Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

Detección molecular de agentes virales en fetos porcinos abortados de granjas tecnificadas de las regiones de Lima y Amazonas

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinaria

AUTOR

Karina Marlene QUIROZ YEREN

ASESOR

Mg. Mercy Gisela RAMIREZ VELÁSQUEZ

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Quiroz K. Detección molecular de agentes virales en fetos porcinos abortados de granjas tecnificadas de las regiones de Lima y Amazonas [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2023.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Karina Marlene Quiroz Yeren
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	76168368
URL de ORCID	
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Mercy Gisela Ramirez Velásquez.
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10713781
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-4082-769X
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Alberto Gustavo Manchego Sayán
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	15619652
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Mariella Ramos González
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	43068125
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Antonio Miguel Ampuero Bustillo
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06645903
Datos de investigación	

Línea de investigación	B.4.1.5. Microbiologia y parasitología veterinaria
Grupo de investigación	Grupo de investigación en Virología e Inmunología veterinaria (GIGIVET) – San Marcos
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado con código A20080821
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Sección de virología y diagnóstico molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria (SV-FMV), Universidad Nacional Mayor de San Marcos País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: San Borja Avenida: Circunvalación 28 Latitud: - Latitud: 12.081461896047118 Longitud: 76.9877184315136
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2020 - 2022
URL de disciplinas OCDE	Ciencia veterinaria https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIA

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **miércoles 27 de marzo de 2023**, a las **10:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral **Nº 0028-EPMV/FMV-2024** integrado por los siguientes profesores:

MV. Mg. MANCHEGO SAYÁN ALBERTO GUSTAVO	**Presidente del Jurado**
MV. Mg. RAMIREZ VELÁSQUEZ MERCY GISELA	**Asesor de la Tesis**
MV. Dra. RAMOS GONZALEZ MARIELLA	**Miembro del Jurado**
MV. AMPUERO BUSTILLO ANTONIO MIGUEL	**Miembro del Jurado**

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Doña: **KARINA MARLENE QUIROZ YEREN,** para optar el Título Profesional de Médico Veterinaria, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

"DETECCIÓN MOLECULAR DE AGENTES VIRALES EN FETOS PORCINOS ABORTADOS DE GRANJAS TECNIFICADAS DE LAS REGIONES DE LIMA Y AMAZONAS"

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria de la Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **diecisiete (17).**

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIA** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las 11:30 horas, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

.....	.....
Manchego Sayán Alberto Gustavo: MV. Mg Prof. Principal DE	Ramírez Velásquez Mercy Gisela: MV. Mg..Prof. Asociado DE
.....	.....
Ramos González Mariella : MV. Dra. Prof. Auxiliar TC	Ampuero Bustillo Antonio Miguel : MV. Prof. Asociado DE

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Vicerrectorado de Investigación y Posgrado

VICERRECTORADO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, ***Mercy Gisela Ramírez Velásquez***. en mi condición de asesora acreditada con la RESOLUCIÓN DIRECTORAL Nº 0037-EPMV/FMV-2022 de la tesis de investigación, cuyo título es "***Detección molecular de agentes virales en fetos porcinos abortados de granjas tecnificadas de las regiones de Lima y Amazonas***", presentado por la bachiller Srta. Karina Marlene Quiroz Yeren, para optar el título de Médico Veterinario **CERTIFICO** que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el 14% de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su publicación en el repositorio institucional.

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del título correspondiente.

Lima, 19 de junio del 2024

Mercy Gisela Ramírez Velásquez
DNI: 10713781

CamScanner

DEDICATORIA

Agradezco este trabajo a mis padres Pedro y Marlene, quienes siempre me han apoyado con el inmenso amor que me tienen. Ellos han estado a mi lado en todos los momentos de mi vida.

Este trabajo no hubiera podido realizarse sin la guía y apoyo de la doctora Mercy Ramirez, mi asesora de tesis, quien me brindò todos los conocimientos y directrices para encaminar de la mejor manera este proyecto. También, agradezco el apoyo de la Dra. Jessica Jurado y del Dr. Dennis Navarro, miembros del laboratorio de Virologìa de la FMV-UNMSM.

INDICE DEL CONTENIDO

Pàgina

LISTA DE CUADROS v
LISTA DE FIGURAS vi
LISTA DE ANEXOS vii
LISTA DE ABREVIATURAS viii
RESUMEN ix
ABSTRACT x
I. INTRODUCCIÓN 1
II. REVISIÒN BIBLIOGRÁFICA 3
2.1. Características de la crianza porcina en el Perú 3
2.2. Manejo de la hembra reproductora 3
2.3. Tracto reproductor de la marrana 4
2.3.1. Anatomía 4
2.3.2. Fisiología 5
2.3.3. Gestación 5
2.4. Desarrollo ontológico del lechón 6
2.4.1. Placentación 6
2.5. Problemas reproductivos en las cerdas 7
2.5.1. Infecciosos 8
2.5.2. No infeccioso 9
2.5.3. Impacto económico 10
2.6. Agentes virales causantes de problemas reproductivos 11
2.6.1. Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (vPRRS) 11
2.6.2. Parvovirus porcino (PVP) 17
2.6.3. Circovirus porcino (CVP) 21
2.6.4. Virus de Influenza A (vIA) 26
2.6.5. Virus de Aujeszky (vEA) 29
2.6.6. Virus de la Peste Porcina Clásica (vPPC) 33

2.7. Situación de los virus causantes de abortos en el Perú 37
III. MATERIALES Y MÉTODOS 39
3.1. Diseño del estudio 39
3.2. Lugar de ejecución y periodo de duración 39
3.3. Descripción del material experimental 40
3.3.1. Muestras de fetos porcinos 40
3.3.2. Toma de muestra: 40
3.3.3. Extracción de ácidos nucleicos: 41
3.3.4. PCR y RT-PCR 43
IV. RESULTADOS 52
4.1. Identificación de granjas porcinas 52
4.2. Procesamiento de las muestras 53
4.3. Procesamiento de las muestras por RT-PCR en tiempo real 54
4.4. Procesamiento de las muestras por PCR 54
V. DISCUSIONES 60
VI. CONCLUSIONES 65
VII. RECOMENDACIONES 66
VIII. LITERATURA CITADA 67

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Cebadores utilizados para la RT-PCR en tiempo real para la detección del vPRRS……...43
Cuadro 2. Configuración del termociclador para la RT-PCR en tiempo real para la detección del vPRRS ……..44
Cuadro 3. Cebadores utilizados para la RT-PCR en tiempo real para la detección del vPPC ……44
Cuadro 4. Configuración del termociclador para la RT-PCR en tiempo real para la detección del vPPC ……45
Cuadro 5. Configuración del termociclador para la RT-PCR en tiempo real para la detección de vIA ……46
Cuadro 6. Config1uración del termociclador para la PCR en tiempo real para la detección de CVP-2 ……47
Cuadro 7. Cebadores utilizados para la PCR convencional para la detección de PVP ……47
Cuadro 8. Configuración del termociclador para la para la PCR convencional para la detección de PVP ……48
Cuadro 9. Cebadores utilizados en la PCR convencional para la detección de la familia *Herperviridae* ……49
Cuadro 10. Configuración del termociclador para la PCR convencional para la detección de la familia *Herperviridae*…….....49
Cuadro 11. Cebadores utilizados en la PCR convencional para la detección de vEA……...50
Cuadro 12. Configuración del termociclador para la PCR convencional para la detección de vEA ...……...50
Cuadro 13. Relación de fetos abortados por marrana y procedencia ……...52
Cuadro 14. Relación de pooles de órganos fetales procesadas por marrana y edad gestacional……53
Cuadro 15. Resultados del procesamiento de las muestras por PCR ……...56
Cuadro 16 Porcentaje de muestras positivas a la RT-PCR y PCR para la detección de agentes virales abortogénicos……..58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Marrana con 10 lechones (izquierda) y 13 lechones (derecha) en una sola parición……..……..…….....4

Figura 2. Representación esquemática de los órganos reproductores femeninos de la cerda ……..…….....5

Figura 3. Representación esquemática de la partícula de VPRRS 12

Figura 4. Visualización de la estructura de PVP por cristalografía por difracción de rayos X

……..…….....18

Figura 5. Microfotografia electrónica de dos cuerpos de inclusión intracitoplasmàticos de un macrófago que incluyen partículas de CVP2 22

Figura 6. Estructura del virión de Influenza A 27

Figura 7. Estructura del virus Aujeszky ……..….30

Figura 8. Fetos abortados remitidos a la Sección de virología del LMP……..41

Figura 9. Procesamiento de las muestras para extracción de ácidos nucleicos…….42

Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa con banda de amplificación del virus de PVP (313 pb)…….. …….57

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de ARN viral……..82

Anexo 2. Protocolo de extracción de ADN viral (Kit comercial: E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit) ……..……...……...83

Anexo 3. Resultados del procesamiento de las muestras por RT- PCR …….....84

Anexo 4. RT-PCR en tiempo real para la detección del vIA ……...85

Anexo 5. RT-PCR en tiempo real para la detección del vPRRS …….……85

Anexo 6. RT-PCR en tiempo real para la detección del vPPC ……86

Anexo 7. PCR convencional para la detección del vEA. ……..…86

LISTA DE ABREVIATURAS

vPRRS: Virus del Sìndrome Respirstorio y Reproductivo Porcino

PVP: Parvovirus Porcino

vEA: Virus de la enfermedad de Aujeszky

vPPC: Virus de la Pete Porcina Clàsica

vIA: Virus de la Influenza Porcina

CVP-2: Circovirus Porcino tipo 2

PCR: Reacciòn de la cadena de la polimerasa

RT-PCR: Reacciòn de la cadena de la polimerasa con transcripción reversa

RESUMEN

El objetivo del estudio fue detectar los principales agentes virales abortogénicos en fetos abortados de granjas tecnificadas de las Regiones de Lima y Amazonas. Se trabajaron con 38 pooles de muestras de tejidos (corazón, pulmón y bazo) de fetos abortados de granjas de Lima y Amazonas desde septiembre del 2020 a octubre del 2021.Se realizó la detección molecular de los virus del Síndrome respiratorio y reproductivo porcino (vPRRS), Influenza A (vIA), Peste Porcina Clásica (vPPC), Aujeszky (vEA), Circovirus tipo 2 (CVP-2) y Parvovirus Porcino (PVP). Se realizó una PCR convencional para vEA y PVP, y en tiempo real para CVP-2 (IDEXX, US). El RT-PCR en tiempo real se realizó para vPRRS, vPPC y vIA (IDEXX, US). El 76, 9% (10/13) y el 23,1% (3/13) de los abortos fueron del último y segundo tercio de gestación, respectivamente. El 5.3% (2/38) de los pooles de órganos fetales (P14 y P19) resultaron positivas al virus de PVP en muestras de pulmón y el 5.3% (2/38) (P3 y P9) resultaron positivas a CVP-2 en muestras de bazo fetal. Las muestras positivas a PVP mostraron un tamaño de banda de 313 pb en gel de agarosa y las muestras positivas a CVP-2 mostraron un Ct de 29.43 (P3) y de 27.37 (P9). No hubo amplificación del vPRRS, vIA, vPPC y vEA en las muestras de órgano fetal. Este es el primer estudio en el Perú que identifica en tejidos de fetos abortados al PVP y CVP-2.

Palabras clave: marrana, abortos, fetos, vPRRS, CVP-2, PVP, vIA, vPPC, vEA.

ABSTRACT

The objective of the study was to detect the main abortiongenic viral agents in aborted fetuses from technical farms in the Regions of Lima and Amazonas. We worked with 38 pools of tissue samples (heart, lung and spleen) from aborted fetuses from farms in Lima and Amazonas from September 2020 to October 2021. Molecular detection of the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) viruses was carried out.), influenza A (vIA), classical swine fever (vPPC), Aujeszky (vEA), circovirus type 2 (CVP-2) and porcine parvovirus (PVP). Conventional PCR was performed for vEA and PVP, and real-time PCR for CVP-2 (IDEXX, US). Real-time RT-PCR was performed for vPRRS, vPPC, and vIA (IDEXX, US). 76.9% (10/13) and 23.1% (3/13) of the abortions were in the last and second third of pregnancy, respectively. 5.3% (2/38) of the fetal organ pools (P14 and P19) were positive for PVP virus in lung samples and 5.3% (2/38) (P3 and P9) were positive for CVP-2 in fetal spleen samples. The PVP-positive samples showed a band size of 313 bp on agarose gel and the CVP-2-positive samples showed a Ct of 29.43 (P3) and 27.37 (P9). There was no amplification of vPRRS, vIA, vPPC and vEA in the fetal organ samples. This is the first study in Peru that identifies PVP and CVP-2 in tissues from aborted fetuses.

Keywords: sow, abortions, fetuses, vPRRS, CVP-2, PVP, vIA, vPPC, vEA.

I. INTRODUCCIÓN

En el Perú, la industria porcina se encuentra en crecimiento. En la actualidad, la población porcina es de 3 370 745 animales, encontrándose la mayor población en el departamento de Lima con 501 088 porcinos (14, 86%), la población porcina en Amazonas es de 9 502 animales (MIDAGRI, 2022).

Las cerdas presentan características reproductivas únicas como su alta prolificidad, llegando a parir de 10 a 14 lechones por parto y pudiendo superar los 25 lechones por año (Pozzi y Rosner, 2009).

Los problemas reproductivos son considerados como la principal causa de descarte de cerdas, llegando a representar el 71%, seguida de los problemas físicos (Masaka *et al*., 2014). Estos problemas incluyen a los abortos, retornos irregulares al estro, muerte y reabsorción embrionaria, fetos momificados, nacidos débiles, nacidos muertos, etc (Pozzi y Alborali, 2012; Dron *et al.*, 2014).

Las fallas reproductivas causan grandes pérdidas económicas; ya que, se incrementan los días no productivos, se generan gastos en tratamientos, alimentación y hay disminución en el número de lechones vivos; además, el dinero invertido en la cerda durante la gestación se pierde por completo, ya que esta no llega a término debido a los abortos (Peñaherrera, 2011; Zhao *et al.*, 2015). Las fallas reproductivas pueden tener diversas causas como el mal

manejo, la inadecuada alimentación, agentes infecciosos, tensiones ambientales, etc (Pozzi y Alborali, 2012; Dron *et al.*, 2014).

Dentro de los agentes infecciosos, los virales son los que ocasionan mayor impacto en la producción porcina, ya que el tratamiento o las medidas correctivas son más dificiles de establecer una vez que el brote ha empezado. Los principales agentes virales involucrados en problemas reproductivos en cerdas son el virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo porcino (vPRRS), Circovirus porcino tipo 2 (CVP-2), Parvovirus porcino (PVP), Virus de la Influenza porcina (vIA), Virus de la Peste Porcina clásica (vPPC) y Virus de Aujeszky (vEA) (Pozzi y Alborali, 2012; Olanratmanee *et al.*, 2015; Salogni *et al.*, 2016).

A pesar de que varios de estos agentes virales han sido identificados en el Perú, no se ha demostrado su presencia como agentes involucrados en problemas reproductivos en marranas. Por esta razón, el objetivo del estudio fue detectar mediante técnicas moleculares a los agentes virales más frecuentes causantes de problemas reproductivos en fetos abortados de granjas tecnificadas de las regiones de Lima y Amazonas.

II. REVISIÒN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características de la crianza porcina en el Perú

La producción porcina es una industria en crecimiento en el país. La población de ganado porcino en el país es de 3 370 745 animales. Además, se menciona que la mayor población de porcinos se encuentra en el departamento de Lima con 501 088 (14. 86%). La población porcina en Amazonas es de 9 502 animales (MIDAGRI, 2022).

2.2. Manejo de la hembra reproductora

Se debe tener en cuenta que las cerdas tienen características reproductivas únicas a diferencia de otras especies, como su alta prolificidad. Una cerda llega a parir de 10 a 14 lechones por parto y puede superar los 25 lechones por año (Pozzi y Rosner, 2009).



Figura 1. Marrana con 10 lechones (izquierda) y 13 lechones (derecha) en una sola parición (Plaza, 2021)

2.3. Tracto reproductor de la marrana

2.3.1. Anatomía

Las cerdas presentan 12 a 14 pezones. Su tracto reproductivo está conformado por un cuerpo uterino corto de 5 cm de longitud con dos cuernos uterinos largos de 120 a 140 cm, aproximadamente. Los ovarios miden 5 cm de longitud y sus oviductos entre 20 a 22 cm. El cuello uterino presenta cojinetes fibrosos a manera de "sacacorchos" y tiene una longitud de 15 a 25 cm, aproximadamente (Pozzi y Alboralí, 2012).

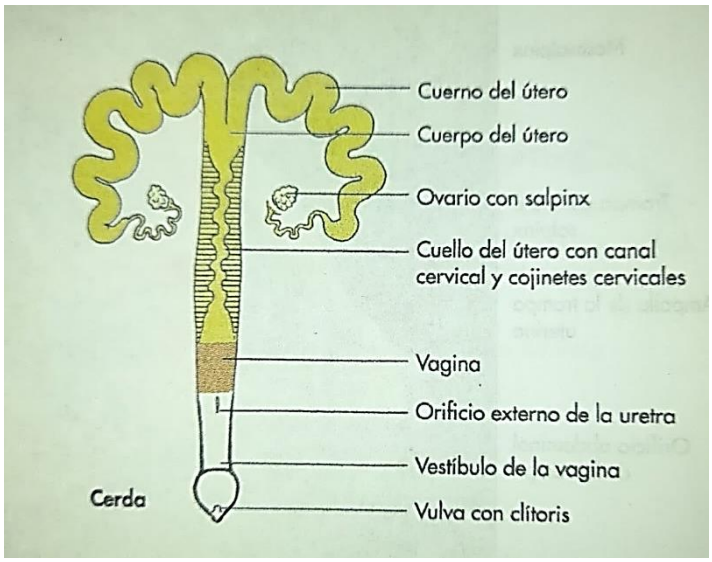


Figura 2. Representación esquemática de los órganos reproductores femeninos de la cerda (Konig y Liebich *et al.*, 2008).

2.3.2. Fisiología

La pubertad de la cerda se da a los 6 meses de edad. El ciclo reproductivo de la cerda es corto (2,2 - 2,4 ciclos por año) en comparación con otro tipo de ganado (Pozzi y Alboralí, 2012). La chanchilla llega a la edad reproductiva entre los 6 a 8 meses, aproximadamente (SENASA. 2020).

2.3.3. Gestación

La gestación de la cerda dura tres meses, tres semanas y tres días; es decir, 114 días, con un rango de 111 a 119 días, aproximadamente. Una cerda primípara puede parir 9 o 10 lechones, mientras que una cerda multípara, hasta 11 o 12 lechones (Muñoz, 2010; Pozzi y Alboralí, 2012), llegando a superar los 25 lechones al año (Pozzi y Rosner, 2009).

La implantación ocurre a los 14 días de gestación, aproximadamente, y la osificación a los 35 días. Se puede dividir a la gestación en dos etapas: embrionaria y fetal. La fase embrionaria ocurre hasta los 30 días de gestación y la fase fetal, entre los días 35 a 114 (Jabif, 2013).

2.4. Desarrollo ontológico del lechón

2.4.1. Placentación

La placentación es fundamental para crear el entorno que albergará al embrión y, posteriormente, al feto. La placenta se define como una íntima aposición o fusión de órganos maternos y fetales para el intercambio fisiológico (Karniychuk *et al.*, 2011). Esta desempeña un papel primordial durante la gestación, ya que su función principal es la de favorecer el intercambio fisiológico de gases y desechos entre los sistemas materno y fetal; de ella depende la implantación y mantenimiento de la preñez (Cristofolini *et al*, 2008; Merkis *et al*, 2009).

Las cerdas presentan una placenta de tipo epiteliocorial difusa, adecidua, plegada, no invasiva, que involucra a casi toda la superficie del alantocorio (Williamson y Koncurat, 2009; Karniychuk *et al.*, 2011; Pozzi y Alboralí, 2012). Existen seis capas que separan la sangre materna de la fetal, impidiendo el paso de anticuerpos maternales durante la gestación. Las microvellosidades maternas y fetales se interdigitan, lo que permite el reconocimiento y adhesión del embrión. A partir de los días 39 a 55, los fetos porcinos presentan membranas fetales individuales (Williamson y Koncurat, 2009; Karniychuk *et al.*, 2011).

En las placentas porcinas, existe un proceso de angiogénesis durante la primera mitad de gestación. Hay un rápido crecimiento y aumento progresivo en la densidad de los vasos sanguíneos entre los días 20 y 60 de gestación, alcanzando su máximo desarrollo al día 70. Esto permite el establecimiento y desarrollo de la placenta, ya que logra el aumento del flujo sanguíneo placentario para satisfacer las demandas metabólicas del feto. Con el feto en desarrollo, la angiogénesis de la placenta facilita el transporte de nutrientes y gases esenciales. A partir del día 55 de gestación, se produce un rápido crecimiento fetal que conlleva a un incremento en la demanda de nutrientes, siendo la placentación un proceso fundamental para satisfacer estas necesidades (Cristofolini *et al.*, 2008).

El periodo de implantación dura entre 12 a 14 días luego de la fecundación. Si ocurre mortalidad embrionaria en este periodo, ocasionaría reabsorción embrionaria y retorno regular al celo (estro). Por otro lado, si la perdida se da entre los días 14 y 35 de gestación,

ocurre retorno irregular al celo (estro). Para que se dé el mantenimiento de la gestación, se deben de implantar al menos 4 embriones (Karniychuk *et al.*, 2011).

El periodo de mineralización fetal inicia a los 35 días de gestación. Si la gestación se ve interrumpida en esta etapa, se da una reabsorción incompleta, conduciendo a la formación de fetos momificados. Desde el día 35 hasta antes de los 60-70 días de gestación, se da el periodo de inmunotolerancia. Si el feto logra sobrevivir, el lechón, después del parto, puede excretar el agente patógeno. Después de los 70 días, se da el periodo de inmunocompetencia o autonomía inmunitaria, en la que el sistema inmunitario del feto puede ser capaz de combatir una infección (Jabif, 2013).

2.5. Problemas reproductivos en las cerdas

Los problemas reproductivos se pueden manifestar de diversas formas dependiendo del momento de la perdida embrionaria o fetal. Si ocurre pérdida embrionaria, generalmente, no hay expulsión de estructuras orgánicas o pasan desapercibidas. Se dan retornos regulares al estro, si esto ocurre antes de los 14 días de gestación, o retornos irregulares al estro, si esto ocurre entre los días 14-35 de gestación, aproximadamente (Madson y Opriessnig, 2011). También, se pueden dar momificaciones fetales (con absorción de líquidos) entre los días 35 a 90 de gestación, cuando ya existe calcificación fetal de los huesos (Pozzi y Alboralí, 2012).

El termino aborto se refiere a la expulsión de fetos muertos en cualquier momento de la gestación (Jabif, 2013). El aborto puede contener fetos muertos normalmente desarrollados, fetos momificados o fetos macerados con diferentes grados de desarrollo, cuando estos mueren en diferentes momentos de la gestación (Pozzi y Alboralí, 2012). Los fetos nacidos muertos son los fetos normalmente desarrollados que mueren antes del parto o durante el parto (Karniychuk *et al*, 2011).

De acuerdo al patógeno involucrado (causa infecciosa) o por factores externos, el aborto puede ocurrir en diferentes estadios de la preñez (Karniychuk *et al*, 2011). Se tienen abortos tempranos que ocurren entre los días 14 a 35 de gestación y abortos tardíos entre los 90 a 110 días de gestación (Jabif, 2013).

A nivel mundial, aproximadamente, el 50% de las cerdas se reemplazan cada año, representando las fallas reproductivas un tercio del total de todos los retiros (Engblom *et al*., 2007). En Europa y Asia, los problemas reproductivos son considerados como la principal causa de descarte de cerdas en las granjas porcinas, llegando a representar del 33 a 71%, seguida de los problemas físicos como cojeras (Lucía *et al*., 2000; Mabry y Goddwin, 2002; Masaka *et al*. 2014; Zhao *et al*., 2015). En Latinoamérica, también se han realizado estudios al respecto, ubicando a la falla reproductiva como la primera causa de descarde de cerdas con porcentajes de 37% a 42%, seguida de los problemas físicos (Saballo *et al*., 2007; Muñoz, 2010).

Las cerdas que son descartadas debido a problemas reproductivos presentan el menor número de partos/año y de lechones destetados/vida, en contraste con las otras causas de descarte (Saballo *et al*., 2007).

Las fallas reproductivas pueden tener diversas causas como, el mal manejo, la inadecuada alimentación, toxinas, patologías (endocrinas, anatómicas, cromosómicas, otras), tensiones ambientales y nutricionales, etc. Además, pueden ser causadas por agentes infecciosos virales o bacterianos que son capaces de interferir con el normal desarrollo de la gestación causando retornos regulares e irregulares al celo, muerte y reabsorción embrionaria, fetos abortados, fetos momificados, nacidos muertos, nacidos débiles, entre otros (Pozzi y Alborali, 2012; Dron *et al.*, 2014).

2.5.1. Infecciosos

Aproximadamente, el 38% de los abortos de cerdas diagnosticados se deben a causas infecciosas. Cualquier enfermedad de gravedad en una cerda preñada puede causar muerte fetal, debido a la interrupción de la normalidad del ambiente uterino (Peñaherrera, 2011). Los principales agentes virales involucrados en problemas reproductivos en cerdas son el virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo porcino (VPRRS), Circovirus porcino tipo 2 (CVP-2), Parvovirus porcino (PVP), Virus de la Influenza porcina (VIA), Virus de la Peste Porcina Clásica (VPPC), Virus de Aujeszky (ADV), Virus de la Peste Porcina Africana (vPPA), (Pozzi y Alborali, 2012; Olanratmanee *et al.*, 2015; Salogni *et al*., 2016). Las bacterias asociadas a estos problemas son *Escherichia coli, Streptococcus sp.,*

Staphylococcus sp., Erysipelothrix rhusiopathiae, Leptospira sp., y *Brucella suis (*Salogni *et al*., 2016).

A nivel mundial, se ha logrado detectar al vPRRS a partir de fetos porcinos abortados en un intervalo de 3 al 65%, usando tejidos fetales como pulmón, corazón, bazo, hígado, timo y ganglios linfáticos (Maldonado *et al.*, 2004; Ritzman *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2004: Olanratmanee *et al.*, 2015; Salogni *et al*., 2016), La edad gestacional fetal se estima mediante la longitud craneocaudal (desde la corona hasta el ano en centímetros) de los fetos. La presencia de vPRRS se ha detectado, mayoritariamente, en fetos de más de 70 días de edad en comparación a los fetos menores de 70 días de edad (Olanratmanee *et al.*, 2015).

Se ha detectado al PPV en porcinos abortados desde un 6% hasta un 96%, utilizando muestras de pulmón, corazón, riñón, timo y bazo (Kim *et al*., 2004; Ritzman *et al.*, 2005; Wolf *et al*., 2008; Salogni *et al*., 2016). Los fetos con 70 a 99 días de edad gestacional tuvieron mayor frecuencia de resultados positivos respecto a los de más edad (Wolf *et al*., 2008).

De igual manera, el CVP-2 ha sido detectado en fetos porcinos abortados en intervalos de 1 a 42% en muestras como hígado, pulmón, corazón, bazo y ganglios linfáticos (Maldonado *et al.,* 2004; Park *et al.,* 2005; Ritzman *et al.,* 2005; Kim *et al*., 2004; Pescador *et al.*, 2007; Salogni *et al*., 2016). Los fetos en etapa tardía fueron más frecuentes en la detección de CVP-2, seguida de la etapa media y finalmente, la etapa temprana (Kim *et al*., 2004).

El vEA se ha hallado en fetos porcinos abortados en un 18 % (Salogni *et al*., 2016).

2.5.2. No infeccioso

Las causas de problemas reproductivos pueden clasificarse en dos grupos. En el primero, se encuentran las fallas ocasionadas por agentes infecciosos que causan una infección sistémica o local en los órganos reproductores de las cerdas (Salogni *et al*., 2016). Un segundo grupo está representado por desviaciones del equilibrio hormonal normal,

tensiones ambientales, nutricionales y el mal manejo en la granja porcina (Maldonado *et al*, 2004; Salogni *et al.*, 2016).

Maldonado *et al.* (2004) sostiene que el diagnóstico de la causa de abortos en las cerdas y otras fallas reproductivas, rara vez es sencilla. Además, un gran porcentaje de pérdidas por fallas reproductivas, probablemente no se asocia con alguna etiología infecciosa.

Cualquier enfermedad grave de la cerda preñada puede resultar en muerte de los fetos, debido a la interrupción de la normalidad del ambiente uterino (Peñaherrera, 2011).

Dron *et al.* (2014) sostiene que el tamaño de la camada también puede ocasionar alguna falla en la reproducción, ya que, en cerdas con tamaño de camada grande, el espacio uterino para cada feto se ve reducido, lo que puede tener un efecto en en la transferencia de nutrientes de la cerda al feto, ocasionando fetos abortados o momificados.

El movimiento de las cerdas antes de los 30 días de gestación, puede generarles estrés y esto conllevar a un aborto. Además, la mala alimentación en calidad y cantidad que no satisfagan las necesidades metabólicas de la madre y del feto y que deterioren la condición corporal general de la madre puede acarrear la muerte fetal (Salogni *et al*., 2016).

2.5.3. Impacto económico

Se considera al aborto como la expresión más dramática de pérdida en la producción, ya que, cuando aumenta su incidencia conlleva a un aumento en costos de medicinas, tratamientos, alimentación y vacunas; además, el dinero invertido en la cerda durante la preñez se pierde por completo llegando a afectar seriamente la rentabilidad de las inversiones en la granja (Peñaherrera, 2011; Zhao *et al.*, 2015).

Para mantener un flujo de caja, se debe mantener a la cerda por un tiempo lo suficientemente largo como para que produzca la mayor cantidad de lechones destetados. La vida productiva de una cerda se define por el número de partos que alcanzó hasta el momento de ser desechada, así como el número de lechones destetados. Mantener a la cerda en producción, puede ser rentable hasta el sexto parto (Saballo *et al.*, 2007). En general, una cerda debe de alcanzar tres paridades para producir suficientes lechones para pagar por ella misma (Engblom *et al*., 2007; Zhao *et al*., 2015).

Las cerdas que son descartadas debido a fallas reproductivas alcanzan mayor cantidad de días no productivos (DNP, días en los que la cerda en producción no está ni gestante ni dando de lactar), lo que significa un mayor gasto de dinero en alimentación y mantenimiento a una cerda improductiva. Estas cerdas producen menos lechones destetados en su vida, con respecto a las cerdas desechadas por otras causas (Saballo *et al.,* 2007).

Si se mejora el manejo productivo, se reduciría la frecuencia de descartes por dicho motivo, por lo cual, es necesario controlar e identificar las causas que la provocan (Saballo *et al.,* 2007).

2.6. Agentes virales causantes de problemas reproductivos

Los principales agentes virales causantes de problemas reproductivos en cerdas son el virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo porcino (vPRRS), Circovirus porcino tipo 2 (CVP-2), Parvovirus porcino (PVP), Virus de la Influenza porcina (vIA), Virus de la Peste Porcina clásica (vPPC) y Virus de Aujeszky (vEA) (Olanratmanee *et al*, 2015).

2.6.1. Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (vPRRS)

El Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo porcino (vPPRS) es un virus de distribución mundial. Causa signos respiratorios y reproductivos en los cerdos, generando pérdidas económicas importantes en el sector, por lo que es considerada como una de las enfermedades más importantes en la industria porcina a nivel mundial (Barranco, 2011; Calle, 2017). Esta enfermedad fue diagnosticada por primera vez en EEUU, en el año 1987 (Zimmerman *et al*., 1998) y se ha ido diseminanda a nivel mundial en los años siguientes (Velasquez *et al.,* 2016).

2.6.1.1. Estructura del virus

El vPRRS pertenece al orden *Nidovirales,* suborden *Arnidovirineae,* familia *Arteviridae.* subfamilia *Variarterivirinae,* género *Betaarterivirus* (ICTV, 2020).

Es un virus ARN de cadena simple y sentido positivo con alrededor de 15 kb y con envoltura. Presenta un tamaño entre 50-65 nanómetros, aproximadamente (Amarilla *et al.,* 2015). Presenta 9 marcos de lectura abiertos (ORF) conocidos. Los fragmentos de lectura

abierta largos ORF1a y ORF1b codifican las poliproteínas pp1a y pp1ab, respectivamente. La poliproteina pp1a genera 9 proteínas no estructurales (nsp1α, nsp1β, y nsp2 a nsp8) y la pp1ab genera 4 proteínas no estructurales (nsp9 a la nsp12), las cuales están involucradas en la transcripción y replicación del genoma viral. Las ORF2a, 3 y 4 codifican proteínas estructurales menores asociadas a la membrana glicosilada (GP2a, GP3 Y GP4). La ORF2b codifica a la proteína E, que está asociada a la membrana no glicosilada. Las proteínas estructurales M (codificada por la ORF6) y la GP5 (codificada por ORF2b) se encuentran en la envoltura viral. La ORF7 codifica para a proteína N que se encuentra en la nucleocápside (Music y Gagnon, 2010).

El vPRRS ha sido reclasificado recientemente por el ICTV (*Internacional Committee on Taxonomy of Viruses)*. El género *Betaarterivirus* se divide en dos subgéneros diferentes: *Eurobartevirus* y *Ampobartevirus*, que albergan a las dos especies distintas denominadas *Betaarterivirus suid 1* (anteriormente denominada vPRRS -1, genotipo 1 o europeo) y *Betaarterivirus suid 2* (anteriormente denominado vPRRS-2, genotipo 2 o norteamericano), respectivamente (ICTV, 2020).

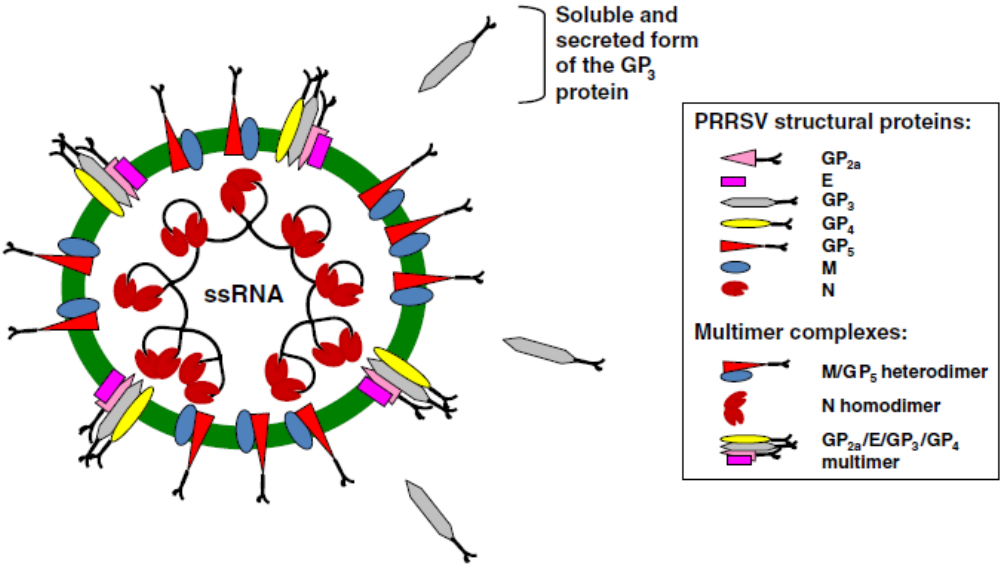


Figura 3. Representación esquemática de la partícula de VPRRS (Music y Gagnon, 2010).

2.6.1.2. Transmisión

El vPPRS es altamente contagioso, siendo su principal vía de transmisión, el contacto directo, mediante contacto oronasal y genital (Calle, 2017). Además, puede haber transmisión aérea a través de aerosoles que viajan en el aire por su poco peso y son inhalados por individuos sanos llegando al sistema respiratorio, también las gotas pueden depositarse en objetos convirtiéndolos en fómites y transmitiendo la enfermedad dentro de granja o fuera de ella a través de redes de vehículos de transporte (Galvis *et al*., 2021; Gonçalves *et al.,* 2019).

Se ha logrado demostrar la presencia del vPRRS en secreciones y excreciones en periodos variables de tiempo como en la saliva hasta los 42 días, en secreciones nasales hasta los 38 días, en orina hasta los 28 días y en heces hasta los 35 días. Además, en semen de 2 a 12 semanas post infección (Rosow *et al.*, 1994; Wills *et al*., 1994; Prieto y Castro 2005).

El virus puede transmitirse de manera vertical debido a que la viremia conduce al vPPRS a replicarse en el endometrio materno, causando el paso a través de la placenta generando una infección fetal (Karniychuk *et al*, 2011). El virus puede permanecer por algunos meses en el cerdo infectado. Se ha logrado detectar el virus mediante RT-PCR en amígdala de cerdos infectados experimentalmente hasta el día 251 post infección (Wills *et al*., 2003).

2.6.1.3. Signos clínicos

Existen dos formas clínicas de la enfermedad producida por el vPRRS: la forma respiratoria y la forma reproductiva (Barranco, 2011). La forma respiratoria se da, principalmente, en lechones. Estos presentan tos, disnea, respiración costoabdominal, fiebre, cianosis, pérdida de apetito, diminución del crecimiento, diarrea, pelaje hirsuto, edema periorbitral e incremento de la mortalidad en animales lactantes (Calle, 2017).

En cuanto a la forma reproductiva, puede ocurrir retorno irregular al estro si la cerda ha sido infectada entre los 14 a 35 días de gestación (Karniychuk y Nauwynck, 2013) o

pueden ocurrir cuadros de abortos, partos prematuros, fetos momificados y nacidos débiles si la infección ocurre hacia el final de la gestación. A excepción de los problemas reproductivos, los signos clínicos en cerdas gestantes suelen ser inexistentes o pasar desapercibidas. La mortalidad en las cerdas es baja (Amarilla *et al*., 2015; Pena *et al.*, 2019).

Los verracos pueden carecer de libido o ser asintomáticos. El virus puede causar disminución de la motilidad de los espermatozoides, aumento de anomalías morfológicas y alteraciones del acrosoma (Barranco, 2011; Amarilla *et al*., 2015).

2.6.1.4. Patogenie

El vPRRS ingresa al organismo vía oronasal y genital, penetra a epitelios nasal y tonsilar, llega al pulmón, donde replica en los macrófagos alveolares porcinos (MAPS). Alcanza los tejidos linfoides regionales, se produce viremia y se disemina por todo el organismo por vía sanguínea y linfoide, circulando libremente o ligado a monocitos circulante, llegando al útero (Barranco, 2011; Lopez *et al.*,2015; Calle, 2017). El periodo de incubación es de 3 días a varias semanas (Karniychuk *et al.,* 2011). Tras la infección fetal, el virus replica dentro de los tejidos linfoides fetales como timo, amígdala y gaglios linfáticos. La infección fetal, se da en el último tercio de gestación, generalmente (Rowland, 2010).

2.6.1.5. Forma reproductiva

La infección viral cobra importancia al final de la gestación (a partir del día 85 en adelante), ya que el virus puede atravesar la placenta e infectar al feto. Se puede dar hasta un 40% de tasa de abortos en cerdas infectadas en el último tercio de gestación (Ladinig *et al.,* 2014) además de nacimiento de lechones débiles o infectados, que repercute en un aumento en la mortalidad pre-destete (Amarilla *et al.,* 2015; Pena *et al.*, 2019).

Se han planteado tres formas de transmisión transplacentaria: propagación directa de célula a célula del vPRRS desde los macrófagos endometriales infectados hasta el epitelio uterino y, posteriormente, a través de las células trofoblásticas hasta los macrófagos placentarios; movimiento de partículas libres de vPRRS directamente a través del epitelio

uterino y las células trofoblásticas o entre ellas; y, propagación del virus asociado a macrófagos maternos infectados que pasan de los tejidos maternos a los fetales (Karniychuk *et al.,* 2011). En el último tercio de gestación, el endometrio se torna más susceptible al virus. Este puede replicar en los macrófagos de la placenta fetal. Luego, las células placentarias infectadas pueden pasar a órganos fetales por vía sanguínea (Huttenloncher y Poznansky, 2008).

El vPPRS es capaz de replicar en el endometrio y placenta, causando la apoptosis de células locales (Karniychuk *et al.*, 2011), que puede contribuir a la reducción del crecimiento y eventual compromiso al impedir la transferencia de nutrición hematotrófica (Harding *et al.,* 2017).

Se ha detectado replicación viral en órganos fetales como pulmones, hígado, timo, bazo y ganglios infanticos en el último tercio de gestación (Rowland, 2010).

Puede existir transmisión viral entre fetos hermanos en el útero (Harding *et al*, 2017). Esto puede darse a través de macrófagos migratorios que atraviesen membranas fetales o por anastomosis sanguíneas entre los alantocorios de los fetos. Se ha detectado células masculinas en el hígado y pulmones de fetos femenino y viceversa (Karniychuk *et al.*, 2011).

Los daños a la placenta porcina debido a la replicación viral en la misma pueden ser los responsables de los problemas reproductivos asociados a la infección con vPRRS. Se han observado lesiones histopatológicas como separación local entre epitelio uterino y trofoblasto, también degradación completa del mesénquima placentario, que sostiene la capa del trofoblasto tras la inoculación con vPPRS 20 días post inoculación a los 90 días de gestación (Karniychuk *et al*., 2012). Estas lesiones impiden la vida fetal por no permitir el intercambio de gases esenciales, alimentación y limpieza de metabolitos tóxicos entre la madre y el feto. Estos problemas se evidencian por la muerte fetal y abortos en el último tercio de gestación (Karniychuk *et al.,* 2012; Harding *et al,* 2017).

Los verracos presentan un curso subclínico llegando a ser asintomático y tener alteraciones en la calidad seminal y libido (Barranco, 2011).

2.6.1.6. Diagnóstico y prevención

Se utiliza el aislamiento viral en muestras como saliva, orina, secreción faríngea, tejido linfoide, semen, pulmón, etc (Hernandez, 2018). Se utiliza cultivo celular en células del riñón de mono verde africano MA-104), requiriéndose, 7 a 14 días para el procesamiento. Los efectos citopáticos que presentan las células son agrupamiento, redondeamiento celular y lisis. Sin embargo, es una técnica laboriosa y lenta, algunas cepas son difíciles de aislar y tiene un bajo nivel de sensibilidad en comparación con el PCR (Mendoza, 2015).

Se puede realizar la Inmunohistoquímica (IHQ) en muestras de pulmón y tonsilas, para detectar el antígeno de VPRRS en tejidos, no se usan, normalmente, tejidos fetales (Calle, 2017). La prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFA) permite detectar anticuerpos a partir de suero. Es una prueba rápida, económica y especifica (99.5% de especificidad). Es necesario realizar 2 pruebas simultaneas, una con la cepa norteamericana y la otra con la cepa europea. No permite el estudio de un numero grande de células (Murriel *et al.*, 2017).

La Elisa es adecuada para un gran número de muestras (Hernandez, 2018). Puede detectar anticuerpos frente a vPRRS a partir de los 7 a 9 días posteriores a la exposición al virus (Lopez y Osorio, 2004).

La Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica en la que se amplifica un segmento del material genético, cuenta con alta especificidad y es rápida. Se puede utilizar tejido linfoide y pulmón, así como tejido fetal, semen y sangre (Hernandez, 2018).

El Síndrome Reproductivo y Respiratorio porcino no tiene tratamiento específico, por lo que la prevención es muy importante (Calle, 2017). Cuando el virus ingresa a una granja de alta densidad, puede difundirse rápidamente por no ser detectado y no contar con medidas de control. En algunos casos, el virus puede ser endémico en cerdos de recría y engorda, llegando a una prevalencia del 50 % (Quevedo *et al.*, 2018). Cuando se introduzcan nuevos animales, estos deben de proceder de una explotación negativa (Murriel, 2017).

Existen dos tipos de vacunas vPRRS en el mercado: vacunas de virus vivos modificados (llamadas atenuadas), que se generan por múltiples pasajes de virus en cultivos celulares hasta conseguir un fenotipo atenuado; y vacunas de virus muerto (llamadas inactivadas),

desarrolladas por inactivación física o química de virus virulentos. Ambas vacunas son desarrolladas a partir de cepas europeas y norteamericanas, se utilizan en la mayoría de países. Las vacunas inactivadas no pueden prevenir la infección por vPRRS, debido a que no inducen la formación de anticuerpos neutralizantes (Karniychuk *et al*, 2011). Por otro lado, las vacunas atenuadas sí inducen la formación de anticuerpos neutralizantes y logran prevenir la replicación viral, viremias y los signos clínicos. Sin embargo, la protección se da de manera parcial, ya que solo se genera frente a cepas homologas; es decir, la vacunación con un genotipo no presenta una protección eficaz frente a otro genotipo (Barranco, 2011).

Se ha referido signos clínicos como aborto y alta mortalidad en cerdas gestantes, luego de la vacunación con vacunas atenuadas de tipo norteamericano (Karniychuk *et al*, 2011).

2.6.2. Parvovirus porcino (PVP)

El PVP provoca fallas reproductivas que incluyen muerte fetal, momificación fetal, abortos y disminución en la tasa de concepciones, lo que conlleva a una reducción del tamaño de la camada, generalmente sin sintomatología en la cerda. El PVP representa un problema mundial en la industria porcina, considerándolo como la mayor causa de muerte embrionaria y fetal, después del PRRS (Streck y Truyen, 2020).

El PVP fue aislado por primera vez a partir de cornetes nasales en 1972, por Mengelin. Se lo relaciónó con fallas reproductivas, ya que también fue aislado de tejidos de fetos abortados, fetos momificados y nacidos muertos (Peñaherrera, 2011).

El PVP en cerdos fue descrita por primera vez por Cartwright y Huck (1967) y años siguientes fue reconocido como el agente causal del Sindrome SMEDI (Stillbirth, mummification, embryonic death and infertility) (Mészáros et *al.*, 2017).

2.6.2.1. Estructura del virus

El PVP pertenece al orden *Piccovirales*, familia *Parvoviridae.*, subfamilia *Parvovirinae*, género *Protoparvovirus.* especie *Ungulate protoparvovirus 1* (denominado así, recientemente) (ICTV, 2019). En las dos últimas décadas, se han descubierto nuevas especies de Parvovirus porcino: Parvovirus porcino 2 (género *Tetraparvovirus*, especie

Ungulate tetraparvovirus 3, Parvovirus porcino 3 (gènero *Tetraparvovirus*, especie *Ungulate tetraparvovirus 2*), Parvovirus porcino 4 (gènero *Copiparvovirus*, especie *Ungulate copiparvovirus 2*), Parvovirus porcino 6 (género *Copiparvovirus*, especie *Ungulate copiparvovirus 4*), Parvovirus porcino 7 (género *Chaphamaparvovirus*, especie *Ungulate chaphamaparvovirus 1*) (ICTV, 2021). Es un virus ADN, de cadena sencilla de 5200 pb, aproximadamente. Presenta cápside icosaédrica, mide entre 18 y 25 nm, y no presenta envoltura. Presenta 4 proteínas estructurales (VP1-VP2) y una no estructural (NS1). Presenta dos grandes marcos de lectura abierta (ORF), que codifican proteínas no estructurales (ubicadas en el extremo 5´) y proteínas de la cápside (ubicada en el exteremo donde el ORF derecho, codifica las proteínas de la cápside (extremo 3´) (Wolf *et al*., 2008, Cheung *et al.,* 2010; Foerster *et al.*,2016).

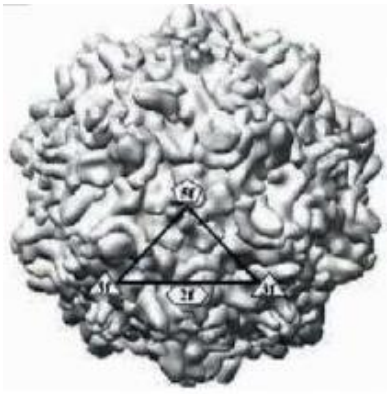


Figura 4. Visualización de la estructura de PVP por cristalografía por difracción de rayos X (Truyen y Streck, 2012).

2.6.2.2. Transmisión

A este virus se lo considera ubicuo y endémico, de distribución mundial. Se difunde en forma horizontal, por vía orofecal, principalmente, también se difunde vía venérea, transplacentaria e intrauterina. El virus puede estar presente en secreciones y excreciones, incluyendo heces y semen. El virus puede persistir en el cerdo infectado durante mucho tiempo, inclusive durante toda su vida. La infección transplacentaria a los fetos se da a las semanas post infección de la madre. También puede haber difusión intrauterina a los fetos

adyacentes, ya que hay gradación en el tamaño de los fetos momificados de una misma camada, que corresponden a diferentes momentos de muerte fetal (Rico *et al.,* 2003; Wolf *et al*., 2008; Foerster *et al.*,2016).

Una de las fuentes principales del virus en el medio ambiente son las heces. Asimismo, el verraco también es considerado una fuente importante, ya que se ha detectado el virus en el semen de verracos. Las cerdas en desarrollo y primerizas contaminadas son el principal reservorio (Rico *et al.,* 2003; Peñaherrera, 2011)**.**

2.6.2.3. Signos clínicos

Los principales signos clínicos producidos por el PVP son las fallas reproductivas como retornos al estro, reabsorciones embrionarias, abortos, fetos momificados, cuadros de infertilidad en la cerda reproductora. Generalmente, esta no presenta sintomatología clínica como fiebre o anorexia. En verracos, no se observan signos clínicos (Zeeuw *et al.,* 2007; Wolf *et al*., 2008). También puede ocasionar lesiones cutáneas en lechones (Miao *et al.,* 2009).

2.6.2.4. Patogenie

El virus ingresa vía oronasal. Replica en tejidos linfoides. Posteriormente, se da la viremia, donde el virus es diseminado sistémicamente a partir del día 10 post infección (Peñaherrera, 2011). Llega al útero, donde es capaz de atravesar la barrera transplacentaria, el mecanismo por el cual logra hacerlo, aun no se comprende (Manjelín *et al.,* 2000; Wolf *et al*., 2008). Se cree que puede atravesar la placenta en macrófagos o linfocitos llegando al feto. El virus tiene un ambiente susceptible a la infección y replicación debido a la alta actividad mitótica que hay en los tejidos fetales. La muerte fetal ocurre por daño a la placenta y a los tejidos fetales (Zhang *et al.,* 2019).

2.6.2.5. Forma reproductiva

La infección viral causada por PVP puede ocasionar muerte fetal, momificación fetal, muerte embrionaria e infertilidad (Síndrome SMEDI) (Miao *et al.,* 2009).

Los efectos reproductivos de la infección por PVP en cerdas dependen del momento de la gestación en la que se da la infección viral. Si la infección se da al inicio de la preñez, cuando el embrión está protegido por la zona pelúcida, este no es susceptible. Si la infección ocurre en los primeros 15 días de gestación, se da muerte embrionaria y reabsorción de esta, evidenciándose como retorno al estro. Si la infección se da hasta el día 35 de preñez, aproximadamente, puede ocurrir muerte embrionaria y reabsorción materna de los tejidos fetales, pudiendo ocurrir retorno irregular al estro. Posteriormente, comienza la osificación del esqueleto fetal. La infección viral en esta etapa puede producir muerte fetal evidenciándose como aborto y momificación. Si los fetos se infectan luego de los 70 días de gestación, estos pueden generar una buena respuesta inmunitaria, desarrollando anticuerpos contra el PVP y lograr sobrevivir. El lechòn puede nacer con anticuerpos anti-PVP (Mengeling *et al.,* 2000; Foerster *et al.,* 2016; Streck y Truyen, 2020).

Se sugiere que el PVP llega al feto a través de la superficie de los macrófagos maternos (Mészáros *et al.,* 2017).

2.6.2.6. Diagnóstico y prevención

Si en una granja se dan casos de fallas reproductivas con muerte embrionaria o fetal sin efectos en la madre se puede sospechar de PVP (Peñaherrera, 2011).

Los métodos clásicos para confirmar la infección fetal son el aislamiento viral, Inmunofluorescenia y hemaglutinación (Wolf *et al*., 2008). El aislamiento viral se puede realizar en líneas celulares como ESK (riñón embrionario porcino), PK-15 (riñón porcino) y STE (epitelio testicular porcino). La replicación en estas células produce efectos citopáticos que incluyen forma irregular, granulaciones, inclusiones intranucleares, núcleo picnótico y muerte celular. A menudo se asocia con fluorescencia (Streck y Truyen, 2020).

También, se pueden utilizar pruebas serológicas como ELISA, Inmunofluorescencia Indirecta (IDA) y Neutralización viral (NV), aaunque, se las considera de poco valor diagnóstico, empleándolos más para conocer el estado inmunológico de la piara (Rico *et al.,* 2003).

En cuanto a las fallas reproductivas, el PCR es la técnica más adecuada para la detección viral en tejidos fetales, teniendo mayor sensibilidad y especificidad diagnóstica que el aislamiento viral (Streck *et al.,* 2015; Yang *et al.,* 2016).

No existe un tratamiento efectivo contra la PVP. Debido a que la infección es endémica en muchas piaras, el control se basa en disminuir los fracasos reproductivos, asegurándose de que las hembras desarrollen una inmunidad adecuada (Hernandez, 2018).

Se debe exponer a las cerdas naturalmente al virus o vacunarlas 30 días antes del servicio (Peñaherrera, 2011). La segunda dosis se aplica a las 3-4 semanas de diferencia, reforzándolo de manera anual (García, 2018). La vacunación provoca una respuesta inmune activa que, durante la gestación, puede proteger a las camadas de una infección viral (Hernandez, 2018). Foerster *et al.* (2016) determinaron, que la vacuna impidió la muerte fetal, luego de la exposición con un virus homologo. Además, el semen para inseminar a las marranas debe de proceder de un verraco libre de PVP (García, 2018).

2.6.3. Circovirus porcino (CVP)

El Circovirus porcino (CVP) fue reportado por primera vez en Bélgica en el año 1969 y descrito en el año 1974 por investigadores alemanes (Noriega *et al.,* 2007; Bermeo, 2012).

La enfermedad que ocasiona puede tener varias manifestaciones clínicas en el cerdo como el Síndrome multisistémico posdestete (PMWS), enfermedad respiratoria, enteritis, insuficiencia reproductiva y el Síndrome de dermatitis y nefropatía porcina (PDNS) (Madson y Opriessnig, 2011). Al conjunto de estas enfermedades se las denomina Enfermedades asociadas al Circovirus porcino 2 (PCAVD) (Pescador *et al,* 2007).

2.6.3.1. Estructura del virus

El virus se encuentra en el orden *Cirlivirales*, familia *Circoviridae,* gènero *Circovirus.* En cerdos, este género se divide en 4 especies: *Porcine circovirus 1*, *Porcine circovirus 2*, *Porcine circovirus 3* y *Porcine circovirus 4 (*ICTV, 2020).

De las 4 especies de CVP, el que se considera patógeno es el Circovirus Porcino tipo 2 (CVP-2) (Madson y Opriessnig, 2011). Es un virus pequeño con solo 17 nm de diámetro,

de simetría icosaédrica y sin envoltura. Presenta ADN circular monocatenario. Se han descrito 6 marcos de lectura abierto (ORFs). La ORF1 codifica a una proteína esencial en la replicación viral del ADN y la ORF2, codifica para las proteínas estructurales principales de la cápside viral (Noriega *et al.,* 2007; Kim *et al*., 2004).

Existen cuatro subtipos de CVP-2 a nivel mundial: CVP-2b, CVP-2c, CVP-2d y CVP-2e. Los dos primeros se asocian al Síndrome Multisistémico y de Desmedro, PCV2c ha sido detectado en Dinamarca y CVP-2d solo ha sido aislado en China (Madson y Opriessnig, 2011; Pescador *et al*, 2007

).

PCV- 1 no se ha socia a enfermedad clínica, incluso al inocularse en cerdos no dio lugar a ningún signo clínico, por lo que se le considera apatógeno. Por otro lado, a CVP-2 se le asocia a varios conjuntos de signos clínicos, que incluyen el Síndrome multisistémico de emaciación Postdestete (PMWS), Dermatitis porcina y Síndrome de nefropatía (PDNS), complejo respiratorio porcino, y epidermitis exudativa (Sorden., 2000; Chae, 2005; Park *et al.,* 2005). Se ha detectado PCV-3 en cerdos asintomáticos y con signos respiratorios, digestivos y reproductivos varios países a nivel mundial mediante técnicas moleculares. Los datos obtenidos hasta el momento lo señalan como un virus potencialmente patógeno; sin embargo, su impacto en la salud porcina en todo el mundo aún está por determinarse (Saporiti *et al.,* 2021).

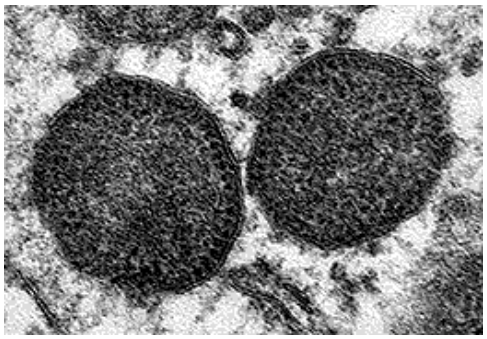


Figura 5. Microfotografia electrónica de dos cuerpos de inclusión intracitoplasmàticos de un macrófago que incluyen partículas de CVP-2. (Campos, 2020)

2.6.3.2. Transmisión

El CVP-2 es ubicuo en cerdos y jabalíes. Además, se ha podido detectar en granjas con y sin enfermedad. La transmisión puede darse de manera vertical como horizontal. De manera horizontal se da por contacto directo vía oronasal (la más frecuente), urinaria, seminal y fecal entre cerdos infectados y susceptibles (Bermeo, 2012; Pescador *et al*, 2007). También se ha detectado la presencia del virus en verracos previamente inoculados con CVP-2, considerando la vía venérea como una ruta de transmisión (Rincon, 2014).

En cuanto a la transmisión vertical, se da vía transparentaría durante el tiempo de viremia, ocasionando problemas reproductivos, esto ha sido demostrado mediante la inoculación intranasal en cerdas gestantes, detectando al virus en el 13% de los fetos abortados y nacidos muertos (Kim *et al.*, 2003; Rincon, 2014).

2.6.3.3. Signos clínicos

Como se mencionó anteriormente, el CVP-2 causa diversas manifestaciones clínicas, que en conjunto son denominadas Enfermedades asociadas al CVP-2 (PVCAD) (Madson y Opriessnig, 2011).

La primera descrita fue el Síndrome de Desmedro Porcino (PMWS, por sus siglas en inglés: *Porcine multisystemic waste syndrome*), que afecta a cerdos destetados entre 5 a 12 semanas causando taquipnea, disnea, jadeo y pérdida de peso progresiva, retardo en el crecimiento, diarrea, ictericia y alta mortalidad (Bermeo, 2012; Pescador *et al.*, 2007).

Este virus es parte del llamado Complejo Respiratorio porcino, un complejo multietiológico, en cerdos entre 8 a 26 semanas. Se caracteriza por ocasionar falla en el crecimiento, tos, fiebre, disnea, neumonía, etc (Bermeo, 2012).

El Síndrome de Dermatitis y Nefropatía porcina (PDNS) ocasiona animales febriles, edema subcutáneo ventrocaudal y lesiones cutáneas multifocales rojas o púrpuras que llegan a crecer, convirtiéndose en placas y costras. Esto se da en orejas, tórax, abdomen o todo el cuerpo. Además, los riñones se agrandan, se tornan pálidos (Bermeo, 2012).

A nivel digestivo, el CVP-2 puede ocasionar enteritis en cerdos entre 8 a 16 semanas de edad, ocasionando diarreas (Bermeo, 2012).

En cuanto a la forma reproductiva, la infección por CVP-2 durante la gestación causa la formación de fetos no viables (mortinatos y momificados) al momento del parto. La madre generalmente, no presenta signos clínicos o son imperceptibles (Madson y Opriessnig, 2011).

2.6.3.4. Patogenie

La patogenie del CVP-2 no está bien esclarecida. El virus ingresa por vía oronasal (Bermeo, 2012). Llega a infectar a células de la línea monocito/macrófago y células dendríticas de los órganos linfoides, además de hígado, riñón y pulmón (Quesada, 2015). El virus se disemina gracias a la movilización de las células infectadas, causando depleción linfoide. Estudios sugieren que el virus puede estar en sangre durante al menos, 10 semanas (Quesada, 2015). Se ha detectado al virus en lechones neonatos de cerdas con problemas reproductivos, lo que sugiere que hay una transmisión vertical viral (Allan y Ellis, 2000; Park *et al.,* 2005). El CVP-2 puede atravesar la placenta asociado a células o como virus libre (Madson y Opriessnig, 2011).

También se ha detectado en semen de verracos (Larochelle *et al*., 2000). El virus seroconvierte entre los 14 a 28 días post infección (PI) y es detectadas entre las 7 y 12 semanas hasta las 28 semanas (Aldunce, 2012).

2.6.3.5. Forma reproductiva

El CVP-2 causa problemas reproductivos en cerdas gestantes como retorno al estro, abortos, momificaciones, tamaño de camada reducido y nacidos débiles (Madson y Opriessnig, 2011; Bermeo, 2012). El CVP-2 se asocia con fallas reproductivas en cualquier momento de la gestación (Kim *et al*., 2004).

Los fetos muertos presentan lesiones como miocarditis y encefalitis. (Enriquez, 2009). Se ha logrado detectar replicación del CVP-2 en pulmón, corazón, riñones, bazo, hígado y linfonódulos de fetos que han sido inoculados de manera intrafetal, habiendo mayores lesiones en los que se inocularon en el día 57, antes de la inmunocompetencia fetal

(Pensaert *et al.,* 2004). De igual manera, se ha logrado detectar al virus en fetos de cerdas que fueron inoculadas intranasalmente. La infección experimental intrauterina a fetos con CVP-2 ha concluido en replicación viral en los fetos y respalda al corazón como el órgano principal de replicación viral fetal (Sanchez *et al.,* 2001; Pensaert *et al.,* 2004). Se ha demostrado infección fetal a través de inseminación artificial con semen infectado con CVP-2 (Segales, 2005).

2.6.3.6. Diagnóstico y prevención

Se puede sospechar de CVP-2 cuando, en la piara, hay signos clínicos de fallas reproductivas como un aumento en el número de lechones no viables en el parto o abortos y presencia de lesiones cardiacas y concentraciones de CVP-2 en corazón fetal y otros tejidos fetales (Segales *et al.,* 2005).

El diagnòstico indirecto de CVP-2 se realiza mediante técnicas serológicas como ELISA, Inmunofluorescencia directa e Inmunoperoxidasa (Bermeo *et al.,* 2012).

Para la detección directa, se pueden utilizar la hibridación in situ e Inmunohistoquimica (Bermeo *et al.,* 2012). El aislamiento viral se realiza en células PK-15. No se produce efecto citopático, por lo que se debe de realizar una tinción inmunofluorescente o inmunoperoxidasa. El aislamiento viral es más difícil y menos sensible que la detección de antígenos ADN (Opriessnig *et al.,* 2007).

Se puede demostrar el ADN del CVP-2 en tejidos afectados, heces, semen y tejidos fetales mediante PCR. Se debe incluir al miocardio fetal en esta técnica (Madson y Opriessnig, 2011; Bermeo *et al.,* 2012).

No hay tratamientos específicos para esta enfermedad, por lo que la prevención cobra alta relevancia para controlarla. Se debe de diagnosticar rápidamente y remover prontamente a los animales enfermos de las granjas para controlar las pérdidas debidas al CVP-2 (Noriega *et al.,* 2007).

Se usan vacunas comerciales en los reproductores (Noriega *et al.,* 2007). La vacunación se realiza en las hembras de pie de cría para aumentar sus niveles de inmunidad específica

contra CVP-2, gracias a los anticuerpos neutralizantes y células inmunes específicas que pueden ser transferidas a los lechones (Arriaga, 2014).

2.6.4. Virus de Influenza A (vIA)

El Virus influenza A es causante de la influenza porcina. Los signos clínicos de gripe se reconocieron en los cerdos durante la pandemia de la gripe española en 1918. El virus se aisló e identificó en los cerdos en el año 1930 (Detmer, 2016).

2.6.4.1. Estructura del virus

El virus Influenza A pertenece al orden *Articulavirales,* familia *Orthomyxoviridae,* género *Alfainfluenzavirus.* Recientemente, ha sido renombrado como especie *Alfainfluenzavirus influenzae* (ICTV, 2021).

Es un virus de forma esférica, de 80 a 120 nm, con envoltura. Presenta genoma ARN, de cadena simple y polaridad negativa (Marroquin, 2012; Piñeyro, 2012). Presenta dos glicoproteínas transmembranales: Hemaglutininas (H) y Neuroaminidasas (N). La Hemaglutinina es la encargada de unir al virus a los receptores de la célula huésped y provoca aglutinación de eritrocitos. La Neuroaminidasa participa en la liberación del virus desde las células infectadas, mediante la separación del ácido siálico de los residuos hidrocarbonados de las glicoproteínas y de los glicolípidos de la célula hospedadora, lo que permite su liberación y facilita la diseminación viral. Se han identificado 16 Hemaglutininas (H1 a H16) y 9 Neuroaminidasas (N1 a N9) hasta la actualidad (Chavez, 2005; Piñeyro, 2012; Zimmerman *et al.,* 2019). Los subtipos de Influenza A que circulan de manera enzootica en los cerdos son el H1N1, H1N2 y H3N2 (Lewis *et al.*, 2016).

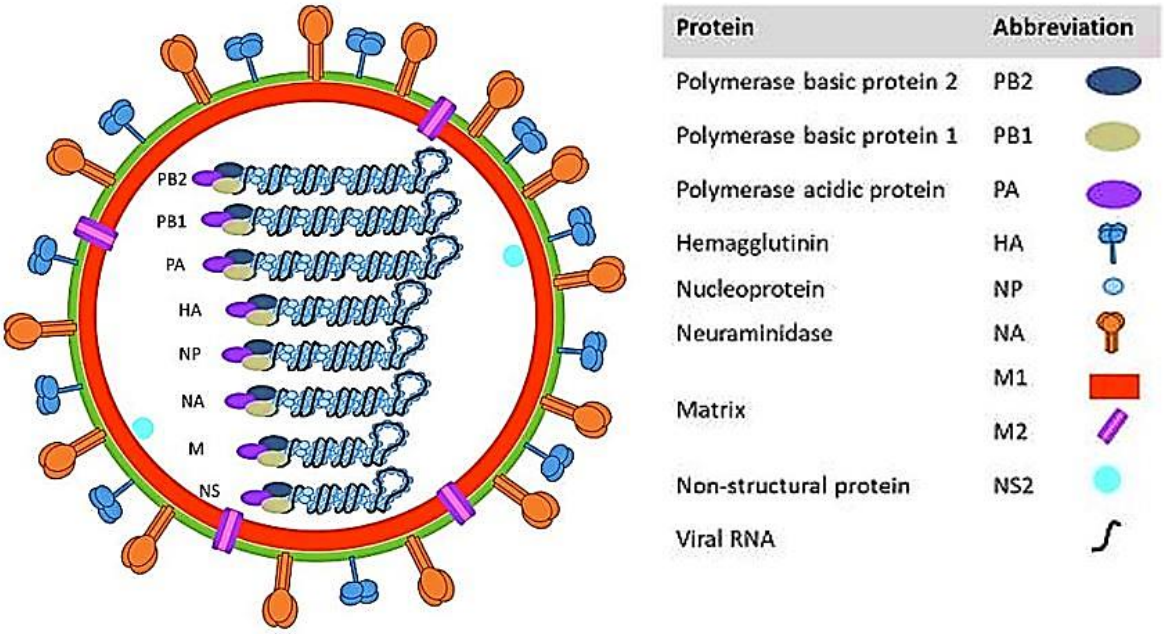


Figura 6. Estructura del virión de Influenza A (Mancera *et al.,* 2020)

2.6.4.2. Transmisión

El virus se transmite por vía aerógena, por el contacto directo entre cerdos infectados y sanos. El virus es eliminado por las secreciones nasales, diseminándose por gotas y aerosoles (Romagosa *et al.*, 2011).

El virus ha sido aislado en los humanos, cerdos, aves, focas y ballenas. La vIA presenta la capacidad de transmitirse entre especies, ocasionando mutación viral (Piñeyro, 2012).

La recombinación del subtipo aviar (H1N1) y humano (H3N2) se da en los cerdos, esta es la única especie que puede ser infectada por ambos subtipos (Chavez, 2005), teniendo un rol importante en la epidemiología de la enfermedad, ya que cuenta con receptores para ambos virus, dando origen a nuevos subtipos que complican el control de la enfermedad (Sanchez *et al.*, 2010).

2.6.4.3. Signos clínicos

Los cerdos afectados pueden presentar fiebre, inactividad, postración, secreción nasal, anorexia, tos, respiración abdominal, letargia, conjuntivitis, tos, estornudos, descargas

nasales, retardo en el crecimiento, fiebre, pérdida de peso (Marroquin, 2012; Piñeyro, 2012; Zimmerman *et al.,* 2019).

La influenza porcina es una enfermedad con alta morbilidad y baja mortalidad. El virus puede estar en circulación en la granja sin evidenciar signos clínicos (Corzo *et al.*, 2013). La enfermedad clínica más grave y mortalidad por esta enfermedad se debe a infecciones bacterias secundarias o coinfecciones, por ejemplo, con el *Haemophilus parasuis*, el Virus del Sìndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (vPRRS) (Detmer, 2016).

2.6.4.4. Patogenie

El virus ingresa por vía oronasal y pasa al tracto respiratorio, replicando en la mucosa nasal, tráquea, linfonódulos bronquiales y pulmonares. El periodo de incubación es de 1 a 3 días. Se producen citosinas (Interleucina I y Factor de Necrosis Tumoral) que contribuyen a los cambios inflamatorios en el pulmón. El virus es eliminado de 7 a 10 días post infección (Chavez, 2005; Manceras *et al.,* 2020).

2.6.4.5. Forma reproductiva

En cerdas gestantes, puede haber abortos tardíos debido al pico febril o por infecciones bacterianas secundarias (Janke, 2000). A la influenza se le considera una enfermedad reproductiva secundaria (Piñeyro, 2012). Se ha observado, también, nacidos muertos y lechones nacidos débiles (Morin *et al.*, 1990).

Luego de infectar con vIA cerdas gestantes en su primera semana de gestación, solo el 23% de estas logró parir; y el 5,5 % las cerdas con 45 días de preñez llegaron a abortar (Madec *et al*., 1989).

Esta enfermedad puede causar un significativo impacto económico debido al fracaso reproductivo en las cerdas debido a la fiebre y la pérdida de peso en los lechones (Manceras *et al*., 2020).

2.6.4.6. Diagnóstico y prevención

El virus se puede aislar en exudado nasal y faríngeo por medio de su inoculación en embriones de pollo de 9-11 días de edad o en líneas celulares como riñón de canino

(MDCK), células de riñón de cerdo (PK), testículo de cerdo y células epiteliales de pulmón de cerdo (Chavez, 2005; Sanchez *et al.,* 2010; Piñeyro, 2012). Se debe de muestrear a cerdos en la fase aguda de la infección, cuando manifiesten fiebre y secreción nasal serosa no purulenta. El aislamiento viral es la prueba "gold estándar" para el diagnóstico de este virus y tiene una duración de 1 a 2 semanas (Piñeyro, 2012). El efecto citopático que se evidencia es el redondeamiento de la célula (Sanchez *et al.,* 2010).

El RT-PCR se usa para determinar las secuencias específicas de los subtipos H1N1, H1N2 y H3N2. También se utilizan técnicas como la Inmunohistoquímica, Inmunofluorescenia, Inmunocromatografía y ELISA. Los subtipos de hemaglutininas y neuroaminidasas son determinados por Inhibición de la Hemaglutinación (IH) y la Inhibición de la Neuroaminidasa, respectivamente (Chávez, 2005).

Para la prevención, existen vacunas inactivadas y vacunas vivas atenuadas contra el Virus de la Influenza para cerdos. Las vacunas inactivadas se utilizan en cerdas gestantes y también se aplican a sus crías en periodo de lactancia y en cerdos en crecimiento. Este tipo de vacunas inducen anticuerpos neutralizantes que se dirigen a la HA viral (Dotmizer *et al.*, 2010; Van *et al.,* 2016). Algunas son monovalentes (H1N1), bivalentes (contienen los subtipos H1N1 y H3N2) y otros solo contiene uno de estos (Chavez, 2005). Las vacunas vivas atenuadas se administran mediante la vía intranasal, activa las respuestas de la mucosa y la respuesta sistemica (Mancera *et al.,* 2020).

2.6.5. Virus de Aujeszky (vEA)

El Virus de Aujeszky (vEA) causa la Enfermedad de Aujeszky, también llamada Pseudorabia porcina. El virus causa signos clínicos, nerviosos, respiratorios y reproductivos en los cerdos y, en menor medida, felino, bovino, canino, equino (Castillo, 2014). Tiene importancia económica ya que se le considera una enfermedad restrictiva para el comercio internacional (Castillo *et al.,* 2016).

2.6.5.1. Estructura del virus

El Virus de Aujeszky (vEA) pertenece al orden *Herpesvirales*, familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, género *Varicelovirus*, denominado especie *Suid alfaherpesvirus 1*(ICTV, 2019). Es un virus ADN de doble hebra de 150kb, aproximadamente (Mettenleiter, 2000). Es redondo, puede medir entre 150 a 180 nm, presenta cápside icosaédrica y envoltura (MacLachlan y Dubovi, 2011; Pomeranz *et al*., 2005).

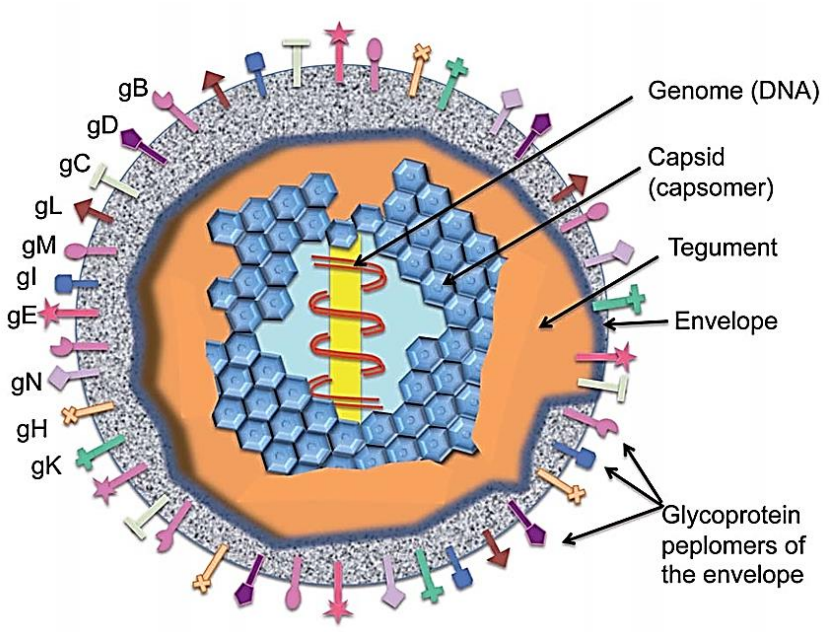


Figura 7. Estructura del virus Aujeszky (Papageorgiou *et al.*, 2011).

2.6.5.2. Transmisión

Se transmite, principalmente, por vía aerógena, mediante aerosoles. También puede haber transmisión uterina (de la madre al feto), genital (mediante inseminación artificial con semen infectado), a través de fómites como recipientes vehículos, etc.; y, a través de otros animales como perros, gatos, aves, etc, quienes pueden transportarlo en las patas, piel y plumas (Fajardo, 2016).

El virus puede ser excretado, en grandes cantidades, en secreciones nasales y saliva, y en menor cantidad, en leche, orina, semen y heces (Maes *et al.,* 2008; Rojas, 2018).

2.6.5.3. Signos clínicos

La enfermedad se manifiesta en 3 formas clínicas: la forma nerviosa, respiratoria y reproductiva.

La forma nerviosa se da en lechones hasta la tercera semana de edad, aproximadamente. Se dan temblores, ataxia, incoordinación, nistagmo, convulsiones, sialorrea, opistótono, fiebre, respuesta disminuida a estímulos, parálisis de miembros posteriores llegando a arrastrarse, algunos caminan en círculos; además de, depresión, fiebre y anorexia (Papageorgiou *et al.,* 2011; Castillo, 2014; Rojas, 2018). El cerdo puede morir dentro de las 24 a 36 horas posteriores a la presentación de signos neurológicos (Boadella *et al.*, 2012). Puede alcanzar tasas de mortalidad del 100% en cerdos menores de 2 semanas de edad (Fajardo, 2016; OIE, 2018).

La forma respiratoria se da, generalmente, en cerdos mayores de 2 meses. Se caracteriza por fiebre, estornudos, secreción nasal, respiración dificultosa, conjuntivitis, anorexia. Puede predisponer a infecciones bacterianas secundarias causando neumonía (Iglesias, 1987: Pesjak y Truszczynski, 2006). Puede alcanzar una morbilidad del 100% (OIE, 2018).

La morbilidad y mortalidad disminuye con la edad del animal, mientras más grandes se infecten, mayor es la probabilidad de supervivencia (Zuckerman, 2000).

La forma reproductiva se detalla en el apartado 2.6.5.5.

2.6.5.4. Patogenie

El virus ingresa al organismo por vía oronasal. El epitelio de las vías respiratorias superiores (epitelio nasal, faríngeo y amigdalino) es el sitio primario de replicación viral (Papageorgiou *et al.,* 2011). El virus se dirige al Sistema nervioso central (SNC) por el nervio olfatorio o nervio trigémino, donde se da la segunda replicación, causando signos nerviosos debido a una meningoencefalitis no supurativa (Iglesias, 1987; Papageorgiou *et al.,* 2011).)

El vEA puede replicar en mucosa nasal y faríngea, e infectar la tráquea, bronquios y alveolos pulmonares (Castillo, 2014).

El virus viaja a través de la sangre y linfa a órganos internos como los pulmones, causando neumonía (Fajardo, 2016) y también llega a los órganos reproductivos. El virus es capaz de atravesar la barrera transplacentaria en infectar a embriones o fetos, generando fallas reproductivas como reabsorción embrionaria, abortos o momificaciones dependiendo de estadío de gestación (Nauwynck *et al.*, 2007).

2.6.5.5. Forma reproductiva

El vEA puede causar problemas reproductivos (Kluge y Mare, 1974; Nauwynck H. 1993, Laval *et al.*, 2018).

El virus puede atravesar la placenta porcina e infectar a embriones y fetos (OIE, 2018), produciendo absorción embrionaria y retorno al estro si esto sucede en el primer tercio de gestación (Nauwynck y Pensaert,1992, Fajardo, 2016; Papageorgiou *et al.*, 2011); por el contrario, se dan abortos, momificaciones, nacidos muertos o débiles, si la infección ocurre en el segundo tercio de gestación (Castillo, 2014; Morilla, 1996). Si la infección se da en el último tercio de gestación, puede haber abortos, en menor medida (Iglesias, 1987).

En los verracos, se puede dar orquitis y disminución de la calidad del semen. Se puede detectar el virus en el semen (OIE, 2018; Papageorgiou *et al.*, 2011).

2.6.5.6. Diagnóstico y prevención

El diagnostico de laboratorio se realiza de manera directa mediante el asilamiento viral, detección de antígeno viral mediante el uso de pruebas inmunohistoquímicas como la Inmunoperoxidasa (IP) o la Inmunofluorescencia (IF) o detección molecular del ácido nucleico (PCR) e indirectamente a través de la detección serológica de anticuerpos como ELISA, aglutinación en látex y neutralización viral (Castillo, 2014; OIE, 2018).

Para el aislamiento viral, se utilizan hisopados buco-faríngeos o tejido pulmonar, amígdalas y encéfalo. La inoculación se realiza en células de Cornete nasal bovino (CNB) (Iglesias, 1987; OIE, 2018).

En nuestro país, no se vacuna contra vEA (Castillo, 2014). Para prevenir esta enfermedad, se debe de evitar el ingreso de cerdos infectados a la granja. De comprobarse la presencia del virus, se tiene que erradicar a estos animales infectados (Morilla, 1996).

2.6.6. Virus de la Peste Porcina Clásica (vPPC)

El Virus de la Peste Porcina clásica es el causante de la Peste porcina clásica, también cono conocida como cólera porcino o fiebre porcina clásica (Noboa *et al*., 2019). La Peste Porcina Clásica es una enfermedad multisistémica con altas tasas de morbilidad y mortalidad, que afecta a cerdos a nivel munidas, y es considerada de notificación obligatoria por la OIE por ser muy contagiosa y de impacto económico severo en los sistemas de producción (Genghini *et al.,* 2005; Portilla, 2006; Perez y Días de Arce, 2008).

2.6.6.1. Estructura del virus

El Virus de la Peste Porcina Clásica (vPPC) pertenece al orden *Amarillovirales*, familia *Flaviviridae*, género *Pestivirus*, especie *Pestivirus C*, como ha sido renombrado hace unos años (ICTV, 2019).

El genoma del vPPC es ARN de cadena simple, polaridad positiva, pesa 12.3 kb, aproximadamente, y está compuesto por dos regiones no traducidas (UTR) (5'NCR y 3'NCR) y un único Marco de Lectura Abierto (ORF) que codifica una poliproteína en 4 estructuras (glicoproteína E de la envoltura, E1 y E2, y proteína C de la cápside) y 8 proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A Y NS5B) (Arainga *et al*., 2010; Chiok *et al.*, 2011; Ganges *et al.*, 2020; Rodriguez, 2012).

2.6.6.2. Transmisión

La transmisión se da por contacto directo entre animales infectados y susceptibles, por vía oronasal. También, se menciona la transmisión iatrogénica por el uso de instrumentos o agujas contaminadas y a través de lesiones cutáneas. El virus se excreta por saliva, secreciones nasales, secreciones oculares y orina (Genghini *et al*., 2005; Rodriguez, 2012; Ganges *et al.*, 2020).

Se ha descrito la transmisión venérea a través del contacto de la cerda con el macho infectado y la vía transparentaría que podría producir infección al feto en desarrollo, dando lugar a animales persistentemente infectados, que pueden excretar el virus sin sinología clínica, suponiendo una fuente de contagio importante (Moenning *et al.,* 2003; Genghini *et al*., 2005). En menor medida, se describe la trasmisión por vectores biológicos como tábanos y moscas, a través de picaduras (Genghini *et al*., 2005). El movimiento de cerdos no controlado es la manera de diseminación más común del virus (Rodriguez, 2012).

Los únicos huéspedes naturales del virus son el cerdo doméstico y el jabalí, miembros de la familia *Suidae* (Genghini *et al*., 2005).

2.6.6.3. Signos clínicos

La enfermedad causada por este virus genera signos clínicos como fiebre y hemorragias múltiples que incluyen petequias en la piel, mucosas y cianosis en hocico, orejas, abdomen y cara medial de las extremidades, aunque también puede ocasionar un cuadro inaparente, hasta la muerte. La forma aguda de esta enfermedad cursa con fiebre, letargo, conjuntivitis, signos respiratorios, linfadenopatía, constipación y diarreas severas ("cólera"); además, se reporta signos neurológicos como alteración locomotora, paresia posterior y postración en fases terminales. La forma crónica se presenta cuando los cerdos no cuentan con una respuesta inmune efectiva contra el virus, resultando fatal (Ganges *et al.,* 2020; Tarradas, *et al*., 2010). La letalidad puede llegar al 100% y ocurrir la muerte entre los 20 días post infección (Moenning *et al.,* 2003). En cerdas gestantes, se puede producir abortos, fetos momificados y malformaciones (Rodriguez, 2012).

2.6.6.4. Patogenie

El virus ingresa mediante contacto directo por vía oronasal. Llega a las tonsilas donde se da la replicación viral (Genghini *et al*., 2005). Luego de replicarse en las tonsilas, pasa a través de la vía linfática y llega a los ganglios linfáticos regionales. Posteriormente, pasa a sangre periférica, iniciándose la viremia y la diseminación del virus (Perez y Días de Arce, 2008). Esto se da 14 a 24 horas post infección (Rodriguez, 2012). Ocurre una nueva multiplicación viral en la medula ósea, bazo, ganglios linfáticos, riñón, pulmón y medula ósea Por vía sanguínea, llega al útero y es capaz de atravesar la placenta e infectar al feto

(Perez y Días de Arce, 2008; Ganges *et al.*, 2020; Acosta, 2021). El virus tiene una afinidad particular por las células endoteliales y el sistema de fagocitos mononucleares; es decir, macrófagos y células dendríticas (DC) (Carrasco *et al.*, 2004). El virus se multiplica en la medula ósea, bazo y otros ganglios linfáticos. La incubación dura 2 a 14 días (Rodriguez, 2012).

2.6.6.5. Forma reproductiva

El virus se ha asociado a fallas reproductivas dependiendo de la etapa de infección viral (Terpstra, 1991; Choi y Chae, 2003). Si la infección se da en el primer tercio de gestación, puede ocasionar reabsorción embrionaria, abortos, momificaciones y malformaciones congénitas) (Van Oirschot y Terpstra, 1977; Moenning *et al.*, 2003). Si la infección se da entre los días 50 a 70 de gestación, pueden ocurrir nacimiento de lechones persistentemente infectados, que suelen ser clínicamente normales y vivir por meses o padecer emaciación y temblores congénitos. Además, pueden eliminar el virus, manteniéndolo en la granja convirtiéndose en fuentes de diseminación de la enfermedad, manteniendo la infección dentro de la población porcina en la granja (Van Oirschot y Terpstra, 1977; Moenning *et al.*, 2003).

2.6.6.6. Diagnóstico y prevención

El diagnostico se basa en los antecedentes y signos clínicos, debiéndose confirmar con pruebas de laboratorio (Rocano, 2015).

El aislamiento viral se realiza en células de riñón de cerdo (PK15 y SK6). El virus no produce efecto citopáticos, por lo que se debe de visualizar con tinciones de inmunofluoresencia o inmunoperoxidasa. Tarda 3 a 10 días en brindar resultados definitivos, por lo que es larga y laboriosa (Acosta, 2021; Ganges *et al.*, 2020).

Las técnicas serológicas se usan 2-3 semanas posteriores a la infección, los más usados son la ELISA y la Virus neutralización. El ELISA detecta la glicoproteína E viral, se puede utilizar a nivel de población o granja, pero no es adecuado para detecciones individuales. Si se obtienen resultados Ps con esta técnica se debe de confirmar por aislamiento viral o RT-PCR (Ganges *et al.*, 2020). La técnica de Virus neutralización es considerada la técnica

“Gold estándar”; sin embargo, no se pueden procesar muchas muestras al mismo tiempo, es laboriosa y demora mucho tiempo (Rodriguez, 2012), además, no es capaz de diferenciar anticuerpos vacúnales de anticuerpos de campo (Chiok *et al.,* 2011).

La Inmunofluorescenia directa tiene la ventaja de ser rápida (2 a 3 horas), se utiliza tejidos tonsilares, esplénicos, y renales. Sin embargo, no se pueden procesar un gran número de muestras y tampoco es capaz de diferenciar anticuerpos vacúnales de los de campo (Portilla *et al.,*2009; Rocano, 2015).

EL RT-PCR es un método más sensible y ràpido para la detección que el aislamiento viral (Rodriguez, 2012). Permite la diferenciación certera entre los miembros del género *Pestivirus* y el virus de la Peste Porcina Africana de manera inequívoca y rápida (Chiok *et al.,* 2011). Es una técnica rápida, practica y eficaz para la detección viral de vPPC (Portilla, 2006).

Para la detección de antígeno viral, aislamiento viral y detección viral de ARN se utilizan muestras de fluidos corporales, bazo, ganglios linfáticos, riñón, pulmón, intestino e hisopado nasal (Petrov *et al.,* 2014).

Una de las medidas de prevención es el uso de vacunas a base de virus vivo modificado. Estas vacunas logran inducir una buena respuesta humoral y celular, como ha ocurrido en EEUU, Canadá y Australia, en donde se logró erradicar la enfermedad mediante la vacunación sistemática en piaras (Portilla, 2006). La vacunación ha sido prohibida en los países de la Unión Europea, ya que no se puede diferenciar entre anticuerpos vacunales de los anticuerpos de campo mediante pruebas serológicas (Chiok *et al.,* 2011). La Unión Europea recomienda el sacrificio sanitario de los animales infectados (Ferrer *et al*., 2010).

En América, una causa que mantiene la circulación del virus e influye en la propagación de la enfermedad es la contaminación transversa (de madre a hijo) (Ferrer *et al.,* 2010). Los lechones que logran sobrevivir pueden excretar el virus permanentemente sin signos clínicos ni desarrollo de respuesta de anticuerpos (Rodriguez, 2012).

Se debe de controlar el movimiento de animales, ya que, la introducción de animales nuevos en una granja puede desencadenar la enfermedad, si estos son portadores asintomáticos o están en el periodo de incubación viral (Ferrer *et al.,* 2010).

2.7. Situación de los virus causantes de abortos en el Perú

Un estudio realizado por Quevedo *et al*. en el 2018, donde se evaluó serológicamente al vPRRS en 23 de los 24 departamentos del país, en granjas porcinas no tecnificadas, reveló que el 17.3% de la población de cerdos presentaron anticuerpos contra el VPRRS. En el país, no está permitido el uso de vacunas contra el vPRRS.

El vPPC fue reportado por primera vez en nuestro país, en el año 1948, cerca de la frontera con Bolivia. La forma aguda se presenta, mayoritariamente en la crianza porcina no tecnificada, mientras que la forma subclínica, se da en crianza tecnificada (Portilla, 2006). En la actualidad, se utilizan vacunas contra esta enfermedad a manera de prevención (Arainga *et al*., 2010). Portilla (2006) detectó la presencia de anticuerpos maternales en lechones de granjas porcinas tecnificadas del departamento de Lima, en las que las cerdas fueron vacunadas contra este virus.

En nuestro país, se han realizado estudios de seroprevalencia del Virus de Aujeszky. En el año 1998, Manchego *et al*., tomaron muestras de suero de marranas de granjas del departamento de lima, ganaderías de la sierra y de la selva. Obtuvieron seroprevalencia total de 10%. Se realizó otro estudio de seroprevalencia en el año 2016, donde se utilizaron muestras de sangre de cerdos en centros de beneficio de Lima, procedentes de granjas semitecnificadas de 13 distritos de dicha provincia. Todas las muestras resultaron negativas a anticuerpos neutralizantes (*Castillo et al.,* 2016).

En el país, están autorizadas las vacunas contra CVP-2, PVP y vPPC como medio de prevención y control de estas enfermedades. Es más, existe un plan de control y erradicación de enfermedades porcinas establecido por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) que contempla acciones para prevenir, controlar y erradicar enfermedades virales de gran impacto como son las producidas por el vPRRS, vPPC y vEA (MIDAGRI, 2011).

Solo se ha realizado un estudio de prevalencia de CPV-2 en el país, en lechones de recría de crianza no tecnificada. Obteniéndose una prevalencia de 40%. Sin embargo, no se han hecho estudios en crianza tecnificada (Santiago, 2020).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño del estudio

El estudio se realizó en tres etapas; **la primera**, contempla la recepción o colección de fetos abortados de granjas porcinas tecnificadas ubicadas en Lima y Amazonas durante los años 2020 y 2021. Los fetos fueron enviados por los Médicos Veterinarios responsables de cada granja a la Sección de Virología (SV) del laboratorio de Microbiología y Parasitología (LMP) de la FMV-UNMSM, ya que, el acceso era restringido por la coyuntura sanitaria del SARS-CoV2. En el Laboratorio, se tomaron muestras de corazón, bazo y pulmones por feto abortado. **La segunda**, comprende la extracción de ácidos nucleicos (ARN y ADN) y las corridas de RT-PCR y PCR para la identificación de virus relacionados a abortos como el virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (vPRRS), virus de la Peste Porcina Clásica (vPPC), virus de Influenza A (vIA), virus de Circovirus Porcino (CVP-2), virus de la enfermedad de Aujeszky (vEA) y Parvovirus porcino (PVP). Finalmente, **la tercera** etapa comprende el análisis de los resultados expresados en porcentajes.

3.2. Lugar de ejecución y periodo de duración

El presente estudio se desarrolló en el ambiente de la Unidad de diagnóstico molecular de la SV del LMP de la FMV-UNMSM. Asimismo, los fetos porcinos fueron enviados a la SV en una caja de tecnopor con geles refrigerantes el mismo día o al día siguiente de ocurrido el aborto. La colección y procesamiento de las muestras se llevaron a cabo durante el 2020-2021.

3.3. Descripción del material experimental

3.3.1. Muestras de fetos porcinos

Se trabajaron todas las muestras de fetos abortados que llegaron a la SV como parte del servicio de diagnóstico, así como, los fetos que fueron enviados previa coordinación con médicos veterinarios de campo para el desarrollo del presente estudio (Fig. 8A). Los fetos fueron enviados en cajas de tecnopor con geles refrigerantes para mantener la cadena de frio. Se trabajaron 2 fetos porcinos como máximo por marrana y con cuatro marranas, como máximo, por granja.

Los fetos abortados fueron enviados a la SV del LMP de la FMV-UNMSM el mismo día de ocurrido el aborto, al día siguiente o transcurrido 4 días como máximo (este tiempo fue solo para los fetos que provenían de Amazonas). Todos los abortos ocurrieron en el último tercio de la gestación a excepción de uno 3 (74, 60 y 75) que ocurrió en el segundo tercio, este aborto perteneció a la granja L2. Todas las marranas mostraron inapetencia y sólo las marranas de la granja L4, adicionalmente, mostraron fiebre cercana a 40°C.

3.3.2. Toma de muestra:

Se realizó la apertura de los fetos remitidos según protocolo de necropsia (Andrews *et al.*, 1986) con ayuda de un bisturí, tijera plana, pinza diente de ratón y placas Petri. Todo el material quirúrgico fue previamente esterilizado. Luego de aperturar la cavidad torácica y abdominal, se extrajeron la totalidad del corazón (C), pulmón (P) y bazo (B) por feto que fueron colocados en una placa Petri estéril de vidrio, previamente rotulada con el número de arete de la marrana y con números arábigos (1, 2 y/o 3) en caso se trabaje con varios fetos por marrana (Fig 8B).

Las muestras por feto de una misma marrana fueron agrupadas por P (pulmones), C (Corazón) y B (Bazo) para ser procesadas a manera de pool. Es decir, se realizó una mezcla de pulmones (pool de pulmones), corazón (pool de corazones) y bazo (pool de bazos) de fetos procedentes de la misma marrana. El procesamiento de las muestras esta explicado en el 3.3.3.

Toda la información como procedencia, número de fetos abortados por marrana, días de gestación en la que se produjo el aborto fue anotado en una base de datos en Excel (Cuadro 14).

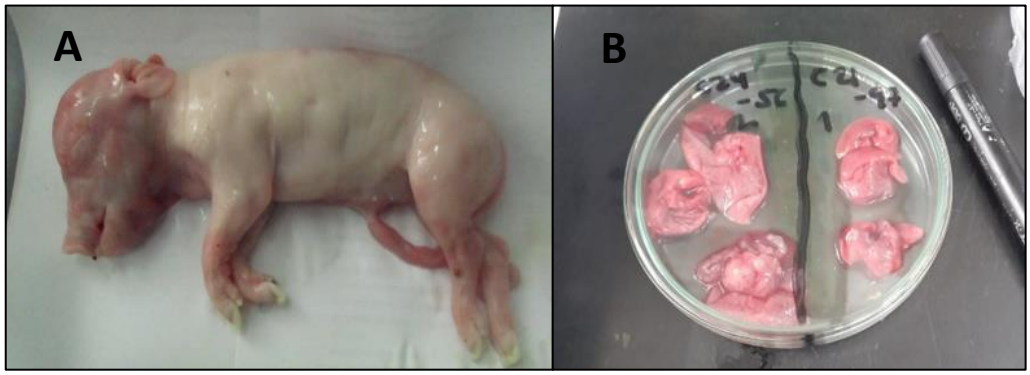


Figura 8: Fetos abortados remitidos a la Sección de virología del LMP.
A. Feto abortado. **B.** Órganos extraídos de dos fetos de una sola marrana.

3.3.3. Extracción de ácidos nucleicos:

El procesamiento de las muestras para la extracción de ácidos nucleicos fue realizado en una cabina de bioseguridad de tipo II el mismo día de recepcionadas los fetos (Fig. 9). Para esto se utilizó 1g de tejido (pool de muestras) y 9 ml de medio de cultivo celular (Medio esencial mínimo, MEM) que fue homogenizado de forma mecánica con ayuda de un mortero y de un pilón (9A). Posteriormente, el machacado fue centrifugado a 112g por 10 minutos y el sobrenadante fue tamizado mediante filtros de jeringa de 0.45µm y alicuotados en 3 viales de 1.8 ml por muestra (Foto 9B y 9C). Todos los viales fueron almacenados a -80°C hasta la extracción de ácidos nucleicos que fue realizada con un sólo protocolo para virus ARN (vPRRS, vPPC y vIA) y otro protocolo para virus ADN (CVP-2, vEA y PVP).

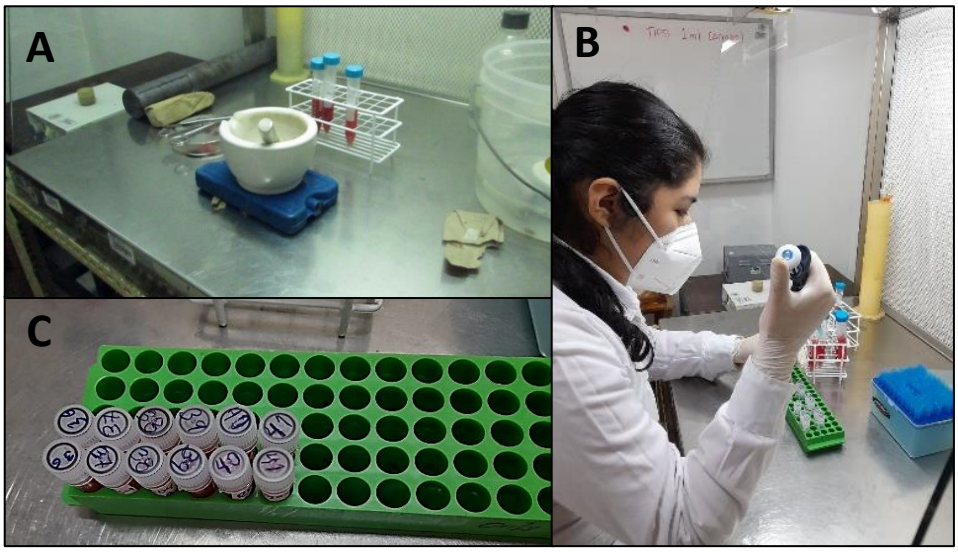


Figura 9. Procesamiento de las muestras para extracción de ácidos nucleicos. A: Machacado de las muestras por cada pool de tejidos. B: Colección de Sobrenadante en viales. C: Viales listos para ser congelados

3.3.3.1. Extracción de ARN total

Para la extracción del ARN total, se utilizó el kit comercial TOTAL RNA PURIFICATION KITS (NORGEN, Canadá), según las instrucciones del fabricante (*Ver Anexo 1*).

3.3.3.2. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN, se utilizó el kit comercial, E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit (Omega, Bio-Tek, USA), según las instrucciones del fabricante (*Ver Anexo 2*).

Los acidos nucleicos obtenidos en ambos casos fueron alicuotados y conservados a -80 °C hasta su procesamiento para la RT-PCR o la PCR, según sea el caso.

3.3.4. PCR y RT-PCR

3.3.4.1. RT-PCR en tiempo real para la detección del vPRRS

Para la detección del ARN del vPRRS, se utilizaron cebadores que reconocen nucleótidos del gen ORF7 que codifica la proteína conservada del virus, la nucleoproteína (N). Las secuencias de los cebadores se describen en el cuadro 1 (Martínez *et al.*, 2008).

Cuadro 1. Cebadores utilizados para la RT-PCR en tiempo real para la detección del vPRRS

Primer	Secuencia (5' a 3')
Forward	CCA GCC AGT CAA TCA RCT GTG
Reverse	GCG AAT CAG GCG CAC WGT

Para la RT-PCR en tiempo real se utilizó el kit comercial GoTaq 1-Step qRT-PCR (Promega, USA) que utiliza Sybr Green I como fluoróforo intercalante.

Se realizó una mezcla conteniendo 10 µl de GoTaq®Green Master Mix 2X (Promega, USA) concentración final de 1X (contiene: GoTaq® DNA Polymerase suplementado en 2X Green GoTaq®Reaction Buffer, 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 400 µM dGTP, 400 µM dTTP y 3 mM $MgCl_2$), 0.4 µl de GoScript™ RT Mix for 1-Step RT-qPCR (50X), 1 µl de cebadores Foward y Reverse cada uno (concentración final de 0.5µM), 7.6 µl de agua libre de nucleasas y 5 µl del extraído de ARN de la muestra. Obteniendo un volumen total de 25 µl. Finalmente, la lectura se realizó en el termociclador qTower 2.2 (Analytic gena) de tiempo real con ayuda del software qPCR Software 3.1 (Cuadro 2). Se utilizó como control positivo el ADNc de la especie americana donada en el 2010 por la Dra. M. Arainga, Japòn (cepa vacunal JJ1882-Ingervac).

Para la interpretación de los resultados, una muestra será considerada positiva al vPPRS cuando presente un Tm entre 82.4-84.0 y un Ct menor a 30 (según protocolo de la SV/LMP-FMV-UNMSM).

Cuadro 2. Configuración del termociclador para la RT-PCR en tiempo real para la detección del vPRRS

Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclo
Transcripción reversa (RT)	50°C	30 minutos	1
Desnaturalización	95°C	15 minutos	1
Hibridación	94°C	1 minuto	40
Elongación	60°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	1 minuto	

3.3.4.2. RT-PCR en tiempo real para la detección del vPPC

Para la detección del ARN del virus de la PPC, se utilizó el GoTaq® 1-Step RT-qPCR, en tiempo real (Promega, USA), utilizando cebadores que identificaron al gen E2 conservado del vPPC, según lo reportado por Chiok *et al.*, 2011.

Las secuencias de los cebadores se describen en el cuadro 3 (Lozada de Gante *et al.*, 2003).

Cuadro 3. Cebadores utilizados para la RT-PCR en tiempo real para la detección del vPPC

Primer	Secuencia (5' a 3')
Forward	ATA TAT GCT CAA GGG CGA GT
Reverse	ACA GCA GTA GTA TCC ATT TC

Se realizó la mezcla conteniendo 10 µl de GoTaqR qPCR Master Mix 2X (concentración final de 1X), 0.4 µl de GoScript™ RT Mix for 1-Step RT-qPCR (50X) (concentración final de 1X), 1µl de cada cebador Foward y Reverse (concentración final de 500 nM de cada uno), 5.6 µl de agua libre de nucleasas y 2 µl del extraído de ARN de la muestra. El volumen total fue de 20 µl. Se utilizó como control positivo la cepa Alfort /187 y como control negativo, se incluyó 2 µl de agua libre de nucleasas en lugar de ARN extraído.

Las muestras fueron corridas en el termociclador qTower 2.2 (Analytic gena) de tiempo real con ayuda del software qPCR Software 3.1, siguiendo el protocolo descrito en el cuadro 4.

Para la interpretación de los resultados, se considerará como positiva al vPPC una muestra con resultados de Tm entre 80.8 – 83.4 y Ct menor a 30 (protocolo de la SV/LMP-FMV-UNMSM).

Cuadro 4. Configuración del termociclador para la RT-PCR en tiempo real para la detección del vPPC

Fase	Tempe	Tiempo	Ciclos
Transcripción reversa (RT)	95°C	15 minutos	1
Inactivación de la transcriptasa reversa y activación de la polimerasa	95°C	10 minutos	1
Desnaturalización	94°C	10 segundos	40
Alineamiento	54°C	30 segundos	
Elongación	72°C	30 segundos	
Extensiòn final	72°C	10 minutos	1

3.3.4.3. RT-PCR en tiempo real para la detección del vIA

Para la detección del ARN del vIA se utilizó el kit Real PCR influenza A RNA Test (IDEXX, Westbrook- USA), según instrucciones del fabricante. Este kit detecta el ARN del gen que codifica la proteína M (Matrix), altamente conservada del vIA. El kit contiene cebadores, sondas, controles internos, positivos y negativos para su uso en tiempo real.

El procedimiento se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante y esta consistió en una mezcla conteniendo 10 µl IAV RNA MIX (previamente reconstituido con 1 ml de agua libre de nucleasas incluida en el kit) y 10 µl de Master mix de RNA. Se homogeneizó con la pipeta varias veces y se mezcló en un vórtex para asegurar que los componentes se mezclen adecuadamente. A esta mezcla se adicionó 5 µl del ARN previamente extraído de cada muestra, obteniéndose 25 µl de volumen final. Además, se prepararon otras 2 mezclas, adicionando, a los 20 µl de la mezcla, 5 µl de control Positivo (cepa Alfort/187) y 5 µl de control Negativo (agua libre de nucleasas incluida en el kit), respectivamente.

Las muestras fueron corridas en un termociclador qTower 2.2 (Analytic gena) de tiempo real, siguiendo el protocolo descrito en el cuadro 5. La lectura se realizó con ayuda del software qPCR Software 3.1.

Para la interpretación de los resultados se considerará como positiva las muestras con Ct < 40 (Laboratorios IDEXX, US).

Cuadro 5. Configuración del termociclador para la RT-PCR en tiempo real para la detección de vIA

Fase	Temperatur	Tiempo	Ciclo
Transcripción reversa	50°C	15 minutos	1
Desnaturalización	95°C	1 minuto	1
Amplificación	95°C	15	45
	60°C	30	

3.3.4.4. PCR en tiempo real para la detección de CVP-2

Esta técnica se utilizó para la detección del ADN del CVP-2 mediante el kit comercial RealPCR™ PCV2/PCV3 multiplex DNA Mix (IDEXX, Westbrook- USA), según las instrucciones del fabricante.

Se realizó una mezcla de 20 µl conteniendo 10 µl ADN RealPCR PCV2/PCV3 Multiplex Mix (previamente reconstituido con 1 ml de agua libre de nucleasas incluida en el kit) y 10 µl de Master mix DNA. Se homogeneizó con la pipeta varias veces y se mezcló en un vórtex para asegurar que los componentes se mezclen adecuadamente. A esta mezcla se adicionó 5 µl del ADN previamente extraído de cada muestra, obteniéndose 25 µl de volumen final. Además, se prepararon otras 2 mezclas, adicionando, a los 20 µl de la mezcla, 5 µl de control Positivo y 5 µl de control Negativo (agua libre de nucleasas incluido en el kit).

Las muestras fueron corridas en un termociclador qTower 2.2 (Analytic gena) de tiempo real, siguiendo el protocolo descrito en el cuadro 6. La lectura se realizó con ayuda del software qPCR Software 3.1 (cuadro 6).

Para la interpretación de los resultados, se considerará como positivo al CVP2 la muestra que presente un Ct < 40, leído en el canal FAM (Laboratorios IDEXX, US).

Cuadro 6. Configuración del termociclador para la PCR en tiempo real para la detección de CVP-2

Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclo
Incubaciòn	50°C	15 minutos	1
Desnaturalización	95°C	1 minuto	1
Amplificación	95°C	15 segundos	45
	60°C	30 segundos	

3.3.4.5. PCR convencional para la detección de Parvovirus porcino (PVP)

Esta técnica se utilizó para la detección del gen que codifica la proteína conservada VP2 del virus de PVP. Se tomó como referencia lo publicado por Zheng *et al*. en el 2013 (Cuadro 7).

Cuadro 7. Cebadores utilizados para la PCR convencional para la detección de PVP (Zheng *et al.*, 2013)

Primer	Secuencia (5' a 3')
Forward	GGG CTT GGT TAG AAT CAC
Reverse	TGG TGG TGA GGT TGC TGA T

La mezcla de cada reacción tuvo un volumen final de 20 µl, incluyendo 2 µl de ADN extraído anteriormente (*Ver 3.1.3.3 Extracción de ADN)*, 12.5 µl de GoTaq G2 Hot Start Colorless Master Mix 2X (Promega, USA), 1 µl del primer Forward, 1 µl del primer Reverse y 3.5 µl de agua libre de nucleasas. Además, se utilizó como control positivo la cepa de PVP donada por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú (SENASA) con colaboración del Servicio de Inspección Sanitaria Animal y vegetal (*APHIS, por sus siglas en inglés* Animal and Plant Health Inspection service controls) que pertenece al Ministerio de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). Asimismo, como control negativo se utilizó 2 µl de agua libre de nucleasas en lugar de 2 µl de ADN extraído.

Las muestras fueron procesadas en un termociclador Blue-Ray (Biotech) Turbocycler 2 siguiendo el protocolo descrito en el cuadro 8.

Cuadro 8. Configuración del termociclador para la para la PCR convencional para la detección de PVP

Fase	Temperatur	Tiempo	Ciclo
Pre desnaturalización	95°C	3 minutos	1
Desnaturalización	95°C	15 segundos	40
Hibridación	55°C	1 minuto	
Elongación	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	5 minutos	1

El análisis se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa. Este gel fue preparado al 1.5% con TBE 0.5X (Tris 0.089 M; ácido bórico 0.0089M; EDTA 0.025 M, pH 8.3) y 5 µl de bromuro de etidio (0.5 µg/ µl). Se colocó 5 µl de cada producto de la PCR (amplicon) en el gel una vez catalizado. Posteriormente, se sometió a electroforesis a 100V por 2 horas con tampón TBE 0.5X. Finalizado este tiempo, los geles se visualizaron en un transiluminador con luz ultravioleta.

3.3.4.6. PCR convencional para la detección del virus de la enfermedad de Aujeszky (vEA)

Para la detección del virus de Aujeszky, se utilizó una PCR anidada. Primero, se realizó un PCR convencional para la detección de la familia *Herpesviridae* y, posteriormente, se realizó una segunda corrida de PCR para la detección del virus de Aujeszky.

Para el desarrollo de la PCR anidada se utilizaron los cebadores descritos por Vandevanter *et al.*, 1996 (Cuadro 9). Estos cebadores amplifican un producto de 334pb que corresponde al gen que codifica la gB de los Herpesvirus.

Cuadro 9. Cebadores utilizados en la PCR convencional para la detección de la Familia *Herperviridae*

Primer	Secuencia (5' a 3')
Forward	ATGGCCATCTCGCGGTGC
Reverse	ACT CGCGGTCCTCCAGCA

Se realizó una mezcla de 23 µl conteniendo 12.5 µl de GoTaq®Green Master Mix, 2X (Promega, USA) concentración final de 1X (contiene: GoTaq® DNA Polymerase suplementado en 2X Green GoTaq®Reaction Buffer, 400 µM dATP, 400 µM CATP, 400 µM dGTP, 400 µM dTTP y 3 mM MgCl2), 2 µl de cebadores Foward y Reverse cada uno (concentración final de 0.8 µM), 6,5 µl de agua libre de nucleasas y 2 µl del extraído de ADN de la muestra. Obteniendo un volumen total de 25 µl. Además, se prepararon otras 2 mezclas, adicionando, a los 23 µl de la mezcla, 2 µl de control positivo (Cepa Shop, SV) y 2 µl de control Negativo (agua libre de nucleasas), respectivamente.

Las muestras fueron procesadas en un termociclador Blue-Ray (Biotech) Turbocycler 2 siguiendo el protocolo descrito en el cuadro 10.

Cuadro 10. Configuración del termociclador para la PCR convencional para la detección de la *Familia Herpesviridae*

Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Pre desnaturalización	94°C	2 minutos	1
Desnaturalización	94°C	30 segundos	45
Hibridación	46°C	1 minuto	
Extensión	72°C	1 minuto	
Incubación	72°C	7 minutos	1
Mantenimiento	4°C	∞	

El análisis se realizó mediante electroforesis en el de agarosa. Este gel fue preparado al 1.5% con TBE 0.5X (descrito en el 3.3.4.5). Los geles se visualizaron en un transiluminador con luz ultravioleta.

Para la detección del virus de Aujeszky, se utilizaron los cebadores descritos por Yoon *et al*., 2005 (cuadro 11). Estos cebadores amplifican un producto de 195 pb de la gB del vEA.

Cuadro 11. Cebadores utilizados en la PCR convencional para la detección de vEA (Yoon *et al*., 2005)

Primer	Secuencia (5' a 3')
Forward	ACG GCA CGG GCG TGA TC
Reverse	GGT TCA GGG TCA CCC GC

Se realizó una mezcla de 23 µl conteniendo 12.5 µl de GoTaq®Green Master Mix, 2X (Promega, USA) concentración final de 1X (contiene: GoTaq® DNA Polymerase suplementado en 2X Green GoTaq®Reaction Buffer, 400 µM dATP, 400 µM CATP, 400 µM dGTP, 400 µM dTTP y 3 mM MgCl2), 2 µl de cebadores Foward y Reverse cada uno (concentración final de 0.8 µM), 6,5 µl de agua libre de nucleasas y 2 µl del extraído de ADN de la muestra. Obteniendo un volumen total de 25 µl. Además, se prepararon otras 2 mezclas, adicionando, a los 23 µl de la mezcla, 2 µl de control positivo Cepa Shop y 2 µl de control negativo (agua libre de nucleasas), respectivamente.

Las muestras fueron procesadas en un termociclador Blue-Ray (Biotech) Turbocycler 2 siguiendo el protocolo descrito en el cuadro 12.

Cuadro 12. Configuración del termociclador para la PCR convencional para la detección de vEA

Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Pre desnaturalización	94°C	5 minutos	1
Desnaturalización	94°C	20 segundos	40
Hibridación	62°C	30 segundos	
Elongación	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	7 minutos	1
Mantenimiento	4°C	∞	

El análisis se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa. Este gel fue preparado al 1.5% con TBE 0.5X (descrito en el 3.3.4.5). Los geles se visualizaron en un transiluminador con luz ultravioleta.

IV. RESULTADOS

4.1. Identificación de granjas porcinas

Se recepcionaron 21 fetos de 13 marranas que abortaron entre los 60 a 108 días de gestación, desde el 02 de septiembre del 2020 al 12 de octubre del 2021. Las muestras proceden de granjas porcinas tecnificadas de la región de Lima (L1, L2, L3 y L4) y de Amazonas (A). La cantidad de fetos enviados a la SV-LMP/ FMV-UNMSM proceden de la granja L1 (4), L2 (4), A (4), L3 (6) y L4 (3) (Cuadro 13).

Cuadro 13. Relación de fetos abortados por marrana y procedencia

Granja	***Procedencia*** **Región/ provincial**	***Identificación marranas***	***N° de fetos abortados***
L1	Lima/Huaral	M1	4
L2	Lima/ Ventanilla	M2	2
L2	Lima/ Ventanilla	M3	2
A	Amazonas/Boangarà	M4	1
		M5	1
		M6	1
		M7	1
L3	Lima/Huaral	M8	1
		M9	2
L4	Lima/Huaral	M10	1
L4	Lima/Huaral	M11	2
L3	Lima/Huaral	M12	1
		M13	2
Total		***13***	***21***

4.2. Procesamiento de las muestras

Las muestras de corazón, bazo y pulmón fueron colectadas por cada feto abortado y fueron trabajados en pooles cuando los fetos procedían de la misma camada, a excepción del F9 y F10, que fueron trabajados en un sólo pool por tener la misma procedencia y edad gestacional cuando se produjo el aborto (Cuadro 14).

Se realizó el machacado de 38 pooles de corazón, bazo y pulmón de los 21 fetos abortados, a excepción de los bazos de dos fetos de la granja A (Amazonas) que no fueron procesados porque estaban autorizados (Cuadro 14). Ademas, el 23,1 % (3/13) y el 76, 9% (10/13) de las marranas abortaron en el segundo y último tercio de gestación, respectivamente.

Cuadro 14. Relación de pooles de órganos fetales procesadas por marrana y edad gestacional
Dañç´fñfña

Granja	Identificación De la Marrana	Fecha de aborto	Fetos abortados	Edad gestational (días)	Pool (muestra)	Órgano	N°
L1	M1	02.09.2020	F1 F2	97	P1 (F1+F2)	corazón	1
					P2 (F1+F2)	pulmón	2
					P3 (F1+F2)	bazo	3
			F3 F4	97	P4 (F3+F4)	corazón	4
					P5 (F3+F4)	pulmón	5
					P6 (F3+F4)	bazo	6
L2	M2	16.09.2020	F5 F6	60	P7 (F5+F6)	corazón	7
					P8 (F5+F6)	pulmón	8
					P9 (F5+F6)	bazo	9
L2	M3	27.09.2020	F7 F8	75	P10 (F7+F8)	corazón	10
					P11 (F7+F8)	pulmón	11
					P12 (F7+F8)	bazo	12
A	M4	20.10.2020	F9	80	P13 (F9+F10)	corazón	13
	M5	20.10.2020	F10		P14 (F9+F10)	pulmón	14
	M6	20.10.2020	F11	105	P15 (F11)	corazón	15
					P16 (F11)	pulmón	16
					P17 (F11)	bazo	17
	M7	20.10.2020	F12	108	P18 (F12)	corazón	18
					P19 (F12)	pulmón	19
					P20 (F12)	bazo	20

Lklñkñkñk

Granja	Identificación De la Marrana	Fecha de aborto	Fetos abortados	Edad gestational (días)	Pool (muestra)	Órgano	N°
L3	M8	19.03.2021	F13	81	P21 (F13)	corazón	21
					P22 (F13)	pulmón	22
					P23 (F13)	bazo	23
	M9	19.03.2021	F14 F15	74	P24 (F14+F15)	corazón	24
					P25 (F14+F15)	pulmón	25
					P26 (F14+F15)	bazo	26
L4	M10	23.09.2021	F16	90	P27 (F16)	corazón	27
					P28 (F16)	pulmón	28
					P29 (F16)	bazo	29
L4	M11	30.09.2021	F17 F18	81	P30 (F17+F18)	corazón	30
					P31 (F17+F18)	bazo	31
					P32 (F17+F18)	pulmón	32
L3	M12	12.10.2021	F19	81	P33 (F19)	corazón	33
					P34 (F19)	bazo	34
					P35 (F19)	pulmón	35
	M13	12.10.2021	F20 F21	89	P36 (F20+F21)	corazón	36
					P37 (F20+F21)	bazo	37
					P38 (F20+F21)	pulmón	38

4.3. Procesamiento de las muestras por RT-PCR en tiempo real

Todas las muestras (38 pooles) resultaron negativas al RT-PCR en tiempo real para la detección de vIA (Anexo 4), vPRRS (Anexo 5), vPPC (Anexo 6). La Curva de amplificación (Ct) para el control positivo de vPRRS, VIA y vPPC fueron de 21.2, 28.9.y 29.69. En el caso del RT-PCR de vIA que trabajan con sondas taqman (IDEXX, US) mostraron Ct para los controles internos entre 26.4 y 28.3 (Anexo 4). La temperatura de melting (Tm) para el Control positivo de la especie americana del vPRRS fue de 83.9 (Anexo 5) y del control positivo de vPPC (Cepa Alfort/187) fue de 82.51 (Anexo 6).

4.4. Procesamiento de las muestras por PCR

Todas las muestras (38 pooles) resultaron negativas al PCR convencional para la detección de vEA (Anexo 7). El 5.3% (2/38), resultaron positivas a la detecciòn de PVP

(313pb) en gel de agarosa (foto 3) y el 5.3% (2/38) para CVP-2 en tiempo real (gráfico 1 y 2 y Cuadro 16).

Las muestras P14 y P19 que resultaron positivas a la detección del gen VP2 del PVP son de pulmón fetal. Estas muestras provienen de la misma granja ubicada en Amazonas y fueron remitidas el mismo momento de colección. Por otra parte, las 2 muestras (P3 y P9) que resultaron positivas a CVP-2 provienen de Huaral y de Ventanilla, respectivamente. En ambos casos, las muestras que resultaron positivas fueron de bazo fetal (Cuadro 15).

Las muestras P3 y P9 positivas al CVP-2 corresponden al pool de bazo de dos fetos procedente de una sola marrana M1 y M2, respectivamente. Asimismo, la muestra P14, corresponde al pool de pulmón de dos fetos procedente de la marrana M5; mientras que, la muestra P19 corresponden al pulmón de un solo feto procedente de la marrana M7 (Cuadro 15).

En el cuadro 16, se muestran los resultados encontrados expresados en porcentajes

Cuadro 15. Resultados del procesamiento de las muestras por PCR

Granja	Identificación de la marrana	Fecha de aborto	Fetos abortados	N° pool	N°	Pool de órganos	RESULTADOS DE PCR			
							Tiempo real		Convencional	
							PCV-2		PVP	vEA
							CT	Status	Status	Status
L1	M1	02.09.2020	F1 F2	P1 (F1+F2)	1	corazón	NA	Negativo	Negativo	Negativo
				P2 (F1+F2)	2	pulmón	NA	Negativo	Negativo	Negativo
				P3 (F1+F2)	3	Bazo	29.43	**Positivo**	Negativo	Negativo
			F3 F4	P4 (F3+F4)	4	corazón	NA	Negativo	Negativo	Negativo
				P5 (F3+F4)	5	pulmón	NA	Negativo	Negativo	Negativo
				P6 (F3+F4)	6	Bazo	NA	Negativo	Negativo	Negativo
L2	M2	16.09.2020	F5 F6	P7 (F5+F6)	7	corazón	NA	Negativo	Negativo	Negativo
				P8 (F5+F6)	8	pulmón	NA	Negativo	Negativo	Negativo
				P9 (F5+F6)	9	Bazo	27.37	**Positivo**	Negativo	Negativo
L2	M3	27.09.2020	F7 F8	P10 (F7+F8)	10	corazón	NA	Negativo	Negativo	Negativo
				P11 (F7+F8)	11	pulmón	NA	Negativo	Negativo	Negativo
				P12 (F7+F8)	12	Bazo	NA	Negativo	Negativo	Negativo
A	M4	20.10.2020	F9	P13 (F9+F10)	13	corazón	NA	Negativo	Negativo	Negativo
	M5	20.10.2020	F10	P14 (F9+F10)	14	pulmón	NA	Negativo	**Positivo**	Negativo
	M6	20.10.2020	F11	P15 (F11)	15	corazón	NA	Negativo	Negativo	Negativo
				P16 (F11)	16	pulmón	NA	Negativo	Negativo	Negativo
				P17 (F11)	17	Bazo	NA	Negativo	Negativo	Negativo
	M7	20.10.2020	F12	P18 (F12)	18	corazón	NA	Negativo	Negativo	Negativo
				P19 (F12)	19	pulmón	NA	Negativo	**Positivo**	Negativo
				P20 (F12)	20	Bazo	NA	Negativo	Negativo	Negativo

NA: No hubo amplificación

Granja	Identificación de la marrana	Fecha de aborto	Fetos abortados	N° pool	N°	Pool de órganos	RESULTADOS DE PCR			
							Tiempo real		Convencional	
							PCV-2		PVP	vEA
							CT	Status	Status	Status
L3	M8	19.03.2021	F13	P21 (F13)	21	corazón	NA	Negativo	Negativo	Negativo
				P22 (F13)	22	pulmón	NA	Negativo	Negativo	Negativo
				P23 (F13)	23	Bazo	NA	Negativo	Negativo	Negativo
	M9	19.03.2021	F14 F15	P24 (F14+F15)	24	corazón	NA	Negativo	Negativo	Negativo
				P25 (F14+F15)	25	pulmón	NA	Negativo	Negativo	Negativo
				P26 (F14+F15)	26	Bazo	NA	Negativo	Negativo	Negativo
L4	M10	23.09.2021	F16	P27 (F16)	27	corazón	NA	Negativo	Negativo	Negativo
				P28 (F16)	28	pulmón	NA	Negativo	Negativo	Negativo
				P29 (F16)	29	Bazo	NA	Negativo	Negativo	Negativo
L4	M11	30.09.2021	F17 F18	P30 (F17+F18)	30	corazón	NA	Negativo	Negativo	Negativo
				P31 (F17+F18)	31	Bazo	NA	Negativo	Negativo	Negativo
				P32 (F17+F18)	32	Pulmón	NA	Negativo	Negativo	Negativo
L3	M12	12.10.2021	F19	P33 (F19)	33	corazón	NA	Negativo	Negativo	Negativo
				P34 (F19)	34	Bazo	NA	Negativo	Negativo	Negativo
				P35 (F19)	35	pulmón	NA	Negativo	Negativo	Negativo
	M13	12.10.2021	F20 F21	P36 (F20+F21)	36	corazón	NA	Negativo	Negativo	Negativo
				P37 (F20+F21)	37	Bazo	NA	Negativo	Negativo	Negativo
				P38 (F20+F21)	38	pulmón	NA	Negativo	Negativo	Negativo

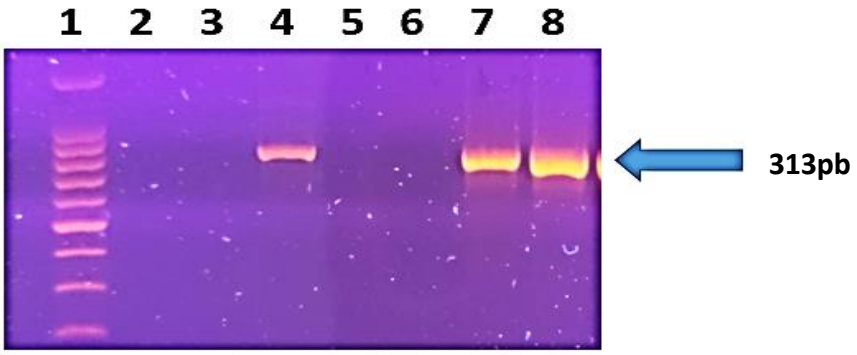


Figura 10. **Electroforesis en gel de agarosa con banda de amplificación del virus de PVP (313 pb).** ***Carril 1***: marcador de peso molecular. ***Carril 2-7***: muestras. ***Carril 8***: control positivo. ***Carril 4,*** muestra P14 y ***Carril 7***, muestra P19.

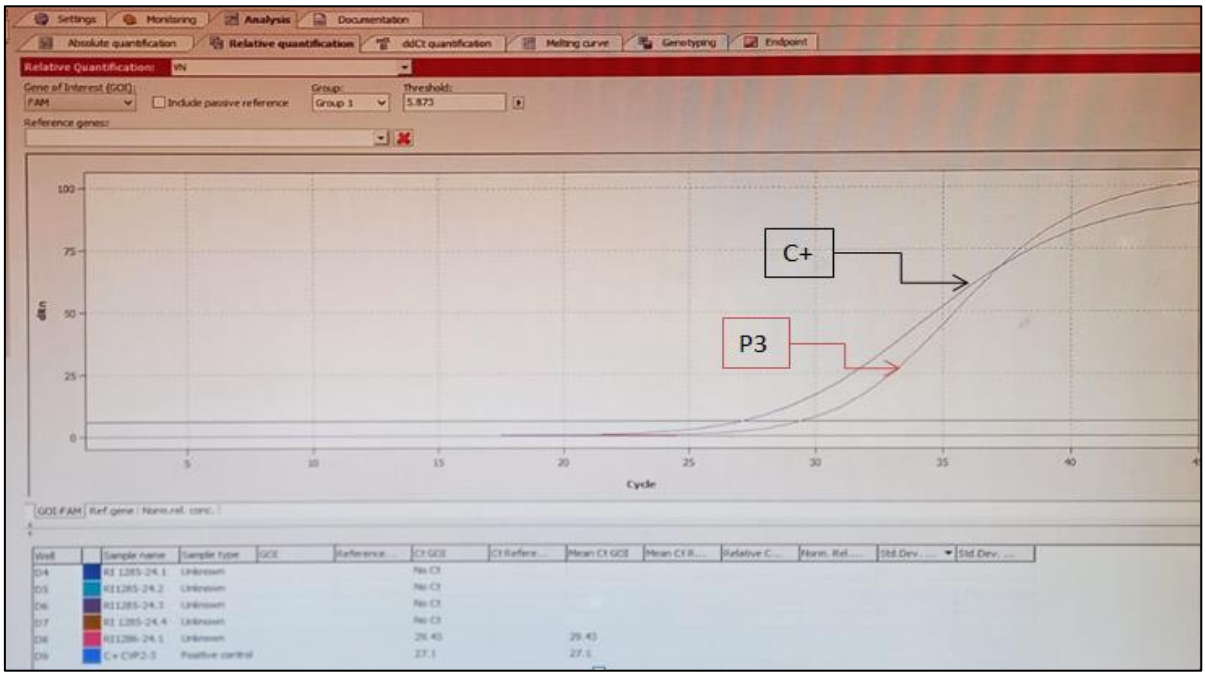


Gráfico 1. **PCR en tiempo real para la identificación de CVP-2.** Se observa curva de amplificación para el control positivo de CVP-2 (Ct: 27.1) y para la muestra P3 (Ct: 29.43)

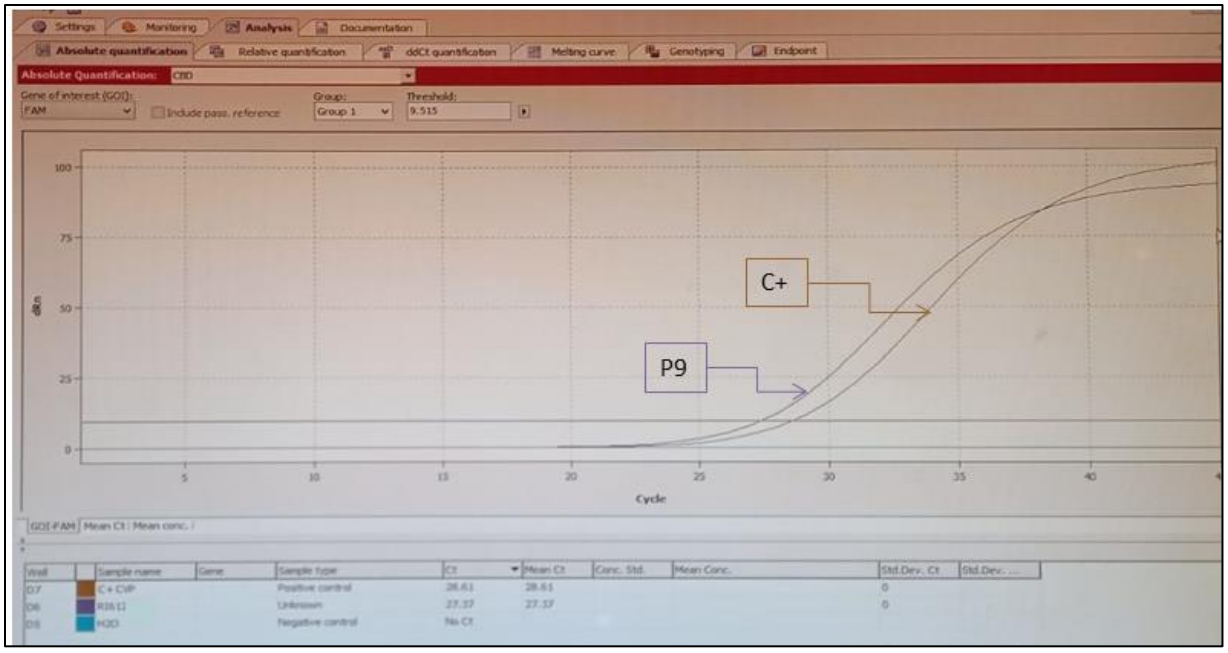


Gráfico 2. **PCR en tiempo real para la identificación de CVP-2.** Se observa curva de amplificación para el control positivo de CVP-2 (Ct: 28.61) y para la muestra P9 (Ct 27.37).

Cuadro 16. Porcentaje de muestras positivas a la RT-PCR y PCR para la detección de agentes virales abortogénicos.

MUESTRAS	RESULTADOS DE RT- PCR EN TIEMPO REAL			RESULTADOS DE PCR		
				Tiempo real	Convencional	
	vPRRS	vPPC	vIA	PCV-2	PVP	vEA
Positivas	0	0	0	2	2	0
Total	38	38	38	38	38	38
Porcentaje (%)	0	0	0	5.3	5.3	0

V. DISCUSIONES

En el Perú, el inicio del Estado de emergencia por la pandemia del SARSCoV-2 fue declarado el 11 de marzo del 2020 (DS N° 008-2020-SA) como medida de prevención y control para evitar la propagación del SARSCoV-2; sin embargo, esta medida también limitó en muchos aspectos el acceso a mayor número de fetos porcinos abortados, ya que muchas de las granjas que se habían comprometido en participar del estudio cerraron, redujeron personal o limitaron el ingreso a sus granjas. Bajo esta coyuntura, se pudo obtener entre septiembre del 2020 y octubre del 2021, 21 fetos porcinos de 13 marranas procedentes de 4 granjas de Lima y 1 de Amazonas (Cuadro 13). De ellos, se obtuvieron 38 muestras de pooles de pulmones (P), bazo (B) y corazón (C) con el objetivo de relacionar el órgano fetal susceptible y la presencia del gen viral identificado por la prueba molecular de RT-PCR o PCR (Cuadro 14).

Varios de los estudios que se han realizado para identificar agentes virales involucrados en problemas de abortos en marranas se han llevado a cabo con mayor número de fetos porcinos, es decir, entre 252 y 350 fetos y con mayor número de granjas muestreadas a diferencia de lo que se pudo obtener en el presente estudio por la pandemia del SARSCoV-2 (Kim *et al.*, 2004; Maldonado *et al.*, 2004, Ritzman *et al*., 2005).

De las 13 marranas, el 76,9% (10/13) abortó en el último tercio de gestación y el 23,1 % (3/13) en el segundo tercio.

En otros países, varios agentes virales han sido identificados como causantes de problemas de abortos en marranas (Kim *et al.,* 2004, Maldonado *et al.,* 2004; Ritzman *et al.,* 2005; Wolf *et al.,* 2008; Pozzi y Alborali, 2012; Olanratmanee *et al.,* 2015; Salogni *et al*., 2016). De ellos, 6 agentes virales son los que han sido estudiados en el Perú por serología, aislamiento viral o por pruebas moleculares en porcinos con problemas reproductivos, nerviosos y/o respiratorios, pero ninguno en fetos abortados (Portilla *et al*., 2009; Chiok *et al.,* 2011; Ramirez *et al.,* 2013, 2021; Flores *et al*., 2023). Por esta razón, el estudio incluyó a vPRRS, vPPC e vIA (virus con genoma ARN) y vEA, CVP-2 y PVP (virus con genoma ADN).

Asimismo, se obtuvieron 38 pooles de C, P y B de fetos abortados por marrana como órganos fetales más frecuentes en los que se han podido detectar estos virus en estudios previos (Kim *et al*., 2004; Segales *et al.,* 2005; Wolf *et al*., 2008; Salogni *et al*., 2016). En el presente estudio, los 38 pooles resultaron negativos para la detecciòn del vIA (Anexo 4), vPRRS (Anexo 5), vPPC (Anexo 6) y vEA (Anexo 7).

Para el caso del vIA, los resultados negativos coinciden con lo reportado por Kwit *et al*., 2013, 2014, quienes no evidenciaron ningún problema reproductivo en primerizas infectadas experimentalmente con diferentes subtipos del vIA, a excepción de la elevada temperatura corporal, mayor a 39.7°C que sí encontraron. Por lo que, para algunos autores, los abortos observados en marranas infectadas, en condiciones de campo, pueden deberse a la fiebre alta por la elevada cantidad de citocinas proinflamatorias "Tormenta de Citoquinas", más que por un efecto directo del vIA sobre la placenta, el embrión o el feto (Choi *et al.,* 2002; Wesley, 2004; Moretti *et al.,* 2005; Edwards, 2006; Kwit *et al.,* 2013, 2014, 2015).

En el caso del vPPC, los resultados negativos coinciden con lo reportado por Salogni *et al*., 2016, quienes no encontraron al vPPC en tejidos de fetos abortados. Sin embargo, este virus ha sido relacionado a fallas reproductivas como reabsorción embrionaria, abortos, momificación fetal, mortinatos y nacimiento de lechones débiles según la etapa de gestación y la virulencia de la cepa viral (Terpstra, 1991; Choi y Chae, 2003; Salogni *et al*., 2016). En el Perú, se viene ejecutando programas de prevención y control de esta

enfermedad desde hace varios años, siendo la inmunización a través de vacunas a virus modificadas las más utilizadas e implementadas. Probablemente, se obtuvieron resultados negativos al vPPC, porque las muestras fueron obtenidas de granjas tecnificadas quienes tienen implementados programas estrictos de vacunación contra el vPPC, lo que haría más difícil su presentación clínica en este tipo de granjas.

El vEA puede causar problemas reproductivos en cerdas (Wittmann y Rziha, 1989; Nauwynck y Pensaert,1992; Nauwynck, 1993). Sin embargo, en estudios con fetos porcinos no se ha logrado su detección (Maldonado *et al.,* 2004) o se ha logrado en porcentajes muy bajos (Salogni *et al*., 2016). En el Perú, el trabajo realizado por Castillo *et al.*, (2014) no detectó anticuerpos contra el vEA en muestras de sangre de porcinos obtenidos de camal, lo que indicaría una escasa o ausencia de circulación viral al momento de hacer el estudio. Es probable que los resultados negativos obtenidos en el presente estudio guarden relación con lo obtenido por Castillo *et al.* 2016, es decir hay una baja, escasa o nula presencia del vEA en granjas porcinas del Perú.

El resultado obtenido para el vPRRS no guarda relación con lo descrito por varios autores quienes lo identificaron en muestras de tejido fetal (Maldonado et al., 2004; Ritzman *et al*., 2005; Olanratmanee *et al*.,2015, Salogni *et al*., 2016) sin embargo, coincide con lo reportado por Pescador *et al.* (2007) quien no halló al vPRRS en muestras de tejido fetal. En el Perú, el vPPRS está ampliamente estudiado y es el patógeno más importante para la industria porcina nacional. Se ha demostrado su presencia por serología (Alegria *et al.,* 1998), por técnicas moleculares (Ramírez *et al.,* 2013) y análisis filogenético (Ramírez et al., 2019).

Los resultados negativos obtenidos en este estudio para el vPRRS, pueden estar asociados a la degradación o fragmentación del ácido nucleico viral (ARN) por enzimas celulares (ARNasas) que son activadas cuando se produce la muerte celular, haciendo difícil su detección por la técnica molecular de RT-PCR (Schroeder *et al.,* 2006). La técnica utilizada en el presente estudio fue el protocolo de la RT- PCR en tiempo real para la detección del gen ORF7 del vPRRS de la SV- LMP de la FMV-UNMSM que utiliza al Sbyr green con fluoroforo intercalante a diferencia de los kits de RT-PCR comerciales, que

utilizan sondas Taqman para su detección y controles internos endógenos, que permiten conocer la integridad de la muestra al momento de correr la prueba molecular. Desafortunadamente, la técnica empleada no permitió descartar que los resultados negativos puedan deberse a la degradación del material genético viral por el tiempo que tomo (aprox 4 meses) entre el machado y la extracción de ácidos nucleicos. Este tiempo fue así de extenso por el estado de emergencia y de inamovilidad que decreto el estado peruano frente al COVID-19.

El 5.3% (2/38) de los pooles de muestras trabajadas en el presente estudio resultaron positivos a CVP-2. Los pooles positivos fueron de bazo fetal y las muestras están identificadas como P3 y P9. Ambas provienen de dos granjas tecnificadas de Lima y la edad gestacional del aborto fue de tercer y segundo tercio de gestación, respectivamente (Cuadro 14). Asimismo, el 5.3% (2/38) de los pooles de muestras resultaron positivos a PVP. Los pooles positivos fueron de pulmón fetal y las muestras están identificadas como P14 y P19. Ambas muestras provienen de una sola granja de Amazonas que experimentó en plena pandemia cuadros de abortos cercanos al 10%. Estos resultados coinciden con los reportado por varios estudios que han identificado al CVP-2 y al PVP como los agentes virales mas frecuentes en órganos fetales porcinos (Kim *et al.,* 2004; Ritzman *et al*., 2005; Pescador *et al*., 2007; Serena *et al.,* 2021).

Asimismo, estos estudios mencionan al pulmón como órgano blanco de PVP y a los órganos linfoides (nódulos y bazo) de elección para CVP-2 (Sanchez *et al.,* 2001; Pensaert *et al.*, 2004; Park *et al*., 2005; Wolf *et al*., 2008; Rocha, 2010). Asimismo, para CVP-2 también se ha reportado a los miocitos cardiacos fetales como blanco de replicación viral, (Sanchez *et al*., 2001), sin embargo, en el presente estudio, todas las muestras de pooles de corazón, resultaron negativas a CVP-2

Cabe mencionar, que la detección de PVP y CVP-2 (virus con genoma ADN), frente a otros agentes virales con genoma ARN, puede haberse debido también a que la molécula de ADN es más estable en condiciones ambientales que la molécula de ARN, lo que ha permitido su identificación utilizando la técnica molecular de PCR.

En el país, hay disponibilidad de vacunas comerciales contra CVP-2 y PVP desde hace varios años. En el caso de CVP-2, la gran mayoría son aplicadas a las chanchillas (150 días de edad) y dependiendo de la vacuna, se aplica una segunda dosis a los lechones al destete. En caso de PVP, las vacunas utilizadas son inactivadas y son aplicadas a los 90 días de gestación. En ambos casos, la detección de material genético de CVP-2 y PVP en órganos fetales, nos hace reflexionar sobre la posibilidad de que las vacunas comerciales utilizadas en el país, no estén protegiendo a los animales de la infección por virus de campo.

Por otro lado, las 34 muestras que resultaron negativas a todos los agentes analizados en este estudio, pueden deberse a causas no infecciosas (genético, nutricional, manejo, hormonal, etc.) e infecciosas como bacterias, hongos y otros agentes virales no considerados en el presente estudio.

Finalmente, más estudios necesitan realizarse con mayor número de muestras obtenidas de diferentes granjas porcinas del país, con el fin de confirmar lo encontrado en este estudio o de ampliar el estudio incluyendo a otros agentes bacterianos o virales involucrados en cuadros de abortos en marranas, para que sean incluidos en el panel de diagnóstico de agentes abortogénicos y puedan tomarse efectivas medidas de prevención y control en granjas porcinas del país. Asimismo, es necesario identificar mediante análisis filogenético el origen y la similitud que existen entre las cepas de PVP y CVP-2 detectadas en el presente estudio con otras cepas de campo y vacunal reportadas en el mundo.

VI. CONCLUSIONES

- Se identificó el 5.3% (2/38) de muestras positivas (P14 y P19) a la detecciòn del gen VP2 del virus de PVP y el mismo porcentaje de muestras positivas (P3 y P9) a la detección del virus de CVP-2.
- Las muestras positivas al virus de PVP (P14 y P19) fueron obtenidas de pulmón fetal; mientras que, las muestras positivas a CVP-2 (P3 y P9) fueron obtenidas de bazo fetal.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar màs estudios similares con un mayor número de muestras de las diferentes regiones del país .

VIII. LITERATURA CITADA

- Acosta F, 2021. Situación epidemiológica de peste porcina clásica en el Perú y su relación con el tipo de explotación pecuaria, edad y sexo del animal, durante el periodo 2015 – 2019. Tesis de Master en Ciencias de la Salud. Huánuco: Universidad de Huánuco. 94p.
- Aldunce I. 2012. Comparación del patrón de seroconversión contra Circovirus Porcino Tipo 2 (pcv-2) entre cerdos vacunados y cerdos infectados naturalmente. Tesis de Médico Veterinario. Santiago: Universidad de Chile. 55p.
- Alegría A, Rivera H, Manchego A. 1998. Evidencia del virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino de crianza tecnificada. Investigaciones pecuarias 9 :53-8
- Allan G, Ellis J. 2000. Porcine circoviruses: a review. J Vet Diagn Invest, 12:3–14p. Doi: 10.1177/104063870001200102
- Amarilla S, Avalos A, Suarez M, Marecos E, Gonzales E. 2015. Síndrome reproductivo y respiratorio porcino: epidemiología, síntomas y lesiones. Compend. Cienc. Vet. 5(2): 38-46 p. Doi: 10.18004/compend.cienc.vet.2015.05.02.38-46.
- Andrews J, Holter J, Daniels G, Larson D, Van Alstine W, Miskimins D, Schwart K. 1986. Diagnostic necropsy of suckling swine. Vet Clin North Am Food Anim Pract. Mar, 2(1):159-72 pp. Doi: 10.1016/s0749-0720(15)31275-5

- Arainga M, Hisanaga T, Hills K, Handel K, Rivera H, Pasick J. 2010. Phylogenetic Analysis of Classical Swine Fever Virus Isolates from Peru. • Transboundary and Emerging Diseases. 57: 262–270p. Doi: 1 0.1111/j.1865-1682.2010.01144.x
- Arriaga A. 2014. Fluctuación de los niveles de anticuerpos contra PCV2 pre y post vacunación en una granja porcina. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Mexico: Universidad Nacional Autónoma De México. 51p.
- Barranco I. 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. Tesis de médico veterinario. Cordoba: Universidad de Córdoba. 264p.
- Bermeo E. 2012. Detección de Circovirus Porcino tipo 2 en cerdos del ecuador mediante PCR. Tesis de médico veterinario. Quito: Universidad de San Francisco de Quito. 43p.
- Boadella M. Gortazar C, Vicente J, Ruiz J. 2012. Wild boar: an increasing concern for Aujeszky's disease control in pigs? BMC Veterinary Research 8 (7)
- Calle F. 2017. Prevalencia del síndrome respiratorio reproductivo porcino en dos parques porcinos de la provincia de Piura. Tesis de Médico Veterinario. Piura: Universidad Nacional de Piura. 90p.
- Campos I. 2020. Circovirosis porcina, una de las patologías que causa más problemas sanitarios. [Internet], [25 de setiembre de 2022]. Disponible en: https://www.engormix.com/porcicultura/articulos/circovirosis-porcina-patologias-causa-t45374.htm
- Castillo A, Rivera H, Ramirez M, Manchego A. 2016. Detección de Anticuerpos Contra el Virus de la Enfermedad de Aujeszky en Porcinos de Crianza Semi-tecnificada en Lima, Perú Rev Inv Vet Perú 27(1): 204-208. doi: 10.15381/rivep.v27i1.11455
- Castillo A. 2014. Detección de anticuerpos contra el Virus de la enfermedad de Aujeszky en porcino de crianza semitecnifica de Lima Metropolitana. Tesis de médico veterinario. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 55p.
- Carrasco C, Rigden R, Vincent E, Balmelli C, Ceppi M, Bauhofer o, Tache V, Hjertner B, Mc Neilly F, Van Gennip H, McCullough K, Summerfield A. 2004. Interaction of classical swine fever virus with dendritic cells. Journal of General Virology (2004), 85, 1633–1641. Doi: 10.1099/vir.0.19716-0
- Chae. 2005. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. The Veterinary Journal 169: 326–336p. Doi: 10.1016/j.tvjl.2004.01.012

- Chavez.2005. Determinación de anticuerpos contra el virus de influenza porcina subtipo H3N2 en diferentes estados de la república mexicana. Tesis de médico veterinario zootecnista. Mexico: Universidad nacional autónoma de Mexico. 56p.
- Cheung W, Wang D, Bayles D, Lager K, Vincent A. 2010. Identification and molecular cloning of a novel porcine parvovirus Andrew K. Cheung. Vincent Arch Virol 155:801–806. DOI: 10.1007/s00705-010-0646-8
- Chiok KL, Manchego A, Rivera H, Sandoval N, Ramirez M. 2011. Estandarización y validación de la técnica RT-PCR cualitativa en tiempo real para la detección del virus de la peste porcina clásica. Rev Inv Vet Perú 2011; 22 (4): 377-387. DOI: https://doi.org/10.15381/rivep.v22i4.337
- Choi Y, Goyal S, Donald M, Farnham W, Soo H. 2002. Phylogenetic analysis of H1N2 isolates of influenza A virus from pigs in the United States. Virus Research 87: 173–179p
- Choi C, Chae C. 2003. Detection of Classical Swine Fever Virus in the Ovaries of Experimentally Infected Sows. J. Comp. Path. 128: 60-66. Doi:10.1053/jcpa.2002.0607
- Corzo C, Culhane M, Juleen K, Stigger- Rosser E, Ducatez M, Webby R, Lowe W. 2013. Active Surveillance for Influenza A Virus among Swine, Midwestern United States, 2009–2011. Emerging Infectious 19 (6). DOI: http://dx.doi.org/10.3201/eid1906.121637
- Cristofolini A, Merkis C, Barroso F, Varquer V, Lloret M, Moschetti E, Koncurat M. 2008. REDVET 1 (7):1-10 p.
- Detmer S. 2016. The clinical features, pathobiology, and epidemiology of influenza infections in pigs. En: Swayne D, Animal influenza. John Wiley & Sons, Inc. 2da ed. p 439-451. Doi: 10.1002/9781118924341.ch16
- Dotmizer P, Galli G, Castellino F, Golding H, Khurana S, Del Giudice G. 2010. Influenza vaccine immunology. 2010. John Wiley & Sons A/S. Immunological Reviews 23. Doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00974.x
- Dron N, Hernandez M, Doyle R, Holyoake P.2014. Investigating risk factors and possible infectious aetiologies of mummified fetuses on a large piggery in Australia. Australian Veterinary Journal 92 (12). Doi: 10.1111/avj.12270
- Edwards M. 2006. Review: Hyperthermia and Fever during Pregnancy. Birth Defects Research (Part A) 76:507–516p
- Engblom L, Lundeheim N, Dalin A, Andersson K. 2007. Sow removal in Swedish commercial herds. Livestock Science 106: 76–86. doi:10.1016/j.livsci.2006.07.002

- Enriquez K. 2009. Evaluación de la participación del Circovirus Porcino Tipo 2 (PCV-2) en la falla reproductiva. Tesis de Master en Ciencias de Producción y Salud Anmial. Mexico: Universidad Nacional Autónoma de México. 58p.
- Fajardo J. 2016. Propuesta del plan de muestreo serológico para la vigilancia epidemiológica de las enfermedades: síndrome respiratorio y reproductivo porcino, gastroenteritis transmisible y enfermedad de Aujeszky en cerdos de traspatio en Guatemala. Tesis de Médico Veterinario. Guatemala: Universidad De San Carlos De Guatemala. 87p.
- Ferrer E, Fonseca O, Percedo M, Abeledo M. 2010. La peste porcina clásica en las américas y el caribe. Actualidad y perspectivas de control y erradicación. Rev. Salud Anim 32 (1): 11-21P
- Flores L, Jurado J, Navarro D, Gonzales-Gustavson E, Gavidia Chucásn, Gonzalez R, Icochea E, Bayona J, Rivera H, Ramirez M. 2023. Frecuencia de anticuerpos contra el virus de Influenza A en granjas porcinas tecnificadas con antecedentes de signos clínicos respiratorios en las regiones de Lima, Ica y Arequipa. Rev Inv Vet Perú 34(1). 9p
- Foerster T, Streck A, Mota S, Selbiz H, Lidner T, Truyan U. 2016. An inactivated whole-virus porcine parvovirus vaccine protects pigs against disease but does not prevent virus shedding even after homologous virus challenge. Journal of General Virology 97: 1408–1413 p. Doi: 10.1099/jgv.0.000446.
- García N. 2018. Identificación de Parvovirus Porcino (PVP), análisis productivo, reproductivo y económico en una granja porcina de ciclo completo, después de un brote de diarrea epidémica porcina (DEP). Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Mexico: Universidad Nacional Autonoma de Mexico. 71p.
- Galvis J, Corzo C, Machado G. 2021. Modelling and assessing additional transmission routes for porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Vehicle movements and feed ingredients. Transfronterizo Emerg Dis (69):1549-1560.DOI: 10.1111/tbed.14488
- Genghini R, Tiranti I, Zamorano-Ponce, E. 2005. Estudio citogenético y citomolecular de la vacuna contra la Peste Porcina Clásica. Theoria. 14 (1): 103-123p.
- Harding J, Ladinig A, Pedrag N, Detmer S, Wilkinson J, Yang T, Lunney J, Plastow G. 2017. Novel insights into host responses and reproductive pathophysiology of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome caused by PRRSV-2. Veterinary Microbiology. DOI:10.1016/j.vetmic.2017.02.019
- Hernandez J. 2018. Estudio de factores de riesgo asociados al virus del Síndrome respiratorio y reproductivo del cerdo, Parvovirus porcino y *Leptospira* en verracos de 30 granjas porcinas

comerciales tecnificadas de Antioquia y Cundinamarca. Tesis de Master en Ciencias Veterinarias. Bogotá: Universidad de La Salle. 81p.

- Huttenloncher A, Poznansky M. 2008. Reverse leukocyte migration can be attractive or repulsive. Trends Cell Biol. 18(6): 298–306p. Doi:10.1016/j.tcb.2008.04.001.
- ICTV. 2019. International Committee on Taxonomy of Viruses. *Pestivirus C* [Internet] [14 de diciembre de 2022]. Disponible en:https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202103155
- ICTV. 2019. International Committee on Taxonomy of Viruses. *Suid alfaherpesvirus 1* [Internet] [18 de noviembre de 2022]. Disponible en: https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202101456
- ICTV. 2019. International Committee on Taxonomy of Viruses. *Ungulates protoparvovirus 1* [Internet] [23 de noviembre de 2022]. Disponible en: https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202104277
- ICTV. 2019. International Committee on Taxonomy of Viruses. *Porcine circovirus 3* [Internet] [7 de octubre de 2022]. Disponible en: https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202105768
- ICTV. 2020. International Committee on Taxonomy of Viruses. *Porcine circovirus 1* [Internet] [7 de octubre de 2022]. Disponible en: https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202102924
- ICTV. 2020. International Committee on Taxonomy of Viruses. *Porcine circovirus* 2 [Internet] [7 de octubre de 2022]. Disponible en: https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202102925
- ICTV. 2020. International Committee on Taxonomy of Viruses. *Porcine circovirus 4* [Internet] [7 de octubre de 2022]. Disponible en: https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202109253
- ICTV. 2020. International Committee on Taxonomy of Viruses. *Betaarterivirus suid 1* [Internet] [23 de noviembre de 2022]. Disponible en: https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202101832
- ICTV. 2020. International Committee on Taxonomy of Viruses. *Betaarterivirus suid 2* [Internet] [23 de noviembre de 2022]. Disponible en: https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202101833

- ICTV. 2020. International Committee on Taxonomy of Viruses. *Alfainfluenzavirus influenzae* [Internet] [7 de octubre de 2022]. Disponible en: https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202103956
- Iglesias G. 1987. Infección con el virus de la enfermedad de Aujeszky en cerdos. Ciencia Veterinaria. 4. 31p.
- Jabif, M.F. 2013. Fallas reproductivas: Herramientas de diagnóstico y control. Informe de actualización técnica Nº 28 Fericerdo 2013
- Janke B. 2000. Diagnosis of swine influenza. *wine Health Prod.*, 8(2):79-84p.
- Karniychuk U, Nauwynck H. 2013. Pathogenesis and prevention of placental and transplacental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. Veterinary Research: 44 – 95
- Karniychuk U, Saha D, Geldhof M, Vanhee M, Cornillie P, Van den Broek, Nauwynck. 2011. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) causes apoptosis during its replication in fetal implantation sites. Microbial Pathogenesis (51): 194-202.
- Karniychuk U, Saha D, Vanhee M, Geldhofa M, Cornillieb P, Caijc A, De Reggec N, Nauwynck H. 2012. Impact of a novel inactivated PRRS virus vaccine on virus replication and virus-induced pathology in fetal implantation sites and fetuses upon challenge. Theriogenology, 78: 1527–1537p. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.06.015
- Kim J, Ha Y, Jung K, Choi C, Chae C. 2003. Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs. The Canadian Journal of Veterinary Research, 68:218–221p.
- Kim J, Jung K, Chae C. 2004. Prevalence of porcine circovirus type 2 in aborted fetuses and stillborn piglets. Veterinary Record 155: 489-492. doi: 10.1136/vr.155.16.489
- Kluge J, Mare C. 1974. Swine pseudorabies: abortion, clinical disease, and lesions in pregnant gilts infected with pseudorabies virus (Aujeszky'sdisease). Am J Vet Res 35:991–995.
- Konig H, Liebich H. 2008. Anatomìa de los animales domésticos. 1era edición. Buenos Aires: Editorial Panamericana. 400 p.
- Kwit K, Pomorska-Mól M, Markowska-Daniel I. 2013 Course of pregnancy in gilts after intranasal infection with the H1N2 subtype of swine influenza virus during the first month of pregnancy. Med Weter 69:641–704p
- Kwit K, Pomorska-Mól M, Markowska-Daniel I. 2014. The influence of experimental infection of gilts with swine H1N2 influenza A virus during the second month of gestation on

the course of pregnancy, reproduction parameters and clinical status. BMC Veterinary Research 10:123

- Kwit K, Pomorska-Mól M, Markowska-Daniel I. 2015. Pregnancy outcome and clinical status of gilts following experimental infection by H1N2, H3N2 and H1N1pdm09 influenza A viruses during the last month of gestation. Arch Virol 160:2415–2425p. Doi: 10.1007/s00705-015-2518-8
- Ladinig A, Wilkinson J, Ashley C, Detmer S, Lunney J, Plastow G, Harding J. 2014. Variation in Fetal Outcome, Viral Load and ORF5 Sequence Mutations in a Large Scale Study of Phenotypic Responses to Late Gestation Exposure to Type 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. Plosne (9).
- Larochelle R, Bielanski A, Muller P, Magar R. 2000. PCR Detection and Evidence of Shedding of Porcine Circovirus Type 2 in Boar Semen. Journal Of Clinical Microbiology, 38 (12): 4629–4632p.
- Laval K, Vernejoul B, Cleemput V, Koyuncu O, Enquist W. 2018. Virulent Pseudorabies Virus Infection Induces a Specific and Lethal Systemic Inflammatory Response in Mice. Journal of Virology 92 (24). Doi10. 1128/JVI.01614-18.
- Lewis N, Rusell C, Langal P, Anderson T, Berger K, Bielejec F, Burke D, Dudas G, Fonville J, Fouchier R, Kellam P, Koel B, Lemey P, Nguyen T, Nuansrichy, Peiris J, Salto T, Simon G, Skepner E, Takemae N, Webby R, Van K, Brookes S, Larsen L, Watson S. 2016. The global antigenic diversity of swine Influenza A viruses. Elife (5). Doi:10.7554/eLife.12217
- Lopez S, Morales R, Mendieta H, Vazquez J. 2015. Sìndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PRRS). Revisión. Rev Mex Cienc Pecu 6(1):69-89.
- Lopez O, Osorio F. 2004. Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. Veterinary Immunology and Immunopathology 102: 155–163
- Lozada de Gante A, Estrada E, Diosdado F, Escabel G, Carrera E, González- Vega D, García H, Morilla A. 2003. Estudio epidemiológico de la fiebre porcina clásica en granjas del altiplano de México. Tec Pec, Méx 41: 261-274.
- Lucía T, Dial G, Marsh W. 2000. Lifetime reproductive performance in female pigs having distinct reasons for removal Thomaz. Livestock Production Science 63: 213–222. doi: 10.2016/ S0301-6226(99)00142-6.
- Mabry J. y Goddwin R. 2002. Trends in sow longevity and sow death rate in the U.S industry. En: Proc. Annual Meeting National Swine Improvement Federation. Nashville.
- MacLachlan J y Dubovi E. 2011. Fenner's Veterinary Virology. 4a ed. El Sevier. 499p

- Madec F, Kaiser C, Gourreal M, Martinat F. 1989. Consequences pathologiques d'un episode grippal severe (virus swine AH1N1) dans les conditions naturelles chez la truie non immune en debut de gestation. Comp. Immun. MicrobioL infect. 12 (1): 17-27p.
- Madson D, Opriessnig T. 2011. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection on reproduction: disease, vertical transmission, diagnostics and vaccination. Animal Health Research Reviews 12(1): 47–65p. Doi:10.1017/S1466252311000053
- Madson D, Patterson A, Ramamoorthy S, Pal N, Meng X, Opriessnig T. 2009. Effect of natural or vaccine-induced porcine circovirus type 2 (PCV2) immunity on fetal infection after artificial insemination with PCV2 spiked semen. Theriogenology 72 : 747–754. Doi: Elsevier Inc. All rights reserved. Doi:10.1016/j.theriogenology.2009.04.024
- Maes D, Nauwynck H, Rijsselaere T, Mateusen B, Vyt P, De Kruif A, Van Soom A. 2008. Diseases in swine transmitted by artificial insemination: An overview. Theriogenology 70(8): 1337-1345.
- Maldonado J, Segalés J, Martínez-Puig D, Calsamiglia M, Riera P, Domingo M, Artigas C. 2004. Identification of viral pathogens in aborted fetuses and stillborn piglets from cases of swine reproductive failure in Spain. El Siever 169: 454-456. doi:10.1016/j.tvjl.2004.05.007
- Mancera J, Pearce D, Masic A, Balash M. 2020. Influenza A Virus in Swine: Epidemiology, Challenges and Vaccination Strategies. Front. Vet. Sci. 7:647. Doi: 10.3389/fvets.2020.00647
- Manchego A, Cerón M, Salas A, Gonzales A, Sandoval N, Rivera H, Rosadio R, 1998. Evidencia serológica del virus de la enfermedad de Aujeszky (pseudorabia) en porcinos. Rev Inv Vet Perú 9(1): 38-43.
- Marroquin D. 2011. Determinación del Virus Influenza en cerdos, en dos comunidades del área central de Guatemala. Tesis de medico veterinario zootecnista. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. 53p.
- Masaka L, Sungirai M, Nyamukanza C, Bhondai C. 2014. Sow removal in a commercial pig herd in Zimbabwe. Trop Anim Health Prod. doi: 10.1007/s11250-014-0554-0
- Mendoza E. 2015. Detección y caracterización del virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino en tres granjas de producción intensiva para el establecimiento del control local de la enfermedad. Tesis de magister en salud y producción animal. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 203p.
- Mengeling W, Lager K, Vorwald C. 2000. The effect of porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive performance. Anim. Reprod. Sci. 60-61

- Mettenleiter TC. 2000. Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis – State of the art, June 1999. Vet Res 31(1): 99-115.
- Merkis C, Crsitofolini A, Barroso F, Vaquer V, Allende F, Chanique A, Koncurat M. 2009. Inmunolocalización de proteínas mitocondriales reguladoras durante la placentación en porcinos. REDVET 10 (9):1-9p
- Mészáros I, Olasz F, Cságola A, Tijseen P, Zádori Z. 2017. Biology of Porcine Parvovirus (Ungulate parvovirus 1). Viruses. 9, 393. Doi:10.3390/v9120393
- Miao L, Zhang C, Chen C, Cui S. 2009. Real-time PCR to detect and analyze virulent PPV loads in artificially challenged sows and their fetuses. Veterinary Microbiology. 138: 145–149p.
- MIDAGRI. 2011**.** Resolución 330 de 2011 [Ministerio de Agricultura y Riego]. Por la cual se establece el período de inducción del Reglamento sanitario porcino. 28 de octubre del 2011
- MIDAGRI. 2022. Perfil productivo y competitivo de las principales especies y productos pecuarios. [Internet], [09 de marzo de 2024]. Disponible en: https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiYWM0MDIwYTktNTk3MS00OTc3LThiZTgtZjRmN2ZhMmZlNjVlIiwidCI6IjdmMDg0NjI3LTdmNDAtNDg3OS04OTE3LTk0Yjg2ZmQzNWYzZiJ9&pageName=ReportSection
- Moretti M, Bar-OZ, Fried S, Koren G. 2005. Maternal Hyperthermia and the Risk for Neural Tube Defects in Offspring Systematic Review and Meta-Analysis. Epidemiology 6 (2). Doi: 10.1097/01.ede.0000152903.55579.15
- Morilla A. 1996. Control y erradicación de la Enfermedad De Aujeszky. Ciencia Veterinaria 7: 241-271p.
- Morin M, Girard C, Elazhary Y, Fajardo R, Drolet R, Lagacé A. 1990. Severe proliferative and necrotizing pneumonia in pigs: A newly recognized disease. Can Vet J. 31: 837-839p.
- Muñoz C. 2010. Evaluación de la eficiencia reproductiva de cerdas en un plantel intensivo de la zona central de Chile. Tesis de Médico Veterinario. Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile. 29 p.
- Murriel D. 2017. Determinacion de Sindrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) mediante inmunocromatografia en porcinos beneficiados del camal metropolitano sector rio seco, distrito cerro colorado, region Arequipa – 2017. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Arequipa: Universidad Católica de Santa María. 79p.

- Music N, Gagnon N. 2010. The role of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus structural and non-structural proteins in virus pathogenesis. Animal Health Research Rewievs 11(2): 135-163 p. doi:10.1017/S1466252310000034
- Nauwynck H, Glorieux S, Favoreel H, Pensaert M. 2007. Cell biological and molecular characteristics of pseudorabies virus infections in cell cultures and in pigs with emphasis on the respiratory tract. Vet. Res. 38: 229–241p. DOI: 10.1051/vetres:200661
- Nauwynck H. 1993. The cell-associated spread of Aujeszky's disease virus and its possible role in the pathogenesis of abortion in vaccinated sows, Ph.D. thesis, Ghent University, Belgium,
- Nauwynck H, Pensaert M. 1992. Abortion induced by cell-associated Pseudorabies virus in vaccinated sows. Am J Vet Res 53:489–493.
- Noboa J, Acosta A, Chavez A, Fernandez-Gomez R, Yáñez P. 2019. Análisis del título de anticuerpos en cerdas vacunadas contra peste porcina clásica a cuatro edades de gestación. Rev Inv Vet Perú 30(2): 939-945p. Doi:10.15381/rivep.v30i2.15143
- Noriega J, Reyes P, Bucarey S. 2007. Circovirus porcino: un virus pequeño que genera un gran problema. Avances en Ciencias Veterinarias 22, 62-71p.
- OIE Organización Mundial de Sanidad Animal.2018. Enfermedad de Aujeszky (infección por el Virus de la enfermedad de Aujeszky. [Internet] [04 junio 2022]. Disponible en: https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.01.02_Enfermedad_Aujeszky.pdf
- Opriessnig T, Meng X, Halbur P. 2007. Porcine circovirus type 2–associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. J Vet Diagn Invest 19:591–615
- Olanratmanee E, Wongyanin P, Thanawongnuwech R, Tummaruk P. 2015. Prevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus detection in aborted fetuses, mummified fetuses and stillborn piglets using quantitative polymerase chain reaction. J Vet. Med. Sci. 77 (9):1071-1077 p.
- Papageorgiou KV, Burriel AR., Filioussis G, Psychas V, Nauwynck HJ, Kritas, SK. Aujeszky's Disease (Pseudorabies). An old threat in current pig industry? Part I. 2011. Pathogenetic information and implications. J Hellen Vet Med Soc 62(1): 29-37
- Park J, Kim J, Ha Y, Jung K, Choi C, Lim S, Chae C. 2005. Birth Abnormalities in Pregnant Sows Infected Intranasally with Porcine Circovirus 2. J. Comp. Path. Vol. 132: 139–144.

- Pena R, Fernandez C, Blasco-Flip M, Fraile L, Estany J. 2019. Genetic Markers Associated with Field PRRSV-Induced Abortion Rates. Viruses 2019, 11, 706; doi:10.3390/v11080706
- Pensaert M, Sanchez R, Ladekjaer A, Allan G, Nauwynck H. 2004. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. Veterinary Microbiology, 98: 175–183p. Doi: 10.1016/j.vetmic.2003.10.011
- Peñaherreran O. 2011. Diagnóstico de parvovirus en cerdas de traspatio en el lpamalag del canton Pujilí provincia Cotopaxi. Tesis de médico veterinario. Cotopaxi: Universidad Técnica de Cotopaxi. 41p.
- Perez L, Días de Arce H. 2008. Peste Porcina Clásica: diagnóstico y control. REDVET. 9 (11): 1-22p
- Pescador C, Bandarra P, Castro L, Antoniassi N, Ravazzolo A, Sonne L, Cruz C, Driemeier D. 2007. Co-infection by porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus vovirus in aborted fetuses and stillborn piglets in southern Brazil. Pesq. Vet. Bras. 27(10):425-429 pp.
- Petrov A, Schotte U, Pietschmann J, Drager C, Beer M, Anheyer-Behmenburg H, Goller K, Blome S. 2014. Alternative sampling strategies for passive classical and African swine fever surveillance in wild boar. Veterinary Microbiology 173: 360-365 pp. Doì: 10.1016/j.vetmic.2014.07.030
- Piñeyro P, 2012**.** Infección por virus de influenza en el cerdo: estudios seroepidemiológicos, anatomopatológicos e inmunohistoquímicos y de biología molecular. Tesis de doctor en ciencias veerinarias. Universidad de La Plata. 23p
- Plaza J, 2021. Rentabilidad de tres sistemas de comercialización en una granja porcina tecnificada. [Internet], [30 noviembre 2022]. Disponible en: https://actualidadporcina.com/rentabilidad-de-tres-sistemas-de-comercializacion-en-una-granja-porcina-tecnificada-parte-1/
- Pomeranz L, Reynolds A, Hengartner C, 2005. Molecular Biology of Pseudorabies Virus: Impact on Neurovirology and Veterinary Medicine. Microbiol Mol Biol Rev 69(3): 462 – 500.
- Portilla K, Manchego A, Rivera H, Arainga M, Ramirez M. 2009. Persistencia de anticuerpos maternales contra el Virus De La Peste Porcina Clásica en lechones nacidos de marranas en granjas con diferentes estrategias de vacunación. Rev Inv Vet, 20 (2): 320-326p
- Portilla K. 2006. Determinación de la persistencia de los niveles de anticuerpos pasivos contra el virus de la peste porcina clásica en lechones nacidos de marranas con distinto

programa de vacunación. Tesis de médico veterinario. Lima: Universidd Nacional Mayor de San Marocs. 61p.

- Pozzi P, Alborali G. 2012. Reproductive diseases in sows (Sus scrofa domestica): A Review. Israel Journal of Veterinary Medicine 67 (1) 24-33
- Pozzi S, Rosner A. 2009. Hormonal therapy in sows (Sus scrofa somestica). Isr. J. Vet. Med 64 (4): 95-102.
- Prieto C, Castro J. 2005. Porcine reproductive and respiratory syndromevirus infection in the boar: a review. Theriogenology 63 (2005) 1–16p. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.03.018
- Quesada O. 2015. Estudio Etiopatogénico del Circovirus Porcino Tipo 2 asociado a virus y bacterias en una infección natural. Tesis de doctor en Sanidad y Patología animal. La Palmas de Gran Canaria: Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 305p.
- Quevedo M, Mantilla J, Portilla K, Villacaqui R, Rivera H. 2018. Seroprevalencia del virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino en cerdos de crianza no tecnificada del Perú. Rev. Inv. Vet. Perú 29(2): 643-651. Doi: 10.15381/rivep.v29i2.14497.
- Ramirez M, Rivera H, Manchego A, More J, Lam K. 2013. Aislamiento y genotipificación del virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (VPRRS) en granjas seropositivas de Lima y Arequipa, Perú. Rev Inv Vet Perú 24(2): 222-232. doi: 10.15381/rivep.v24i2.2512
- Rico S, Molina S, Pabón F. 2003. Detección y aislamiento del Parvovirus porcino en Medellín, Colombia. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 16(1): 40-45p.
- Rincon M. 2014. Circovirosis porcina en Colombia: Aspectos moleculares y caracterización biológica de cepas de campo. Tesis de doctor en Ciencias de la salud animal. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 212p.
- Ritzman M, Wilhelm S, Zimmermann P, Etschmann B, Bogner K, Selbitz H, Heinritzi K, Truyen U. 2005. Prevalence and association of porcine circovirus Type 2 (PCV2), porcine parvovirus (PPV) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in aborted fetuses, mummified fetuses, stillborn and nonviable neonatal piglets. Dtsch. Tierárztl 113: 348-351.
- Rocano P. 2015. Prevalencia de peste porcina clasica en el canton paute provincia del Azuay, mediante las pruebas de elisa ac y elisa Ag. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. 109p.
- Rocha C. 2010. Detecção de parvovírus suíno em material proveniente de porcas com patologias reprodutivas. Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC. requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

- Rodriguez C. 2012. La patogénesis de la infección por Circovirus porcino tipo 2. Sitio Argentino de producción animal. 14. [Internet], [12 mayo 2022]. Disponible en: https://www.produccion-animal.com.ar
- Rojas D. 2018. Determinación de la ausencia de la infección de Aujeszky, gastroenteritis transmisible y coronavirus respiratorio en la principal zona de producción porcícola de Colombia. Tesis de Magister en Ciencias Animales y Veterinarias. Santiago de Chile: Universidad de Chile. 63p.
- Romagosa A, Allerson M, Gramer M, Soo H, Deen J, Detmer S, Torremorell M. 2011. Vaccination of influenza a virus decreases transmission rates in pigs. Veterinary Research 42:120. DOI: 10.1186/1297-9716-42-120
- Rowland R. 2010. The interaction between PRRSV and the late gestation pig fetus. Epub 154 (1-2):114-122 p. Doi: doi: 10.1016/j.virusres.2010.09.001
- Saballo A, López-Ortega A, Márquez A. 2007. Causas de descarte de cerdas en granjas de la región centro occidental de Venezuela durante el período 1996-2002. Zootecnia Tropical 25(3): 179 -187rowman
- Salogni C, Lazzaro M, Giacomini E, Giovannini S, Zanoni M, Giuliani M, Ruggeri J, Pozzi P, Pasquali P, Boniotti M, Alborali G. 2016. Infectious agents identified in aborted swine fetuses in a high-density breeding area: a three-year study. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 28(5): 550–554. doi:10.1177/1040638716656024
- Sanchez R, Nauwynck J, McNeilly F, Allans G, Pensaert M. 2001. Porcine circovirus 2 infection in swine fetuses inoculated at different stages of gestation. Veterinary Microbiology 83. 169–176 p. Doi: 10.1016/s0378-1135(01)00425-4
- Sanchez D, Carreón N, Palacios J. 2010. Comparison of two diagnostic methods for the detection of the porcine influenza virus. Veterinaria Mexico, 41 (1): 45-58p.
- Santiago J. 2020. Prevalencia de Circovirus tipo 2 (CVP-2) en el parque porcino de Ventanilla-Callao 2019. Tesis de Médico Veterinario. Huánuco: Universidad Nacional Hermilio Valdizán. 79p.
- Saporiti V, Franzo G, Sibila M, Segales J. 2021. Porcine circovirus 3 (PCV-3) as a causal agent of disease in swine and a proposal of PCV-3 associated disease case definition. Transbound Emerg Dis. (68):2936–2948. DOI: 10.1111/tbed.14204
- Segales J, Rosell C, Domingo M. 2004. Pathological findings associated with naturally acquired Porcine Circovirus type 2associated disease. Veterinary Microbiology 98: 137–149 p. Doi: 10.1016/j.vetmic.2003.10.006

- Segales J. 2005.Relevancia de circovirus porcino tipo 2 en alteraciones reproductivas de la cerda. Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA). 7p.
- Segales J, Allan G, Domingo M. 2005. Porcine circovirus diseases. Anim Salud Res Rev. 6 (2): 119-42. Doi: 10.1079/ahr2005106.
- SENASA.2020. Procedimiento: identificación indivirual de bovinos y porcinos. PRO-SIAG-21. Revisión 00. 78pp.
- Serena M, Cappuccio J, Metz G, Aspitia C, Dibarbora M, Calderón M, Echeverría M. 2021. Detection and molecular characterization of porcine parvovirus in fetal tissues from sows without reproductive failure in Argentina. Heliyon (5). Doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02874.
- Sorden S. 2000. Update on porcine circovirus and postweaning multisistemic wasting syndrome (PMWS). Swie Health Prod. 8:133-136p.
- Streck A, Wageck C, Truyen U. 2015. Molecular epidemiology and evolution of porcine parvoviruses. Infection, Genetics and Evolution 36: 300–306 p. Doi: https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.10.007
- Streck A, Truyen U. 2020. Porcine Parvovirus. Curr. Issues Mol. Biol. Vol. 37. Doi:10.21775/cimb.037.033 .
- Tarradas J, Argilaguet J, Rosell R, Nofrarìas M, Crisci E, Còrdoba L, Perez E, Dìas I, Rodriguez F, Domingo M, Montoya M, Ganges L. 2010. Interferon-gamma induction correlates with protection by DNA vaccine expressing E2 glycoprotein against classical swine fever virus infection in domestic pigs. Veterinary Microbiology 142 (2010) 51–58
- Terpstra, C. 1991. Hog cholera: an update of present knowledge. British Veterinary Journal, 147: 397-406.
- Truyen U, Streck A. 2012. Porcine Parvovirus. In: Zimmerman, Jeffrey J. et al. Diseases of Swine. 10. ed. Uk: Wiley-blackwell. Cap. 29. p. 447-454
- Van K, Vincent Al, Larger K. 2016. Vaccines and vaccination for swin influenza: differing situations in Europe and the US. En: Swayne DM, eds Animal Influenza. Ames. 2da ed. JohnWilley and Sons Inc p. 576–93.
- Wesley R. 2004. Exposure of sero-positive gilts to swine influenza virus may cause a few stillbirths per litter. The Canadian Journal of Veterinary Research 689: 215-217p
- Williamson D, Koncurat M. 2009. Expresión de la integrina avß3 y de las subunidades de integrinas a3 y ß1 durante la placentación porcina. Invet (1):31-37 pp.

- Wills R, Zimmerman J, Yoon K, Swenson S, Hoffman L, Mc Ginnley M, Hill H, Platt K. 1994. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: rutes of excretion. Veterinary microbiology (57): 69-81p.
- Wills R, Doster A, Galeota J, Sur J, Osorio F. 2003. Duration of Infection and Proportion of Pigs Persistently Infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. Journal Of Clinical Microbiology, Jan. 2003, p. 58–62 Vol. 41, No. 1. DOI: 10.1128/JCM.41.1.58–62.2003
- Wittmann G, Rziha H-J. 1989. Aujeszky's disease (pseudorabies) in pigs, En Herpesvirus diseases of cattle, horses, and pigs. Kluwer Academic Publishers, Boston: 230–325pp
- Wolf V, Menossi M, Mourão G, Gatti M. 2008. Molecular basis for porcine parvovirus detection in dead fetuses. Genet Mo Res 7 (2): 509-517. doi: 10.4238/vol7-2gmr440
- Yang Y, Qin X, Zhang W, Yanmin L, Z Zhang. 2016. Rapid and specific detection of porcine parvovirus by isothermal recombinase polymerase amplification assays Molecular and Cellular Probes10.1016/j.mcp.2016.08.011
- Yoon H, Eo S, Aleyas A, Cha S, Lee J, Chae J, Jang H, Cho J, Song H. 2005. Investigation of Pseudorabies virus latency in nervous tissues of seropositive pigs exposed to field strain. College of veterinary medicine, Chonbuk National University: 561-756 p.
- Zhang J, Fan J, Li Y, Liang S, Huo S, Wang X, Zuo Y, Cui D, Li W, Zhong Z, Zhong F. 2016. Porcine Parvovirus Infection Causes Pig Placenta Tissue Damage Involving Nonstructural Protein 1 (NS1)-Induced Intrinsic ROS/Mitochondria-Mediated Apoptosis. Viruses (11) 389- 403 doi:10.3390/v11040389
- Zhao Y, Liu X, Mo D, Chen Q, Chen Y. 2015. Analysis of reasons for sow culling and seasonal effects on reproductive disorders in Southern China. Animal Reproduction Science 159: 191–197. doi: 10.1016/j.anireprosci.2015.06.018

- Zhao Y, Liu X, Mo D, Chen Q, Chen Y. 2015. Analysis of reasons for sow culling and seasonal effects on reproductive disorders in Southern China. Animal Reproduction Science 159: 191–197. doi: 10.1016/j.anireprosci.2015.06.018

- Zheng L. Wang Y, Li M, Chen H, Guo X, Geng J, Wang Z, Wei Z, Cui B. 2013. Simultaneous detection of porcine parvovirus and porcine circovirus type 2 by duplex real-time PCR and amplicon melting curve analysis using SYBR Green. Journal of Virological Methods 187: 15-19pp. Doi: 10.1016/j.jviromet.2012.06.024
- Zeeuw E, Leinecker N, Herwing V, Selbitz J, Truyen U. 2007. Study of the virulence and cross-neutralization capability of recent porcine parvovirus field isolates and vaccine viruses

in experimentally infected pregnant gilts. Journal of General Virology (88): 420–427. DOI 10.1099/vir.0.82302-0

- Zimmerman J, Yoon K, Stevenson G, Dee A. 1998. The 1998 PRRS compendium: a comprehensive reference on porcine reproductive and respiratory syndrome for pork producers, veterinary practitioners, and researchers. National Pork Producers Council. 118 p.
- Zimmerman J, Karriker L, Ramirez A, Schwartz A, Stevenson G, Zhang G. 2019. Diseases of swin. JohnWilley and Sons Inc. 480 – 504 p.
- Zuckermann F. 2000. Aujeszky's disease virus: opportunities and challenges. BioMed Central, 31 (1): 121-131p

ANEXOS

Anexo 1. **Protocolo de extracción de ARN viral.**

Kit comercial: TOTAL RNA PURIFICATION KITS (NORGEN, Canadá)

Procedimiento:

1. Transferir 100 µl de la muestra a un tubo libre de ARNasa.
2. Agregar 350 µl de Buffer RL por cada 100µl de muestra.
3. Mezclar en un vórtex por 10 segundos.
4. Centrifugar 2 segundos.
5. Agregar 200 µl de etanol absoluto (96-100%) al lisado por cada 100µl de muestra.
6. Mezclar en un vórtex por 10 segundos.
7. Transferir 650 µl de la solución lisada dentro de una columna y centrifugar a 6000 rpm por 1 minuto.
8. Eliminar el líquido y ensamblar nuevamente la columna.
9. Repetir el paso 1 y 2 dependiendo del volumen trabajado.
10. Adicionar 400 µl de solución de lavado A a la columna y centrifugar a 14000 rpm por 1 minuto.
    Nota: asegúrese de que todo el líquido atraviese la membrana, en caso contrario, centrifugar a 1400 rpm por 1 minuto.
11. Eliminar el líquido y reensamblar la columna.
12. Repetir el paso 1 y 2 dos veces más.
13. Centrifugar la columna por 2 minutos a 14000 rpm.
14. Eliminar el tubo de centrifugación y transferir la columna a un tubo de elución.
15. Agregar 30 µl de la solución de elución A a la columna.
16. Centrifugar por 2 minutos a 2000 RPM seguido de 1 minuto a 14000 rpm.
17. Conservar el ARN a -80 °C.
    Nota: para maximizar la recuperación de ARN, es recomendable que una segunda elución sea realizada en otro tubo de centrifuga repitiendo los pasos 1 y 2.

Anexo 2. **Protocolo de extracción de ADN viral (Kit comercial: E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit (Omega, Bio-Tek, USA)**

Procedimiento:

1. Girar brevemente el tubo disruptor para eliminar las perlas de vidrio de la pared del tubo. Destape el tubo disruptor y guarde.
2. Agregar 20-30 mg de tejido.
3. Añada 725 µl de tampón SLX-Mlus. Selle el tubo disruptor con tapa que quitó en el p1.
4. Agitar en el vórtex a velocidad máxima durante 3-5 minutos para lisar y homogeneizar las muestras.
5. Centrifugar a 1000-2000 rpm durante 15 segundos a temperatura ambiente.
6. Destape el tubo disruptor y guarde la tapa para usarla en el paso 8.
7. Añada 72 µl de tampón DS y 20 µl de solución de Proteinasa K.
8. Selle el tubo disruptor con la tapa que quitó en el paso 6.
9. Agite en vórtex durante 60 segundos para mezclar bien.
10. Incubar a 70 °C durante 15 minutos. Mezclar una vez durante la incubación.
11. Centrifugar a 12000 RPM durante 5 minutos.
12. Transfiera 300 µl de sobrenadante aclarado a un tubo de centrifuga de 1.5 ml.
13. Añada 600 µl de tampón RBB. Agite en el vórtex para mezclar bien.
14. Deje reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
15. Inserte una columna de ADN MicroElute®LE en un tubo de recogida de 2 ml.
16. Transfiera 700 µl de muestra del paso 14 a la columna de ADN MicroElute®LE.
17. Centrifugue a velocidad máxima durante 1 minuto.
18. Deseche el filtrado y reutilice el tubo de la recolección.
19. Transfiere el lisado restante del paso 14 a la columna de ADN MicroElute®LE.
20. Centrifugue a velocidad máxima durante 1 minuto.
21. Deseche el filtrado y reutilice el tubo de recolección.
22. Agregue 500 µl de tampón HBC.
23. Centrifugue a velocidad máxima durante 30 segundos.
24. Deseche el filtrado y el tubo de recogida.
25. Inserte la columna de ADN MicroElute®LE en un nuevo tubo de recogida 2 ml.
26. Agregue 700 µl de tampón de lavado de ADN.
27. Centrifugue a velocidad máxima durante 30 segundos.
28. Deseche el filtrado y reutilice el tubo colector.
29. Repita los pasos 26-28 para un segundo paso de lavado con tampón de lavado de ADN.
30. Centrifugar por dos minutos la columna de ADN MicroElute
31. Transferir la columna de ADN MicroElute ®LE a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml sin nucleasas.
32. Añada 15-100 µl de tampón de elución calentado a 70 °C.
33. Dejar reposar a temperatura ambiente durante 2 minutos.
34. Centrifugar a velocidad máxima durante 1 minuto.
35. Repita los pasos 32-34 para un segundo paso de elución.

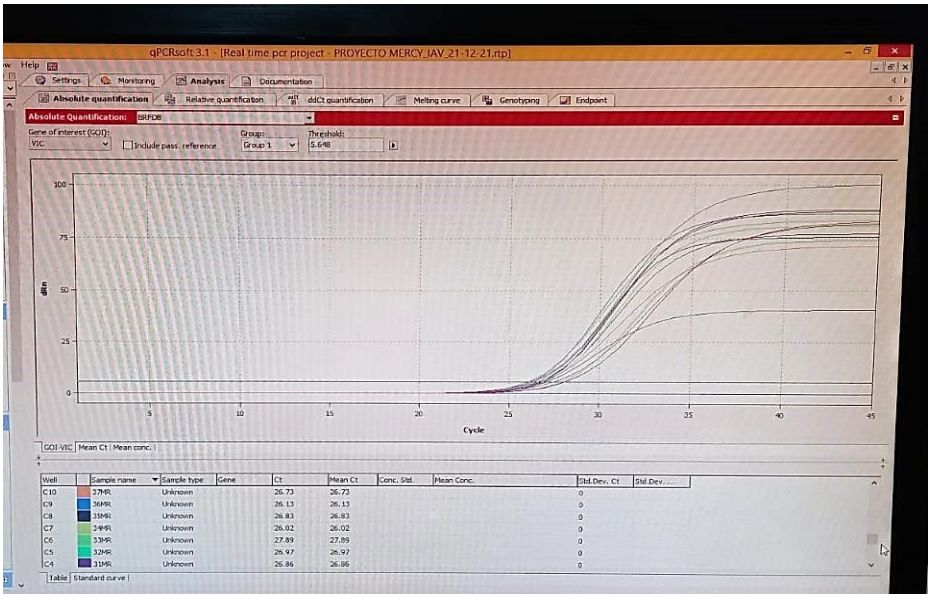
36. Almacene el ADN eluído a -80 °C.

Anexo 3. Resultados del procesamiento de las muestras por RT- PCR

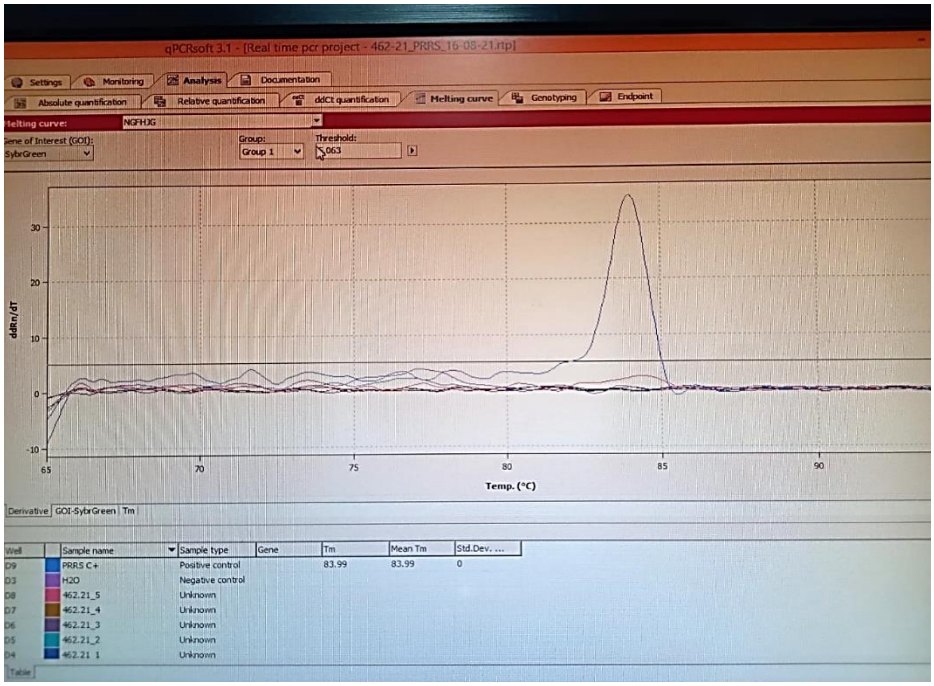
GRANJA	Identificación de la Marrana	Fecha de aborto	Fetos abortados	N° pool	Órgano que conforma el pool	RESULTADOS DE RT- PCR EN TIEMPO REAL					
						PRRS		PPC		vIA	
						CT	Status	CT	Status	CT	Status
L1	M1	02.09.2020	F1 F2	P1 (F1+F2)	Corazón	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
				P2 (F1+F2)	Pulmón	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
				P3 (F1+F2)	bazo	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
			F3 F4	P4 (F3+F4)	corazón	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
				P5 (F3+F4)	pulmón	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
				P6 (F3+F4)	bazo	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
L2	M2	16.09.2020	F5 F6	P7 (F5+F6)	corazón	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
				P8 (F5+F6)	pulmón	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
				P9 (F5+F6)	bazo	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
L2	M3	27.09.2020	F7 F8	P10 (F7+F8)	corazón	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
				P11 (F7+F8)	pulmón	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
				P12 (F7+F8)	bazo	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
A	M4	20.10.2020	F9	P13 (F9+F10)	corazón	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
	M5	20.10.2020	F10	P14 (F9+F10)	pulmón	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
	M6	20.10.2020	F11	P15 (F11)	corazón	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
				P16 (F11)	pulmón	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
				P17 (F11)	bazo	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
	M7	20.10.2020	F12	P18 (F12)	corazón	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
				P19 (F12)	pulmón	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
				P20 (F12)	bazo	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
L3	M8	19.03.2021	F13	P21 (F13)	corazón	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
				P22 (F13)	pulmón	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
				P23 (F13)	bazo	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
	M9	19.03.2021	F14 F15	P24 (F14+F15)	corazón	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
				P25 (F14+F15)	pulmón	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
				P26 (F14+F15)	bazo	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
L4	M10	23.09.2021	F16	P27 (F16)	corazón	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
				P28 (F16)	pulmón	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
				P29 (F16)	bazo	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
L4	M11	30.09.2021	F17 F18	P30 (F17+F18)	corazón	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
				P31 (F17+F18)	bazo	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
				P32 (F17+F18)	pulmón	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
L3	M12	12.10.2021	F19	P33 (F19)	corazón	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
				P34 (F19)	bazo	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
				P35 (F19)	pulmón	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
	M13	12.10.2021	F20 F21	P36 (F20+F21)	corazón	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
				P37 (F20+F21)	bazo	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo
				P38 (F20+F21)	pulmón	NA	Negativo	NA	Negativo	NA	Negativo

NA: No hubo amplificación

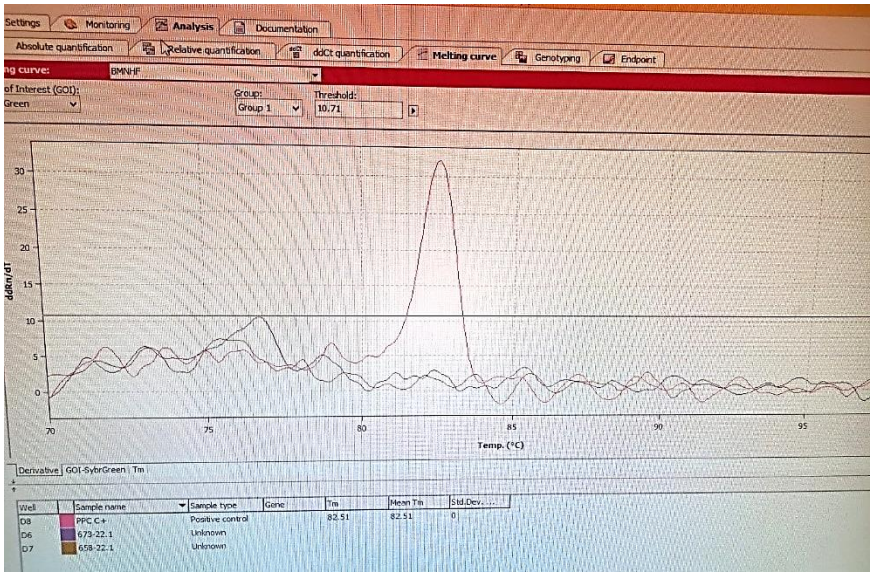
Anexo 4. **RT-PCR en tiempo real para la detección del vIA**. Se muestra la Curva de amplificación del control interno (*canal VIC*) de muestras y controles.



Anexo 5. **RT-PCR en tiempo real para la detección del vPRRS:** Se observa la Temperatura de melting (Tm) del Control positivo del vPRRS (Tm =83.9). Todas las muestras fueron negativas al vPRRS.



***Anexo 6*. RT-PCR en tiempo real para la detección del vPPC:** Se observa la Temperatura de melting (Tm) del Control positivo de vPPC (Tm=82.5). Todas las muestras fueron negativas.



Anexo 7*. PCR convencional para la detección del vEA.** Se observa el gel de agarosa con banda de amplificación del control positivo del virus de Aujeszky. ***Carril 1: marcador de pares de bases; ***carril 2 y 3***, muestras; ***carril 4***, control de Aujeszky diluido 1/5 y control de Aujeszky sin diluir. Todas las muestras resultaron negativas al vEA.

