S (1997) Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants. *J Gen Virol* 78:1867-73.
143. Pirzadeh B y Dea S (1998) Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 79:989-99.
144. Plagemann PG (2003) Porcine reproductive and respiratory virus: origin hypothesis. *Emerg Infect Dis* 9:903-5.
145. Plagemann PG (2004) The primary GP5 neutralization epitope of North American isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol* 102:263-75.

146. Plana-Duran J, Climent I, Sarraseca J, Urniza A, Cortes E, Vela C, Casal JI (1997) Baculovirus expression of proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain Olot/91. Involvement of ORF3 and ORF5 proteins in protection. *Virus Genes* 14:19-29.
147. Plana Durán, J.A; Vayreda, M; Vilarrasa, J; Bastons, M; Pourquet, L; Urniza, A. (1992). Enfermedad reproductiva y respiratoria de la cerda (Mystery pig disease>. Resumen de los trabajos llevados a cabo por nuestro grupo sobre esta enfermedad. *Med Vet.* 9, 407-411.
148. Pol, J. M. ; van Dijk; J.E; Wensvoort, O; Terpstra, C. (1991). Pathological, ultrastructural, and immunohistochemical changes caused by Lelystad virus in experimental induced infections of mystery swine disease (synonym: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS). 137-143.
149. Pol, J; Wagenaar, F; Broekhuijsen-Davies, J; Wensvoort, O. (1992) The morphogenesis of Lelystad virus in porcine lung alveolar macrophages. *The Hague.12 mt Pig Vet Soc;* 8/17-20, 127.
150. Pol, JMA., Wagenaar, F., Reus, JEG. (1997) Comparative morphogenesis of three PRRS virus strains. *Vet. Microb.* 55, 203-208.
151. Polson, D.D; Marsh, W.E.; Dial, G.D. (1990). Mystery swine disease. *Proc. Mystery Dis Comm Meet Livest Conserv. Inst.* 1, 8-28.

152. Prieto C, Sanchez R, Martin-Rillo S, Suarez P, Simarro I, Solana A, Castro JM, (1996) Exposure of gilts in early gestation to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Rec* 138: 536-9.
153. Prieto C, Suárez P, Bautista JM, Sánchez R, Rillo SM, Simarro I, Solana A, Castro JM (1996) Semen changes in boars after experimental infection with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Theriogenology*, 45, 383-395.
154. Prieto C.S. (1997) efecto de la infección por el virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino (VSRRP) en el verraco y en la cerda al comienzo de la gestación: sus repercusiones en la reproducción. Tesis doctoral. Universidad Complutense de MADRID Facultad de veterinaria departamento de patología animal 1 (sanidad animal).
155. Prieto C.; Castro J. M. (1998^a). Síndrome reproductivo y respiratorio porcino: aspectos más importantes de la enfermedad Parte I. *Anaporc* 175:1-15
156. Prieto C, Castro JM (2005) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in the boar: a review. *Theriogenology*, 63, 1-16.
157. ProMED-mail (2007b). Porcine reproductive and respiratory syndrome – China (08); 30 Oct: 20071030.3523 <http://www.promedmail.org>. Accessed 30 Oct 2007.
158. Ramírez E., (2005), Una actualización sobre el Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino, su situación nacional y avances en investigación. *Avances en Ciencias Veterinarias* 20 pp, 12-31.

159. Ramírez MG, (2011) Uso De Las Variantes Del Pcr En El Estudio Del Virus Del Síndrome Respiratorio Y Reproductivo Porcino. Universidad Nacional Mayor De San Marcos Facultad De Medicina Veterinaria pp. 1-7.
160. Ramírez M., Rivera H., Manchego A., More J., Kim L. , (2013) Aislamiento Y Genotipificación del Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (VPRRS) en granjas seropositivas de las provincias de Lima y Arequipa, Perú Rev Inv Vet Perú; 24(2): 222-232 .
161. Ramos, J; Pujois, J; Domingo, M; Miller, M; Roseel, A; Badiola, I; Perez de Rozas, A; Majo, N; San Gabriel, A. (1992). Experimental infection of weaner pigs with PRRS. American Assoc Swine Pract News: 4. 25.
162. Riveroll E. (2013) Frecuencia de Anticuerpos contra el virus del Síndrome Disgénésico y Respiratorio Porcino (prrs) en granjas porcinas ubicadas en cinco estados de la república mexicana. Cuautitlan Izcalli. Tesis de Licenciatura UNAM.
163. Robertson IB (1992). Transmission of blue-eared pig disease. Vet Rec 130:478-9.
164. Rossow KD, Benfield D.A., Goyal S.M., Nelson EA., Christopher-Hennings J., Collins JE., (1996) Chronological immunohistochemical detection and localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in gnotobiotic pigs. Vet. Pathol 33:551-6
165. Rossow K.D. (1998). Porcine reproductive and respiratory syndrome. Vet. Pathol., 35, 1-20.

166. Rossow, K.D., J.E. Collins, S.M. Goyal, E.A. Nelson, J. Christopher-Hennings, D.A. Benfield. (1995). Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. *Vet. Pathol.* 32: 361-373.
167. Rovira A, Clement T, Christopher-Hennings J, Thompson B, Engle M, Reicks, D, Muñoz-Zanzi Cl. (2007). Evaluation of the sensibility of reverse transcription polymerase chain reaccion to detect porcine reproductive and respiratory syndrome virus on individual and pooled samples from boars. *J Vet Diagn Invest* 19: 502-509.
168. Rowland RR, Steffen M, Ackerman T, Benfield D (1999) The evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: quasispecies and emergence of a virus subpopulation during infection of pigs with VR-2332. *Virology* 259:262-6.
169. Rowland RR, Robinson B, Stefanick J, Kim TS, Guanghua L, Lawson SR, Benfield DA (2001) Inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by interferon-gamma and recovery of virus replication with 2-aminopurine. *Archives of Virology*, 146, 539-555.
170. Royae AR., Husmaan RJ., Dawson HD., Calzada-Nova G., Schnitzlein WM., Zuckermann FA., Lunney JK., (2004) Deciphering the involvement of innate immune factors in the development of the host response to PRRSV vaccination. *Vet Immunol Immunopathol* 102: 199-216.
171. Ruiz A, Neira V, Ramírez E, García A, Lecocq C, Quezada M. 2009. Estudio de la excreción y la transmisión del aislado chileno del virus del síndrome Respiratorio y

Reproductivo porcino (PRRS) en animales inoculados experimentalmente y centinelas en contacto mediante RT-nPCR y ELISA. Arch Med Vet 41: 221-228.

172. Samsom JN., de Bruin TG., Voermans JJ., Meulenberg JJ., Pol JM., Bianchi AT., (2000) Changes of leukocyte phenotype and function in the broncho-alveolar lavage fluid of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a role for CD8(+) cells. J Gen Virol 81:497-505.
173. Sánchez Vizcaíno, JM. Arias, M; Agüero, M; Sánchez, C; Romero, LJ; Canals, A; and Gómez-Tejedor, C (2000). Detection of PRRS virus in pig sera and semen with a newly developed PCR method: in vivo, in vitro and field testing. MacJournal of Animal Reproduction, 6(1), 69-81.
174. Scotti M, Prieto C, Martínez Lobo FJ, Simarro I, Castro JM, (en prensa) Effects of two commercial European modified-live vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in pregnant gilts. Vet J.
175. Shen S., Kwang J., Liu W., Liu D.X. (2000) Determination of the complete nucleotide sequence of a vaccine strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and identification of the Nsp2 gene with a unique insertion. Arch. Virol 145:871-83.
176. Shibata I, Mori M, Yazawa S. Experimental reinfection with homologous porcine reproductive and respiratory syndrome virus in SPF pigs. J Vet Med Sci 2000;62:105-108.
177. Shin. (1997). Monitoring of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection boars. Veterinary Microbiology 55(1)337-346.

178. Sierra N., Ramírez R., Mota D., (2000) Aislamiento del virus de PRRS en México: Estudio clínico, serológico y virológico. Archivos de medicina veterinaria v. 32 n.1 Valdivia.
179. Snijder EJ, Meulenbergg JJ (1998) The molecular biology of arteriviruses. J Gen Virol 79: 961-79.
180. Stephano HA, Gay GM. (1985) Síndrome del ojo azul en cerdos. En: Correa GP y Morilla GA. (eds.). Encuentro Sobre Enfermedades Infecciosas del Cerdo. AMVEC. México, D.F.,:1-13.
181. Stephano HA, Gay GM, Ramírez TC. (1988) Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with a Paramyxovirus infection. Veterinary Record; 122(2):6-10.
182. Snijder E.J. & Meulenbergg J.J.M. (1998). The molecular biology of arteriviruses. J. Gen. Virol., 79, 961-979.
183. Sorensen K.J., Botner A., Madsen E.S., Strandbygaard B. & Nielsen J. (1997). Evaluation of a blocking ELISA for screening of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. Vet. Microbiol., 56, 1-8.
184. Sorensen K.J., Strandbygaard B., Botner A., Madsen E.S., Nielsen J. & Have P. (1998). Blocking ELISAs for the distinction between antibodies against European and American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet. Microbiol., 60, 169-177.

185. Stadejek T, Stankevicius A, Storgaard T, Oleksiewicz MB, Belak S, Drew TW, Pejsak Z (2002) Identification of radically different variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Eastern Europe: towards a common ancestor for European and American viruses. *Journal of General Virology*, 83, 1861-1873.
186. Stadejek T, Oleksiewicz MB, Potapchuk D, Podgorska K (2006). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in Eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. *Journal of General Virology*, 87, 1835-1841.
187. Suárez, P.; Zardoya, R.; Prieto, C.; Solana, A.; Tabarés, E.; Bautista, J.M.; Castro, J.M (1994). Direct detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus by reverse polymerase chain reaction (RT-PCR). *Arch. Virol.*, 135: 89-99.
188. Suárez P.F. (1995) *Genética Molecular del virus del Síndrome Reprodutor y Respiratorio Porcino: aspectos evolutivos diagnósticos e inmunogénicos*. Universidad Complutense de Madrid. Sanidad Animal. Madrid.
189. Suárez P. (2000) Ultrastructural pathogenesis of the PRRS virus *Vet. Res.* 31 (2000) 47-55. *Veterinary Research, BioMed Central*, 2000, 31 (1), pp.47-55.
190. Swenson SL, Hill HT, Zimmerman JJ, Evans LE, Landgraf JG, Wills RW, Sanderson TP, McGingley MJ, Brevik AK, Ciszewski DK, Frey ML (1994) Excretion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen after experimentally induced infection in boars. *J Am Vet Med Assoc* 204: 1943-8.

191. Swenson SL, Hill HT, Zimmerman JJ, Evans LE, Wills RW, Yoon KJ, Schwartz KJ, Althouse GC, Mc Ginley MJ, Brevik AK, (1995) Preliminary assessment of an inactivated PRRS virus vaccine on the excretion of virus in semen. *Swine Health and Production* 3:244-47.
192. Terpstra C; Wensvoort G; Pol J.M.A. (1991) Experimental reproduction of porcine endemic abortion and respiratory syndrome (Mystery swine disease) by infection with Lelystad virus Koch's postulates fulfilled. *Veterinary Quarterly* 13:131-136.
193. Tian K, Yu X, Zhao T, Feng Y, Cao Z, et al. (2007) Emergence of Fatal PRRSV Variants: Unparalleled Outbreaks of Atypical PRRS in China and Molecular Dissection of the Unique Hallmark. *PLoS ONE* 2(6): e526. doi:10.1371/journal.pone.0000526.
194. Tian K, Yu X, Zhao T, Feng Y, Cao Z, Wang C, Hu Y, Chen X, Hu D, Tian X, Liu D, Zhang S, Deng X, Ding Y, Yang L, Zhang Y, Xiao H, Qiao M, Wang B, Hou L, Wang X, Yang X, Kang L, Sun M, Jin P, Wang S, Kitamura Y, Yan J, Gao GF (2007) Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark. *PloS ONE* 2, 1-10.
195. Torremorell M., Pijoan C., Janni K., Walker R., Joo H S., (1997) Airborne transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nurse piglets. *Am J. Vet. Res* 58:828-32.
196. Trautmann A and Fiebiger J (1957) *Fundamentals of the Histology of Domestic Animals*. Ithaca (NY): Comstock Publishing Associates, 121-123.

197. Trinchieri G (1995) Natural killer cells wear different hats: effector cells of innate resistance and regulatory cells of adaptive immunity and of hematopoiesis. *Seminars in Immunology*, 7, 83-88.
198. Van Alstineei,W.G.; Kanitz, CL.; Stevenson, G.W. (1993). Time and temperature survivability of PRRS virus in serum and tissues. *J. Ver. Diagn. Invest.*, 5: 621-622.
199. Van der Linden IFA, van der Linde-Bril EM, Voermans JJM, van Rijn PA, Pol JMA, Martin R, Steverink PJGM (2003). Oral transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by muscle of experimentally infected pigs. *Veterinary Microbiology* 97, 45-54.
200. Van Reeth K. (1997). Pathogenesis and clinical aspects of a respiratory porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet Microbiol.* 55: 223-230.
201. Van Reeth, K., G. Labarque, H.J. Nauwynck, and M. Pensaert, (1999): Differential production of Proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections: correlations with pathogenicity. *Res. Vet. Sci.* 67, 47-52.
202. Van Reeth K, Van Gucht S, Pensaert M (2002) In vivo studies on cytokine involvement during acute viral respiratory disease of swine: troublesome but rewarding. *Vet Immunol Immunopathol* 87: 161-8.
203. Van Vugt JJ, Storgaard T, Oleksiewicz MB, Botner A (2001) High frequency RNA recombination in porcine reproductive and respiratory syndrome virus occurs preferentially between parental sequences with high similarity. *J Gen Virol* 82: 2615-20.

204. Van Woensel PA, Liefkens K, Demaret S (1998) Effect on viraemia of an American and a European serotype PPRSV vaccine after challenge with European wildtype strains of the virus. *Veterinary Record*, 142, 510–512.
205. Vezina, SA, Loemba H, Fournier M, Dea S, Archambault D (1996) Antibody production and blastogenic response in pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can J Vet. Res* 60: 94–9.
206. Weiland E, Wiczorek-Krohmer M, Kohl D, Conzelmann KK, Weiland F (1999) Monoclonal antibodies to the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are more effective in virus neutralization than monoclonal antibodies to the GP4. *Vet Microbiol* 66:171–86
207. Weimersheimer R. J; Canto A. G. J; Anaya E. A; Coba A. M; Milian S. F. Ad Correa G. P. (1997). Frecuencia de anticuerpos contra el virus del Síndrome Disgenésico y respiratorio en cerdos sacrificados en rastros de México. *Técnica Pecuaria Méx.* 35(3):139–144.
208. Wensvoort *et. al.* 1992. Antigenic comparasion of Lelystad virus and swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation* 4(2):134–138. White 1991. Blue ear disease of pig. *Veterinary Record* 128(24):574–576.
209. Wensvoort G., Terpstra C., Pol J.M.A., Ter Laak E.A., Bloemraad M., De Kluyver E.P., Kragten C., Van Buiten L., Den Besten A., Wagenaar F., Broekhuijsen J.M., Moonen P.L.J.M., Zetstra T., De Boer E.A., Tibben H.J., De Jong M.F., Van't Veld P., Groenland G.J.R., Van Gennep J.A., Voets M.TH., Verheijden J.H.M. & Braamskamp J. (1991). Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet. Q.*, 13, 121–130.

210. White ME., (1991) Blue ear disease of pigs. *Vet. Rec* 128:574.
211. Wills R., Zimmerman J., Yoon KJ., Swenson S., McGinley M., Hill H., Platt K., Christopher-Hennings J., Nelson E. (1995) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: A persistent infection. In *Proceedings of the 2nd International Symposium on Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome* p. 19.
212. Wills RW, Zimmerman JJ, Yoon KJ, Swenson SL, McGinley MJ, Hill HT, Platt KB, Christopher-Hennings J, Nelson EA (1997) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection. *Veterinary Microbiology*, 55, 231-240.
213. Wills RW, Doster AR, Galeota JA, Sur JH, Osorio FA (2003) Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of clinical microbiology*, 41, 58-62.
214. Wissink E.H., van Wijk H.A., Kroese M.V., Weiland E., Meulenbergh J.J., Rottier P.J., van Rijn P.A. (2003) The major envelope protein, GP5, of a European porcine reproductive and respiratory syndrome virus contains a neutralization epitope in its N-terminal ectodomain. *J Gen Virol* 84:1535-43.
215. Wu WH, Fang Y, Farwell R, Steffen-Bien M, Rowland RR, Christopher-Hennings J, Nelson EA (2001). A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF2b. *Virology*, 287, 183-191.

216. Wu WH, Fang Y, Rowland RR, Lawson SR, Christopher-Hennings J, Yoon KJ, Nelson EA (2005) The 2b protein as a minor structural component of PRRSV. *Virus research*, 114, 177-181.
217. Yang L., K.J. Yoon, Y. Li, J.H. Lee J.J. Zimmerman, M.L. Frey, K.M. Harmon, K.B. Platt. (1999). Antigenic and genetic variations of the 15kD nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Arch. Virol.* 144 (3): 525-546.
218. Yang Z-Z, Fang WH, Habib M. (2006). First results of detection de PRRSV and CSFV RNA by SYBR green I- based quantitative PCR. *J. Vet. Med. B* 53, 461-467.
219. Yoon, I.J.; Joo, H.S.; Christianson, W.'U.; Kim, RS. ; Collins, JE. ; Morrison, R.B.; Dial, C.D. (1992b). An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 4: 144-147.
220. Yoon K.J., Zimmerman J.J., Swenson S.L., Mc Ginley M.J., Eernisse K.A., Brevik A. Rhinehart L.L., Frey M.L., Hill H.T., Platt K.B. (1995) Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. *J Vet. Diagn. Invest* 7:305-12.
221. Yoon KJ., Wu LL., Zimmerman JJ., Platt (1996) Antibody-dependent enhancement (ADE) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PPRSV) infection in pigs. *Virol Immunol* 9:51-63.

222. Yoon, K.J., J. Christopher-Hennings and E.A. Nelson. (2003). Diagnosis pp: 59- 68. In: J. Zimmerman and K.J. Yoon (Ed.) 2003 PRRS Compendium (2nd ed.) National Pork Board. Iowa, U.S.A.
223. Zhou, Y., Barghusen, S., Choi, C., Rossow, K., Collins, J., Laber, J., Molitor, T., Murtaugh, M. (1992). Effect of SIRS virus infection on leukocyte populations in the peripheral blood and on cytokine expression in alveolar macrophages of growing pigs. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 4:28.
224. Zhou EM, Zimmerman JJ, Zhou KX, Jiang Z, Platt KB (2002) IgM- capture ELISA as a serodiagnostic test for detection of primary infection of PRRSV in pigs. *Proc Annu Meet Am Assoc Swine Vet*, p 295-8.
225. Zimmerman JJ., Yoon KJ., Pirtle EC., Wills RW., Sanderson TJ., McGinley MJ., (1997) Studies of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection in avian species. *Vet Microbiol* 55:329-36.
226. Zimmerman JJ., (2003) Epidemiology and Ecology. In: PRRS Compendium, 2d edition. Ed: Zimmerman JJ, Yoon KJ., Iowa p27-50.

ANEXOS

TABLA 1. Resultados de cultivo celular

No. DE MUESTRA	ESTADO	GRANJA	TEJIDO	ECP 1° PASE	ECP 3° PASE
1	GUANAJUATO	1	LINFONODO C-1	NEGATIVO	SOSPECHOSO
2	GUANAJUATO	1	LINFONODO C-1	NEGATIVO	NEGATIVO
3	GUANAJUATO	1	LINFONODO C-1	SOSPECHOSO	NEGATIVO
4	GUANAJUATO	1	TONSILA C-2	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO
5	GUANAJUATO	1	LINFONODO RF C-2	SOSPECHOSO	NEGATIVO
6	GUANAJUATO	1	PULMON C-2	NEGATIVO	NEGATIVO
7	GUANAJUATO	2	TONSILA C-3	POSITIVO	POSITIVO
8	GUANAJUATO	2	LINFONODO C-3	POSITIVO	NEGATIVO
9	GUANAJUATO	3	LINFONODO C-1	NEGATIVO	SOSPECHOSO
10	VERACRUZ	1	LINFONODO C-3	POSITIVO	NEGATIVO
11	GUANAJUATO	3	LINFONODO C-1	NEGATIVO	NEGATIVO
12	PUEBLA	1	LINFONODO RF C-2	SOSPECHOSO	NEGATIVO
13	PUEBLA	1	LINFONODO RF C-2	POSITIVO	NEGATIVO
14	PUEBLA	1	LINFONODO P C-1	POSITIVO	NEGATIVO
15	PUEBLA	1	PULMON C-1	SOSPECHOSO	NEGATIVO
16	PUEBLA	2	PULMON C-1	SOSPECHOSO	NEGATIVO
17	PUEBLA	2	LINFONODO C-1	POSITIVO	NEGATIVO
18	PUEBLA	3	PULMON C-1	POSITIVO	POSITIVO
19	PUEBLA	3	TONSILA C-1	SOSPECHOSO	NEGATIVO
20	PUEBLA	3	PULMON C-2	SOSPECHOSO	NEGATIVO
21	PUEBLA	3	TONSILA C-2	POSITIVO	NEGATIVO
22	GUANAJUATO	4	TONSILA L-1	NEGATIVO	NEGATIVO
23	GUANAJUATO	4	PULMON L-1	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO

No. DE MUESTRA	ESTADO	GRANJA	TEJIDO	ECP	ECP
				1° PASE	3° PASE
24	GUANAJUATO	4	PULMON L-2	SOSPECHOSO	POSITIVO
25	GUANAJUATO	4	TONSILA L-2	NEGATIVO	NEGATIVO
26	VERACRUZ	1	POOL C-4	SOSPECHOSO	NEGATIVO
27	VERACRUZ	1	POOL C-1	SOSPECHOSO	POSITIVO
28	VERACRUZ	1	POOL C-2	SOSPECHOSO	POSITIVO
33	GUANAJUATO	5	PULMON D-2	SOSPECHOSO	POSITIVO
34	GUANAJUATO	5	TONSILA D-2	SOSPECHOSO	NEGATIVO
35	QUERÉTARO	1	PULMON C-1	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO
36	QUERÉTARO	1	TONSILA C-1	NEGATIVO	SOSPECHOSO
37	QUERÉTARO	1	LINFONODO C-1	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO
38	QUERÉTARO	1	LINFONODO C-2	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO
39	QUERÉTARO	1	PULMON C-2	NEGATIVO	SOSPECHOSO
40	QUERÉTARO	1	TONSILA C-2	NEGATIVO	SOSPECHOSO
41	QUERÉTARO	2	PULMON C-1	NEGATIVO	SOSPECHOSO
42	QUERÉTARO	2	LINFONODO RF C-1	SOSPECHOSO	NEGATIVO
43	QUERÉTARO	2	TONSILA C-1	NEGATIVO	SOSPECHOSO
44	QUERÉTARO	2	PULMON C-2	NEGATIVO	SOSPECHOSO
45	QUERÉTARO	2	LINFONODO RF C-2	NEGATIVO	SOSPECHOSO
46	QUERÉTARO	2	TONSILA C-2	NEGATIVO	NEGATIVO
47	QUERÉTARO	3	PULMON C-1	NEGATIVO	NEGATIVO
48	QUERÉTARO	3	TONSILA C-1	NEGATIVO	NEGATIVO
49	QUERÉTARO	3	LINFONODO SMAX C-1	NEGATIVO	NEGATIVO
50	QUERÉTARO	3	PULMON C-2	NEGATIVO	NEGATIVO
51	QUERÉTARO	3	TONSILA C-2	NEGATIVO	NEGATIVO
52	QUERÉTARO	3	LINFONODO SMAX C-2	NEGATIVO	NEGATIVO
53	QUERÉTARO	4	LINFONODO RF C-1	SOSPECHOSO	NEGATIVO
54	QUERÉTARO	4	TONSILA C-1	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO

No. DE MUESTRA	ESTADO	GRANJA	TEJIDO	ECP	ECP
				1° PASE	3° PASE
55	QUERÉTARO	4	PULMON C-1	SOSPECHOSO	NEGATIVO
56	QUERÉTARO	4	LINFONODO RF C-2	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO*
57	QUERÉTARO	4	TONSILA C-2	NEGATIVO	SOSPECHOSO*
58	QUERÉTARO	4	PULMON C-2	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO*
59	QUERÉTARO	5	PULMON C-1	SOSPECHOSO	NEGATIVO
60	QUERÉTARO	5	LINFONODO C-1	POSITIVO	NEGATIVO
61	QUERÉTARO	5	TONSILA C-1	POSITIVO	SOSPECHOSO
62	QUERÉTARO	5	TONSILA C-2	SOSPECHOSO	POSITIVO
63	QUERÉTARO	5	LINFONODO C-2	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO*
64	QUERÉTARO	5	PULMON C-2	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO*
65	QUERÉTARO	6	TONSILA C-1	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO*
66	QUERÉTARO	6	LINFONODO C-1	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO*
67	QUERÉTARO	6	PULMON C-1	NEGATIVO	SOSPECHOSO*
68	QUERÉTARO	6	TONSILA C-2	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO*
69	QUERÉTARO	6	LINFONODO C-2	NEGATIVO	SOSPECHOSO*
70	QUERÉTARO	6	PULMON C-2	NEGATIVO	NEGATIVO
71	QUERÉTARO	7	TONSILA C-1	NEGATIVO	NEGATIVO
72	QUERÉTARO	7	LINFONODO C-1	SOSPECHOSO	NEGATIVO
73	QUERÉTARO	7	PULMON C-1	NEGATIVO	NEGATIVO
74	QUERÉTARO	7	PULMON C-2	SOSPECHOSO	NEGATIVO
75	QUERÉTARO	7	LINFONODO C-2	NEGATIVO	NEGATIVO
76	QUERÉTARO	7	TONSILA C-2	NEGATIVO	NEGATIVO
77	QUERÉTARO	7	TONSILA C-3	NEGATIVO	NEGATIVO
78	QUERÉTARO	7	PULMON C-3	NEGATIVO	NEGATIVO
79	QUERÉTARO	7	LINFONODO C-3	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO*
80	QUERÉTARO	8	TONSILA C-1	NEGATIVO	SOSPECHOSO*
81	QUERÉTARO	8	PULMON C-1	NEGATIVO	SOSPECHOSO*

No. DE MUESTRA	ESTADO	GRANJA	TEJIDO	ECP 1° PASE	ECP 3° PASE
82	QUERÉTARO	8	LINFONODO C-1	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO*
83	QUERÉTARO	8	TONSILA C-2	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO*
84	QUERÉTARO	8	PULMON C-2	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO*
85	QUERÉTARO	8	LINFONODO C-2	NEGATIVO	SOSPECHOSO*
86	QUERÉTARO	9	PULMON C-1	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO*
87	QUERÉTARO	9	LINFONODO C-1	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO*
88	QUERÉTARO	9	TONSILA C-1	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO*
89	QUERÉTARO	9	PULMON C-2	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO*
90	QUERÉTARO	9	LINFONODO C-2	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO*
91	QUERÉTARO	9	TONSILA C-2	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO*
92	QUERÉTARO	10	TONSILA C-1	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO*
93	QUERÉTARO	10	PULMON C-1	SOSPECHOSO	NEGATIVO
94	QUERÉTARO	10	LINFONODO C-1	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO
95	QUERÉTARO	10	TONSILA C-2	NEGATIVO	SOSPECHOSO*
96	QUERÉTARO	10	PULMON C-2	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO*
98	GUANAJUATO	6	TONSILA C-1	NEGATIVO	SOSPECHOSO
99	GUANAJUATO	6	PULMON C-1	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO
100	GUANAJUATO	6	L. INGUIN C-1	POSITIVO	SOSPECHOSO
101	GUANAJUATO	6	TONSILA C-2	NEGATIVO	NEGATIVO
102	GUANAJUATO	6	PULMON C-2	POSITIVO	SOSPECHOSO
103	GUANAJUATO	6	L. INGUIN C-2	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO
104	GUANAJUATO	6	TONSILA C-3	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO
105	GUANAJUATO	6	PULMON C-3	SOSPECHOSO	NEGATIVO
106	GUANAJUATO	6	POOLG.ING C-3	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO
107	GUANAJUATO	7	TONSILA C-1	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO
108	GUANAJUATO	7	PULMON C-1	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO
109	GUANAJUATO	7	L. INGUIN C-1	SOSPECHOSO	POSITIVO

No. DE MUESTRA	ESTADO	GRANJA	TEJIDO	ECP	ECP
				1° PASE	3° PASE
110	GUANAJUATO	7	TONSILA C-2	NEGATIVO	NEGATIVO
111	GUANAJUATO	7	PULMON C-2	NEGATIVO	NEGATIVO
112	GUANAJUATO	7	L. INGUIN C-2	SOSPECHOSO	NEGATIVO
138	GUANAJUATO	8	TONSILA C-1	POSITIVO	POSITIVO
139	GUANAJUATO	8	PULMON C-1	POSITIVO	NEGATIVO
140	GUANAJUATO	8	LINFONODO C-1	POSITIVO	POSITIVO
141	GUANAJUATO	8	RIÑON C-1	SOSPECHOSO	POSITIVO
142	GUANAJUATO	8	PULMON C-2	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO
143	GUANAJUATO	8	POOL G. ING. C-2	POSITIVO	POSITIVO
144	MICHOACÁN	1	TONSILA C-1	NEGATIVO	POSITIVO
145	MICHOACÁN	1	PULMON C-1	SOSPECHOSO	POSITIVO
146	MICHOACÁN	1	LINFONODO SMAX C-1	SOSPECHOSO	NEGATIVO
147	MICHOACÁN	1	TONSILA C-2	SOSPECHOSO	NEGATIVO
148	MICHOACÁN	1	PULMON C-2	POSITIVO	POSITIVO
149	MICHOACÁN	1	LINFONODO SMAX C-2	SOSPECHOSO	NEGATIVO

TABLA 2. Resultados del RT-PCR. A partir de tejidos y de la cosecha de CC.

No. DE MUESTRA	ESTADO	GRANJA	TEJIDO	RT- PCR EN TEJIDO	RT-PCR DE 3° PASE VPRRS	RT- PCR DE 1° PASE VPRRS
1	GUANAJUATO	1	LINFONODO C-1	POS	NEG	NEG
2	GUANAJUATO	1	LINFONODO C-1	POS	NEG	NEG
3	GUANAJUATO	1	LINFONODO C-1	POS	NEG	NEG
4	GUANAJUATO	1	TONSILA C-2	NEG	NEG	NEG
5	GUANAJUATO	1	LINFONODO RF C-2	POS	NEG	NEG
6	GUANAJUATO	1	PULMON C-2	POS	NEG	NEG
7	GUANAJUATO	2	TONSILA C-3	POS	POS	POS
8	GUANAJUATO	2	LINFONODO C-3	POS	POS	POS
9	GUANAJUATO	3	LINFONODO C-1	NEG	NEG	NEG
10	VERACRUZ	3	LINFONODO C-3	POS	POS	POS
11	GUANAJUATO	3	LINFONODO C-1	NEG	NEG	NEG
12	PUEBLA	1	LINFONODO RF C-2	NEG	NEG	NEG
13	PUEBLA	1	LINFONODO RF C-2	NEG	NEG	NEG
14	PUEBLA	1	LINFONODO P C-1	POS	NEG	NEG
15	PUEBLA	1	PULMON C-1	POS	NEG	NEG
16	PUEBLA	2	PULMON C-1	POS	NEG	NEG
17	PUEBLA	2	LINFONODO C-1	POS	NEG	NEG
18	PUEBLA	3	PULMON C-1	POS	NEG	NEG
19	PUEBLA	3	TONSILA C-1	POS	NEG	NEG
20	PUEBLA	3	PULMON C-2	POS	NEG	NEG
21	PUEBLA	3	TONSILA C-2	POS	NEG	NEG
22	GUANAJUATO	4	TONSILA L-1	POS	NEG	NEG
23	GUANAJUATO	4	PULMON L-1	POS	NEG	NEG
24	GUANAJUATO	4	PULMON L-2	POS	NEG	NEG
25	GUANAJUATO	4	TONSILA L-2	POS	NEG	NEG
26	VERACRUZ	1	POOL C-4	POS	NEG	NEG

No. DE MUESTRA	ESTADO	GRANJA	TEJIDO	RT- PCR EN TEJIDO	RT-PCR DE 3° PASE VPRRS	RT- PCR DE 1° PASE VPRRS
27	VERACRUZ	1	POOL C-1	POS	NEG	NEG
28	VERACRUZ	1	POOL C-2	POS	NEG	NEG
33	GUANAJUATO	5	PULMON D-2	NEG	NEG	NEG
34	GUANAJUATO	5	TONSILA D-2	NEG	NEG	NEG
35	QUERÉTARO	1	PULMON C-1	NEG	NEG	NEG
36	QUERÉTARO	1	TONSILA C-1	NEG	NEG	NEG
37	QUERÉTARO	1	LINFONODO C-1	NEG	NEG	NEG
38	QUERÉTARO	1	LINFONODO C-2	NEG	NEG	NEG
39	QUERÉTARO	1	PULMON C-2	NEG	NEG	NEG
40	QUERÉTARO	1	TONSILA C-2	NEG	NEG	NEG
41	QUERÉTARO	2	PULMON C-1	NEG	NEG	NEG
42	QUERÉTARO	2	LINFONODO RF C-1	NEG	NEG	NEG
43	QUERÉTARO	2	TONSILA C-1	NEG	NEG	NEG
44	QUERÉTARO	2	PULMON C-2	NEG	NEG	NEG
45	QUERÉTARO	2	LINFONODO RF C-2	NEG	NEG	NEG
46	QUERÉTARO	2	TONSILA C-2	NEG	NEG	NEG
47	QUERÉTARO	3	PULMON C-1	NEG	NEG	NEG
48	QUERÉTARO	3	TONSILA C-1	NEG	NEG	NEG
49	QUERÉTARO	3	LINFONODO SMAX C-1	NEG	NEG	NEG
50	QUERÉTARO	3	PULMON C-2	NEG	NEG	NEG
51	QUERÉTARO	3	TONSILA C-2	NEG	NEG	NEG
52	QUERÉTARO	3	LINFONODO SMAX C-2	NEG	NEG	NEG
53	QUERÉTARO	4	LINFONODO RF C-1	NEG	NEG	NEG
54	QUERÉTARO	4	TONSILA C-1	NEG	NEG	NEG
55	QUERÉTARO	4	PULMON C-1	NEG	NEG	NEG
56	QUERÉTARO	4	GRF C-2	NEG	NEG	NEG
57	QUERÉTARO	4	TONSILA C-2	NEG	NEG	NEG

No. DE MUESTRA	ESTADO	GRANJA	TEJIDO	RT- PCR EN TEJIDO	RT-PCR DE 3° PASE VPRRS	RT- PCR DE 1° PASE VPRRS
58	QUERÉTARO	4	PULMON C-2	NEG	NEG	NEG
59	QUERÉTARO	5	PULMON C-1	NEG	NEG	NEG
60	QUERÉTARO	5	LINFONODO C-1	NEG	NEG	NEG
61	QUERÉTARO	5	TONSILA C-1	NEG	NEG	NEG
62	QUERÉTARO	5	TONSILA C-2	POS	NEG	NEG
63	QUERÉTARO	5	LINFONODO C-2	POS	NEG	NEG
64	QUERÉTARO	5	PULMON C-2	POS	NEG	NEG
65	QUERÉTARO	6	TONSILA C-1	NEG	NEG	NEG
66	QUERÉTARO	6	LINFONODO C-1	NEG	NEG	NEG
67	QUERÉTARO	6	PULMON C-1	NEG	NEG	NEG
68	QUERÉTARO	6	TONSILA C-2	NEG	NEG	NEG
69	QUERÉTARO	6	LINFONODO C-2	NEG	NEG	NEG
70	QUERÉTARO	6	PULMON C-2	NEG	NEG	NEG
71	QUERÉTARO	7	TONSILA C-1	NEG	NEG	NEG
72	QUERÉTARO	7	LINFONODO C-1	NEG	NEG	NEG
73	QUERÉTARO	7	PULMON C-1	NEG	NEG	NEG
74	QUERÉTARO	7	PULMON C-2	NEG	NEG	NEG
75	QUERÉTARO	7	LINFONODO C-2	NEG	NEG	NEG
76	QUERÉTARO	7	TONSILA C-2	NEG	NEG	NEG
77	QUERÉTARO	7	TONSILA C-3	NEG	NEG	NEG
78	QUERÉTARO	7	PULMON C-3	NEG	NEG	NEG
79	QUERÉTARO	7	LINFONODO C-3	NEG	NEG	NEG
80	QUERÉTARO	8	TONSILA C-1	NEG	NEG	NEG
81	QUERÉTARO	8	PULMON C-1	NEG	NEG	NEG
82	QUERÉTARO	8	LINFONODO C-1	NEG	NEG	NEG
83	QUERÉTARO	8	TONSILA C-2	NEG	NEG	NEG
84	QUERÉTARO	8	PULMON C-2	NEG	NEG	NEG

No. DE MUESTRA	ESTADO	GRANJA	TEJIDO	RT- PCR EN TEJIDO	RT-PCR DE 3° PASE VPRRS	RT- PCR DE 1° PASE VPRRS
85	QUERÉTARO	8	LINFONODO C-2	NEG	NEG	NEG
86	QUERÉTARO	9	PULMON C-1	NEG	NEG	NEG
87	QUERÉTARO	9	LINFONODO C-1	NEG	NEG	NEG
88	QUERÉTARO	9	TONSILA C-1	NEG	NEG	NEG
89	QUERÉTARO	9	PULMON C-2	NEG	NEG	NEG
90	QUERÉTARO	9	LINFONODO C-2	NEG	NEG	NEG
91	QUERÉTARO	9	TONSILA C-2	NEG	NEG	NEG
92	QUERÉTARO	10	TONSILA C-1	NEG	NEG	NEG
93	QUERÉTARO	10	PULMON C-1	NEG	NEG	NEG
94	QUERÉTARO	10	LINFONODO C-1	NEG	NEG	NEG
95	QUERÉTARO	10	TONSILA C-2	NEG	NEG	NEG
96	QUERÉTARO	10	PULMON C-2	NEG	NEG	NEG
97	QUERÉTARO	10	LINFONODO C-2	NEG	NEG	NEG
98	GUANAJUATO	6	TONSILA C-1	POS	NEG	NEG
99	GUANAJUATO	6	PULMON C-1	POS	NEG	NEG
100	GUANAJUATO	6	L. INGUIN C-1	POS	NEG	NEG
101	GUANAJUATO	6	TONSILA C-2	POS	NEG	NEG
102	GUANAJUATO	6	PULMON C-2	POS	NEG	POS
103	GUANAJUATO	6	L. INGUIN C-2	POS	NEG	NEG
104	GUANAJUATO	6	TONSILA C-3	NEG	NEG	NEG
105	GUANAJUATO	6	PULMON C-3	NEG	NEG	NEG
106	GUANAJUATO	6	POOLG.ING C-3	NEG	NEG	NEG
107	GUANAJUATO	7	TONSILA C-1	POS	NEG	NEG
108	GUANAJUATO	7	PULMON C-1	POS	NEG	NEG
109	GUANAJUATO	7	L. INGUIN C-1	NEG	NEG	NEG
110	GUANAJUATO	7	TONSILA C-2	NEG	NEG	NEG
111	GUANAJUATO	7	PULMON C-2	NEG	NEG	NEG

No. DE MUESTRA	ESTADO	GRANJA	TEJIDO	RT- PCR EN TEJIDO	RT-PCR DE 3° PASE VPRRS	RT- PCR DE 1° PASE VPRRS
112	GUANAJUATO	7	L. INGUIN C-2	POS	NEG	NEG
138	GUANAJUATO	8	TONSILA C-1	POS	NEG	POS
139	GUANAJUATO	8	PULMON C-1	POS	NEG	POS
140	GUANAJUATO	8	LINFONODO C-1	POS	NEG	POS
141	GUANAJUATO	8	RIÑON C-1	POS	NEG	NEG
142	GUANAJUATO	8	PULMON C-2	POS	NEG	NEG
143	GUANAJUATO	8	POOL G. ING. C-2	POS	NEG	POS
144	MICHOACÁN	1	TONSILA C-1	POS	NEG	NEG
145	MICHOACÁN	1	PULMON C-1	POS	NEG	NEG
146	MICHOACÁN	1	LINFONODO SMAX C-1	NEG	NEG	NEG
147	MICHOACÁN	1	TONSILA C-2	POS	NEG	NEG
148	MICHOACÁN	1	PULMON C-2	POS	NEG	POS
149	MICHOACÁN	1	LINFONODO SMAX C-2	NEG	NEG	NEG

TABLA 3. Resultados de PCR respecto a otros virus.

DE No. MUESTRA	ESTADO	GRANJA	PCR EOA	PCR PCV2	RT- PCR PRRS
1	GUANAJUATO	1	NEG	NEG	NEG
2	GUANAJUATO	1	NEG	NEG	NEG
3	GUANAJUATO	1	NEG	NEG	NEG
4	GUANAJUATO	1	NEG	NEG	NEG
5	GUANAJUATO	1	NEG	NEG	NEG
6	GUANAJUATO	1	NEG	NEG	NEG
7	GUANAJUATO	2	NEG	NEG	POS
8	GUANAJUATO	2	NEG	NEG	POS
9	GUANAJUATO	3	NEG	POS	NEG
10	VERACRUZ	3	NEG	NEG	POS
11	GUANAJUATO	3	NEG	POS	NEG
12	PUEBLA	1	NEG	POS	NEG
13	PUEBLA	1	NEG	POS	NEG
14	PUEBLA	1	NEG	POS	NEG
15	PUEBLA	1	NEG	POS	NEG
16	PUEBLA	2	NEG	NEG	NEG
17	PUEBLA	2	NEG	NEG	NEG
18	PUEBLA	3	NEG	NEG	NEG
19	PUEBLA	3	NEG	NEG	NEG
20	PUEBLA	3	NEG	NEG	NEG
21	PUEBLA	3	NEG	NEG	NEG
22	GUANAJUATO	4	NEG	POS	NEG
23	GUANAJUATO	4	POS	POS	NEG
24	GUANAJUATO	4	NEG	NEG	NEG
25	GUANAJUATO	4	NEG	POS	NEG
26	VERACRUZ	1	NEG	POS	NEG

DE No. MUESTRA	ESTADO	GRANJA	PCR EOA	PCR PCV2	RT- PCR PRRS
27	VERACRUZ	1	NEG	POS	NEG
28	VERACRUZ	1	NEG	NEG	NEG
29	GUANAJUATO	5	NEG	NEG	NEG
30	GUANAJUATO	5	NEG	NEG	NEG
31	GUANAJUATO	5	NEG	POS	NEG
32	GUANAJUATO	5	NEG	NEG	NEG
33	GUANAJUATO	5	NEG	NEG	NEG
34	GUANAJUATO	5	NEG	POS	NEG
35	QUERÉTARO	1	NEG	NEG	NEG
36	QUERÉTARO	1	NEG	NEG	NEG
37	QUERÉTARO	1	NEG	NEG	NEG
38	QUERÉTARO	1	NEG	NEG	NEG
39	QUERÉTARO	1	NEG	NEG	NEG
40	QUERÉTARO	1	NEG	NEG	NEG
41	QUERÉTARO	2	NEG	NEG	NEG
42	QUERÉTARO	2	NEG	NEG	NEG
43	QUERÉTARO	2	NEG	NEG	NEG
44	QUERÉTARO	2	NEG	POS	NEG
45	QUERÉTARO	2	NEG	POS	NEG
46	QUERÉTARO	2	NEG	POS	NEG
47	QUERÉTARO	3	NEG	POS	NEG
48	QUERÉTARO	3	NEG	POS	NEG
49	QUERÉTARO	3	NEG	POS	NEG
50	QUERÉTARO	3	NEG	POS	NEG
51	QUERÉTARO	3	NEG	POS	NEG
52	QUERÉTARO	3	NEG	POS	NEG
53	QUERÉTARO	4	NEG	NEG	NEG
54	QUERÉTARO	4	NEG	NEG	NEG

DE No. MUESTRA	ESTADO	GRANJA	PCR EOA	PCR PCV2	RT- PCR PRRS
55	QUERÉTARO	4	NEG	NEG	NEG
56	QUERÉTARO	4	NEG	NEG	NEG
57	QUERÉTARO	4	NEG	NEG	NEG
58	QUERÉTARO	4	NEG	NEG	NEG
59	QUERÉTARO	5	NEG	NEG	NEG
60	QUERÉTARO	5	NEG	NEG	NEG
61	QUERÉTARO	5	NEG	NEG	NEG
62	QUERÉTARO	5	NEG	NEG	NEG
63	QUERÉTARO	5	POS	NEG	NEG
64	QUERÉTARO	5	NEG	NEG	NEG
65	QUERÉTARO	6	NEG	NEG	NEG
66	QUERÉTARO	6	NEG	NEG	NEG
67	QUERÉTARO	6	NEG	NEG	NEG
68	QUERÉTARO	6	NEG	NEG	NEG
69	QUERÉTARO	6	NEG	NEG	NEG
70	QUERÉTARO	6	NEG	NEG	NEG
71	QUERÉTARO	7	NEG	NEG	NEG
72	QUERÉTARO	7	NEG	NEG	NEG
73	QUERÉTARO	7	NEG	NEG	NEG
74	QUERÉTARO	7	NEG	POS	NEG
75	QUERÉTARO	7	NEG	POS	NEG
76	QUERÉTARO	7	NEG	POS	NEG
77	QUERÉTARO	7	NEG	POS	NEG
78	QUERÉTARO	7	NEG	POS	NEG
79	QUERÉTARO	7	NEG	POS	NEG
80	QUERÉTARO	8	POS	NEG	NEG
81	QUERÉTARO	8	POS	NEG	NEG
82	QUERÉTARO	8	NEG	NEG	NEG

DE No. MUESTRA	ESTADO	GRANJA	PCR	PCR	RT-PCR
			EOA	PCV2	PRRS
83	QUERÉTARO	8	NEG	NEG	NEG
84	QUERÉTARO	8	NEG	NEG	NEG
85	QUERÉTARO	8	NEG	NEG	NEG
86	QUERÉTARO	9	POS*	NEG	NEG
87	QUERÉTARO	9	POS*	NEG	NEG
88	QUERÉTARO	9	POS*	NEG	NEG
89	QUERÉTARO	9	POS*	NEG	NEG
90	QUERÉTARO	9	POS*	NEG	NEG
91	QUERÉTARO	9	POS*	NEG	NEG
92	QUERÉTARO	10	POS*	NEG	NEG
93	QUERÉTARO	10	POS*	NEG	NEG
94	QUERÉTARO	10	POS*	NEG	NEG
95	QUERÉTARO	10	POS*	NEG	NEG
96	QUERÉTARO	10	POS*	NEG	NEG
97	QUERÉTARO	10	POS*	NEG	NEG
98	GUANAJUATO	6	NEG	NEG	NEG
99	GUANAJUATO	6	NEG	NEG	NEG
100	GUANAJUATO	6	NEG	NEG	NEG
101	GUANAJUATO	6	NEG	POS	NEG
102	GUANAJUATO	6	NEG	NEG	POS**
103	GUANAJUATO	6	NEG	NEG	NEG
104	GUANAJUATO	6	NEG	NEG	NEG
105	GUANAJUATO	6	NEG	POS	NEG
106	GUANAJUATO	6	NEG	POS	NEG
107	GUANAJUATO	7	NEG	NEG	NEG
108	GUANAJUATO	7	NEG	NEG	NEG
109	GUANAJUATO	7	NEG	NEG	NEG
110	GUANAJUATO	7	NEG	NEG	NEG

No. DE MUESTRA	ESTADO	GRANJA	PCR EOA	PCR PCV2	RT- PCR PRRS
111	GUANAJUATO	7	NEG	NEG	NEG
112	GUANAJUATO	7	NEG	NEG	NEG
138	GUANAJUATO	8	NEG	NEG	POS**
139	GUANAJUATO	8	POS	NEG	POS**
140	GUANAJUATO	8	POS	NEG	POS**
141	GUANAJUATO	8	POS	NEG	NEG
142	GUANAJUATO	8	POS	NEG	NEG
143	GUANAJUATO	8	NEG	NEG	POS**
144	MICHOACÁN	1	NEG	NEG	NEG
145	MICHOACÁN	1	NEG	NEG	NEG
146	MICHOACÁN	1	POS	NEG	NEG
147	MICHOACÁN	1	POS	POS	NEG
148	MICHOACÁN	1	POS	POS	POS**
149	MICHOACÁN	1	NEG	POS	NEG