



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA  
SALUD ANIMAL

**INTERACCIONES VIRALES CON CIRCOVIRUS PORCINO  
TIPO 2 EN CERDOS CONVENCIONALES EN LA ETAPA DE  
CRECIMIENTO.**

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ROSALBA GUTIÉRREZ DOLORES

TUTOR: HUMBERTO RAMÍREZ MENDOZA

COMITÉ TUTORAL: JESÚS HERNÁNDEZ LÓPEZ .  
ARMANDO PÉREZ TORRES

MÉXICO DF

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por permitirme realizar el posgrado bajo sus aulas y permitirme ser parte de ella.

Al CONACYT por proporcionarme el apoyo económico necesario para solventar mis estudios de posgrado.

Al Dr. Humberto Ramírez Mendoza, por permitirme realizar este proyecto bajo su dirección, por todos los años de convivencia y por la experiencia compartida. GRACIAS HUMBERTO.

A todas y cada una de las personas que conforman el Departamento de Microbiología e Inmunología FMVZ-UNAM, porque en estos últimos años han sido mi familia.

A los doctores: Mario Solís Hernández, Iván Sánchez Betancourt, Jesús Hernández López, Armando Pérez Torres, Andrea Ropón, Eduardo Fano, porque a pesar de la figura que representa cada uno de ustedes, siempre recibí su apoyo incondicional.

Por supuesto a mi familia, Oli, Pedro, Mel, Rafa, por su cariño, apoyo y entrega, doy gracias y pido una disculpa por estos años de ausencia.

Este trabajo fue financiado por los siguientes proyectos: PAPIIT-IN211308 “Evaluación del Rubulavirus porcino en semen de verracos”. CONACYT AC-90024 “Estandarización de técnicas de diagnóstico para la enfermedad de ojo azul en cerdos”. PAPIME-PE/202709. “Apoyo a la docencia en las prácticas de laboratorio de la materia de virología y enfermedades virales de los animales domésticos de la FMVZ-UNAM”.

## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
A. EPIDEMIOLOGÍA DE CVP-2 .....	1
B. PATOGÉNESIS E INMUNOESTIMULACIÓN.....	2
C. INTERACCIONES VIRALES. ....	3
1. <i>Complejo respiratorio porcino (CRP)</i> . ....	3
2. <i>Síndrome multisistémico de desgaste postdestete (SMDP)</i> .....	4
<b>II. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>7</b>
<b>III. HIPÓTESIS.....</b>	<b>7</b>
<b>IV. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>7</b>
<b>V. OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>7</b>
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>8</b>
A. OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS. ....	8
1. <i>Localización</i> . ....	8
2. <i>Animales</i> .....	8
B. TÉCNICAS PARA DETERMINACIÓN DE NIVELES DE ANTICUERPOS Y AISLAMIENTO VIRAL. ....	8
1. <i>Inmunoperoxidasa sobre monocapa de cultivo celular (IPMA)</i> .....	8
2. <i>Inhibición de la hemoaglutinación (IHA)</i> .....	9
3. <i>Inmunofluorescencia indirecta (IFI)</i> .....	9
4. <i>Virus suero neutralización (VSN)</i> .....	10
5. <i>Aislamiento viral</i> .....	10
C. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	11
<b>VII. RESULTADOS .....</b>	<b>12</b>
1. CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2.....	12
a) <i>Aislamiento y serología</i> .....	12
b) <i>Diferencias entre grupos: identificación y períodos de producción</i> .....	13
2. RUBULAVIRUS PORCINO .....	17
a) <i>Aislamiento y serología</i> .....	17

b) <i>Diferencias entre grupos: identificación y períodos de producción.</i> .....	18
3.    VIRUS DEL SÍNDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO	
a) <i>Serología: Diferencias entre grupos y por período de producción</i> .....	21
4.    VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY .....	23
a) <i>Serología y aislamiento</i> .....	23
5.    INFLUENZA PORCINA H3N2 .....	24
b) <i>Serología: Diferencias entre grupos y por período de producción</i> .....	24
6.    PARVOVIRUS PORCINO .....	26
a) <i>Serología: diferencias entre grupos y por período de producción</i> .....	<b>¡Error!</b>
<b><i>Marcador no definido.</i></b>	
ASOCIACIONES ENTRE LOS DIFERENTES VIRUS PORCINOS.....	29
<b>VIII. DISCUSION .....</b>	<b>32</b>
<b>IX. CONCLUSIONES.....</b>	<b>36</b>
<b>X. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>37</b>

## INDICE DE GRÁFICAS

<b>GRÁFICA 1.</b> <i>Identificación y serología de CVP2 por grupos</i> .....	15
<b>GRÁFICA 2.</b> <i>Comparación del título de anticuerpos de CVP2 por periodo de producción</i> .....	16
<b>GRÁFICA 3.</b> <i>Comparación del porcentaje acumulado de muestras positivas de CVP2 por grupos</i> .....	16
<b>GRÁFICA 4.</b> <i>Identificación y serología de RbVP</i> .....	19
<b>GRÁFICA 5.</b> <i>Comparación del título de anticuerpos de RbVP por periodo de producción</i> .....	20
<b>GRÁFICA 6.</b> <i>Comparación del porcentaje acumulado de muestras positivas de RbVP por grupos</i> .....	22
<b>GRÁFICA 7.</b> <i>Serología de VSRRP</i> .....	23
<b>GRÁFICA 8.</b> <i>Comparación del título de anticuerpos de VPRSS por periodo de producción</i> .....	23
<b>GRÁFICA 9.</b> <i>Serología de VIP-H3N2</i> .....	25
<b>GRÁFICA 10.</b> <i>Comparación del título de anticuerpos de VIP-H3N2 por periodo de producción</i> .....	26
<b>GRAFICA 11.</b> <i>Serología PVP</i> .....	28
<b>GRÁFICA 12.</b> <i>Comparación del título de anticuerpos de PVP por periodo de producción</i> .....	29

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>CUADRO 1.</b> <i>Coeficientes de correlación <math>r</math> (RHO) de Spearman para Edad vs los diferentes virus estudiados</i> .....	30
<b>CUADRO 2.</b> <i>Coeficientes de correlación <math>r</math> (RHO) de Spearman de Viru vs virus</i> .....	31

## RESUMEN

Las enfermedades más importantes en la etapa de crecimiento de los cerdos están relacionadas con el complejo respiratorio porcino y el síndrome de desgaste pos-destete en donde el circovirus porcino tipo 2 (CVP2) tiene una participación muy importante, sin embargo es necesaria la participación de otros antígenos principalmente virales para desencadenar una condición patológica. El objetivo principal del presente trabajo consistió en determinar cuales son las interacciones más comunes en cerdos convencionales: sanos y enfermos, en la etapa de crecimiento. Para lo cual se utilizaron muestras serológicas de 140 cerdos de 4, 6, 8, 10, 12, 16 y 22 semanas de edad, 10 animales sanos (G1) y 10 enfermos G2 de cada edad. Se detectaron anticuerpos contra: CVP2, síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), virus de la enfermedad de Aujeszky (VEA), rubulavirus porcino (RbVP), influenza porcina subtipo H3N2(IP) y parvovirus porcino (PPV). Se realizó aislamiento viral sobre cultivo celular para los primeros cuatro antígenos. Los resultados muestran alta seroprevalencia de CVP2, PPV y PRRS en ambos grupos, mientras que PRV no es significativo ( $p > 0.05$ ) para ninguno. Los análisis de correlación indican que las interacciones presentes en G1 no se presentan en G2. La interacción más importante en el G1, está dada por CVP2 y PPV, el cual no se relacionó con enfermedad. En G2 hay gran participación de RbVP e IP asociado a condición de enfermedad. El RbVP e IP han marcado diferencias importantes entre ambos grupos. En G2 mantienen alta seroprevalencia, no así en G1. En aislamiento se logró la detección de RbVP donde el 45% de las muestras son positivas en G1 y en 81% en G2, en contraste con CVP2 en un 52% en G1 y 18% en G2. Por tanto las principales interacciones virales que afectan a cerdos convencionales en la etapa de crecimiento no están dadas con circovirus porcino tipo 2.

Palabras clave: Circovirus porcino tipo 2, enfermedades virales del cerdo.

## ABSTRACT

The most important diseases in the growth stage of the pigs, are associated with porcine respiratory complex and post-weaning multisistémic wasting syndrome. Porcine circovirus type 2 (PCV2) is very important on it. However is necessary to involve other viral antigens mainly to trigger a pathological condition. The main objective of this study was to determine which interactions are most common in conventional pigs: healthy and sick, in the growth stage. To this work were used serum samples from 140 pigs in 4, 6, 8, 10, 12, 16 and 22 weeks of age, 10 in each age healthy animals (G1) and 10 sick animals G2. Antibodies detected to: PCV2, porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), Aujeszky's disease (PRV), porcine rubulavirus(RbVP), swine influenza-H3N2 (IP) and porcine parvovirus (PPV). Virus isolation was on cell culture for the first four antigens. The results show high seroprevalence of CVP2, PPV and PRRS in both groups. PRV was not significant ( $p > 0.05$ ) for none group. The correlation analysis indicate that the interactions present in G1 do not occur in G2. The interaction is more important in the G1, is given by CVP2 and PPV, which was not associated with disease. In G2 there is great participation RbVP and IP associated with disease status. The RbVP and IP have marked differences between groups. Maintaining high seroprevalence in G2, but not in G1. Isolation show that: RbVP where 45% of the samples are positive in G1 and 81% in G2, in contrast to CVP2 by 52% in G1 and 18% in G2. Thus the main interactions that affect viral conventional pigs in the growth stage are not given with porcine circovirus type 2.

Keywords: Porcine circovirus type 2, virus from pigs.

## I. INTRODUCCIÓN

En México, las enfermedades virales más frecuentes durante la etapa de crecimiento están relacionadas al complejo respiratorio porcino (CRP) y el síndrome de desgaste postdestete (SMDP) en las cuales están involucrados: el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), Parvovirus porcino (PPV), virus de la influenza porcina (VIP), además del virus de la enfermedad de Aujeszky o pseudorabia porcina (SR). Actualmente el virus porcino tipo 2 (CVP2) es considerado como un importante patógeno asociado a estos y otros síndromes en cerdos. CVP2 ocasiona una depleción linfocítica, lo que provoca una susceptibilidad a infecciones virales o bacterianas de tipo secundario y, aumento en la mortalidad, pues dada por cualquiera de estos agentes no supera el 10% cuando actúan de forma individual, pero puede llegar hasta el 50% cuando actúan de forma simultánea (Chae *et al.*, 2005; Ellis *et al.*, 2004; Segalés *et al.*, 2002).

### A. Epidemiología de CVP-2

CVP2 presenta una distribución mundial (Allan y Ellis, 2000). Alrededor del 100% de los animales muestreados en Europa, Estados Unidos y Canadá son seropositivos. En México la primera descripción fue realizada por Trujano en el año 2001 (Trujano *et al.*, 2001), corroborada por Ramírez en el 2004, quien además, reporta la presencia del virus en México desde 1972 (Ramírez MH *et al.*, 2006).

Las vías de transmisión son la ingestión o inhalación de partículas víricas a partir de secreciones oro-nasales, orina o heces de cerdos infectados. CVP2 presenta un seroperfil típico de muchas infecciones víricas del cerdo, caracterizado por una baja de los anticuerpos colostrales durante el destete y una seroconversión al inicio de la engorda, con presencia de anticuerpos hasta el final. Experimentalmente se ha demostrado que la aparición de anticuerpos no necesariamente está relacionado con la presentación de enfermedad. El perfil serológico que se presenta en granja está muy relacionado con el estado de viremia de los animales, lo cual es más frecuente entre las 7 y 16 semanas de vida, además es variable, oscilando entre 5 y 21 semanas de duración. Se ha observado también que cerdos seropositivos, pueden ser virémicos, lo

que sugiere la ausencia de anticuerpos neutralizantes o un desarrollo tardío de estos (Calsamiglia *et al.*, 2001; Sibila *et al.*, 2004).

## **B. Patogénesis e inmunoestimulación.**

Se ha detectado con mucha frecuencia genoma o antígeno del CVP2 en células presentadoras de antígeno. Se ha descrito que CVP2 se puede encontrar en citoplasma de células dendríticas, monocitos y macrófagos derivados de monocitos, aunque no se ha demostrado que estas permitan un eficiente replicación vírica (Guilpin *et al.*, 2003). Característicamente los animales con desmedro presentan neutrofilia monocitosis y, aunque el número total de leucocitos no está alterado, se presenta una disminución significativa en el número de linfocitos. En un perfil hematológico un cerdo con circovirus tendrá 60 -70% de neutrófilos y un 30-40% de linfocitos, mientras que las proporciones de un animal sano deberían ser las opuestas (Segalés *et al.*, 2000).

Por otra parte, ha sido demostrado experimentalmente que la activación del sistema inmune de cerdos infectados con CVP2, por algún virus o agente no infeccioso mejora la replicación y aumenta la carga viral en tejidos y suero. Indicando que la infección por CVP2 y la inmunoestimulación pueden ser el punto desencadenante para el desarrollo de SMDP (Shibara *et al.*, 2000).

CVP2 se localiza principalmente en células de la línea monocito macrófago, así como en otras células presentadoras de antígeno, tales como las células dendríticas foliculares. Se ha sugerido que la depleción de los órganos linfoides observada en los casos de SMDP podría ser causada por la apoptosis de las células B; también se ha observado disminución de células T en los órganos afectados, así como un incremento de las células en la línea monocito macrófago, y de la expresión de MHC-II. En sangre periférica las alteraciones son similares a las detectadas en los órganos linfoides, en donde se observa disminución de linfocitos T (especialmente en linfocitos CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>-CD8<sup>+</sup>) y linfocitos B así como un aumento de los monocitos circulantes. Estos hallazgos sugieren que, la capacidad de respuesta inmune de los cerdos afectados por CVP2 y afectados clínicamente por SMDP está alterada. En cerdos infectados experimentalmente con CVP2, la seroconversión ha sido demostrada por presentarse entre 14 y 28 días post-infección en animales con y sin enfermedad clínica. Algunos estudios han demostrado que

los cerdos enfermos seroconvierten en la etapa final de la infección (Rodríguez-Arrijoja *et al.*, 2002).

Los anticuerpos calostrales van declinando durante la fase de lactación sin desaparecer. Se observa seroconversión entre la 7<sup>a</sup>. y 12<sup>a</sup>. semanas de vida, que coincide con la forma clínica de la enfermedad (Rodríguez-Arrijoja *et al.*, 2002)

El SMDP no se observa en lechones menores de 4 semanas de edad (Segalés y Domingo, 2002) lo cual se asocia con la inmunidad materna, que evita el desarrollo de SMDP (Allan *et al.*, 2002). Aunque la respuesta inmune humoral a CVP2 en campo se da de los 2-3 meses de edad, un porcentaje variable de animales en crecimiento o finalización pueden ser virémicos, lo cual sugiere que los anticuerpos no dan una protección completa (Rodríguez-Arrijoja *et al.*, 2002). Esta situación puede ocurrir en animales adultos en condiciones de granja, desde que son infectados pero no manifiestan sinología clínica aparente (Calsamiglia *et al.*, 2002).

### C. **Interacciones virales.**

#### 1. **Complejo respiratorio porcino (CRP).**

Es una enfermedad muy seria en animales de engorda y finalización, afecta especialmente entre la 16 y 22 semanas de edad, y se caracteriza por retraso en el crecimiento, baja conversión alimenticia, letargo, anorexia, fiebre, tos y disnea (Tacker *et al.*, 2001). La neumonía en cerdos con CRP, es debida a la combinación de agentes bacterianos y virales como CVP2, PRRSV, VIP, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobasillus pleuroneumonie* y *Pasteurella multocida*. La identificación de CVP2 en casos de neumonía necrotizante, sugiere una gran participación de este en el CRP. El papel de CVP2 en el CRP siempre está relacionado con la interacción o sinergismo con otros patógenos respiratorios. En alrededor del 55% de los casos de CRP, hay evidencia de la interacción de CVP2 y PRRSV. Coinfecciones experimentales entre CVP2 y PRRS, induce signos respiratorios y lesiones pulmonares mas severas. PRRSV potencializar la acción de PCV2 (Kim *et a.l.*, 2003).

Los cerdos afectados presentan generalmente disnea. En estos animales, a la necropsia y a nivel histológico, se observa una neumonía intersticial. Neumonía proliferativa y necrotizante es un término utilizado para describirlos hallazgos

histológicos propios de una neumonía subaguda o crónica en el cerdo. Estas lesiones han sido asociadas con la infección por influenza y PRRS. Estudios recientes han revelado alta prevalencia de PCV2, ocasionalmente interactuando con PRRS y otros agentes. PCV2 se puede identificar en epitelio bronquial y macrófagos alveolares, mientras que PRRS es detectable en cantidades menores y se limita a los macrófagos (Drolet *et al.*, 2003; Harms *et al.*, 2002, ).

## **2. Síndrome multisistémico de desgaste postdestete (SMDP)**

Es la enfermedad asociada a CVP2 de mayor impacto económico. Comúnmente afecta a cerdos de 2 a 4 meses de edad. SMDP es caracterizado por pérdida de peso, palidez corporal, alteraciones respiratorias y en algunos casos ictericia y diarrea. Las lesiones observadas con mayor frecuencia se encuentran en nódulos linfáticos que pueden presentar un aumento de tamaño y color blanquecino; las lesiones histológicas se observan en los órganos linfoides se caracterizan por depleción linfocitaria, infiltración de células histiocíticas, células gigantes multinucleadas y necrosis lítica multifocal (Segalés y Domingo, 2002). En pulmón no se observa colapso con un marcado patrón lobulillar y/o zonas de consolidación en los lóbulos medio y craneal, atribuidas a infecciones bacterianas concomitantes. En riñón detectamos múltiples focos blanquecinos de diámetro variable en la corteza, los histiocitos presentan cuerpos de inclusión intracitoplásmicos así como gran cantidad de ácido nucleico viral detectado mediante hibridación *in situ* (Rossell *et al.*, 1999).

La signología clínica en cerdos convencionales no es específica y no responde a terapia con antibióticos. La morbilidad varía entre 4 y 30%, pudiendo alcanzar hasta más del 50%. La mortalidad va del 1-2 y puede alcanzar el 30% (Allan y Ellis, 2000; Kim y Chae, 2002; Segalés y Domingo 2002 ).

Si bien es un hecho que en la mayoría de las explotaciones expuestas a CVP-2 se produce una seroconversión, solo en algunas explotaciones seropositivas se observan algunos animales que manifiestan episodios de enfermedades relacionados con el SMDP. La elevada frecuencia de infecciones subclínicas, pone de manifiesto la necesidad de que ocurran factores adicionales (estrés, característica propias del animal, condiciones inmunológicas o la presencia de otros virus concomitantes) como causa final para la aparición de enfermedad clínica. Tanto en campo como experimentalmente

la aparición de síntomas y lesiones en cerdos infectados con CVP-2 se observa cuando se produce la infección simultánea con otros patógenos (Kim y Chae 2002; Pallares *et al.*, 2002, Segalés y Domingo, 2002).

La coinfección de virus o bacterias ha ocasionado que los porcentajes de mortalidad en SMDP se incrementen del 1-2% al 10-25% (Allan y Ellis, 2002; Kim y Che 2002). La presencia de SMDP ocasionada solamente por CVP-2, representa el 15 % de los casos. Los principales agentes infecciosos virales asociados con SMDP son: el virus del PRRS, el virus de Influenza, Parvovirus porcino y el virus de Aujeszky. La contribución de estos patógenos a la aparición del síndrome se ha confirmado en numerosos estudios realizados. Se han propuesto distintos mecanismos por los cuales determinados virus podrían potencializar la enfermedad en animales infectados con CVP2 resultando en SMDP. Por una parte, tanto PRRS, como PPV, se han asociado a efectos inmunosupresores lo que podría tener relevancia para la aparición de SMDP, en coinfecciones con CVP2. Alternativamente PCV2 y PPV, son virus DNA que dependen de la síntesis de DNA celular para una óptima producción de viriones por lo que la estimulación de la síntesis de DNA celular durante la infección por PPV (macrófagos e histiocitos son células diana para ambos virus), podría promover al mismo tiempo una mayor replicación de CVP2. De igual forma, se ha demostrado experimentalmente que una inmunoestimulación en cerdos gnobióticos infectados con CVP2, potencializa la producción de la progenie viral y por tanto su diseminación a tejidos, causando el SMDP. Estos resultados sugieren que en cerdos infectados con CVP2 la activación del sistema inmune es un evento fundamental y clave en la aparición del SMDP. La presencia de otros patógenos podría estar originada por el mismo efecto.

Dentro de los principales signos de SMDP están la diarrea, palidez e ictericia, sin la presencia aparente de agentes coinfectantes, aunque también se ha visto sinergismo con PPV para la generación de estos signos. Se ha descrito la coinfección de CVP2 con el virus de la enfermedad de Aujeszky en cerdos con SMDP grave y con lesiones hepáticas (Rodríguez- Arrijoja *et al.*, 1999). En hígado se *pueden* observar áreas de decoloración del parénquima con presencia de un prominente tejido conjuntivo interlobulillar. En casos graves se observan hepatocitos en apoptosis y grado variable de desorganización e cordones hepáticos, en un 50 a 75% de las animales afectados con

SMDP. También se ha observado lesiones hepáticas en desafío con CVP2 y PRRS en cerdos en crecimiento (Rosell *et al.*, 1999).

Esta situación de coinfección ocasiona que la presencia de los signos sea confusa. Las coinfecciones dependerán del tipo manejo en la explotación porcina, las condiciones sanitarias, área geográfica, hacinamiento. También puede desencadenarse cuando los cerdos infectados son inmunoestimulados con inmunógenos con adyuvante a base de aceites (Segalés y Domingo, 2002; Kim y Chae, 2002).

El Rubulavirus porcino, responsable de la enfermedad del ojo azul en cerdos lactantes y falla reproductiva en animales adultos, es un patógeno viral importante endémico en México es el impacto de éste en la línea de producción no está bien definido aún. Se ha reportado que en animales en la etapa de crecimiento no se presentan signos neurológicos como en animales lactantes, sin embargo si produce inmunosupresión a nivel de pulmón expresado en ligeros problemas respiratorios, al igual que PRRS y CVP2 (Stephano *et al.*, 1994)

## **II. JUSTIFICACIÓN**

CVP2 está relacionado con las principales enfermedades en la etapa de crecimiento y finalización en la producción porcina, resulta ser necesario para la presentación de estos y otros padecimientos. Experimentalmente se ha demostrado que es un virus que no cumple con los postulados de Koch, pues está presente en animales sanos, pero por si solo no es suficiente para desencadenar ninguna enfermedad, siempre está asociado a otra serie de elementos y agentes infecciosos, principalmente virales para que la enfermedad se exprese en toda su extensión. Por esto es importante definir cuáles son las infecciones mas frecuentes en cerdos convencionales en crecimiento.

## **III. HIPÓTESIS**

En cerdos convencionales de las 4 a las 22 semanas de edad las principales interacciones virales están dadas con circovirus porcino tipo 2.

## **IV. OBJETIVO GENERAL**

Identificar las principales asociaciones virales, en cerdos convencionales de las 4 a las 22 semanas de edad.

## **V. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Detectar anticuerpos contra las principales enfermedades virales que impactan en la línea de producción, Aujeszky, Ojo Azul, Síndrome reproductivo y respiratorio porcino, Influenza porcina subtipo H3N2, Parvovirus porcina y enfermedades asociadas a Circovirus.
- Identificar a los antígenos: Herpes virus suis tipo 1, Rubulavirus porcino, virus del PRRS y Circovirus porcino tipo 2.
- Correlacionar los hallazgos en serología y aislamiento para buscar la relación de las enfermedades dentro de una explotación específica.

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **A. Obtención de muestras biológicas.**

#### **1. Localización.**

Para la realización del presente proyecto de investigación se utilizaron muestras de animales provenientes de dos granjas porcinas convencionales con sistema de producción multisitios, las cuales se encuentran ubicadas en la región del Bajío mexicano. Se formaron dos grupos: 1) Grupo 1 (G1); formado a partir de los animales clínicamente sanos, y 2) Grupo 2 (G2); compuesto por animales clínicamente enfermos. Cabe mencionar que el diagnóstico clínico se basó en la opinión del médico experto dedicado al cuidado de la salud de dichos animales dentro de cada explotación.

#### **2. Animales**

Se obtuvieron muestras serológicas de cerdos de 4, 6, 8 y 10 semanas de edad, correspondientes a la etapa de destete y de 12, 16 y 22 semanas de edad, que se incluyen dentro de la etapa de engorda. Para cada grupo experimental se utilizaron 10 animales.

### **B. Técnicas para determinación de niveles de anticuerpos y aislamiento viral.**

Para la detección de anticuerpos frente a las diferentes enfermedades se realizaron las siguientes pruebas: 1. Inmunoperoxidasa sobre monocapa de cultivo celular (IPMA)- CVP-2. 2. Inhibición de la hemaglutinación (IHA) para RbVP, PVP y VIP-H3N2. 3. Inmunofluorescencia indirecta (IFI) para VPRRS. 4. Virus suero neutralización (VSN)-Virus de la enfermedad de Aujeszky (VEA).

Se realizó el aislamiento de los siguientes virus: VEA, CVP-2, VPRRS y RbVP. A partir de la inoculación sobre cultivo celular, y haciéndolo evidente por IPMA para circovirus e Inmunofluorescencia indirecta para los tres restantes. La metodología de las técnicas anteriores se describe a continuación.

#### **1. Inmunoperoxidasa sobre monocapa de cultivo celular (IPMA)**

Para la detección de anticuerpos frente a CVP-2, se prepararon placas de 96 pozos conteniendo células PK-15 infectadas con el virus mencionado. Se realizaron diluciones cuádruples del suero desde 1:20 hasta 1:20480. Las diluciones obtenidas se incubaron durante una hora a 37°C, para posteriormente agregarles un conjugado de

proteína A marcada con peroxidasa (Zymed Laboratories) y continuar con la incubación durante una hora más. El paso final consistió en el revelado con aminodietilcarbazol. Los sueros se consideraron positivos hasta la dilución en donde se encontraron núcleos de células teñidos de color marrón. (Rodríguez-Arriola et al., 2002; Segalés y Domingo 2002)

## **2. Inhibición de la hemoaglutinación (IHA)**

Para la titulación de anticuerpos en contra del RbVP, PVP y el VIP-H3N2 se emplearon placas para micro titulación de 96 pozos con fondo en “U”. Los sueros se inactivaron a 56°C durante 30 min y en cada pozo se agregaron 50µl de PBS y 50µl del suero sospechoso en el primer y segundo pozos de cada hilera. La dilución del suero se inició a partir del segundo pozo. Las diluciones iniciales comenzaron en 1:16, 1:32 y 1:80 para RbVP, PVP y VIP-H3N2, respectivamente. Después de diluir el suero se agregó el virus a cada pozo, calculando 8 unidades hemoaglutinantes por cada 50µl y se incubó durante 1 hora. Finalmente se agregaron 50µl de eritrocitos de ave lavados y concentrados al 0.5% en cada pozo, esto para el VIP-H3N2 para Influenza Porcina. Para el caso del RbVP se emplearon glóbulos rojos de bovino y para PVP fueron glóbulos rojos de cuyo. Las lecturas se realizaron a los 30, 45 y 60 minutos (Ramírez-Mendoza *et al.*, 1996; Burlenso, 1992)

## **3. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

La identificación de los anticuerpos de VPRRS consistió en la realización de ensayos de IFI en células MARC 145 infectadas con el VPRRS. Las cuales fueron fijadas con paraformaldehído y congeladas con etanol y 3% de peróxido de hidrógeno. Al momento de la descongelación las células se lavaron con PBS para después agregarles el suero problema, haciendo seis diluciones cuádruples a partir de la dilución 1:20. Posteriormente se incubó la muestra durante 30 minutos a 37°C y transcurrido este tiempo se realizaron tres lavados con PBST para finalmente agregar un conjugado anticuerpo (Anti porcine IgG FITC). Finalmente se realizó una contra tinción con azul de Evans durante 5 min. Se buscó fluorescencia específica en el citoplasma (OIE, 2008 ).

#### **4. Virus suero neutralización (VSN)**

Para la detección de HVP-1 mediante la técnica de VSN se utilizaron células VERO, las cuales fueron cultivadas en placas de 96 pozos hasta formar monoestrato al 70% de confluencia. La reacción antígeno-anticuerpo se realizó en otra placa, agregando inicialmente 50µl de solución de buffer de fosfatos salinos (PBS) en todos los pozos de la placa, seguidos de la adición de 50µl del suero problema al primer pozo de cada fila. Así, se realizaron 10 diluciones dobles, dejando 2 pozos como testigos. Posteriormente se agregaron a todos los pozos de la placa 50µl de virus (100 DICC<sub>50%</sub> del HVS-1), la placa se incubó durante 30 minutos para llevar a cabo la reacción antígeno-anticuerpo, finalmente se 50µl de esta solución a la primera placa. Después de un período de 72 horas, las células fueron fijadas y teñidas con cristal violeta. Los sueros se consideraron positivos cuando no se observó el efecto citopático y negativo cuando este fue evidente (OIE, 2008) .

#### **5. Aislamiento viral**

A partir de los sueros recolectados, se buscó la presencia de los agentes virales: HVP-1, RbVP, VPRRS y CVP-2. Se utilizó la línea celular PK15 para CVP-2, VERO para HVP-1, MARC para VPRRS y MDCK para RbVP. Para ello se inoculó un volumen de 50µl, diluido 1:5 en medio de cultivo celular. El inóculo se incubó durante 3 horas sobre el cultivo celular. Posteriormente se cambió por medio MEM Dulbecco adicionado con 10% de suero fetal bovino y bicarbonato. Las placas fueron fijadas a las 72 horas con paraformaldehído, y congeladas con etanol más 3% de peróxido de hidrógeno.

Para hacer evidente la replicación viral, se utilizó IFI. Se agregó el anticuerpo primario elaborado en conejo (anti HPV-1, VPRRS, RbVP y CVP-2), el cual se incubó durante 30 min, para después lavar tres veces con PBS. Posterior a los lavados, se agregó el anticuerpo secundario (Anti Rabbit IgG FITC), el cual se incubó durante 30 minutos y se procedió a hacer contra-tinción con Azul de Evans al 0.02% durante 5 minutos.

### C. Análisis estadístico

Para realizar el análisis de los datos experimentales se procedió a la transformación a  $\text{Log}_{(2)}$  de los valores obtenidos de la titulación de los anticuerpos, lo anterior debido a que se utilizaron únicamente diluciones pares en la serología. Las medias se expresan como medias geométricas con intervalos de confianza al 95% (IC 95%).

Se realizaron pruebas no paramétricas para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre dos grupos de datos (prueba “U” de Mann-Whitney, equivalente a una  $t$  de Student) y entre tres o más grupos de datos (prueba de Kruskal-Wallis, equivalente a un análisis de varianza de una vía). En caso de encontrar diferencias significativas con la prueba de Kruskal-Wallis se realizó una comparación entre grupos mediante la prueba de comparación múltiple de Dunn.

La comparación de identificación positiva de las muestras entre grupos se realizó mediante un análisis de sobrevivencia. En dicho análisis se grafica el porcentaje acumulado de identificación del virus específico y tomando como variable independiente la edad de los animales. La comparación de las curvas se realizó con la prueba de Log-rank (prueba de Mantel-Cox) que indica si existen diferencias en la forma de la curva y en el porcentaje total de animales detectados positivos en el total del tiempo en que se realizó el estudio.

Por otra parte, para determinar la existencia de correlaciones entre los diferentes tipos de virus y entre la edad de los animales se realizó un análisis multivariado no paramétrico con ayuda del coeficiente de correlaciones por rangos de Spearman, tomando como variables los valores de los títulos de anticuerpos de cada uno de los virus y la edad, lo anterior se realizó para los dos grupos por separado.

El análisis estadístico se realizó con el programa JMP 7.0.2 (SAS Institute, Cary NC, USA) y con GraphPad Prism 5.0. Para los resultados, un valor de  $P < 0.05$  se considero significativo.

## VII. RESULTADOS

### 1. CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2

#### a) Aislamiento y serología

Como respuesta a la infección de CVP-2 los ensayos, de serología muestran que la media geométrica de los títulos de anticuerpos presentan una tendencia hacia mayores niveles de anticuerpos en G1 conforme aumenta la edad de los animales (Gráfica 1A), con diferencias significativas entre las edades de los animales ( $p < 0.05$ ). De esta forma, las primeras edades, de 4-8 semanas (etapa de destete), presentaron los títulos de anticuerpos más bajos ( $p < 0.05$ ), mientras que en la semana 12 y 22 (etapa de engorda) se detectaron valores intermedios de títulos de anticuerpos, sin diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las semanas de 4-8 y las edades de 10 y 16 semanas, en las cuales se detectaron los títulos de anticuerpos significativamente más altos ( $p < 0.05$ ).

El análisis de los resultados experimentales indica que la identificación de CVP-2 en G1 se realizó en un 55.7% del total de las muestras (39/70) (Gráfica 1A), mientras que durante las primeras edades de muestreo (4, 6 y 8 semanas de vida) se detectan 12/30 animales (40% de identificación), que representa un porcentaje de aislamiento bajo, el cual se corresponde con los títulos de anticuerpos significativamente más bajos detectados en las mismas edades. En contraste, el porcentaje de identificación en las siguientes dos edades de muestreo, 10 y 12 semanas, es prominentemente mayor al previamente mencionado, ya que en estas edades se detectaron 18/20 animales (90% positividad al virus). Dicho incremento en la circulación del virus se refleja en el aumento gradual de los valores de titulación de anticuerpos en las siguientes edades de los animales experimentales (Gráfica 1A). Así, el valor más alto obtenido en la titulación de anticuerpos, correspondiente a la semana 16, es producto del incremento de la identificación del virus en las semanas previas (Gráfica 1A). De igual forma, el decremento en el título de anticuerpos de la semana 22 se corresponde con la disminución de muestras positivas detectadas durante la semana previa.

Con respecto a G2, CVP-2 se detectó en 18/70 muestras (25.7%). En la Figura 1B se aprecia la tendencia que presentó la identificación del virus a lo largo del

experimento, en donde únicamente se obtuvieron muestras positivas hasta la semana 12 de edad. En general, se obtuvieron números bajos en la identificación de las muestras, desde 2 hasta 6 animales detectados como positivos en las diferentes edades. Por tal razón no se aprecia un patrón preciso en la titulación de los anticuerpos en contra del virus, esto a pesar de que se encontraron diferencias significativas en los valores de los títulos para las edades exploradas en el experimento ( $p < 0.05$ ). De acuerdo al análisis realizado se determinó que las semanas 10 y 12 presentaron los valores de titulación más altos con respecto a la semana 16 que representa la edad que tiene los valores más bajos de anticuerpos ( $p < 0.05$ ). La anterior diferencia está determinada por la evidente disminución en la identificación de muestras positivas durante las edades de 10 y 12 semanas. Sin embargo, las edades restantes (4, 6, 8, 10 y 22) no presentaron diferencias significativas con las edades de 10, 12 y 16 semanas ( $p > 0.05$ ) (Gráfica 1B).

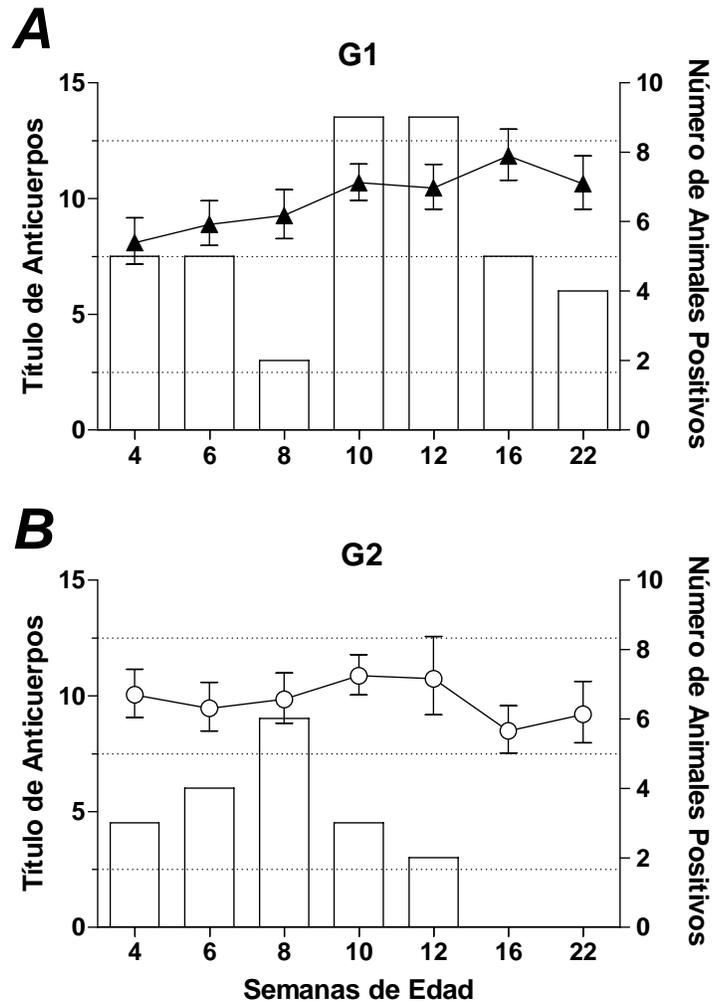
**b) Diferencias entre grupos: identificación y períodos de producción**

Con la intención de mostrar las diferencias existentes en las dos etapas de producción previamente definidas: Destete (4-10 semanas de edad) y Engorda (12-22 semanas de edad), se realizó una comparación del título de anticuerpos de CVP-2 dentro de cada grupo y posteriormente entre ambos grupos. La Gráfica 3 resume la información del análisis mencionado.

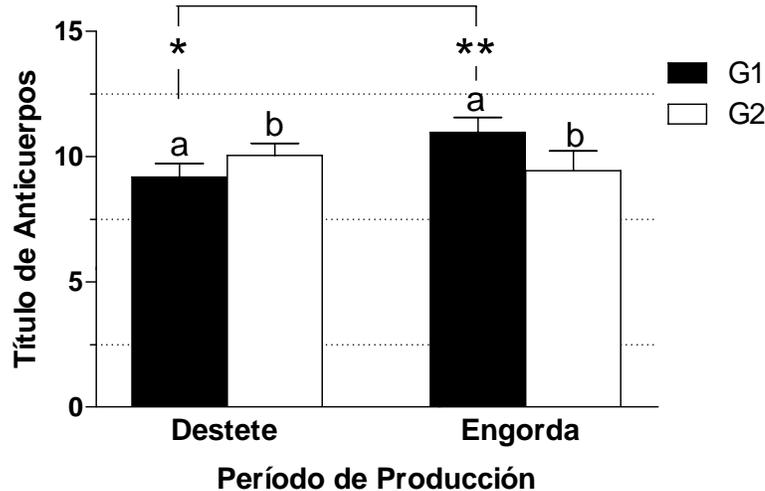
De forma general la Gráfica nos indica que existen diferencias significativas en ambos grupos con respecto al período de producción, esto es: para G1 se obtuvo un valor de 9.2 ( $8.9 < IC\ 95\% > 9.7$ ) para Destete y 10.9 ( $10.4 < IC\ 95\% > 11.6$ ) para Engorda, los cuales son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0.05$ ) (Gráfica 2). El anterior comportamiento se corrobora con la tendencia que se observa hacia un aumento del título de anticuerpos a lo largo del tiempo en G1 (Gráfica 1A). Con respecto a G2, se obtuvieron los siguientes valores: 10.0 ( $9.6 < IC\ 95\% > 10.5$ ) y 9.4 ( $8.7 < IC\ 95\% > 10.2$ ) para Destete y Engorda, respectivamente, sin diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) (Gráfica 2). Por otra parte, la comparación entre grupos para un mismo período de producción nos indicó que en Destete se presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre G1 y G2, siendo mayor la media geométrica del segundo (Gráfica 2). El caso contrario se presentó cuando se comparó el período de Engorda, en el cual se encontró

que la media geométrica mayor se presentó en G1, de igual forma la diferencia resulto significativa ( $p < 0.05$ ) (Gráfica 2).

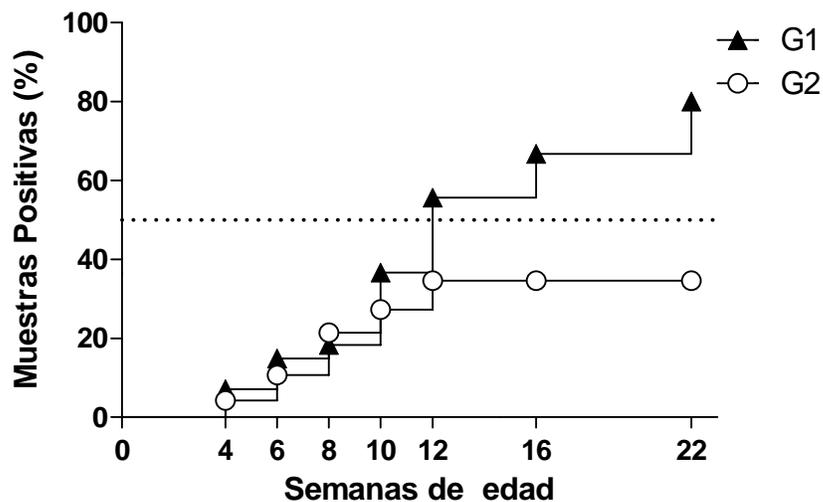
El análisis realizado para la comparación de la determinación de muestras positivas a lo largo del tiempo para ambos grupos experimentales se resume en la Gráfica 3. Como se aprecia en la Gráfica, G1 presenta un mayor porcentaje acumulado de muestras positivas al final del experimento, 80.0%. En contraste, G2 únicamente reporta para el mismo período de tiempo un 34.5% de muestras positivas acumuladas. Adicionalmente, el reporte de la prueba estadística indica que la forma de las curvas es significativamente diferente ( $p < 0.05$ ). También resulta evidente que en G2 a partir de 12 semanas de edad el porcentaje de muestras identificadas se mantiene constante hasta el final del experimento, mientras que para G1 se observa una marcada tendencia a incrementar el porcentaje de muestras positivas.



**GRÁFICA 1. Identificación y serología de CVP-2 por grupos.** Los puntos del eje Y izquierdo ( $\blacktriangle$  y  $\circ$ ) representan el título de anticuerpos detectado en las muestras de cada edad, expresados como la media geométrica con IC al 95%, y las columnas graficadas en el eje Y derecho representan el número de animales detectados como positivos para CVP-2 para G1 (A) y G2 (B). Nótese que se trazó una línea continua sobre los títulos de anticuerpos para mostrar la tendencia de los valores de titulación. Para todos los casos  $n = 10$  animales por edad.



**GRÁFICA 2. Comparación del título de anticuerpos de CVP-2 por período de producción.** Se presenta la media geométrica con IC al 95% del título de anticuerpos. Diferentes literales (a, b) entre cada par de columnas por período de producción indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las columnas unidas con las líneas y con diferentes signos (\* y \*\*) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los períodos de producción de un mismo grupo experimental.



**GRÁFICA 3. Comparación del porcentaje acumulado de muestras positivas de CVP-2 por grupos experimentales.** Los puntos representan el porcentaje acumulado de muestras positivas con respecto al total de muestras analizadas ( $n = 70$ ). El análisis estadístico demuestra que existen diferencias significativas entre la forma de las curvas

para G1 y G2 ( $\chi^2 = 7.786$ ,  $p = 0.0053$ ). Nótese que la curva de G2 a partir de la semana 12 de edad presenta el mismo porcentaje acumulado hasta el final del experimento. En contraste, G2 presenta una tendencia hacia mayores porcentajes acumulados de muestras positivas a lo largo del estudio.

## 2. RUBULAVIRUS PORCINO

### a) Aislamiento y serología

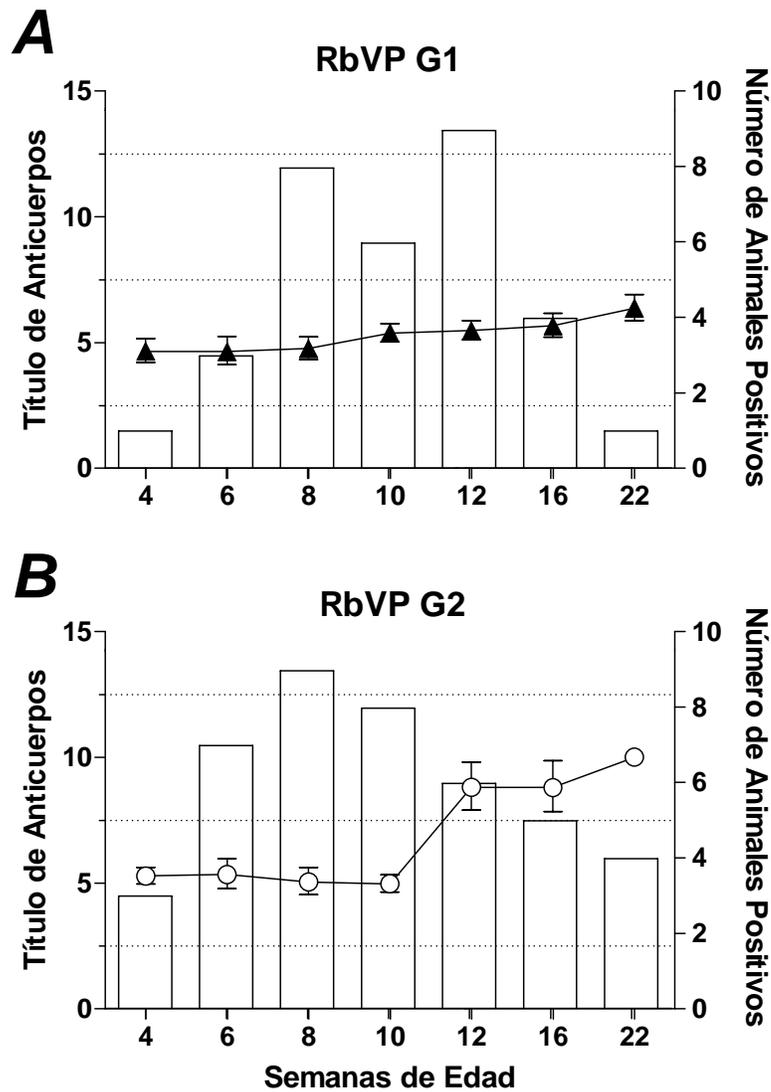
En G1 RbVP se detectó positivamente en 32/70 muestras (45.7%) y en la Gráfica 4A se muestra la ligera tendencia del incremento en los títulos de anticuerpos. Inicialmente, a la edad de 4 semanas, el valor de anticuerpos pasó de 4.6 ( $4.2 < IC\ 95\% > 5.2$ ) hasta un valor final, a la edad de 22 semanas, de 6.3 ( $5.9 < IC\ 95\% > 6.9$ ). Las pruebas estadísticas indican que los títulos significativamente más bajos se ubican en las edades de 4, 6 y 8 semanas, al ser comparadas con la edad de 22 semanas que presenta los valores de anticuerpos más altos ( $p < 0.05$ ). Las edades intermedias de 10, 12 y 16 semanas no son significativamente diferentes a las anteriores ( $p > 0.05$ ). El análisis de identificación de RbVP en G1 muestra que el menor número de animales identificados como positivos se ubica en la primera y última edad muestreadas (1/10 para cada edad), mientras que el mayor porcentaje de muestras positivas se encontraron en las edades de 8, 10 y 12 semanas, con 80, 60 y 90% de positividad para cada edad, respectivamente (Gráfica 4A). Dicho aumento se corresponde con el leve incremento en el título de anticuerpos que se observa a lo largo del tiempo.

Por su parte, RbVP se detectó positivamente en el 60% de las muestras analizadas de G2 (42/70) (Gráfica 4B). En la gráfica se observa una meseta en los títulos de anticuerpos, la cual va de la semana 4 hasta la semana 10, correspondiente al período de destete. En dicha meseta, los títulos de anticuerpos son similares entre las diferentes semanas que conforman el período de engorda ( $p > 0.05$ ) y significativamente diferentes con respecto al período de Engorda ( $p < 0.05$ ). Es evidente el incremento en el título de anticuerpos que inicia desde la primera semana de este período, mismo que se conserva, incluso con un leve incremento, hacia el final de dicha etapa, al pasar de 8.8 ( $7.9 < IC\ 95\% > 9.8$ ) hasta 10 ( $10 < IC\ 95\% > 10$ ) para la semana de edad 12 y 22, respectivamente (Gráfica 4B).

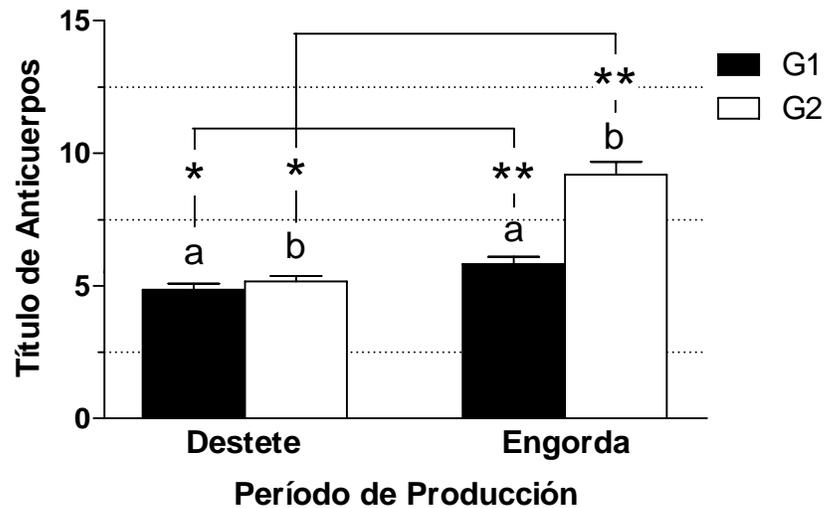
**b) Diferencias entre grupos: identificación y períodos de producción.**

La comparación de los períodos de producción para G1 muestra que la media geométrica del título de anticuerpos de RbVP en Destete de 4.8 (4.6 < IC 95% > 5.1) es significativamente diferente al de 5.8 (5.5 < IC 95% > 6.1) que se obtuvo en el período de Engorda ( $p < 0.05$ ) (Gráfica 5). La ligera diferencia, aunque significativa, que se observa entre los dos períodos productivos de G1 se determina por la tendencia en el aumento de los títulos de anticuerpos en las edades muestreadas (Gráfica 4A). Sin embargo, en G2 la diferencia es evidentemente mayor, y de igual forma los valores en los títulos de anticuerpos de 5.2 (4.9 < IC 95% > 5.4) y 9.2 (8.7 < IC 95% > 9.7) para Destete y Engorda, respectivamente, resultaron significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) (Gráfica 5). Adicionalmente, al comparar los dos grupos experimentales para un mismo período de producción se observa la existencia de diferencias significativas entre G1 y G2 para Destete y Engorda. Y es en ésta última etapa en la cual se observan las diferencias más pronunciadas para los títulos de anticuerpos de G1: 5.8 (5.5 < IC 95% > 6.1), cuando se comparan contra aquellos obtenidos en G2: 9.2 (8.7 < IC 95% > 9.7) ( $p < 0.05$ ). En la Gráfica 8 se resumen el análisis anterior.

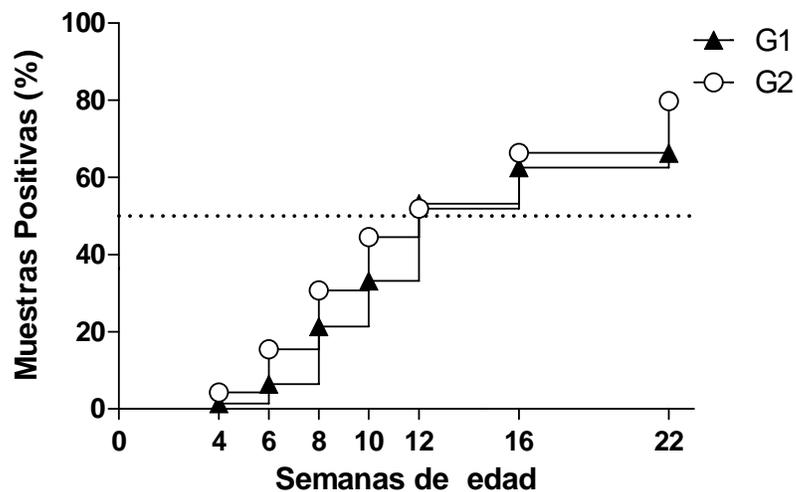
La determinación de muestras positivas con respecto al tiempo de muestreo en ambos grupos experimentales se resume en la Gráfica 6. En los grupos se presentaron los siguientes valores de porcentajes acumulados totales, 66.3 y 79.8% para G1 y G2, respectivamente. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en la forma de las curvas ( $p > 0.05$ ).



**GRÁFICA 4. Identificación y serología de RbVP.** Los puntos del eje Y izquierdo ( $\blacktriangle$  y  $\circ$ ) representan el título de anticuerpos detectado en las muestras de cada edad, expresados como la media geométrica con intervalos de confianza al 95%, y las columnas graficadas en el eje Y derecho representan el número de animales detectados como positivos para RbVP para G1 (**A**) y G2 (**B**). Nótese que se trazó una línea continua sobre los títulos de anticuerpos para mostrar la tendencia de los valores de titulación. Para todos los casos  $n = 10$  animales por edad.



**GRÁFICA 5. Comparación del título de anticuerpos de RbVP por período de producción.** Las columnas representan la media geométrica con IC al 95% del título de anticuerpos correspondiente a cada grupo de acuerdo al período de producción. Diferentes literales (a, b) entre cada par de columnas por período de producción indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las columnas unidas con las líneas y con diferentes signos (\* y \*\*) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los períodos de producción de un mismo grupo experimental.



**Gráfica 6. Comparación del porcentaje acumulado de muestras positivas de RbVP por grupos experimentales.** Cada punto experimental representa el porcentaje acumulado de muestras identificadas como positivas con respecto al total de muestras

analizadas ( $n = 70$ ). El análisis estadístico demuestra que no existen diferencias significativas entre la forma de las curvas para G1 y G2 ( $X^2 = 1.326$  y  $p > 0.05$ ). La tendencia de ambos grupos es hacia un incremento del porcentaje acumulado a lo largo del experimento.

### 3. VIRUS DEL SÍNDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO

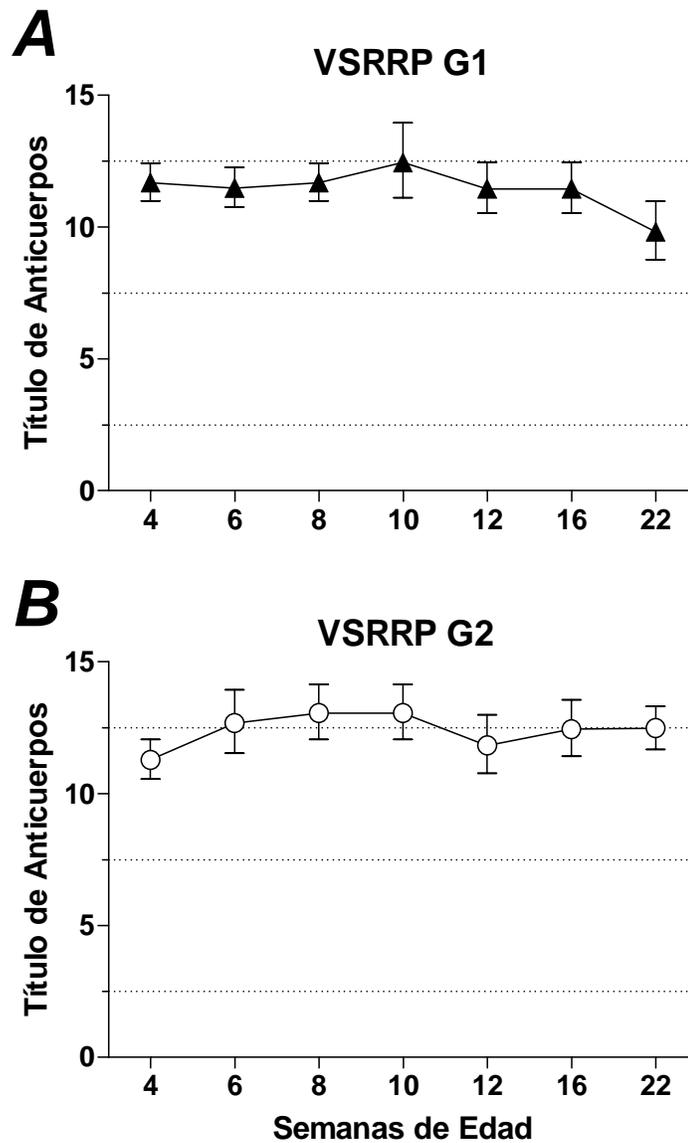
#### a) Serología: Diferencias entre grupos y por período de producción

Los títulos de anticuerpos de VSRRP en G1 presentan valores muy similares entre las diferentes edades, únicamente se encontraron diferencias significativas entre los títulos de la semana 8; 12.5 (11.1 < IC 95% > 13.9) y 10; 11.7 (11.0 < IC 95% > 12.7), con respecto a la semana de edad 22, siendo ésta última la que presenta los valores más bajos de anticuerpos 9.8 (8.7 < IC 95% > 10.9) ( $p < 0.05$ ), mientras que las edades restantes de 4, 6, 12 y 16 semanas presentan valores intermedios sin diferencias significativas entre sí y con valores similares a las edades de 8, 10 y 22 semanas. En la Gráfica 7A se presenta el comportamiento descrito para los valores de los títulos de anticuerpos de G1. Como se observa en la Gráfica 10B no se presenta una tendencia clara ni diferencias significativas en el movimiento de los anticuerpos de VSRRP para las diferentes edades muestreadas de G2 ( $p > 0.05$ ). La media geométrica más alta correspondiente a la semana 10; 13.1 (12.1 < IC 95% > 14.1) y la más baja de la semana 4; 11.3 (10.1 < IC 95% > 12.1) nos indican que en G2, al igual que en G1, en general se presentan valores altos (> 10) en los títulos de anticuerpos (Gráfica 7).

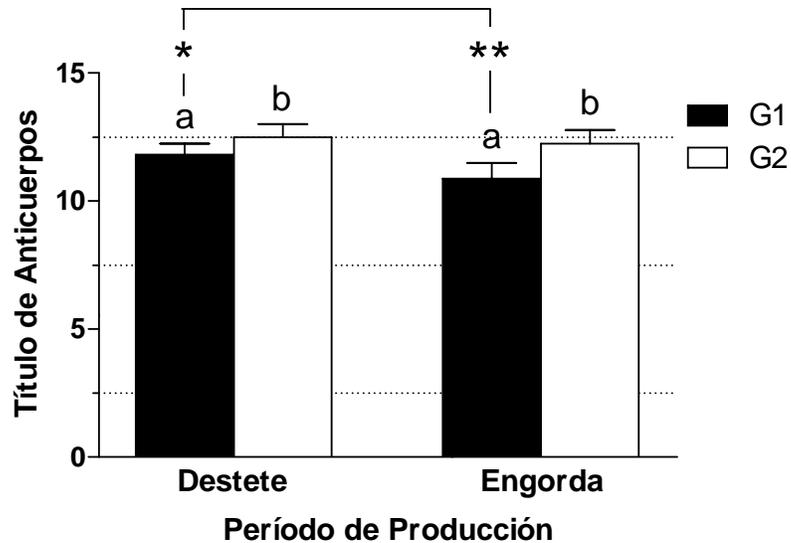
Es importante mencionar que los títulos de anticuerpos de VSRRP en ambos grupos experimentales presentan los valores más altos, cuando se compara el valor total de los mismos durante todo el experimento con respecto a los demás virus porcinos ( $p < 0.05$ , datos no mostrados). El único virus que no presentó diferencias con respecto a VSRRP en G1 fue CVP-2 ( $p > 0.05$ , datos no mostrados). Cabe señalar, por otra parte, que para el caso particular de VSRRP la identificación del virus en todas las edades fue del 100%, por tal razón no se muestran los datos experimentales de la identificación.

El análisis general de la Gráfica 8 señala las diferencias existentes entre los grupos experimentales, tomando en cuenta los períodos de producción. Así, G1 en la

etapa de Destete presentó una media geométrica de 11.8 (11.4 < IC 95% > 12.2), considerada significativamente mayor a la de Engorda de 10.9 (10.3 < IC 95% > 11.5) ( $p < 0.05$ ). Dichas diferencias no se presentaron para G2. De la misma forma, la comparación de un mismo período de producción para ambos grupos indicó que tanto en Destete como en Engorda G1 y G2 son significativamente distintos, ya que para el caso de G2 se presentan los títulos de anticuerpos más altos ( $p < 0.05$ ) (Gráfica 8).



**GRÁFICA 7. Serología de VSRRP.** Los puntos del eje Y izquierdo ( $\blacktriangle$  y  $\circ$ ) representan el título de anticuerpos detectado en las muestras de cada edad, expresados como la media geométrica con intervalos de confianza al 95%, y las columnas graficadas en el eje Y derecho representan el número de animales detectados como positivos para VSRRP para G1 (**A**) y G2 (**B**). Nótese que se trazó una línea continua sobre los títulos de anticuerpos para mostrar la tendencia de los valores de titulación. Para todos los casos  $n = 10$  animales por edad.



**GRÁFICA 8. Comparación del título de anticuerpos de VSRRP por período de producción.** Las columnas representan la media geométrica con IC al 95% del título de anticuerpos correspondiente a cada grupo de acuerdo al período de producción. Diferentes literales (a, b) entre cada par de columnas por período de producción indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos experimentales. Las columnas unidas con las líneas y con diferentes signos (\* y \*\*) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los períodos de producción de un mismo grupo experimental.

#### 4. VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY.

##### a) Serología y aislamiento

Característicamente, en ninguna de las edades de ambos grupos muestreados se logró detectar anticuerpos. La ausencia de anticuerpos contra VEA se responde por la nula identificación del virus en las muestras examinadas (datos no mostrados). No se realizó la comparación por períodos de producción, debido a valores nulos de título de anticuerpos.

## 5. INFLUENZA PORCINA H3N2.

### b) **Serología: Diferencias entre grupos y por período de producción**

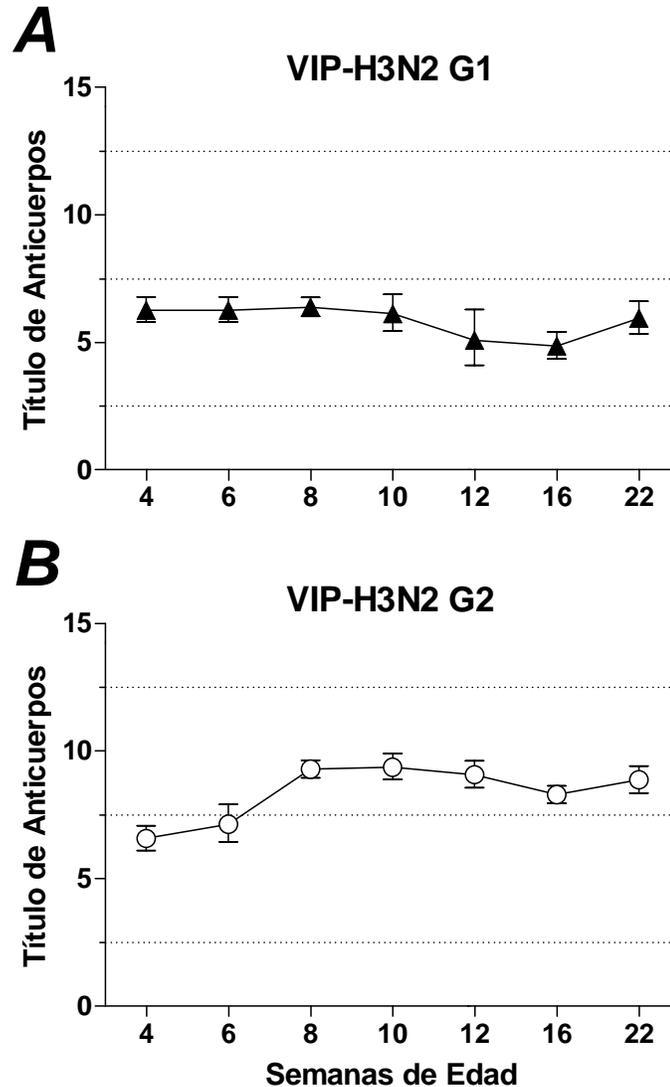
La determinación de los niveles de anticuerpos en VIP-H3N2 se presenta en la Gráfica 9A y 9B para G1 y G2, respectivamente. Para G1 únicamente existen diferencias significativas entre los títulos de anticuerpos de la semana 8 y la semana 16, ya que son las edades con los valores más altos y más bajos, 6.4 ( $6.0 < IC\ 95\% > 6.7$ ) y 4.8 ( $4.3 < IC\ 95\% > 5.4$ ), respectivamente (Gráfica 9A). En la Gráfica también se aprecia que a partir de la primera semana del período de Engorda se reduce el título de anticuerpos y se conserva hacia el final del período, aunque con un ligero aumento en el título de anticuerpos, al pasar de 5.1 ( $4.1 < IC\ 95\% > 6.3$ ) en la semana 12 a 5.9 ( $5.3 < IC\ 95\% > 6.6$ ) en la semana 22.

En comparación, en G2 se encontró que los títulos de anticuerpos de las edades iniciales de 4 y 6 semanas del período de Destete son significativamente inferiores a las edades de 8, 10, 12 y 22 semanas ( $p < 0.05$ ). La edad de 16 semanas presentó valores de anticuerpos similares a todas las edades ( $p > 0.05$ ) (Gráfica 9B). Los títulos de anticuerpos de las diferentes edades muestran un incremento en los valores con cierta dependencia de la edad de muestreo.

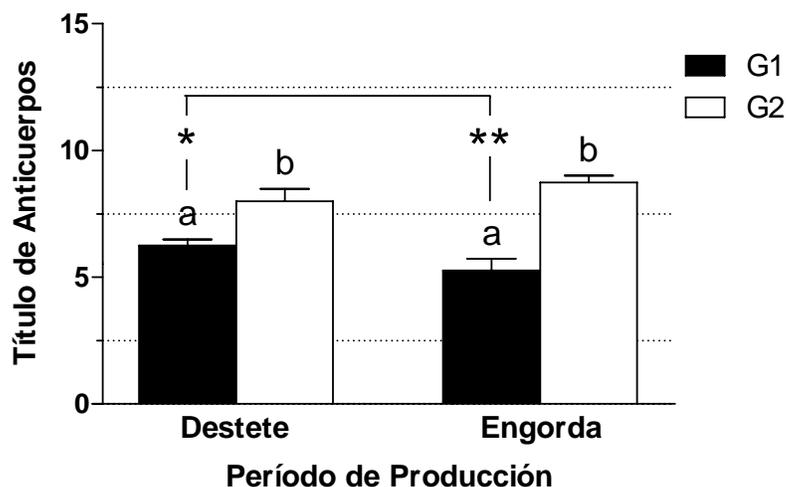
Es importante señalar que en el caso de VIP-H3N2 únicamente se realizó la titulación de los anticuerpos, razón por la cual se carece de una comparación directa de los mismos con el porcentaje de identificación del virus a lo largo del tiempo.

El análisis de las diferencias encontradas en los dos períodos de producción indica que en G1 se presentan los siguientes valores: 6.2 ( $6.0 < IC\ 95\% > 6.5$ ) para Destete y 5.2 ( $4.8 < IC\ 95\% > 5.7$ ) para engorda, ambos con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) (Gráfica 10). Dichas diferencias no se encontraron cuando se comparó el nivel de anticuerpos entre los períodos de producción para G2. Finalmente, la comparación de un mismo período de producción entre los grupos experimentales mostró que en ambos períodos existen diferencias significativas, ya que en G2 se detectaron niveles significativamente mayores del título de anticuerpos ( $p < 0.05$ ). Los valores reportados

para G2 corresponden a: 7.9 (7.5 < IC 95% > 8.5) y 8.7 (8.4 < IC 95% > 9.0) para G2 en el período de Destete y Engorda, respectivamente (Gráfica 10).



**GRÁFICA 9. Serología de VIP-H3N2.** Los puntos del eje Y izquierdo (▲ y ○) representan el título de anticuerpos detectado en las muestras de cada edad, expresados como la media geométrica con intervalos de confianza al 95%, y las columnas graficadas en el eje Y derecho representan el número de animales detectados como positivos para VIP-H3N2. para G1 (A) y G2 (B). Nótese que se trazó una línea continua sobre los títulos de anticuerpos para mostrar la tendencia de los valores de titulación. Para todos los casos  $n = 10$  animales por edad.



**GRÁFICA 10. Comparación del título de anticuerpos de VIP-H3N2 por período de producción.** Las columnas representan la media geométrica con IC al 95% del título de anticuerpos correspondiente a cada grupo de acuerdo al período de producción. Diferentes literales (a, b) entre cada par de columnas por período de producción indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos experimentales. Las columnas unidas con las líneas y con diferentes signos (\* y \*\*) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los períodos de producción de un mismo grupo experimental.

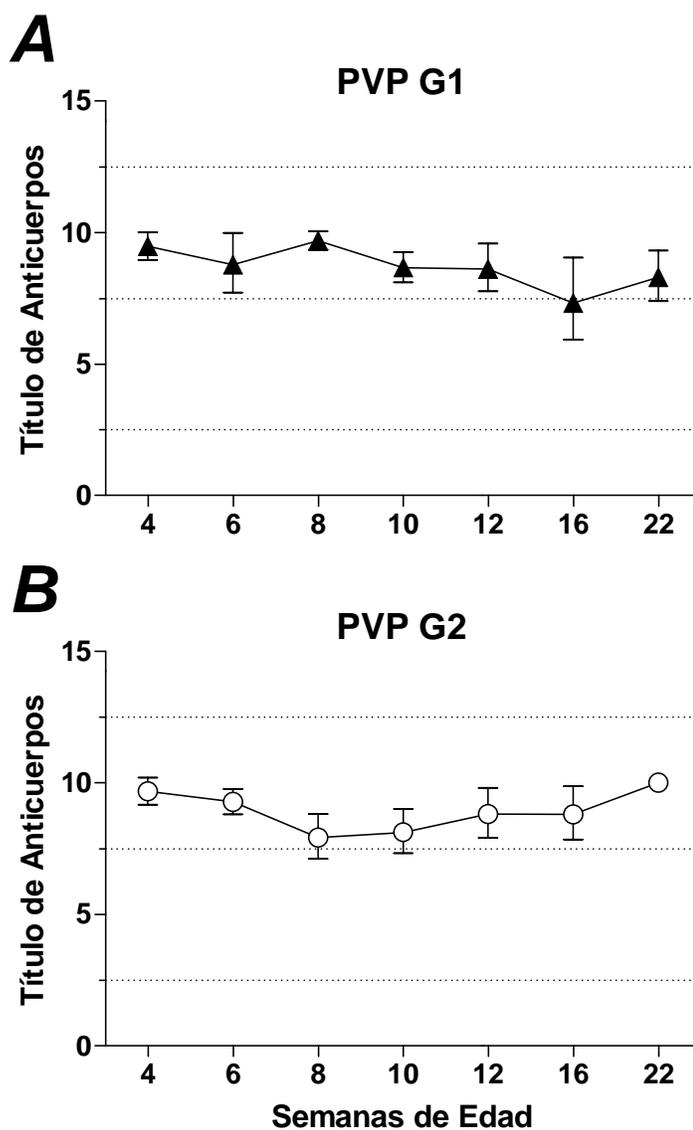
## 6. PARVOVIRUS PORCINO

### a) Serología: diferencias entre grupos y por período de producción

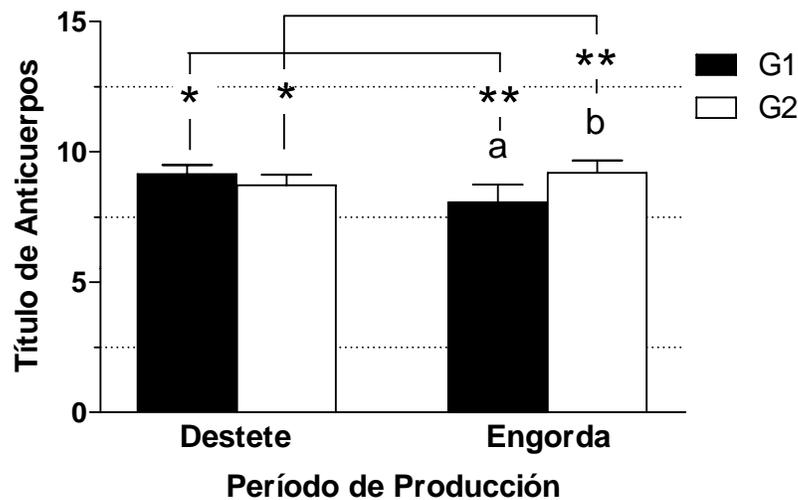
Los resultados de los ensayos de serología de PVP muestran que tanto en G1 como en G2 se presentaron niveles muy similares de títulos de anticuerpos, ya que no se detectaron diferencias significativas cuando se compararon los títulos de anticuerpos en ambos grupos a lo largo del tiempo ( $p > 0.05$ , datos no mostrados). Por otra parte, el análisis individual de G1 indicó que en los valores de los títulos de anticuerpos no existen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Lo anterior, a pesar de que los títulos de anticuerpos presentan una ligera tendencia hacia valores bajos a lo largo del tiempo (Gráfica 11A). Con respecto a G2, los valores más bajos del título de anticuerpos se detectaron en las edades de 8 y 10 semanas con respecto a las edades con los títulos más altos, correspondientes a las edades de 4 y 22 semanas ( $p < 0.05$ ) (Gráfica 11B). Las

edades restantes: 6, 12 y 16 semanas presentaron valores intermedios entre los anteriores sin la existencia de diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Desafortunadamente, para el caso de PVP únicamente se realizó el análisis serológico de las muestras, razón por la cual no se puede comparar el movimiento de los virus y su correspondiente producción de anticuerpos.

La comparación de los títulos de anticuerpos por grupos en cada período de producción se presenta en la Gráfica 12. Para G1 no se detectaron diferencias significativas entre destete y engorda, con los siguientes valores: 9.1 ( $8.8 < \text{IC } 95\% > 9.4$ ) y 8.0 ( $7.43 < \text{IC } 95\% > 8.7$ ), respectivamente. Por el contrario, para G2 los valores del título de anticuerpos de 8.7 ( $8.3 < \text{IC } 95\% > 9.1$ ) y 9.1 ( $8.8 < \text{IC } 95\% > 9.5$ ) para destete y engorda, respectivamente, resultaron significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) (Gráfica 12). La gráfica muestra que para G1 los títulos de anticuerpos son mayores en el período de Destete comparados con la Engorda, mientras que para G2 se presenta un comportamiento inverso de la misma variable. El análisis por período entre los dos grupos indica que únicamente se obtienen diferencias significativas cuando se compara la etapa de Engorda ( $p < 0.05$ ), en la cual G1 presenta los títulos de anticuerpos más bajos 8.0 ( $7.43 < \text{IC } 95\% > 8.7$ ) comparado contra los valores de G2 de 9.1 ( $8.8 < \text{IC } 95\% > 9.5$ ) (Gráfica 12).



**GRÁFICA 11. Serología de PVP.** Los puntos del eje Y izquierdo ( $\blacktriangle$  y  $\circ$ ) representan el título de anticuerpos detectado en las muestras de cada edad, expresados como la media geométrica con intervalos de confianza al 95%, y las columnas graficadas en el eje Y derecho representan el número de animales detectados como positivos para PVP para G1 (**A**) y G2 (**B**). Nótese que se trazó una línea continua sobre los títulos de anticuerpos para mostrar la tendencia de los valores de titulación. Para todos los casos  $n = 10$  animales por edad.



**GRÁFICA 12. Comparación del título de anticuerpos de PVP por período de producción.** Las columnas representan la media geométrica con IC al 95% del título de anticuerpos correspondiente a cada grupo de acuerdo al período de producción. Diferentes literales (a, b) entre cada par de columnas por período de producción indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos experimentales. Las columnas unidas con las líneas y con diferentes signos (\* y \*\*) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los períodos de producción de un mismo grupo experimental.

### ASOCIACIONES ENTRE LOS DIFERENTES VIRUS PORCINOS

Con la intención de determinar la existencia de correlaciones entre los títulos de anticuerpos detectados para los diferentes virus porcinos analizados y la edad de muestreo se procedió a realizar un análisis multivariado no paramétrico, utilizando para ello el coeficiente de correlaciones por rangos de Spearman. El coeficiente de correlación de Spearman va de -1 a 1, pasando por 0 y nos da una medida de la relación existente entre dos variables, ya sea negativa o positiva. En caso de no existir relación alguna los valores tienden a cero.

En el Cuadro 1 se resume la información correspondiente del análisis de correlación no paramétrico para Edad vs los virus porcinos, mientras que en el cuadro 2 se muestran los coeficientes de correlación correspondientes para el análisis de cada uno de los virus vs los virus porcinos restantes. En ambos casos se resume la información

para los grupos experimentales por separado, para así realizar una comparación sobre las correlaciones existentes entre las variables señaladas anteriormente.

Variable	Por variable	G1	G2
		r de Sperman	r de Spearman
Edad	CVP-2	0.4963 *	-0.0899
	PVP	-0.3523 *	0.0917
	RbVP	0.6667 *	0.7553 *
	VSRRP	-0.2649 *	0.0861
	VIP-H3N2	-0.3495 *	0.4478 *

**CUADRO 1.** Coeficientes de correlación r (rho) de Spearman para Edad vs los diferentes virus porcinos estudiados. El símbolo (\*) indica que el coeficiente de correlación es significativamente distinto de cero. En el G1 existe correlación significativa, entre CVP-2, RbVP con la edad, en una proporción positiva. Esto significa que a medida que avanza la edad, aumenta el título de anticuerpos. Esta relación es significativa pero en sentido opuesto con PVP, VSRRP e IP-H3N2. El G2 únicamente presenta correlación positiva entre RbVP e IP-H3N2 con respecto a la edad.

Variable	Por Variable	G1	G2
		r de Sperman	r de Spearman
CVP-2	PVP	-0.3464 *	-0.0968
	RbVP	0.2777	-0.0620
	VSRRP	0.2599 *	0.1959
	VIP-H3N2	-0.1255	0.3114 *

<b>PVP</b>	RbVP	-0.1850	0.4771 *
	VSRRP	-0.0436	-0.4071 *
	VIP-H3N2	0.1797	-0.2505 *
	VSRRP	-0.3129 *	-0.2175
	VIP-H3N2	-0.2952 *	0.1101
	VIP-H3N2	0.1545	0.1862

**CUADRO 2. Coeficientes de correlación r (rho) de Spearman de virus vs virus.** El símbolo (\*) indica que el coeficiente de correlación es significativamente distinto de cero. Las correlaciones existentes en un grupo son diferentes de las que se presentan en el otro. Las correlaciones mas significativas existentes en el G1 son: únicamente existe correlación positiva ente CVP-2 VSRRP. Pero presenta correlaciones negativas entre CVP-2- PVP, RbVP-VSRRP y RbVP –VIP-H3N2. Mientras que en el G2 existe correlación positiva entre CVP-2 –VIP-H3N2 y PVP-RbVP. Mientras que PVP – VSRRP y PVP-VIP-H3N2.

## VIII. DISCUSION

La asociación entre circovirus porcino tipo 2 y enfermedades en el cerdo no existía antes del año 1996. A partir de las descripciones del virus y su asociación con el síndrome multisistémico de desgaste postdestete, en el cual la signología es variada y no es específica, se asume que todos los problemas son causados por este, y se han dejado de lado algunas enfermedades tan importantes como PRRS, e Influenza. Tomando en cuenta los estudios retrospectivos de Ramírez Mendoza (2004) se sabe que el virus ha estado circulando en cerdos de México desde 1972, y que hasta el 2005 la seroprevalencia de este ya era superior al 95% en cerdos de toda la república y de todas las etapas de producción. Por tanto no es un virus nuevo, sin embargo si ha estado muy asociado a enfermedad, lo cual seguramente se debió a un cambio de virulencia de este agente infeccioso. Algunos autores han detectado anticuerpos anti PCV2 previos a ese año, indicando que estos virus infectan a cerdos sin causarles la enfermedad (Larochelle *et al.*, 2003 ), lo cual coincide con lo observado en este estudio, donde animales clínicamente sanos, presentan importantes títulos de anticuerpos (Gráfica 1). Las curvas de seroconversión observadas en este trabajo son bastante típicas, donde los anticuerpos presentes en las primeras semanas de vida, correspondientes a Inmunidad materna, decaen a partir de la octava semana en la mayoría de los casos excepto en el caso de PCV2 y PRRS los cuales aumentan, asumiendo que estos son debidos al contacto con estos antígenos de campo que también es reportado por (Larochelle *et al.*, 2003). Esto último coincide con la práctica del movimiento y mezclado de animales lo que origina el contacto entre animales susceptibles e infectados favoreciendo la diseminación del agente entre la población, la infección en cerdos jóvenes sugiere que estos pueden permanecer infectados en forma subclínica, lo anterior concuerda con resultados de trabajos en granjas de cerdos en etapa de finalización en los que se notifica seroprevalencias elevadas sin historial clínico según Álvarez 2004.

Kim en el 2002 y Drolet en el 2003 reportan que la simple interacción de PCV2 y PRRS puede desencadenar una condición de enfermedad, especialmente en el complejo respiratorio porcino. No es este caso, donde ambos virus están presentes con, niveles de títulos considerables pero sin desencadenar patología alguna en el grupo 1 que se considera clínicamente sano. Esto se debe a que ambos agentes son enzooticos, tanto en el de pie de cría (dato no mostrado) como de línea de producción, por lo que se

da cierta protección al destete y da tiempo a que se monte una respuesta inmune sólida, capaz de hacer frente a las infecciones. En el caso del grupo 2 donde los animales están clínicamente enfermos las condiciones son diferentes, a partir de la semana 6 de edad donde se observa que los anticuerpos maternos no decaen, al contrario, aumentan con niveles bastante considerables, asociado a una mayor presión de infección en edades más tempranas y corroboradas por los resultados de aislamiento. Dado que ambos grupos presentan importantes títulos de anticuerpos anti PCV2 y PRRS se asume que su función es como agente primario y que son otros factores los que dan la diferencia entre la condición de sano y enfermo. Además de mayor presión de infección donde participan otros agentes como Influenza, que su presencia no es significativa en el grupo 1 observándose que los anticuerpos detectados están en las primeras semanas correspondientes a inmunidad materna y se convierten en negativos hacia el final de la engorda. Harms en el 2001 y Ellis en el 2004 afirman que Influenza está fuertemente asociada al complejo respiratorio porcino que se puede presentar a cualquier edad especialmente entre las 13 y 22 semanas donde tiene importante participación PRRS y PCV2. Se ha reportado que el subtipo H3N2 es más importante que el H1N1, ciertos autores mencionan que H3N2 tiene una seroprevalencia del 65% mientras que H1N1 apenas llega al 20% lo que lo hace no relevante para la producción. Según Álvarez 2004 y Pallares 2002, la presencia de H3N2 si está asociada a una condición patológica sobre todo cuando está presente *Mycoplasma hyopneumoniae*. Por lo que además de la participación de PCV2 y PRRS la presencia de Influenza subtipo H3N2 es importante para desencadenar una enfermedad según Grau-Roma, 2007 y Drolet et al., 2003.

Parvovirus ha sido asociado a PMWS, se ha mencionado que este y PCV2 tiene cierta competencia por la replicación en los macrófagos alveolares y que de cierta forma quien ingrese primero al organismo limita la replicación del otro. Es difícil determinar la edad exacta en que los animales se infectan sobre todo bajo condiciones de campo. En este caso PPV está presente de forma similar en el grupo 1 y 2, por tanto no resulta significativo.

En el caso de Ojo Azul, se han reportado que tiene mayor impacto en el de pie de cría, y animales lactantes a quienes resulta fatal en el 90% de los casos, se ha reportado que no hay mucha relación entre la POA, y padecimientos durante el

crecimiento dado que este virus tiene afinidad por tejido nervioso de cerdos neonatos y lactantes, y por células germinativas testiculares de los conductos epididimarios en individuos pos púberes, especialmente la cepa PAC3 según Ramírez 1997 y Stephano 1993. En este caso resulta contradictorio, pues en el grupo 2, que corresponde al grupo de animales clínicamente enfermos se puede observar un mayor porcentaje de positividad para el virus y mayores títulos de anticuerpos con respecto al grupo 1. La condición de enfermedad está más relacionada con asociación entre PCV2-POA, que por los comúnmente reportados que son PRRS y PPV. Si tomamos a las curvas de seroconversión de los animales sanos como basales y las comparamos con las curvas tan dispersas de el grupo 2, donde hay más virus presentes y mayores títulos. Además juega un papel importante en la asociación con Parvovirus, virus de síndrome reproductivo y respiratorio porcino e Influenza porcina subtipo H3N2 los cuales están fuertemente relacionados con el complejo respiratorio porcino. La relación del rubulavirus con PCV2, resulta ser más importante que la asociación de este con PRRS y PPV puesto que las correlaciones no son significativas. La participación activa de POA, puede estar asociado a un cambio en la glicoproteína HN, quien es el componente más abundante en la envoltura del Rubulavirus porcino y hacia ella está dirigida la respuesta inmune producida en cerdos infectados, lo que permite el cambio de afinidad del virus y la adaptación a tejidos de cerdos maduros (Sánchez- Betancourt et al, 2008). Sin embargo son necesarios más estudios para determinar la participación de este tanto en el complejo respiratorio porcino como en el síndrome de desgaste pos destete.

La porcicultura en México está bien distribuida hacia el centro y norte del país, regiones que según SENASICA 2008 resultan estar libres de fiebre porcina clásica, y Aujeszky está en control en la zona analizada. A pesar de ser un factor importante en la producción, dado que se reportan mortalidades del 1-2% en la etapa de engorda y finalización y puede llegar hasta un 5% en el destete. Serológicamente no resultó significativa la relación de PRV con algún otro virus en ninguno de los grupos.

A pesar de que los sistemas de producción son muy similares en todo el país con sistemas multisitios, los parámetros son independientes de cada granja. Se debe tener presente que no hay dos granjas iguales, además la situación sanitaria de una explotación está en continuo cambio, por tanto, no se pueden generalizar los escenarios,

y es preciso considerar cada explotación y cada momento de forma individual. Sin embargo, los resultados aquí presentados dan un panorama general de los que está pasando en México en este momento.

## **IX. CONCLUSIONES.**

- En animales clínicamente sanos la asociación mas importante está dada por Circovirus porcino tipo 2 con Parvovirus porcino.
- En ningún caso se encontró asociación de PCV2 con el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino.
- Las interacciones que hay en el grupo de animales sanos, no se presentan en el de animales enfermos.
- En el grupo de animales enfermos, hay mayor número de antígenos presentes, por ende mayor título de anticuerpos.
- El virus de influenza subtipo H3N2, solo estuvo presente en el grupo 2.
- En animales clínicamente enfermos la asociación mas importante está dada por circovirus porcino y el Rubulavirus porcino.
- Las principales asociaciones virales en animales convencionales en la etapa de crecimiento no están dadas por circovirus porcino tipo 2.

## **X. BIBLIOGRAFÍA**

Allan GM., Ellis JA. 2000 Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest.* 12,3-14.

Allan GM, McNelly F, Meehan BM, Kennedy S, Johnston D, Ellis J, Krakowka S, Fossum C, Watrang E, Wallgren P (2002) Reproduction of PMWS with a 1993 Swedish isolate of PCV-2. *Veterinary Record* 150; 255-256.

Burlenson FG, Chambers TM, Wiedbrauk DL. *Virology: a laboratory manual.* Academic Press, Inc. 1992.

Calsamiglia M, Segales J, Quintana J, Rosell C, Domingo M, (2002) Detection of porcine circovirus types 1 and 2 in serum and tissue samples of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 1848-1850.

Chae C. 2005. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *The Veterinary Journal*, 169, 326-336.

Drolet R, Larochelle R, Morin M, Delisle B, Magar R. (2003). Detection rates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, and Influenza virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia. *Veterinary Pathology*, 40; 143-148.

Ellis J, Clark E, Haines D, West K, Krakowka S, Kennedy S, Allan (2004) Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. *Veterinary Microbiology*; 98; 159-163.

Gilpin DF, McCullough K, Meehan BM, McNeilly F, McNair I, Stevenson LS, Foster JC, Ellis JA, Krakowka S, Adair BM, Allan GM, (2003) In vitro studies on the infection and replication of porcine circovirus type 2 in cells of the porcine immune system. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 94: 149-161.

Harms, P.A., Halbur, P.G., Sorden, S.D., 2002. Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. *Journal of Swine Health and Production* 10, 27-30.

Kim, J., Chung, H.-K., Chae, C., 2003. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *The Veterinary Journal* 166, 251–256.

Kim J. and Chae C. 2002. Double In Situ Hybridization for Simultaneous Detection and Differentiation of Porcine Circovirus 1 and 2 in Pigs with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome; *The Veterinary Journal*, 164, 247-253.

Larrochelle R, Magar R, y D`Allaire Sylvie. Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds and whitout postweaning multisistémico wasting syndrome. *Vet. Res* 2003, 67 (2): 114-120.

Montiel -Velazquez O. 2008. Detección mediante PCR múltiple de PCV2, PPV y *Mycoplasma hyopneumoniae*, en pulmones de cerdos con lesiones neumónicas (Tesis de licenciatura) Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia -UNAM, México.

OIE. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals 2008. Vol 1, Cap 2.8.7. Porcine reproductive and respiratory syndrome.

OIE. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals 2008. Vol 1, Cap 2.1.2. Aujeszky's disease .

Pallares FL, Halbur PG, Opriesning T, Sorden SD, Villar D, Janke BH, Yaeger MJ, Larson DJ, Schwartz KJ, Yoo KJ, Hoffman LJ. Porcine circovirus type 2 (PCV2) coinfections in US field cases of postweaning multisistémico wasting syndrome (PMWS) *J Vet Diagn Invest.* 2002; (14) 515-9.

Ramírez MH, Martínez C, MercadoM, Castillo-Juárez H, Hernández J, Segalés J. 2006. Porcine circovirus type 2 antibody detection in backyard pigs from México City. *Res. Vet. Sci.* 10.012-16.

Ramírez MH, Carreón NR, Mercado GC, Rodríguez TJ. Hemoaglutinación e inhibición de la hemaglutinación del Paramixovirus porcino a través de la modificación de algunas variables que participan en la prueba. *Vet Mex* 1996; 27: 257-259.

Rodriguez-Arrijo GM, Segales J, Rosell C, Quintana J, Ayllon S, Campronon A, Domingo M, (1999) Aujeszky's disease virus infection concurrent with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Veterinary Record* 144: 152-153.

Rodríguez – Arrijo GM, Segalés J, Calsamiglia M, Resendes AR, Balasch M, Plana-Durán J, Casal J, Domingo M. 2002, Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Am J Vet Res.*; 63:354-357.

Rosell C., Seagalés J., Plana-Duran J., Balasch M., Rodriguez-Arrijo GM., Kennedy S., Allan GM., McNeilly F., Latimer KS., Domingo M;1999. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of Natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J Comp Pathol.* 120, 59-78.

Sanchez –Betancourt JI, Santos-López G, Alonso R, Doporto JM, Ramírez-Mendoza H, Mendoza S, Hernández J, Reyes Leyva J, Trujillo ME. 2008. Molecular characterization of the hemagglutinin-neuraminidase gene of porcine rubulavirus isolates associated with neurological disorders in fattening and adult pig. *Research in Veterinary Science*; 85; 359-367.

Segalés J, Pastor J, Cuenca R, Domingo M, (2000) Haematological parameters in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. *Veterinary Record* 146: 675-676.

Segles J. Domingo M; 2002;. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Vet Q.* ;24(3):109-24.

Sibila M, Calsamiglia M, Segales J, Blanchard P, Badiella L, Le Dimna M, Jestin A, Domingo M; Use of a polymerase chain reaction assay and an ELISA to monitor porcine circovirus type 2 infection in pigs from farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *American Journal of Veterinary Research.* 2004. 65: 88-92.

Shibahara T., Sato K., Ishikawa Y., Kadota K.; Porcine Circovirus induces B lymphocyte depletion in pigs with wasting disease síndrome. *J. Vet. Med Sci.* 2000. 62,1125-1131.

Stephano A. Blue eye diseases. In: Leman AD., Straw BF, Mengeling WL., Allaire AD, Taylor DJ, editors, *Porcine Diseases.* Ames, Ia: Iowa State University Press, 1994: 237-241.

Thacker, E.L., Porcine respiratory disease complex – what is it and why does it remain a problem? *The Pig Journal* 2001; 48, 66–70.

Trujano M., Iglesias G., Segalés J., Palacios JM; PCV-2 from emaciated pigs in México. *Vet. Rec.* 2001; 148,792.