

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Instituto de Ciencias Agrícolas

Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias



**DETECCIÓN DEL VIRUS DEL SÍNDROME
RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO TIPO 2 Y
DE CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2 EN HATOS
PORCINOS DE BAJA CALIFORNIA, MÉXICO,
MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR**

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

**PRESENTA
SERGIO DANIEL GÓMEZ GÓMEZ**

**DIRECTOR
GILBERTO LÓPEZ VALENCIA**

Mexicali, Baja California, México

Febrero, 2019

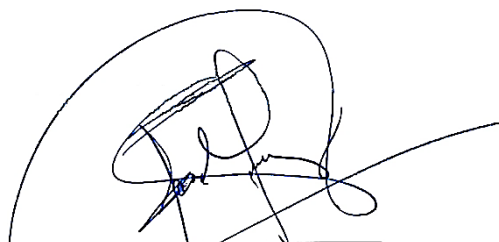
La presente tesis “**Detección del Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino tipo 2 y de Circovirus Porcino tipo 2 en hatos porcinos de Baja California, México, mediante la técnica de PCR**” realizada por el **C. Sergio Daniel Gómez Gómez**, dirigido por el **Dr. Gilberto López Valencia**, ha sido evaluada y aprobada por el Comité Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias Agropecuarias

Comité Particular



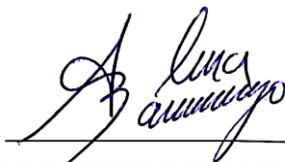
DR. GILBERTO LÓPEZ VALENCIA
DIRECTOR DE TESIS



DR. FRANCISCO JAVIER MONGE NAVARRO
SECRETARIO



DR. GERARDO ENRIQUE MEDINA BASULTO
SINODAL



DRA. ALMA ROSSANA TAMAYO SOSA
SINODAL



DR. HECTOR MANUEL ACOSTA VALLE
SINODAL

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, hermanos y amigos por toda su contribución para ser quien soy.

Al Dr. Gilberto por aceptar ser mi tutor, darme su apoyo incondicional y compartir sus conocimientos en el arte de la investigación y sobre todo sus experiencias de vida.

A mis sinodales por tener siempre las puertas abiertas y ayudarme a resolver todas mis dudas, aportando comentarios acertados y sobre todo necesarios.

Al MVZ José Soto y a la Dra. Laura Kinejara por compartir información de gran valor con respecto a la situación real y actual de los porcicultores en Baja California.

A los MC Kelvin Espinoza y Ricardo Martínez por siempre estar al pie del cañón en los muestreos alrededor del estado.

A las MC Kattya Moreno y Karla Núñez, así como al Dr. Carlomán Herrera, sin ellos seguiría haciendo las pruebas de laboratorio.

A la UABC por permitirme no sólo la oportunidad de enseñar, sino también de continuar superándome académica y personalmente.

Al Dr. Víctor González, Director del IICV durante mi período de estudio doctoral, por estar pendiente de este proyecto y ofreciendo su ayuda en todo momento.

Al Sindicato de Profesores de Superación Universitaria de UABC, al Cuerpo Académico de Diagnóstico de Enfermedades del IICV y a Hema Diagnóstico Veterinario AC por sus apoyos económicos tanto para inscripciones como para materiales de muestreo y de laboratorio.

DEDICATORIA

Al igual que todo lo que hago en mi vida,
a la persona que me da la dicha de compartir la suya conmigo.

CONTENIDO

RESUMEN	IX
ABSTRACT	X
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1 Situación mundial en producción de carne.....	2
1.2 Porcicultura en México	2
1.3 Enfermedades reproductivas en cerdos.....	3
CAPÍTULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA Y BIBLIOGRAFÍA CITADA	6
2.1 VIRUS DEL SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO	7
2.1.1 Etiología	7
2.1.2 Patogenia.....	8
2.1.3 Epidemiología	8
2.1.4 Diagnóstico	9
2.1.5 El Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino en México.....	11
2.1.6 MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
2.1.6.1 Tamaño y toma de muestra	12
2.1.6.2 Procesamiento y almacenamiento de muestras de sangre	12
2.1.6.3 Extracción de ARN.....	14
2.1.6.4 Diseño de oligonucleótidos para PRRSV.....	14
2.1.6.5 Optimización del ensayo de RT-PCR	16
2.1.6.6 RT-PCR	16
2.1.6.7 Interpretación de resultados de RT-PCR.....	17
2.1.6.8 Comprobación de PRRSV2 mediante secuenciación.....	17
2.1.6.9 Análisis de factores de riesgo	18
2.1.7 RESULTADOS.....	18
2.1.7.1 Estudio de secuenciación	19
2.1.7.2 Análisis de factores de riesgo	20
2.2 CIRCOVIRUS PORCINO	22
2.2.1 Etiología	22
2.2.2 Patogenia.....	22
2.2.3 Epidemiología	23
2.2.4 Diagnóstico	24
2.2.5 El Circovirus Porcino en México.....	24

2.2.6 MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
2.2.6.1 Tamaño y toma de muestras	25
2.2.6.2 Extracción de ADN.....	25
2.2.6.3 Oligonucleótidos para PCV2.....	25
2.2.6.4 PCR en punto final para diagnóstico de PCV2	25
2.2.7 RESULTADOS.....	27
2.3 BIBLIOGRAFÍA CITADA	28
CAPÍTULO 3. ARTÍCULOS PRODUCIDOS.....	39
3.1 Artículos derivados del trabajo de tesis	40
3.1.1 First detection of porcine reproductive and respiratory syndrome in porcine herds from Baja California, Mexico.....	40
3.1.2 Presencia de Circovirus Porcino tipo 2 en hatos porcinos de Baja California, México.....	45
3.2 Artículos publicados durante el período de estudio.....	52
3.2.1 Immunopathological evaluation of recombinant mycobacterial antigen Hsp65 expressed in <i>Lactococcus lactis</i> as a novel vaccine candidate	52
3.2.2 Prevalence and distribution of intestinal parasites in stray dogs in the northwest area of Mexico	58
3.3 Colaboración en artículos por publicar	65
3.3.1 Prevalence and geographical distribution of <i>Nosema apis</i> and <i>Nosema cerenae</i> in apiaries of Northwest Mexico using a duplex Real-Time PCR with melting-curve analysis.....	65
3.3.2 Development and analytical validation of an enzyme-linked immunosorbent assay based on baculovirus recombinant LipL32protein antigen for the accurate detection of canine leptospirosis.....	65
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES GENERALES	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Genoma del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino	7
Figura 2. Determinación de la curva estándar de los oligonucleótidos diseñados	16
Figura 3. Gráfica de una muestra positiva a PRRSV2 mediante RT-PCR en tiempo real	19
Figura 4. Resultados de la comparación del amplicon obtenido donde se muestra el 100% de similitud con cepas del PRRSV2	20

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cuestionario aplicado a los productores	13
Cuadro 2. ORF7 de PRRSV2 completo resaltando el amplicon obtenido....	15
Cuadro 3. Secuencias y características de los oligonucleótidos diseñados a partir de ORF7 del PRRSV2	15
Cuadro 4. Reactivos y volumen de reacción para el RT-PCR en tiempo real de PRRSV2	17
Cuadro 5. Relación de animales positivos y animales muestreados por granja en cada localidad	19
Cuadro 6. Valor p luego del análisis de factores de riesgo mediante la prueba de chi cuadrada con corrección de Yates	21
Cuadro 7. Genoma completo de PCV2 resaltando el amplicon obtenido	26

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue detectar la presencia del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino tipo 2 (PRRSV2) y de Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2) en los hatos porcinos de Baja California, México. Se obtuvieron 97 muestras sanguíneas de cerdos en diferentes estadios de producción procedentes de 26 granjas distribuidas en las ciudades de Mexicali, Ensenada, Tecate y Tijuana, así como de los Valles de Mexicali y San Quintín. Los ácidos nucleicos fueron extraídos a partir de la capa leucoplaquetaria y mediante RT-PCR se analizaron individualmente las muestras para diagnóstico de PRRSV2, en los cuales encontramos 9 (9.3%) muestras positivas. Para diagnóstico de PCV2 se hicieron grupos de 5 muestras y se analizaron mediante la técnica de PCR, resultando positivos 3 de los 20 (15.0%) grupos estudiados. Se encontró presencia de ambos virus en las muestras provenientes de Mexicali, Ensenada, Tecate, Tijuana y Valle de San Quintín. Este es el primer reporte de la presencia tanto del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino tipo 2, como de Circovirus Porcino tipo 2 en Baja California.

Palabras clave: PRRS, PCV, detección, México.

ABSTRACT

The objective of this study was to detect the presence of type 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV2) and Porcine Circovirus type 2 (PCV2) within the porcine herds in Baja California, Mexico. We obtained 97 blood samples from pigs in different productive stages, coming from 26 farms distributed in Mexicali, Ensenada, Tecate and Tijuana, as well as Mexicali and San Quintin Valleys. Nucleic acids were extracted from the buffy coat and they were individually analyzed by RT-PCR for PRRSV2 diagnosis, 9 (9.3%) samples resulted positive. For PCV2 diagnosis we did pools of 5 samples coming from the same geographic place and they were analyzed by PCR, obtaining 3 out of 20 (15.0%) positive pools. We found the presence of both virus in the samples from Mexicali, Ensenada, Tecate, Tijuana and San Quintin Valley. This is the first report of the presence of both type 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Porcine Circovirus type 2 in Baja California.

Key words: PRRS, PCV, detection, Mexico.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Situación mundial en producción de carne

Para mantener la salud y el buen desarrollo de los animales es necesario el consumo de una dieta balanceada. En el caso de los humanos una dieta saludable debe incluir entre 55-65% de carbohidratos, 7-20% de proteínas y 15-30% de grasas (Lim, 2018). La carne es la fuente principal de proteína y grasa para las poblaciones a nivel mundial, además de contribuir con el aporte de gran cantidad de vitaminas y minerales tales como vitamina B, vitamina A, zinc y hierro (Boada et al., 2016), por razones como ésta, la carne es considerada como un componente muy importante dentro de la dieta humana a lo largo de su evolución (Wyness, 2016).

Existen diferentes animales que son consumidos por el humano, sin embargo, la mayor cantidad de producción recae principalmente en cerdos, gallinas y bovinos (FAO, 2014). Mundialmente se producen en promedio 110'224,600 t de carne de cerdo, 87'914,200 t de carne de pollo y 60'573,000 t de carne de bovino lo cual se corresponde con el consumo mundial, donde encontramos unas cifras de consumo de 109'929,800 t para la carne de cerdo, 86'179,600 t de carne de pollo y 58'677,200 t de carne de bovino (FAS, 2017), sin embargo, en el consumo per cápita observamos que hay mayor consumo mundial de carne de pollo (13.460 kg), seguido de la carne de cerdo (12.520 kg) y muy por debajo encontramos el consumo per cápita de la carne de bovino (6.480 kg) (DIEES, 2017).

1.2 Porcicultura en México

En México, en promedio se producen 1'236,000 t de carne de cerdo al año (SIAP, 2017), sin embargo, a nivel de población se consume un total de 2'110,000 t (DIEES, 2017) e individualmente 18.6 kg per cápita (SIAP, 2017), de tal manera que es necesario importar casi 1'000,000 t de carne de cerdo, además de aproximadamente 25,000 animales en pie para engorda y pie de cría principalmente desde Estados Unidos de Norteamérica y Canadá (DIEES, 2017; FAS, 2017). Por otro lado, la calidad e inocuidad de la carne producida en México al ser de excelente calidad es consumida por mercados japoneses, norcoreanos y norteamericanos (DIEES, 2017).

Particularmente en Baja California, la producción de carne de cerdo (879,897 kg) es muy baja comparada con el consumo de la misma, la cual se encuentra sobre los 64'000,000 kg con un consumo per cápita de 18.5 kg, razón por la cual se importan desde Norteamérica más de 56'000,000 kg y se introducen casi 9'000,000 kg de carne (OEIDRUS, 2016), principalmente desde el estado de Sonora, además de algunos animales en pie para su engorda y reproducción (CEIR, 2015).

Como puede observarse, la producción de carne de cerdo en el estado de Baja California, no es particularmente intensiva. Existen aproximadamente 214 granjas productoras de carne de cerdo, de las cuales alrededor del 70% son de traspatio mientras que el otro 30% presentan cierto grado de tecnificación (SEFOA, 2017).

1.3 Enfermedades reproductivas en cerdos

El grado de intensificación en la producción de carne de cerdo se ha correlacionado con la emergencia de nuevas enfermedades (Opriessnig et al., 2011), las cuales en ocasiones son endémicas y no producen signos clínicos muy notorios (Biernacka et al., 2016), sin embargo sí pueden producir pérdidas económicas importantes debido al manejo que se debe llevar a cabo para limitar / erradicar una enfermedad, la repetición de celos, las momificaciones y mortinatos, el pobre crecimiento de lechones así como el nacimiento de camadas pequeñas y/o débiles (Basto et al., 2004).

Existe una gran variedad de agentes infecciosos que afectan la productividad de la industria porcina a nivel mundial (CFSPH, 2018). Particularmente en el tracto reproductivo, las infecciones virales son las que producen mayor cantidad de pérdidas en la industria porcina, de los cuales, el Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino tipo 2 (PRRSV2), el Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2) y el Parvovirus Porcino (PPV) son con gran diferencia, los más comunes en Norteamérica (Kirkwood et al., 2012).

A partir del año 2005, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) elaboró un documento el cual es revisado periódicamente, donde se listan

enfermedades, infecciones e infestaciones de importancia a mundial, con el fin de estar en consonancia con la terminología utilizada por el Acuerdo sobre la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias de la Organización Mundial del Comercio al clasificar las enfermedades como riesgos específicos y otorgar a todas las enfermedades que formen parte de la lista el mismo grado de importancia en el comercio internacional. En dicha lista encontramos al virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (OIE, 2018).

Por su parte, en México se publicó se publicó en el Diario Oficial de la Federación el 4 de mayo de 2016, un acuerdo mediante el cual se dan a conocer las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos (SAGARPA, 2016). En dicho acuerdo se describen 3 grupos:

1. Grupo 1. Enfermedades y plagas que no se encuentran en el territorio nacional o que han sido erradicadas; y que por su rápida diseminación y afectación al sector y riesgo para la salud pública, son consideradas de notificación inmediata. En este grupo se incluye el síndrome reproductivo y respiratorio porcino tipo 1 (*Arterivirus* tipo 1, cepa europea).
2. Grupo 2: Enfermedades y plagas endémicas transmisibles que se encuentran en el territorio nacional; y que por sus efectos significativos en la producción pecuaria, comercio internacional, salud pública y por su importancia estratégica para las acciones de salud animal y sanidad acuícola en el país, son consideradas de notificación inmediata. En este grupo se incluyen el síndrome reproductivo y respiratorio porcino tipo 2 (*Arterivirus* tipo 2, cepa americana) y el síndrome de emaciación multisistémico posdestete (*Circovirus* tipo 2).
3. Grupo 3: Enfermedades y plagas que se encuentran presentes en el territorio nacional y son consideradas endémicas; y que por representar un riesgo menor desde el punto de vista epidemiológico, económico, de salud pública y de comercio nacional e internacional, son consideradas de notificación mensual. En este grupo se incluye el Parvovirus porcino (*Protoparvovirus*).

Anteriormente, en el año de 2007, únicamente el Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino estaba contemplado dentro el grupo 3 de este mismo acuerdo (SEGOB, 2007).

CAPÍTULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA Y BIBLIOGRAFÍA CITADA

2.1 VIRUS DEL SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO

2.1.1 Etiología

El Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRSV, *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus*) pertenece al virus del orden Nidovirales, familia Arteriviridae, género Porartevirus (Adams et al., 2017). Presentan una cadena simple, positiva de ARN, de 15.1 kb (Han et al., 2017), protegida por un núcleo pleomórfico de 39 nm (Dokland, 2011) y una envoltura lipídica con 7 tipos de proteínas GP2-GP5, GP5a, E y M, a las cuales debemos sumar otra proteína estructural interna, la proteína N (Snijder et al., 2013) y al menos 16 proteínas no estructurales (nsp, *non structural proteins*) (Fang et al. 2010). El genoma se muestra en la figura 1.

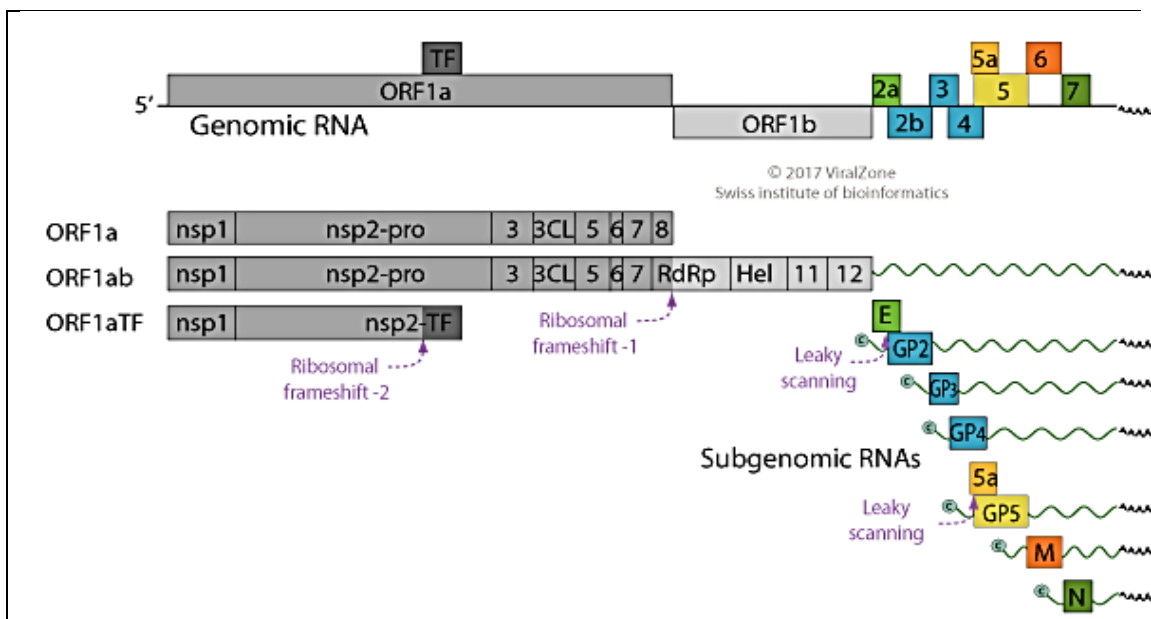


Figura 1. Genoma del virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino. Esquema tomado de: viralzone.expasy.org

Desde finales de la década de 1980 se reconocen dos tipos distintos de PRRSV, el Tipo 1 (Europeo, EU) representado por el genotipo Lelystad (LV) y el tipo 2 (Norteamericano, NA), representado por el genotipo VR-2332 (Dea et al., 1992), los cuales comparten 50-70% de nucleótidos y 50-80% de aminoácidos (Shi et al., 2010), sin embargo estructuralmente son similares (Murtaugh et al., 1995). En 2007, Tian y colaboradores, reportaron el aislamiento en China de un virus parecido al tipo 2, el cual fue denominado cepa de alta patogenicidad dada

la severidad de los signos; dicho virus está representado por la cepa JXA1. En 2017, Liu y colaboradores, compararon cada región del genoma completo de 4 cepas de alta patogenicidad aisladas en 2015, las cuales tenían una homología de más del 96% con 10 cepas del PRRSV tipo 2 (PRRSV2) y el JXA1, pero únicamente de 60% con el LV, siendo el lugar con mayor heterología la región del marco de lectura abierto 1 (ORF 1, *Open Reading Frame*) que codifica para la nsp2. La variación principal de las cepas de alta patogenicidad consiste en una supresión no continua de 30 aminoácidos de la nsp2 (Li et al., 2012).

2.1.2 Patogenia

La vía de entrada puede ser vertical, por aerosoles, a través de fluidos corporales, fómites e incluso es capaz de atravesar mucosas y piel intacta (Pileri and Mateu, 2016). Experimentalmente se ha demostrado la transmisión hacia otros cerdos a través del consumo de carne contaminada (van der Linden et al., 2003; Magar and Larochelle, 2004). En ambos genotipos la viremia se observa a las 12 horas post infección y el pico se encuentra a los 7-10 días post infección, una vez dentro el virus, éste llega a tejido linfóide infectando macrófagos sialoadhesina⁺ (Sn o CD169) y CD163⁺ (Mateusen et al., 2007) los cuales son receptores de membrana exclusivos de macrófagos de mamíferos (Van Gorp, 2008). Los signos clínicos incluyen distrés respiratorio, neumonía, fiebre, anorexia, conjuntivitis y bajo crecimiento (Li, 2016). En hembras no gestantes puede ser asintomático, causar pérdida de apetito o fiebre (Rossow, 1998), sin embargo, durante la gestación es capaz de atravesar la placenta e infectar el feto en desarrollo, aumentando el riesgo de aborto, partos prematuros, mortinatos (Karniychuk, 2013) y momificaciones (Olanratmanee 2015). En la necropsia se puede apreciar hiperplasia folicular en el bazo, linfonodos y tonsilas, así como reducción linfóide en el timo (Morgan, 2016), pues el tejido linfóide son las células blanco.

2.1.3 Epidemiología

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino es la enfermedad de mayor impacto económico en la industria porcina a nivel mundial, causando pérdidas mayores a los 664,000 millones de dólares en EUA (Holthkamp, 2013) y Europa

(Nieuwenhuis, 2012) ya que produce alta morbilidad y mortalidad en lechones (Lunney, 2010) además de las pérdidas que suponen la repetición de celos y la necesidad de hacer despoblaciones parciales o totales como medidas de control (Gonçalves, 2016). El PRRSV se transmite por saliva, secreciones nasales, orina, semen, leche y calostro (Pileri y Mateu, 2016) puede migrar a través de la placenta de cerdas infectadas, particularmente en el último trimestre de gestación (Karniychuk et al., 2011) resultando en mortalidad fetal y aumentando la proporción de lechones nacidos muertos por camada (Zimmerman et al., 2006). Cuando se introduce en hatos libres, puede alcanzar una mortalidad en lechones hasta del 69% (Young et al., 2010). El diagnóstico del PRRS es difícil debido a que los signos clínicos son comunes a diferentes enfermedades así como a la gran variabilidad genética de su genoma (Wang et al., 2017). Esta variabilidad genética es también la principal responsable del grado de protección desarrollado en animales vacunados contra el PRRSV, pues dicha protección está relacionada con el nivel de similitud genética y antigénica entre la cepa vacunal y la de campo (Kristensen et al., 2018). Los principales factores de riesgo que se han relacionado con el PRRS incluyen el tamaño del hato, la distancia entre hatos (Lambert et al., 2010), la introducción de animales reproductores (Martínez et al., 2002), la adquisición de semen, la falta de cuarentena (Jordá-Cravioto et al., 2010) la densidad poblacional y el tipo de confinamiento (Velasova et al., 2012). Actualmente se trata de una enfermedad ampliamente distribuida en el mundo, siendo Sudáfrica, uno de los países donde más recientemente se ha reportado la infección por primera vez con este virus (Mokoele, 2015). Por otro lado, países como Nueva Zelanda (Cobb 2015), Australia (Brookes, 2015) y Brasil (Rech, 2017) son considerados libres.

2.1.4 Diagnóstico

Además del aislamiento viral y la inmunocromatografía (Yang, 2017), los métodos diagnósticos más comúnmente utilizados son el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) y la transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR, *Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*) convencional, idealmente acompañados de la secuenciación (Fiebre, 2008).

El aislamiento viral se realiza en macrófagos alveolares porcinos (PAMs, *Porcine Alveolar Macrophages*), células que la mayoría de las cepas virales son capaces de infectar y en las que se pueden replicar (Wensvoort et al., 1993), a diferencia de las líneas celulares estándar de riñón de mono MA-104, en las que la infección es difícil (Kim et al., 1993).

La inmunocromatografía ha comenzado a utilizarse en tiras reactivas, herramienta que brinda una detección sencilla y rápida sobre el terreno a partir de tejido o suero. Las muestras se mezclan con anticuerpos monoclonales marcados con oro dirigidos a proteínas del PRRSV específicas, y forman complejos proteína-anticuerpo que quedan atrapados en las tiras (Global PRRS Solutions).

Para las pruebas de ELISA, existe comercialmente el kit de CIVTEST®SUIS PRRS E/S PLUS de Laboratorios HIPRA y el IDEXX PRRS OF Ab Test del laboratorio IDEXX, los cuales proporcionan una prueba indirecta de ELISA. Estos kits están diseñados para detectar anticuerpos contra PRRSV tipo 1 (CIVTEST) (HIPRA, 2018) y contra diversos tipos de cepas (IDEXX, 2018), ambos a partir de fluido oral y suero.

Las técnicas de RT-PCR permiten realizar diagnóstico para cualquier cepa de PRRSV, dependiendo de los oligonucleótidos utilizados para la reacción. Los fragmentos utilizados con mayor frecuencia son los que forman parte de la nucleocápside, los cuales se encuentran contenidos en el ORF7, ya que ésta es la proteína viral más conservada en células de cerdo infectados con PRRSV (King et al., 2016). Para poder llevar a cabo esta prueba es necesario purificar el ARN a partir de los tejidos, para posteriormente, mediante la adición de una transcriptasa, convertir el ARN en una cadena de ADN complementario y así poder llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (Lorenz, 2012).

Como se mencionó previamente, es deseable la secuenciación de las partículas virales encontradas. Actualmente el método de secuenciación más utilizado es la pirosecuenciación, pues es un método menos complejo y con un límite superior de detección que la degradación química desarrollada por Maxam y Gilbert así como por el método enzimático descrito por Sanger y colaboradores, ambas técnicas ampliamente utilizadas desde 1977. Durante la

pirosecuenciación se libera una molécula de pirofosfato al añadir un desoxirribonucleótido trifosfato al final de una cadena de ADN en formación, de esta manera conociendo la concentración y monitoreando ambas moléculas continuamente se puede determinar la secuencia (Harrington et al., 2013). En los últimos años se han desarrollado 4 técnicas llamadas de siguiente generación (NGS, *Next Generation Sequencing*), las cuales comprenden la Secuenciación Completa del Genoma (WGS, *Whole Genome Sequencing*), la Secuenciación Completa del Exoma (WES, *Whole Exome Sequencing*), la secuenciación del ARN (RNA-seq) y la secuenciación dirigida (Vera and Sharm, 2018).

2.1.5 El Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino en México

En México el primer reporte de la presencia del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino se realizó al encontrarse prevalencia serológica en cerdos importados desde EUA y Canadá (Milián et al., 1994), aunque el virus no fue aislado de granjas mexicanas sino hasta el año 2000 (Sierra, et al., 2000). En 2004, López y colaboradores realizaron un metaanálisis de las enfermedades de importancia económica en el sureste de México, reportando que el estado con mayor prevalencia para el virus del PRRS tipo 2, era el estado de Chiapas, con una prevalencia de 38%. En 2006, Rivera y colaboradores buscaron la presencia del PRRSV2 mediante serología en 140 unidades de producción porcina al sur de la ciudad de México, encontrando una prevalencia de 0.001%. Rovelo-Celorio y colaboradores, en 2008 encontraron una prevalencia de 36% de anticuerpos y 12% del antígeno viral en verracos de Yucatán. En 2013, se encontró una frecuencia viral de 16% en piaras del Estado de México, Guanajuato, Puebla y Veracruz (Carrera et al., 2013) así como 47% de antígeno de PRRS en órganos de cerdos con signos respiratorios en los estados de Hidalgo, Guanajuato, Puebla, Veracruz, Morelos, Jalisco, Michoacán, Estado de México, Oaxaca, Sonora, Yucatán, Ciudad de México, Guerrero, Coahuila y Tlaxcala (Galindo et al., 2013). En la actualidad el virus del PRRS tipo 2 se encuentra ampliamente diseminado en territorio nacional (Martínez-Bautista et al., 2018), sin embargo, aún existen estados en los que nunca se ha reportado su presencia, como es el caso de Baja California.

2.1.6 MATERIAL Y MÉTODOS

2.1.6.1 Tamaño y toma de muestra

Se realizó un estudio transversal por conveniencia en 25 granjas de 6 diferentes localidades del Estado de Baja California entre el verano de 2016 y el verano de 2017. Las granjas que decidieron participar se encuentran en las ciudades de Mexicali, Tecate, Tijuana y Ensenada, así como en los Valles de Mexicali y San Quintín.

Para detectar, con un nivel de confianza del 95%, si en una población de 10,315 cerdos (OEIDRUS, 2016) se encontraba al menos un animal infectado, asumiendo una prevalencia mínima esperada del 4.00%, se seleccionó una muestra con al menos 74 individuos (De Blas et al., 2006). La prevalencia esperada utilizada se eligió para obtener un tamaño de muestra de aproximadamente 100 muestras, dado que no hay estudios previos en el estado de Baja California para ninguna de las enfermedades evaluadas y hasta ahora es considerado libre de la presencia estos virus, sin embargo, aunque en el estado de Sonora se ha reportado una prevalencia de 95% para el PRRSV2 (Batista et al., 2010), al haber utilizado dicha prevalencia, el tamaño de muestra hubiera resultado de menos de diez individuos.

En total se colectaron aleatoriamente 97 muestras de sangre en tubos Vacutainer® con anticoagulante EDTA (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) a partir de la vena yugular de hembras y machos clínicamente sanos en diferentes estadios de producción. Adicionalmente se aplicó un cuestionario epidemiológico en el cual se tomaban en cuenta factores de riesgo tales como la introducción de animales en su hato, programas de vacunación y desparasitación, medidas de higiene, etc., (cuadro 1).

2.1.6.2 Procesamiento y almacenamiento de muestras de sangre

Las muestras de sangre fueron almacenadas en refrigeración a 4°C durante un período de 24 horas para permitir la sedimentación de los componentes sanguíneos y la formación de la capa leucoplaquetaria de forma natural. Posteriormente, se separó el plasma con una pipeta de 1000 µL, se depositó individualmente en tubos Eppendorf que fueron almacenados en congelación a

-20 °C. La capa leucoplaquetaria se obtuvo aspirando suavemente el paquete leucocitario empleando una pipeta de 200 µL, colectando un volumen de 200-300 µL para proceder inmediatamente a la extracción de ARN y, posteriormente realizar la prueba de RT-PCR en tiempo real para diagnóstico de PRRSV2.

Cuadro 1. Cuestionario aplicado a los productores.

NÚMERO CONSECUTIVO DE PRODUCTOR: _____	FECHA: _____		
MUNICIPIO: _____			
De las siguientes preguntas, favor de responder la opción que corresponda con su tipo de granja:			
Mi granja es:			
a. Cerrada	b. Abierta	c. Semiabierta	
Cantidad de sementales: _____			
Cantidad de vientres: _____			
Utiliza vacunación contra: _____			
¿Con qué desinfecta su material? _____			
¿Utiliza un área de cuarentena con enfermos? _____			
¿Utiliza un área de cuarentena con animales nuevos? _____			
Da tratamiento profiláctico en cambios de estación _____			
¿Hace desparasitaciones profilácticas? _____			
¿Con qué frecuencia? _____			
¿Realiza control de roedores? _____			
Tipo de fecundación que realiza:			
a. I. artificial	b. Monta natural	c. Ambas	
Adquiere sementales / pajillas de semen en:			
a. México	b. Extranjero	c. Reemplazo propio	
En el último año:			
¿Ha notado bajo porcentaje de fecundación? _____			
¿Ha disminuido el número de lechones vivos al nacimiento? _____			
¿Presenta mortalidad mayor al 30% antes del destete? _____			
¿Ha notado disminución en la libido de verracos? _____			
¿Ha presentado más de 30% de abortos? _____			
¿Ha presentado fetos momificados en más del 30% de los partos? _____			
¿Ha notado una disminución en el tamaño de camadas en el último año? _____			
¿Ha visto poco / lento crecimiento en lechones? _____			
¿Qué tipo signos de enfermedad han sido más comunes?:			
a. Respiratoria ()	b. Digestiva ()	c. Nerviosa ()	d. Otra () _____
¿Qué tipo de signos de muerte han sido más comunes?:			
a. Respiratoria ()	b. Digestiva ()	c. Nerviosa ()	d. Otra () _____
Comentarios adicionales: _____			

2.1.6.3 Extracción de ARN

Se extrajo el ARN a partir de las capas leucoplaquetarias utilizando el *AurumTM Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN fue reconstituido en un volumen final de 30 μ L en solución de elución proporcionada. Posteriormente el ARN fue almacenado a -70°C hasta la realización de las pruebas RT-PCR para diagnóstico de PRRSV2.

2.1.6.4 Diseño de oligonucleótidos para PRRSV

Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar un fragmento de 87 pares de bases (pb) del gen de la nucleocápside, contenido en el ORF7 (*Open Reading Frame 7*) del PRRSV2 (*GenBank* AF94042.1) que es la proteína viral más conservada en células de cerdos infectadas con PRRSV (King et al., 2016). El diseño se realizó utilizando los programas en línea *Primer3Plus* versión 2.4, disponible en <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi> y *OligoCalc* versión 3.2, disponible en <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.htm>, así como el programa *Gene Runner* versión 6.1. A partir de estos programas se construyeron y seleccionaron oligonucleótidos que cumplen con las características recomendadas por el fabricante del termociclador *BioRad* CFX96 utilizado en este estudio. Dichas características incluyen longitud de oligonucleótidos de 20 nucleótidos con un contenido de GC entre 50 y 60%, manteniendo una temperatura de fusión entre 50-65°C, evitar repeticiones >3 nucleótidos G o C continuos, verificar que las secuencias positiva y negativa no produzcan complementariedad, evitar la formación de dímeros u otro tipo de estructuras secundarias aberrantes y obtener el tamaño óptimo de producto en un rango de 75 a 200 bases, ya que los productos más pequeños desarrollan mayor eficiencia. Los oligonucleótidos generados fueron: PRRS-USA-F 5'-CGA TCC AGA CTG CCT TTA AC-3' y 5'-GCA AAC TAA ACT CCA CAG TG-3'. La amplificación con estos oligonucleótidos mediante RT-PCR genera un amplicon de 87 pares de bases. En el cuadro 2 se muestra el ORF 7, los oligonucleótidos sintetizados y el amplicon producido.

Cuadro 2. ORF7 de PRRSV2 completo resaltando el amplicon obtenido.

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate P129, complete genome.
GenBank: AF494042.1

ORF7 "nucleocapsid protein" 14873...15244 Amplicon: 87 pb (15,055-15,141)

NOTA: Aun cuando el número de *GenBank* muestra el genoma completo, debido a la extensión del mismo, aquí únicamente se muestra el ORF7, el cual es de 371 pb.

```
GCCAGTCAATCAGCTGTGCCAGATGCTGGGTAAAATCATCGCCCAGCAAACCAGTC
CAGAGGCAAGGGACCGGGCAAGAAAAGTAAGAAGAAAAACCCGGAGAAGCCCCATTT
TCCTCTAGCGACCGAAGATGACGTCAGGCATCACTTCACCCCTGGTGAGCGGCAATT
GTGTCTGTTCGT CGATCCAGACTGCCTTTAACCAGGGCGCTGGAACTTGTACCCTGTC
AGATTCAGGGAGGATAAGTTACACTGTGGAGTTTAGTTTGCCGACGCATCATACTGT
GCGCCTGATCCGCGTCACAGCATCACCCCTCAGCATGATGGGCTGGCATTCTTTAGGC
ACCTCAGTGTGAGAATTGGAAGAATGTGT
```

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por GenScript LTD (Piscataway, NJ, USA), empacados y enviados liofilizados. Cada uno fue reconstituido con agua grado biología molecular, centrifugándolos a máxima velocidad por 10 segundos; posteriormente, dentro de la campana de flujo laminar, se agregaron a cada tubo 10 veces el valor de la concentración en nano moles referida por el fabricante para obtener una concentración estándar de 100 micro molar (μM). Los tubos fueron mezclados en vórtex por 30 segundos a máxima velocidad, incubados en refrigeración a 4°C por 60 minutos y mezclados nuevamente a máxima velocidad en vórtex. Para el RT-PCR, la concentración de trabajo de los oligonucleótidos fue establecida en 10 μM para lo cual se realizó una dilución de la mezcla de la concentración estándar 1:10 en agua grado biología molecular, produciendo cinco alícuotas de 200 μl cada una. Las soluciones estándar y de trabajo de oligonucleótidos fueron almacenadas en congelación a -20°C hasta el momento de las pruebas. Las características de los oligonucleótidos se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3. Secuencias y características de los oligonucleótidos diseñados a partir del ORF 7 del PRRSV2.

Oligonucleótido: PRRS-USA-F		Oligonucleótido: PRRS-USA-R	
5'-CGATCCAGACTGCCTTTAAC-3'		5'-GCAAACCTAACTCCACAGTG-3'	
Inicio: 182	Tm: 53.4°C	Inicio: 269	Tm: 52.0°C
Longitud: 20 b	GC: 50%	Longitud: 20 b	GC: 45%

Producto: 87 pb

2.1.6.5 Optimización del ensayo de RT-PCR

Las condiciones del RT-PCR se optimizaron probando los oligonucleótidos por triplicado a 200 nM, 400 nM y 800 nM con 1 μ L, 2 μ L y 3 μ L de plantilla de ARN en un volumen total de 10 μ L empleando una mezcla maestra con EvaGreen (Biotium, Hayward, CA, USA). La mayor eficiencia se encontró al mezclar los oligonucleótidos a 800 nM con 2 μ L de plantilla de ARN. La sensibilidad analítica se determinó generando una curva estándar a partir de una dilución de 1:10, resultando en una eficiencia (E) de 97.6%, un coeficiente de determinación (R^2) de 0.996 y una pendiente entre resultados (*slope*) de 3.25 (Figura 2).

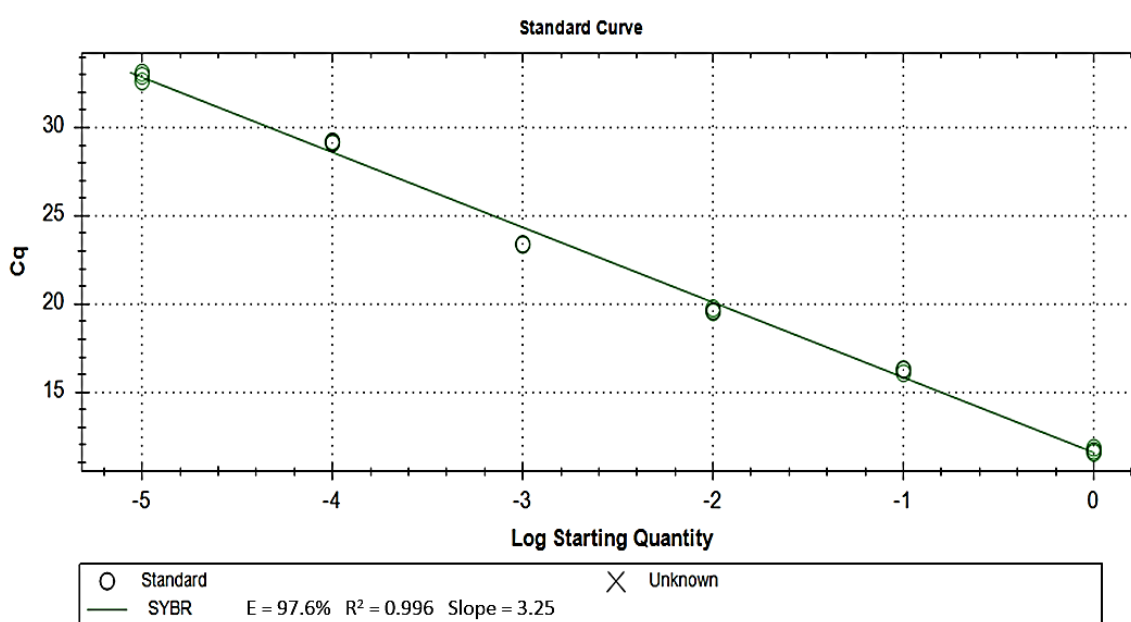


Figura 2. Determinación de la curva estándar de los oligonucleótidos diseñados.

2.1.6.6 RT-PCR

El control positivo de ARN viral se extrajo de la vacuna Ingelvac PRRS® MLV (Boehringer Ingelheim), como control negativo se utilizaron la mezcla maestra sin ARN, agua grado molecular y aire. Todas las muestras y controles se probaron por duplicado. Las reacciones de RT-PCR se realizaron en un termociclador de tiempo real CFX96 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA); para cada reacción se utilizó 1 μ L de ARN, 800 nM de cada oligonucleótido y mezcla maestra *iScript One Step*, RT-PCR con tinción EvaGreen (Biotium, Hayward, CA, USA) y agua grado molecular para un total de 10 μ L por reacción (Cuadro 4). Las condiciones del termociclador se calcularon usando el *software* CFX y

resultaron en: un paso inicial a 50°C por 10 min para transcripción reversa, 95°C por 3 min para desnaturalización y 40 ciclos de 95°C por 15 s para desnaturalización, 53.7°C por 25 s para hibridación y 72°C por 20 s para extensión. Cada corrida incluyó el análisis de la curva de disociación para confirmar la temperatura de fusión del fragmento de ADN amplificado, calculada en 77.4°C a 78.9°C. Las muestras positivas fueron confirmadas mediante secuenciación en un laboratorio externo.

Cuadro 4. Reactivos y volumen de reacción para el RT-PCR en tiempo real de PRRSV2.

Reactivo	800 nM	
	1 reacción	60 reacciones
Mezcla maestra	5 µL	300 µL
ARN	2 µL	2 µL individual
Transcriptasa reversa	0.125 µL	7.5 µL
<i>Forward</i>	1.0 µL	60 µL
<i>Reverse</i>	1.0 µL	60 µL
Agua	1 µL	60 µL
Volumen final	10 µL	487.5 µL (más el ADN individual)

2.1.6.7 Interpretación de resultados de RT-PCR

Los resultados de las pruebas por RT-PCR se consideraron como positivos cuando la muestra correspondiente alcanzó una señal fluorescente de amplificación por encima de la línea umbral del control negativo de referencia en un máximo de 40 ciclos (Walker, 2002) y dentro de la temperatura previamente calculada de 77.4-78.0°C. Los resultados fueron considerados negativos cuando la muestra correspondiente no logró desarrollar una señal fluorescente de amplificación por encima de la línea umbral del control negativo de referencia en un máximo de 40 ciclos.

2.1.6.8 Comprobación de PRRSV2 mediante secuenciación

Las muestras que resultaron positivas fueron enviadas a un laboratorio externo en EEUU. Los resultados fueron comparados con los genomas reportados en la base de datos BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) disponible en: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Previo a su envío, se consultó la página oficial de USDA (*United States Department of Agriculture*) donde está publicada la “Guía para importación #1114 (*Recombinant Microbes and their Products*)”, en la cual se establece que solamente es necesario un permiso de importación para el material que suponga un riesgo de introducción de enfermedades con potencial epizootico en ganado y que además, sean exóticas en los EEUU. Ninguna de las enfermedades revisadas en este estudio son exóticas para los EEUU, sin embargo, en la misma guía se menciona que es necesario un oficio, así como una carta anexa a la documentación de envío donde se exponga el nombre o descripción del producto, incluyendo su descripción genética y declarando que no incluye aditivos animales tales como albúmina.

Una vez lista la documentación, se realizó una prueba de electroforesis en un gel de agarosa para asegurar que se formaba una sola banda, la cual confirma que el producto llevaría sólo una cadena de nucleótidos para su secuenciación, ya que los productos de RT-PCR obtenidos no fueron purificados en nuestro laboratorio, se enviaron 10 µL del producto de PCR a una concentración de 50 ng/µL, contenidos en tubos para PCR sellados con papel parafilm con la finalidad de evitar derrames, evaporación y contaminación. Las muestras iban perfectamente etiquetadas tanto en los tubos como en la hoja de solicitud de Eurofins Genomics® (Chicago, IL, USA) y los oficios para el USDA.

2.1.6.9 Análisis de factores de riesgo

Los datos obtenidos mediante los cuestionarios fueron analizados con el software Statistix 9.0, con el cual se compararon las diferentes características entre las granjas y entre individuos. Posterior a ello se realizó la prueba de Chi cuadrada con corrección de Yates.

2.1.7 RESULTADOS

De las 97 muestras obtenidas, 9 de ellas resultaron positivas (9.3%) a PRRSV2, correspondiendo con 7/25 granjas en 4/6 regiones muestreadas, En Tijuana encontramos una prevalencia de 33%, en el Valle de San Quintín 16%,

en Mexicali 12% y en Ensenada 3%. En el cuadro 5 se detalla la cantidad de animales positivos a PRRSV2 en relación con las muestras obtenidas en cada una de las granjas de cada localidad.

Cuadro 5. Relación de animales positivos y animales muestreados por granja en cada localidad.

Localidad	Granjas muestreadas								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tijuana	2/3	0/3	-	-	-	-	-	-	-
VSQ*	1/1	1/1	1/3	0/1	0/1	0/2	0/2	0/3	0/4
Mexicali	2/5	1/5	0/2	0/3	0/4	0/8	-	-	-
Ensenada	1/9	0/3	0/4	0/4	0/7	-	-	-	-
Tecate	0/6	0/7	-	-	-	-	-	-	-
VM**	0/3	0/3	-	-	-	-	-	-	-

*Valle de San Quintín

**Valle de Mexicali

En las figuras 3A y 3B se muestra gráficamente varios resultados de RT-PCR en tiempo real, donde se aprecia un conjunto de reacciones y se resalta la amplificación de una muestra positiva a PRRSV2 al amplificarse durante el ciclo 26 (A) y con un pico máximo de fusión a los 78.0°C (B).

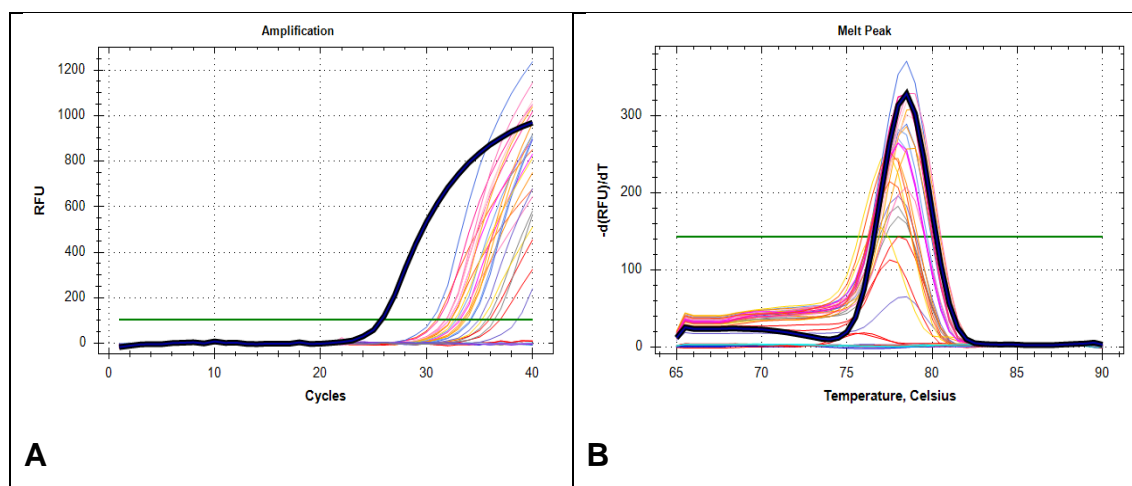


Figura 3. Gráfica de una muestra positiva a PRRSV2 mediante RT-PCR en tiempo real.

2.1.7.1 Estudio de secuenciación

Todas las muestras secuenciadas fueron confirmadas comparando los nucleótidos obtenidos en la base de datos BLAST. En estas comparaciones se observó una similitud del 100% con múltiples cepas reportadas de PRRSV2. En la figura 4 se muestra la captura de pantalla de un resultado comparativo entre un amplicon obtenido en nuestro estudio y la base de datos de BLAST, en éste

se aprecia la similitud del 100% con varias cepas del PRRSV2 en su región de la nucleocápside (ORF7). La secuencia particular de este amplicon utilizado fue: AAGTTACTGTGGAGTTTAGTT.

2.1.7.2 Análisis de factores de riesgo

Luego de analizar los cuestionarios con la prueba de Chi cuadrada con corrección de Yates, todos los factores de riesgo evaluados obtuvieron un valor de $p > 0.05$, lo cual indica que no son significativos estadísticamente, razón por la cual no se muestran los resultados de la razón de momios. Estos valores se muestran en el cuadro 6.

The screenshot shows the BLAST interface with the following details:

- BLAST** » **blastn suite** » **RID-15AWTBFR014**
- Home Recent Results Saved Strategies Help
- BLAST Results**
- Your search parameters were adjusted to search for a short input sequence.
- Job title: **Nucleotide Sequence (23 letters)**
- RID: 15AWTBFR014 (Expires on 12-15 01:57 am)
- Query ID: lcl|Query_201027
- Description: None
- Molecule type: nucleic acid
- Query Length: 23
- Database Name: nr
- Description: Nucleotide collection (nt)
- Program: BLASTN 2.8.1+ > Citation
- Other reports: Search Summary [Taxonomy reports] [Distance tree of results] [MSA viewer]
- Buttons: **New** Designing or Testing PCR Primers? Try your search in Primer-BLAST. **Go**
- Graphical Summary (expanded)
- Descriptions (expanded)
- Sequences producing significant alignments:
- Select: All None Selected: 0
- Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus 2 strain P/MZLT-148 N protein gene, compl	46.1	46.1	100%	0.007	100%	MG963163.1
<input type="checkbox"/> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate sdbz04 nucleocapsid protein (N), ger	46.1	46.1	100%	0.007	100%	MG922947.1
<input type="checkbox"/> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate sdx11 nucleocapsid protein (N), gen	46.1	46.1	100%	0.007	100%	MG922946.1
<input type="checkbox"/> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate sdsq09 nucleocapsid protein (N), ger	46.1	46.1	100%	0.007	100%	MG922944.1
<input type="checkbox"/> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate sdlz02 nucleocapsid protein (N), gen	46.1	46.1	100%	0.007	100%	MG922943.1
<input type="checkbox"/> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate sdc05 nucleocapsid protein (N), gen	46.1	46.1	100%	0.007	100%	MG922941.1
<input type="checkbox"/> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate adaq06 nucleocapsid protein (N), ger	46.1	46.1	100%	0.007	100%	MG922939.1
<input type="checkbox"/> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate sdaq01 nucleocapsid protein (N), ger	46.1	46.1	100%	0.007	100%	MG922938.1
<input type="checkbox"/> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate lnzd03 nucleocapsid protein (N), gen	46.1	46.1	100%	0.007	100%	MG922937.1
<input type="checkbox"/> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate lnzd02 nucleocapsid protein (N), gen	46.1	46.1	100%	0.007	100%	MG922936.1

Figura 4. Resultados de la comparación del amplicon obtenido donde se muestra el 100% de similitud con cepas del PRRSV2.

Cuadro 6. Valor p luego del análisis de factores de riesgo mediante prueba de Chi cuadrada con corrección de Yates.

Factor de riesgo	Valor de p comparando entre individuos	Valor de p comparando entre granjas
Granjas abiertas	0.0909	0.2969
No vacuna	1.0000	1.0000
No desinfecta material	0.9224	1.0000
No utiliza área de cuarentena	1.0000	1.0000
Insemina con semen externo (local)	1.0000	1.0000

2.2 CIRCOVIRUS PORCINO

2.2.1 Etiología

El Circovirus Porcino (PCV, *Porcine Circovirus*) está clasificado dentro del Género Circovirus, en la Familia Circoviridae (Meng, 2013). Fue reportado por primera vez como contaminante de líneas celulares PK-15 de riñón de cerdo en 1974 (Tischer et al., 1974). Fue hasta 1997 que este virus se aisló a partir de cerdos que presentaban una enfermedad debilitante, demostrándose su patogenicidad y dividiendo la especie en dos genotipos, PCV tipo 1 y tipo 2, de los cuales el PCV tipo 2 (PCV2) se ha reconocido como patógeno (Allan et al., 1998). Posteriormente se han reconocido 3 genotipos del PCV2, denominados PCV2a, PCV2b y PCV2c (Guo et al., 2011). El PCV2 presenta una cadena simple de ADN circular de 1.7 kb dentro de una cápside, con un genoma que presenta 2 ORF, de los cuales el ORF1 codifica para la proteína replicasa y el ORF2 para la cápside (Meng, 2013). En 2015, se detectó en EEUU mediante secuenciación metagenómica un Circovirus porcino nuevo, denominado PCV3 (Shen et al., 2018), el cual fue asociado con el síndrome de dermatitis nefropatía porcino, falla reproductiva (Palinski et al., 2016), falla cardíaca e inflamación multisistémica (Phan et al., 2016).

2.2.2 Patogenia

La vía natural de transmisión para el PCV2 es la oronasal, aunque experimentalmente se ha infectado cerdos por vía intramuscular e intrauterina (Segalés, 2012), infectando todo el organismo y siendo excretado por secreciones orales, respiratorias, orina y heces fecales (Opriessnig et al., 2007). Al ingresar al organismo, el virus es introducido dentro de células dendríticas mediante fagocitosis o endocitosis, lo cual se manifiesta con una menor producción y secreción de citosinas que en animales no infectados, facilitando así su transmisión a todo el organismo (Wang et al., 2017). Hay evidencia de replicación tanto en células linfoides de sangre periférica como en linfonodos bronquiales de cerdos infectados, lo cual produce depleción de este tejido y su reemplazo por tejido histiocítico (Meng, 2013), hígado, riñones, o intestinos (Gillespie et al., 2009). Los signos clínicos más comunes son debilidad, aumento

de mortalidad o de signos respiratorios, lesiones histológicas en tejido linfoide así como depleción linfoide (Opriessnig y Halbur, 2013).

2.2.3 Epidemiología

Como se mencionó previamente, la infección por PCV2 ha sido vinculada con una enfermedad debilitante principalmente en lechones, a esta enfermedad se le llamó síndrome de emaciación multisistémico post destete (PMWS, *Porcine Multisystemic Wasting Syndrome*), sin embargo, al ser un signo clínico que incluye diferentes agentes infecciosos, ambientales, nutricionales y de manejo, actualmente se utiliza el término Enfermedad Sistémica por Circovirus Porcino (PCV-SD, *Porcine Circovirus Systemic Disease*) (Alpizar et al., 2018). A este virus también se le reconoce como un agente necesario para el desarrollo de un complejo de enfermedades llamadas Enfermedades Asociadas al Circovirus Porcino (PCVAD, *Porcine Circovirus Associated Disease*), aunque por sí solo no es capaz de producir infección (Anoopraj et al., 2015). Su transmisión se lleva a cabo mediante secreciones oronasales, heces fecales, orina, calostro, leche y semen (Patterson et al., 2011). Del mismo modo que el diagnóstico del PRRS, el diagnóstico de PCV2 es difícil puesto que los signos clínicos son comunes a diferentes enfermedades, además de la variabilidad genética de su genoma (Wang et al., 2017). Las vacunas se consideran la manera más efectiva de prevenir la enfermedad, ya que aunque no limitan la infección, sí disminuyen la diseminación y presencia de signos clínicos (Feng et al., 2014), de tal manera que la ausencia de vacunación, la alimentación con bazofoia o el contacto con granjas vecinas son factores importantes en la diseminación del agente patógeno (Monger et al., 2014), así como el uso de corrales muy grandes en el área de destete y la coinfección con Parvovirus Porcino o PRRSV son considerados factores de riesgo en la detonación de la infección por PCV2 (Rose et al., 2003). En la actualidad, la presencia del Circovirus Porcino tipo 2 ha sido reportada prácticamente en todos los países productores de carne de cerdo (Afolabi et al., 2017).

2.2.4 Diagnóstico

El diagnóstico debe realizarse tomando en cuenta tanto los signos clínicos como las “pruebas de oro” para el diagnóstico de PCV, siendo estas pruebas la detección del antígeno viral o del ácido nucleico ya sea mediante PCR, inmunohistoquímica o hibridación *in situ* (Opriessnig et al., 2007), sin embargo son de mucha utilidad los ensayos de tipo ELISA, inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa de monocapa para IgM, ensayos de neutralización viral en suero, aislamiento viral y microscopía electrónica (Afolabi et al., 2017).

2.2.5 El Circovirus Porcino en México

El Circovirus Porcino tipo 2 fue aislado en Norteamérica en 1997 (Allan, 2000) y específicamente en México en 2004 (Ramírez et al., 2004) sin embargo, con ayuda de bancos de sueros porcinos, se encontró evidencia de anticuerpos en México contra PCV2 desde la década de los 1970's (Ramírez-Mendoza et al., 2009). A partir de entonces se han realizado estudios serológicos en diferentes estados de la República Mexicana, encontrando presencia de anticuerpos contra PCV2 en 98% de granjas de traspatio en la Ciudad de México (Ramírez-Mendoza, 2007), y 22% de prevalencia en pulmones de cerdos colectados en rastros TIF (Tipo Inspección Federal) en el Estado de México (Montiel y Sahagún, 2008). Por su parte, Gutiérrez y colaboradores (2007a) reportaron una seropositividad del 100% en animales en finalización provenientes de Jalisco, Guanajuato y Michoacán, así como 97% de seropositividad en más de 1,200 sueros provenientes de 11 estados de la República Mexicana (2007b). Para 2012, Robles-González y colaboradores analizaron más de 3500 muestras de diferentes tejidos de cerdos provenientes de 10 de los estados con mayor producción de carne de cerdo mediante la técnica de PCR, encontrando presencia del virus en al menos el 90% de las zonas estudiadas. Actualmente se ha reportado la presencia de los genotipos PCV2a y PCV2b en granjas de Sonora, Jalisco, Veracruz, Estado de México e Hidalgo (Bedolla et al., 2018) sin embargo, aún no existen estudios que determinen la prevalencia del PCV2 a nivel nacional (Alpízar et al., 2018).

2.2.6 MATERIAL Y MÉTODOS

2.2.6.1 Tamaño y toma de muestras

Las características de tamaño y toma de muestra, así como el procesamiento y almacenamiento de las muestras de sangre son las mismas descritas previamente en el apartado de PRRS.

2.2.6.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó utilizando los reactivos *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN extraído se reconstituyó en un volumen final de 50 µL empleando la solución de rehidratación suministrada. El ADN de las muestras también fue congelado a -70°C para el posterior diagnóstico de PCV2.

2.2.6.3 Oligonucleótidos para PCV2

Los oligonucleótidos utilizados para el diagnóstico de PCV2 fueron los reportados por Laroche y colaboradores (1999) a partir del ORF2: PCV2F 5'-TAG GTT AGG GCT GTG GCC TT-3' y PV2R: 5'-CCG CAC CTT CGG ATA TAC TG-3', los cuales producen un amplicon de 264 pares de bases. Estos oligonucleótidos fueron ordenados a ADN Sintético SA PI de CV (Guanajuato, México), siendo reconstituídos y conservados de la misma manera descrita para los oligonucleótidos para el diagnóstico de PRRSV. En el cuadro 7 se muestra el genoma completo del PCV2, resaltando el amplicon obtenido con los oligonucleótidos utilizados.

2.2.6.4 PCR en punto final para diagnóstico de PCV2

Las muestras se concentraron en 17 grupos de 5 individuos. La reacción de PCR se llevó a cabo en una mezcla de 20 µL que contenía 75 mM Tris-HCl (pH 8.8), 20 mM de sulfato de amonio, 0.01% Tween 20, 1.5 mM de cloruro de magnesio, 200 µM de dNTPs, 7.5% de DMSO, 1.25 unidades de ADN polimerasa, 5 pmol de oligonucleótidos y 1 ng del extracto viral. La amplificación se realizó en un termociclador S1000™ de BIO-RAD con 30 ciclos de 94°C por

1 minuto, 60°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto. Al terminar la reacción se llevó a cabo un paso final de extensión de 7 minutos a 72°C. Finalmente se comprobaron los productos del PCR mediante electroforesis utilizando alícuotas de 10 µL a través de un gel de agarosa al 3% en 0.5 x TAE, considerándose como positivas los grupos donde se evidenciaba un fragmento amplificado de 264 pb.

Cuadro 7. Genoma completo de PCV2 resaltando el amplicon obtenido.

Porcine Circovirus 2 strain pmws PCV, complete genome.	
GenBank: AF027217.1	
ORF2 "capside protein" 1322...1586	Amplicon: 264 pb (1322-1586)
<p>ACCAGCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCACCTCAGCAGCAACATGCCCA GCAAGAAGAATGGAAGAAGCGGACCCCAACCACATAAAAGGTGGGTGTTACGCTGA ATAATCCTTCCGAAGACGAGCGCAAGAAAATACGGGAGCTCCCAATCTCCCTATTTG ATTATTTTATTGTTGGCGAGGAGGGTAATGAGGAAGGACGAACACCTCACCTCCAGG GGTTCGCTAATTTTGTGAAGAAGCAAACCTTTTAATAAAGTGAAGTGGTATTTGGGTG CCCGCTGCTACATCGAGAAAGCCAAAGGAAGTATCAGCAGAATAAAGAATATTGCA GTAAAGAAGGCAACTTACTTATTGAATGTGGAGCTCCTCGATCTCAAGGACAACGGA GTGACCTGTCTACTGCTGTGAGTACCTTGTGGAGAGCGGGAGTCTGGTGACCGTTG CAGAGCAGCACCTGTAAACGTTTGTGAGAAATTTCCGCGGGCTGGCTGAACCTTTGA AAGTGAGCGGGAAAATGCAGAAGCGTGATTGGAAGACCAATGTACACGTCATTGTGG GGCCACCTGGGTGTGGTAAAAGCAAATGGGCTGCTAATTTTGCAGACCCGAAACCA CATACTGGAAACCACCTAGAAACAAGTGGTGGGATGGTTACCATGGTGAAGAAGTGG TTGTTATTGATGACTTTTATGGCTGGCTGCCGTGGGATGATCTACTGAGACTGTGTG ATCGATATCCATTGACTGTAGAGACTAAAGGTGGAAGTGTACCTTTTTTGGCCCGCA GTATTCTGATTACCAGCAATCAGACCCCGTTGGAATGGTACTCCTCAACTGCTGTCC CAGCTGTAGAAGCTCTCTATCGGAGGATTACTTCCCTTGGTATTTTGGAGAATGCTA CAGAACAATCCACGGAGGAAGGGGGCCAGTTCGTCACCCTTTCCCCCCATGCCCTG AATTTCCATATGAAATAAATTACTGAGTCTTTTTTATCACTTCGTAATGGTTTTTAT TTTTCATTTAGGGTTTAAGTGGGGGTCTTTAAGATTAATTCTCTGAATTGTACAT ACATGGTTACACGGATATTGTAGTCTGGTCGTATATACTGTTTTCGAACGCAGTGC CGAGGCCTACGTGGTCCACATTTCTAGAGGTTTGTAGCCTCAGCCAAAGCTGAGTCC TTTTGTTATTTGGTTGGAAGTAATCAATAGTGGAGTCAAGAACAGGTTTGGGTGTGA AGTAACGGGAGTGGTAGGAGAAGGGTTGGGGGATTGTATGGCGGGAGGAGTAGTTA CATATGGGTCA TAGGTTAGGGCTGTGGCCTT TGTTACAAAGTTATCATCTAGAATAA CAGCAGTGGAGCCCCTCCCTATCACCTGGGTGATGGGGGAGCAGGGCCAGAATT CAACCTTAACCTTTCTTATTCTGTAGTATTCAAAGGGTATAGAGATTTTGTGGTCC CCCCTCCCGGGGAACAAAGTCGTC AATATTAATCTCATCATGTCCACC GCCCAGG AGGGCGTTCTGACTGTGGTAGCCTTGACAGTATATCCGAAGGTGCGG GAGAGGCGGG TGTTGAAGATGCCATTTTTCTTCTCCAACGGTAGCGGTGGCGGGGGTGGACGAGCC AGGGGCGGCGGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCGGGGCGGTGTCTTCTTCTGC GGTAACGCCTCCTTGATACGTCATAGCTGAAAACGAAAGAAGTGCCTGTAAGTAT T</p>	

2.2.7 RESULTADOS

Tres de los 17 grupos evaluados mostraron amplificación con los oligonucleótidos utilizados. En los 3 grupos positivos se encontraban muestras de las ciudades de Mexicali, Ensenada, Tecate y Tijuana, así como del Valle de San Quintín. El único lugar de muestreo que no estuvo presente en ninguna reacción positiva fue el Valle de Mexicali. En la figura 5 se muestra la fotografía de un gel de agarosa luego de la PCR y electroforesis, evidenciando una banda de 246 pb, lo cual es indicativo de una muestra positiva a PCV2.

2.3 BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ, Harrach B, Harrison RL, Knowles NJ, Kropinski AM, Krupovic M, Kuhn JH, Mushegian AR, Nibert M, Sabanadzovic S, Sanfaçon H, Siddell SG, Simmonds P, Varsani A, Zerbini FM, Gorbalenya AE, Davison AJ. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). *Arch Virol*. 2017;162:2505-2538. doi: 10.1007/s00705-017-3358-5.
2. Allan GM, Ellis JA. Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest*. 2000;1:3-14. doi: 10.1177/104063870001200102.
3. Anónimo. Statistix 9.0 Analytical Software. Borland International. Tallahassee FL, USA. Disponible en: <http://www.statistix.com/> Consultado el 20 de diciembre de 2017.
4. Anoopraj R, Rajkhowa TK, Cherian S, Arya RS, Tomar N, Gupta A, Ray PK, Somvanshi R, Saikumar G. Genetic characterization and phylogenetic analysis of PCV2 isolates from India: indications for emergence of natural inter-genotypic recombinants. *Infect Genet Evol*. 2015;31:25–32. doi: 10.1016/j.meegid.2015.01.006.
5. Afolabi KO, Iweriebor BC, Okoh AI, Obi LC. Global Status of Porcine Circovirus Type 2 and Its Associated Diseases in Sub Saharan Africa. *Adv Virol*. 2017;6807964:1-16. doi: 10.1155/2017/6807964.
6. Allan GM, Mc Neilly F, Kennedy S, Daft B, Clarke EG, Ellis JA, Haines DM Meehan BM, Adair BM. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J Vet Diagn Invest*. 1998;10(1):3-10.
7. Alpízar A, Segalés J, Martínez S, Martínez A, Socci G, Córdova D, Fajardo R. Histopathological and virological findings in emaciated pigs from Mexico: an exploratory study. *Acta Vet Brno*. 2018;87:213-217. doi: 10.2754/avb201887030213.
8. Basto, EG, Williams JJ, Alzina LA, Pech MV. Determinación del costo de desecho de marranas de auto reemplazo seropositivas a PRRS en una granja del estado de Yucatán. *Tec Pec Mex*. 2004;42:295-301.
9. Batista L, Fernández M, Miramontes J, Pliego R, Mondaca E. Advancing PRRS area regional control in the state of Sonora, Mexico. Proceedings 21st International Pig Veterinary Society Congress, Vancouver, Canada, pp.274. 2010.
10. Bedolla LF, Trujillo OME, Mendoza ES, Quintero RV, Alonso MR, Ramírez-Mendoza H, Sánchez-Betancourt JI. Identification and genotyping of porcine Circovirus type II (PCV2) in Mexico. *Virus Dis*. 2018;29(3):385-389. Doi:10.1007/s13337-018-0460-6.
11. Biernacka K, Karbowiak P, Wróbel P, Chareza T, Czopowicz M, Balka G, Goodell C, Rauh R, Stadejek T. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and influenza A virus (IAV) in oral fluid of pigs. *Res Vet Sci*. 2016;109:74–80. doi: 10.1016/j.rvsc.2016.09.014.
12. Boada LD, Henríquez-Hernández LA, Luzardo OP. The impact of red and processed meat consumption on cancer and other health outcomes: Epidemiological evidences. *Food Chem Toxicol*. 2016;92:236-244. doi: 10.1016/j.fct.2016.04.008.

13. Brookes VJ, Hernández-Jover M, Holyoake P, Ward MP. Industry opinion on the likely routes of introduction of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome into Australia from south-east Asia. *Aust Vet J.* 93(1-2):13-19. doi: 10.1111/avj.12284.
14. Carrera SE, Socci EG, Diosdado VF, Martínez LA, Coba AMA, Zapata SE, Identificación del virus del síndrome disgenésico y respiratorio porcino mediante RT-PCR en granjas de diferentes estados. XLIX Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, Veracruz, México, pp. 43. 2013.
15. CEIR (Centro de Extensión e Innovación Rural Noroeste). Agenda de innovación cadena porcinos del GEIT pecuario Mexicali en el Estado de Baja California. 2015. Disponible en: http://www.extensionismo.mx/sermexicano/docs/geit/201603142_10201.pdf Consultado el 13 de mayo de 2018.
16. CFSPH (The Center for Food Security & Public Health). Swine Diseases and Resources. *Iowa State University of Science and Technology.* Publicado en 2018. Disponible en: <http://www.cfsph.iastate.edu/Species/swine.php> Consultado el 20 de junio de 2018.
17. Cobb SP, Pharo H. Stone M, Groenendaal H, Zagmutt FJ. Quantitative risk assessment of the likelihood of introducing porcine reproductive and respiratory syndrome virus into New Zealand through the importation of pig meat. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 2015;34(3):961-975.
18. De Blas I, Ruiz-Zarzuela I. Vallejo A. WinEpi: Working In Epidemiology. An Online Epidemiological Tool. Page in Proceedings of the 11th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics, Cairns, Australia. 2006. Disponible en <http://www.winepi.net/>
19. Dea S, Bilodeau R, Athanassious R, Sauvageau R, Pierre Martineau G. Swine reproductive and respiratory syndrome in Quebec: isolation of an enveloped virus serologically-related to Ielystad virus. *Can Vet J.* 1992;33(12):801-802.
20. DIEES (Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial). Panorama Agroalimentario: Carne de bovino 2017. *Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura.* México, 2017. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200639/Panorama_Agroalimentario_Carne_de_bovino_2017__1_.pdf Consultado el 24 de enero de 2018.
21. DIEES (Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial). Panorama Agroalimentario: Carne de cerdo 2017. *Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura.* México, 2017. Disponible en: <http://www.ugrpg.org.mx/pdfs/Panorama%20Agroalimentario%20Carne%20de%20Cerdo%202017.pdf> Consultado el 24 de enero de 2018.
22. Dokland T. The structural biology of PRRSV. *Virus Res* 2011;154:86–97.
23. Fang Y, Snijder E. The PRRSV replicase: Exploring the multifunctionality of an intriguing set of nonstructural proteins. *Virus Res.* 2010;154:61-76.
24. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). Consumo de Carne. Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor.

- Producción y Sanidad Animal. 2014. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/background.html> Consultado el 2 de febrero de 2018.
25. FAS (Foreign Agricultural Service). Livestock and Poultry: World markets and trade. *United States Department of Agriculture*. USA 2017. Disponible en: https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf Consultado el 20 de enero de 2018.
 26. Feng H, Blanco G, Segalés J, Sibila M. Can Porcine Circovirus type 2 (PCV2) infection be eradicated by mass vaccination? *Vet Microbiol*. 2014;172(1-2):229-234. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.05.003.
 27. Fiebre, Q. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de la Vacunas para los Animales Terrestres (mamíferos, aves y abejas). Volumen II. Capítulo 2.6.5. Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino. *Organización Mundial de Sanidad Animal* 5ª ed. 2004. Disponible en: <http://www.oie.int/doc/ged/d6509.pdf> Consultado el 14 de febrero de 2017.
 28. Galindo CLM, Sotomayor GA, Trujillo OME, Sánchez BJI. Frecuencia de muestras positivas al virus del síndrome respiratorio y reproductivo del cerdo (PRRS) con la técnica de RT-PCR en muestras tomadas en 15 estados de la República Mexicana. XIX Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, Veracruz, México, pp.69. 2013.
 29. Gillespie J, Opriessnig T, Meng XJ, Pelzer K, Buechner-Maxwell V. Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. *J Vet Intern Med*. 2009;23(6):1151-1163. doi: 10.1111/j.1939-1676.2009.0389.x.
 30. Global PRRS Solutions. Detección de virus de PRRS. Boehringer Ingelheim. Disponible en: <https://www.prrs.com/es/prrs-enfermedad/diagnostico-prrs/deteccion-virus-prrs/> Consultado el 7 de mayo de 2018.
 31. Gonçalves AA, Friendship R, Carpenter J, Greer A, Poljak Z. Evaluation of control strategies for porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in swine breeding herds using a discrete event agent-based model. *PLoS ONE*. 2016;11(11):e0166596. doi: 10.1371/journal.pone.0166596.
 32. Guo L, Lu Y, Wei Y, Huang L, WuH, Changming L. Porcine circovirus genotype 2a (PCV2a) and genotype 2b (PCV2b) recombinant mutants showed significantly enhanced viral replication and altered antigenicity *in vitro*. *Virology*. 2011;419(2):57-63. doi: 10.1016/j.virol.2011.08.004.
 33. Gutiérrez DR, Carreón NR, Mercado C, Milo R, Hernández LJ, Castillo JH, Segalés J, Ramírez MH, Montiel OV. Seroprevalencia de Circovirus Porcino tipo 2 en diferentes estados de la República Mexicana. XLIII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, Sinaloa, México, pp. 66. 2007a.
 34. Gutiérrez DR, Carreón NR, Sánchez JI, Segalés J, Ramírez MH. Comparación serológica de anticuerpos frente a PCV2 en rastros del Bajío Mexicano en los años 1998 y 2007. XLIII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, Sinaloa, México, pp. 67. 2007b.

35. Han M, Hanzhong K, Yijun D, Qingzhan Z, Yoo D. Reverse Genetics for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Methods Mol Biol.* 2017;1602:29-46.
36. Harrington CT, Lin EI, Olson MT, Eshleman JR. Fundamentals of Pyrosequencing. *Arch Pathol Lab Med.* 2013;137(1296-1303). doi: 10.5858/arpa.2012-0463-RA.
37. Hipra. Manual de CIVTEST SUIS PRRS E/S PLUS. 2018. Disponible en: https://www.hipra.com/wcm/connect/hipra/e18692f3-335f-4c49-913d-e8bb3f683c13/CIVTEST+SUIS+PRRS+E-S+PLUS-+ES-707649-01.0.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=ROOTWORKSPACE.Z18_L26A0J40OGJR60QGTTTS0N3067-e18692f3-335f-4c49-913d-e8bb3f683c13-IKABCmW
Consultado el 6 de abril de 2018.
38. Holtkamp DJ, Kliebenstein JB, Neumann EJ, Zimmerman JJ, Rotto HF, Yoder TK, Wang C, Yeske PE, Mowrer CL. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. *J Swine Health Prod.* 2013;21(2):72–84.
39. Huang C, Zhang Q, Feng WH. Regulation and evasion of antiviral immune responses by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res.* 2015;202:101-111. doi: 10.1016/j.virusres.2014.12.014.
40. IDEXX Laboratories Inc. Livestock. Swine. Disponible en: https://www.idexx.com/en/livestock/products/?cy=y_category_236&ts=all
Consultado el 6 de abril de 2018.
41. Jordan-Cravioto A, Segura JS, Alzina-Lopez A, Rodriguez-Buenfil C, Villegas-Perez S. Prevalence and risk factors associated with the PRRS virus in semen of boars in pig farms of Yucatan. *Tropical and subtropical Agroecosystems.* 2010;12(1).
42. Karniychuk UU, Nauwynck HJ. Pathogenesis and prevention of placental and transplacental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet Res.* 2013;44:95. doi: 10.1186/1297-9716-44-95.
43. Karniychuk UU, Saha D, Geldhof M, Vanhee M, Cornillie P, Van den Broeck W, Nauwynck HJ. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) causes apoptosis during its replication in fetal implantation sites. *Microb Pathog.* 2011;51(3):194-202. doi: 10.1016/j.micpath.2011.04.001.
44. King SJ, Ooi PT, Phang LY, Allaudin ZNB, Loh WH, Tee CY, How SP, Yip LS, Choo PY, Lim BK. Phylogenetic characterization of genes encoding for viral envelope glycoprotein (ORF5) and nucleocapsid protein (ORF7) of porcine reproductive & respiratory syndrome virus found in Malaysia in 2013 and 2014. *BMC Vet Res.* 2016;13;3. doi: 10.1186/s12917-016-0933-z
45. Kim HS, Kwang J, Yoon IJ, Joo HS, Frey ML. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch. Virol.* 1993;133:477-483.

46. Kirkwood RN, Althouse GC, Yaeger MJ, Carr J, Almond GW. Diseases of the Reproductive System. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW eds. *Diseases of Swine* 10th ed. *Willey-Blackwell*;2012:329-347.
47. Kristensen CS, Kvisgaard LK, Pawlowski M, Carlsen SH, Hjulsgaard CK, Heegard PMH, Bøtner A, Stadejek T, Haugegaard S, Larsen LE. Efficacy and safety of simultaneous vaccination with modified live virus vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus types 1 and 2 in pigs. *Vaccine*. 2018;36:227-236. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.11.059.
48. Lambert ME, Arsenault J, Poljak Z, D'allare S. Epidemiological investigations in regard to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in Quebec, Canada. Part 2: Prevalence and risk factors in breeding sites. *Prev Vet Med*. 2012;104(1-2):84-93.
49. Larrochelle R, Antaya M, Morin M, Magar R. Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. *J Virol Methods*. 1999;80:69-75. Meng XJ. *Circoviridae*. In: Knipe DM, Howley PM eds. *Fields Virology*. Volume 2 6th ed. *Wolters Kluwer / Lippincott Williams & Wilkins*;2013:1792-1801.
50. Li Z, Leng X, Qi Q, Wang F, Wen Y, Tan B, He Y Xia M, Lu W, Chen L, Cheng S, Wu H. Complete genome sequence of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus NM1 strain from northern China. *J Virol*. 2012;86(24):13863-13864. doi: 10.1128/JVI.02642-12
51. Li Z, Yanling H, Xu X, Leng X, Li S, Wen Y, Wang F, Xia M, Cheng S, Wu H. Pathological and immunological characteristics of piglets infected experimentally with a HP-PRRSV TJ strain. *Vet Res*. 2016;12:230. doi: 10.1186/s12917-016-0854-x.
52. Lim S. Eating a balanced diet: A healthy life through a balanced diet in the age of longevity. *JOMES*. 2018;27(1):39-45. doi: 10.7570/jomes.2018.27.1.39.
53. Liu JK, Zhou X, Zhai JQ, Li B, Wei CH, Dai AL, Yang XY, Lou ML. Emergence of a novel highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China. *Transbound Emerg Dis*. 2017;64(6):2059-2074. doi: 10.1111/tbed.12617
54. López FN, Milián SF, García CL. Detección de las enfermedades de importancia económica de los animales domésticos en el Sureste de México. XL Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, Yucatán, México, pp.7. 2004.
55. Lorenz TC. Polymerase Chain Reaction: Basic protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *J Vis Exp*. 2012;63:3998. doi: 10.3791/3998.
56. Lunney JK, Benfield DA, Rowland RR. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: an update on an emerging and re-emerging viral disease of swine. *Virus Res*. 2010;154(1-2):1-6. doi: 10.1016/j.virusres.2010.10.009.
57. Magar R, Larochelle R. Evaluation of the presence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pig meat and experimental transmission following oral exposure. *Can J Vet Res*. 2004;68(4):259-266.

58. Martínez BG, Williams JJ, Alzina LA. Identificación de factores de riesgo asociados a la exposición al virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino dentro de granjas porcinas del estado de Yucatán, México. *Vet Mex.* 2002;33(4):363-369.
59. Martínez-Bautista NR, Sciutto-Conde E, Cervantes-Torres J, Segura-Velázquez R, Mercado GMC, Ramírez-Mendoza H, Trujillo OME, Delgadillo AJ, Castillo-Juárez H, Sánchez-Betancourt JI. Phylogenetic analysis of ORF 5 and ORF7 of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and the frequency of wild-type PRRS virus in Mexico. *Trans Emerg Dis.* 2018;1-16. doi: 10.1111/tbed.12831.
60. Mateusen B, Van Soom A, Maes DG, Favoreel H, Nauwynck HJ. Receptor-determined susceptibility of preimplantation embryos to pseudorabies virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Biol Reprod.* 2007;76:415-423. doi: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.056697>.
61. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1977;74(9):560-564.
62. Meulenberg JJ, de Meijer EJ, Moormann RJJ. Subgenomic RNAs of Lelystad virus contain a conserved leader-body junction sequence. *Gen Virol.* 1993;74(8):1697-1701.
63. Milián SF, Cantó AGJ, Weimersheimer RJ, Coba AMA, Anaya EAM, Correa GP. Estudio seroepidemiológico para determinar la presencia de anticuerpos contra el virus del síndrome disgenésico del cerdo en México, *Tec Pecu Mex.* 1994;32(3):139-144.
64. Mokoel JM, van Rensburg LJ, van Lochem S, Bodenstern H, du Plessis J, Carrington CAP, Spencer BT, Fasina FO. Overview of the perceived risk of transboundary pig diseases in South Africa. *J S Afr Vet Assoc.* 2015;86:1197. doi:10.4102/jsava.v86i1.1197
65. Monger VR, Stegman JA, Koop G, Dukpa K, Tenin T, Loeffen WLA. Seroprevalence and associated risk factors of important pig viral diseases in Buthan. *Prev Vet Med.* 2014;117(1):222-232. doi: 10.1016/j.prevetmed.2014.07.005.
66. Montiel VO, Sahagún RA. Detección de PPV, PCV2 y *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos con lesiones neumónicas. XLIV Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, Yucatán, México, pp. 15. 2008.
67. Morgan SB, Frossard JP, Pallares FJ, Gough J, Stadejek T, Graham SP, Steinbach F, Drew TW, Salguero FJ. Pathology and Virus Distribution in the Lung and Lymphoid Tissues of Pigs Experimentally Inoculated with Three Distinct Type 1 PRRS Virus Isolates of Varying Pathogenicity. *Transbound Emerg Dis.* 2016;63(3):285-295. doi: 10.1111/tbed.12272.
68. Murtaugh MO, Elam MR, Kakach LT. Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. *Arch Virol.* 1995;140(8):1451-60.
69. Nelsen CJ, Murtaugh MP, Faaberg KS. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *J Virol.* 1999;73(1):270-80.

70. Nieuwenhuis N, Duinhof TF, van Nes A. Economic analysis of outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nine sow herds. *Vet Rec.* 2012;170: 225. doi:10.1136/vr.100101.
71. OEIDRUS (Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable). Cuaderno estadístico pecuario de Baja California, 2011-2015. *Secretaría de Fomento Agropecuario.* México, 2016. Disponible en http://www.oeidrus-bc.gob.mx/oeidrus_bca/pdf/cuaderno/Cuaderno%20Estadístico%20Pecuario%20de%20BC%202011-2015.pdf Consultado el 25 de enero de 2018.
72. OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). Enfermedades, infecciones e infestaciones de la Lista de la OIE en vigor en 2018. Disponible en: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-la-lista-de-la-oie-2018/> Consultado el 13 de febrero de 2018.
73. Olanratmanee EO1, Wongyanin P, Thanawongnuwech R, Tummaruk P. 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.* 2015;77(9):1071-1077. doi: 10.1292/jvms.14-0480.
74. Opriessnig T, Giménez-Lirola LG, Halbur PG. Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Anim Health Res Rev.* 2011;12(2):133-48. doi: 10.1017/S1466252311000120
75. Opriessnig T, Halbur PG. Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease. *Virus Res.* 2012;164(1-2):20-32. doi: 10.1016/j.virusres.2011.09.014.
76. Opriessnig T, Meng XJ, Halbur PG. Porcine Circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest.* 2007;19(6):591-592. doi: 10.1177/104063870701900601.
77. Palinski R, Piñeyro P, Shang P, Yuan F, Guo R, Fang Y Byers E, Hause BM. A Novel Porcine Circovirus Distantly Related to Known Circoviruses Is Associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and Reproductive Failure. *J Virol.* 2016;91(1). doi: 10.1128/JVI.01879-16.
78. Patterson AR, Madson DM, Halbur PG, Opriessnig T. Shedding and infection dynamics of porcine Circovirus type 2 (PCV2) after natural exposure. *Vet Microbiol.* 2011;149(1-2):225-229. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.10.021.
79. Pesente P, Rebonato V, Sandri G, Giovanardi D, Ruffoni LS, Torriani. Phylogenetic analysis of ORF5 and ORF7 sequences of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) from PRRS-positive Italian farms: a showcase for PRRSV epidemiology and its consequences on farm management. *S Vet Microbiol.* 2006;114(3-4):214-24.
80. Pileri E, Mateu E. Review on the transmission porcine reproductive and respiratory syndrome virus between pigs and farms and impact on vaccination. *Vet Res.* 2016;47:108. doi: 10.1186/s13567-016-0391-4.

81. Phan TG, Giannitti F, Rossow S, Marthaler D, Knutson TP, Li L, Deng X, Resende T, Vannucci F, Delwart E. Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation. *J Virol.* 2016;13(1):184. doi: 10.1186/s12985-016-0642-z.
82. Ramírez-Mendoza H, Castillo-Juárez H, Hernández J, Correa P, Segalés J. Retrospective serological survey of Porcine Circovirus-2 infection in Mexico. *Can J Vet Res.* 2009;73:21-24.
83. Ramírez-Mendoza H, Martínez C, Mercado C, Castillo-Juárez H, Hernández J, Segalés J. Porcine Circovirus type 2 antibody detection in backyard pigs from Mexico City. *Res Vet Sci.* 2007;83:130-132. doi: 10.1016/j.rvsc.2006.10.012.
84. Ramírez M, Fort PM, Rosales EF, Hernández LJ, Mercado GC, Allan G, McNair I, Segalés CJ. Primer aislamiento y detección de anticuerpos a Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2) en México. XL Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, Yucatán, México, pp. 50. 2004.
85. Rech RR, Gava D, Silva MC, Fernandes LT, Haach V, Ciacci-Zanella JR, Schaefer R. Porcine respiratory disease complex after the introduction of H1N1/2009 influenza virus in Brazil. *Zoonoses Public Health.* 2017;65(1). doi: 10.1111/zph.12424.
86. Rivera BJF, Martínez BNR, Macías GM, García CAC. Prevalencia de anticuerpos contra el síndrome respiratorio y reproductivo porcino, Rubulavirus Porcino y Parvovirus Porcino. XLII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, Veracruz, México, pp.42. 2006.
87. Robles-González F, Díaz E, Chevez JC, Angulo R, González C. Epidemiological Investigation and Genetic Characterization of Type 2 PCV (Type 2 Porcine Circovirus) in Mexican Commercial Herds. *JASP.* 2012;2:363-372.
88. Rose N, Larour G, Le Diguerghe G, Eveno E, Jolly JP, Blanchard P, Oger A, Le Dimna M, Jestin A, Madec F. Risk factors for porcine postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in 149 French farrow-to-finish herds. *Prev Vet Med.* 2003;61(3):209-225. doi: 10.1016/j.prevetmed.2003.07.003.
89. Rossow KD. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet Pathol.* 1998;35(1):1-20. doi: 10.1177/030098589803500101.
90. Rovelo-Celorio A, Alzina-López A, Rodríguez-Buenfil JC, Segura-Correa JC, Villegas-Pérez S. Prevalencia y factores de riesgo asociados con el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino en sementales de granjas porcinas en Yucatán. XLIV Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, Yucatán, México, pp.34 2008.
91. SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). ACUERDO mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos. Diario Oficial de la Federación. Publicado el 4 de mayo de 2016. Disponible en: <https://normateca.sagarpa.gob.mx/sites/default/files/normateca/Documentos/ACUERDO%20mediante%20el%20cual%20se%20dan%20enfermedades%20y%20plag>

as%20exoticas%20y%20end%C3%A9micas%20de%20los%20animales.pdf

Consultado el 4 de enero de 2017.

92. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977;74(12):5463-5467.
93. SEGOB (Secretaría de Gobernación). ACUERDO mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas de los animales, exóticas y endémicas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos. Diario Oficial de la Federación. Publicado el 20/09/2007. Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5001157&fecha=20/09/2007
Consultado el 7 de abril de 2018.
94. SEFOA (Secretaría de Fomento Agropecuario) Números de la Actividad Agropecuaria de Baja California. Disponible en: <http://www.sefoa.gob.mx/static/pdf/NumerosBC-Ed2017.pdf>. Consultado el 16 de marzo de 2018.
95. Segalés J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res*. 2012;164(1-2):10-19. doi: 10.1016/j.virusres.2011.10.007.
96. Seuberlich T, Tratschin JD, Thür B, Hofmann MA. Nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection and differentiation of antibodies against European and North American porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9(6):1183-91.
97. Shen H, Liu X, Zhang P, Wang L, Liu Y, Zhang L, Liang P, Song C. Genome characterization of a porcine Circovirus type 3 in South China. *Transbound Emerg Dis*. 2018;65(1):264-266. doi: 10.1111/tbed.12639.
98. Shi M, Lam TT, Hon CC, Hui RK, Faaberg KS, et.al. Molecular epidemiology of PRRSV: A phylogenetic perspective. *Virus Res*. 2010;154:7-17. doi: 10.1016/j.virusres.2010.08.14.
99. SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). Atlas Agroalimentario 2017. *Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación*. México, 2017. Disponible en: <https://www.gob.mx/siap/prensa/atlas-agroalimentario-2017>
Consultado el 14 de enero de 2018.
100. Sierra N, Ramírez R, Mota D. Aislamiento del virus de PRRS en México: Estudio clínico, serológico y virológico. *Arch Med Vet*. 2000;32(1):1-9. doi: 10.4067/S0301-732X2000000100001.
101. Snijder EJ, Kikkert M. Arteriviruses. In: Knipe DM, Howley PM eds. *Fields Virology*. Volume 1, 6th ed. *Wolters Kluwer / Lippincott Williams & Wilkins*;2013:859-879.
102. Snijder EJ, Meulenberg JJJ. The molecular biology of arteriviruses. *Gen Virol*. 1998;79(5):961-79.
103. Swiss Institute of Bioinformatics. Expasy Bioinformatics Resource Portal. Porarterivirus. Disponible en:

https://viralzone.expasy.org/7776?outline=all_by_species Consultado el 10 de agosto de 2018.

104. Tian K, Yu X, Zhao T, Feng Y, Cao Z, Wang C, Hu Y, Chen X, Dongmei H, Tian X, Liu D, Zhang S, Deng X, Ding y, Yang L, Zhang Y, Xiao H, Mingming Q, Wang B, Hou L, Wang X, Yang X, Kang L, Sun M, Jin P, Wang S, Yoshihiro K, Yan J, Gao GF. Emergence of fatal PRRSV variants: Unparalleled Outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark. *PLoS one*. 2007;2(6):e526. doi: 10.1371/journal.pone.0000526.
105. Tischer I, Rasch R, Tochtermann G. Characterization of papovavirus- and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl Bakteriol Orig A*. 1974;226:153-167.
106. Van der Linden IF, Van der Linde-Brill EM, Voerland JJ, Van Rijn PA, Pol JM, Martin R, Steverink PJ. Oral transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by muscle of experimentally infected pigs. *Vet Microbiol*. 2003;97(1-2):45-54.
107. Van Gorp H, Van Breedam W, Delputte PL, Nauwynck HJ: Sialoadhesin and CD163 join forces during entry of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol*. 2008;89(12):2943-53. doi: 89: 2943-2953. 10.1099/vir.0.2008/005009-0.
108. Velasova M, Alarcon P, Williamson S, Wieland B. Risk factors for porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection and resulting challenges for effective disease surveillance. *BMC Vet Res*. 2012;8:184. doi: 10.1186/1746-6148-8-184.
109. Vera R, Sharma PC. Next generation sequencing-based emerging trends in molecular biology of gastric cancer. *Am J Cancer Res*. 2018;8(2):207-225.
110. Walker NJ. A technique whose time has come. *Science*. 2002;296:557–559. doi: 10.1126/science.296.5567.557
111. Wang X, Chen L, Yuan W, Li Y, Li L, Li T, Li H, Song Q. Effect of porcine Circovirus type 2 (PCV2) on the function of splenic CD11c⁺ dendritic cells in mice. *Arch Virol*. 2017;162(5):1289-1298. doi: 10.1007/s00705-017-3221-8.
112. Wang Y, Yuan F, Liu X, Zheng W, Zhang H, Zhang J, Yoom K, Peddireddi L, Fang Y. Genome diversity and molecular detection of PRRS field strains and vaccine strains, and PCV3 and PCV2 strains. 2017;7(3). doi: 10.4148/2378-5977.7508.
113. Wensvoort G, Terpstra C, Pol JMA, Ter Laak EA, Bloemraad M, De Kluyver EP, Wensvoort G, Moormann RJM. Lelystad virus, the isolation of Lelystad virus. *Vet Q*. 1993;13:121-130.
114. Wissink EH, van Wijk HA, Kroese MV, Weiland E, Meulenberg JJ, Rottier PJ, van Rijn PA. The major envelope protein, GP5, of a European porcine reproductive and respiratory syndrome virus contains a neutralization epitope in its N-terminal ectodomain. *J Gen Virol*. 2003;84:1535–1543. Wyness L. The role of red meat in the diet: nutrition and health benefits. *Proc Nutr Soc*. 2016;75(3):227-32. doi: 10.1017/S0029665115004267.

115. Yang K, Tian Y, Zhou D, Duan Z, Guo R, Liu Z, Yuan F, Liu W. A multiplex RT-PCR assay detect and discriminate porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in clinical specimens. *Viruses*. 2017;9(8):205. doi: 10.3390/v9080205.
116. Young B, Dewey C, Poljak Z, Rosendal T, Carman S. Clinical signs and their association with herd demographics and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) control strategies in PRRS PCR-positive swine herds in Ontario. *Can J Vet Res*. 2010;74(3):170-177.
117. Zimmerman J, Benfield DA, Murtaugh MP, Osorio F, Stevenson GW, Torremorel M. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (Porcine Arterivirus). pp. 387–417. In: *Disease of Swine*, 9th ed. (Straw BE, Zimmerman JJ, D’Allaire S, Taylor DJ. eds.), *Blackwell Publishing Professional*, 2006, USA.

CAPÍTULO 3. ARTÍCULOS PRODUCIDOS

3.1 Artículos derivados del trabajo de tesis

Artículo en revisión como reporte de caso en:

Austral Journal of Veterinary Sciences

3.1.1 First detection of porcine reproductive and respiratory syndrome in porcine herds from Baja California, Mexico.

Sergio D. Gómez, Francisco J. Monge, Gilberto López^{1*}, Enrique Trasviña, José C. Herrera, Kattya Moreno, Gerardo E. Medina.

ABSTRACT. The objective of this study was to detect the presence of type 2 PRRSV in Baja California. Samples from pig farms of six locations were tested by real-time-PCR. The 9.27% (9/97) resulted positive in all the locations excluding Tecate and Mexicali valley. This is the first report of PRRSV in Baja California.

Keywords: type 2 PRRS virus, Mexico, real-time-PCR.

Two types of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) designated as genotype 1 (European) and genotype 2 (North American) are currently recognized worldwide (Nan *et al* 2017). Since 1994 it was reported type 2 PRRSV (PRRSV2) serological prevalence in Mexico (Milián *et al* 1994). The presence of multiple genetic variants of PRRSV2 has been documented in pig farms all over the neighbouring state of Sonora since 2002 (Batista *et al* 2004, Burgara-Estrella *et al* 2013). In Baja California (Baja), despite the pork industry is small (OEIDRUS 2016), the presence of PRRSV has never been reported (Boletín SIVE 2017) therefore vaccination to this pathogen has never been used,

All the authors: Institute for Researches in Veterinary Sciences, Autonomous University of Baja California, México.

¹ ***Corresponding author:** Dr. Gilberto López Valencia, Institute for Researches in Veterinary Sciences, Autonomous University of Baja California, Mexico, Fracc. Laguna Campestre Carretera San Felipe Km 3.5, Mexicali Baja California. CP 21386; Tel: 01-686-563-6906; gilbertolopez@uabc.edu.mx

although Sonora introduce pigs (CEIRN 2015), and this represents a risk of introduction of PRRSV into Baja. Therefore, the objective of this study is to conduct a molecular survey in pigs from different locations in Baja in order to detect the presence of type 2 porcine reproductive and respiratory virus.

We performed a cross-sectional study on 2016 and 2017 in Baja. Smallholder pig operations included in the study were 26 farms from Baja California Pig Farmers Association database. Only the ones who were interested in participate were visited. The volunteers were: 5 farms in Ensenada, 6 in Mexicali, 2 in Tecate, 2 in Tijuana, 2 in Mexicali Valley (MV) and 9 in San Quintin Valley (SQV). In order to detect the presence of PRRSV2 we collected and analyzed 97 samples from the jugular vein in EDTA-coated vacutainer tubes of clinically healthy pigs, extracting RNA from the buffy coat and amplifying an 87 bp fragment from the nucleocapsid (GenBank AF494042.1) using the primers PRRS-USA-F 5'-CGATCCAGACTGCCTTTAAC-3' and PRRS-USA-R 5'-GCAAATAAACTCCACAGTG-3'. Blood sampling and animal management were performed following the Sinclair Research's Blood Collection in Swine Guidelines (Swindle 2015). Positive samples were confirmed by sequencing. In all farms, we did questionnaires and took records to assess risk factors and the possible presence of clinical signs associated with PRRSV2 infection.

Real-time-PCR tests were positive for PRRSV2 in 9/97 (9.27%) samples from the 26 farms included. Positive samples correspond to 4/6 (66.6%) locations, excluding Tecate and MV. The frequency of positive results is showed in Table 1.

In the present study we found 9 positive samples to PRRSV2 in blood of clinically healthy pigs across Baja, in 4/6 of the main pork production locations in the state. This work represents the first study conducted in the state in which PRRSV2 has been detected, nevertheless, this might be as a result of the lack of research, since in Mexico, regardless of the genotype, PRRS virus is not under a national surveillance campaign (SENASICA 2016). The pork industry in Baja represents the second livestock activity after feedlot operations (CEIRN 2015); however, up to 15.9% of the pork meat consumed in Baja is raised and introduced from other states (OEIDRUS 2016), as it happens with the live animals introduced

from the state of Sonora (CEIRN 2015). The rt-PCR results were confirmed by sequencing analysis suggesting the presence of a probably low virulence strain of PRRSV2, because none of the farms tested showed any signs of reproductive or respiratory disease, agreeing with Weimersheimer *et al* (1997) whom proposed the existence of low virulence strains of PRRSV2 within Mexican territory, as well as with the results of Biernacka *et al* (2016) which suggest that diseases of the porcine respiratory complex are occasionally endemic and do not produce notorious clinical signs. The amplification of positive samples was observed after cycle 30 of the rt-PCR test, which might be considered as relatively low viral loads (Walker 2002). Our study demonstrates for the first time the presence of PRRSV in Baja despite the absence of clinical signs indicating the presence of the pathogen. It would be ideal to perform additional epidemiologic studies to determine the prevalence and risk factors that determine the real magnitude and permit to propose appropriate preventive and control measures.

REFERENCES

- Batista L, Pijoan C, Lwamba H, Johnson CR, Murtaugh MP. 2004. Genetic diversity and possible avenues of dissemination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in two geographic regions of Mexico. *J Swine Health Prod* 12, 170–175.
- Batista L, Fernández M, Miramontes J, Pliego R, Mondaca E. Advancing PRRS area regional control in the state of Sonora, Mexico. Proceedings 21st International Pig Veterinary Society Congress, Vancouver, Canada, pp.274. 2010.
- Biernacka K, Karbowski P, Wróbel P, Chareza T, Czopowicz M, *et al*. 2016. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and influenza A virus (IAV) in oral fluid of pigs. *Res Vet Sci* 109, 74–80.
- Boletín SIVE Informa, 2017. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), 2017. Available at: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/boletin-sive-informa-2017>. Accessed 10 October 2018.
- Burgara-Estrella A, Reséndiz-Sandoval M, Cortey M, Mateu E, Hernández J. 2014. Temporal evolution and potential recombination events in PRRSV strains of Sonora Mexico. *Vet Microbiol* 174(3-4), 540-546.

- CEIRN (Centro de Extensión e Innovación Rural Noroeste). Agenda de innovación cadena porcinos del GEIT pecuario Mexicali en el Estado de Baja California. 2015. Available at: http://www.extensionismo.mx/sermexicano/docs/geit/201603142_10201.pdf. Accessed 13 May 2018.
- King SJ, Ooi PT, Phang LY, Allaudin ZNB, Loh WH, *et al.* 2016. Phylogenetic characterization of genes encoding for viral envelope glycoprotein (ORF5) and nucleocapsid protein (ORF7) of porcine reproductive & respiratory syndrome virus found in Malaysia in 2013 and 2014. *BMC Vet Res* 13, 3.
- Milián SF, Cantó AGJ, Weimersheimer RJ, Coba AMA, Anaya EAM, *et al.* 1994. Estudio seroepidemiológico para determinar la presencia de anticuerpos contra el virus del síndrome disgenésico del cerdo en México, *Tec Pec Mex* 32(3), 139-144.
- Nan Y, Wu C, Gu G, Sun W, Zhang YJ, *et al.* 2017. Improved vaccine against PRRSV: Current progress and future perspective. *Front Microbiol* 8, 1635.
- OEIDRUS (Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable). Cuaderno estadístico pecuario de Baja California, 2011-2015. *Secretaría de Fomento Agropecuario*. México, 2016. Available at: http://www.oeidrus-bc.gob.mx/oeidrus_bca/pdf/cuaderno/Cuaderno%20Estadístico%20Pecuario%20de%20BC%202011-2015.pdf. Accessed 13 May 2018.
- SEFOA (Secretaría de Fomento Agropecuario) Números de la Actividad Agropecuaria de Baja California. Published 2017. Available at: <http://www.sefoa.gob.mx/static/pdf/NumerosBC-Ed2017.pdf>. Accessed October 17, 2018.
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). Campañas zoonositarias. Acciones para proteger la producción pecuaria del país. 15 de abril 2016. Available at: <https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/programas-y-campanas-zoonositarias>. Accessed 19 December 2018.
- Swindle MM. Sample collection series. Blood collection in swine. *Sinclair Bio-Resources*. Available at: <http://www.sinclairresearch.com/assets/sites/2/Blood-Collection-in-Swine.pdf>. Accessed February 12, 2015.
- Walker NJ. 2002. A technique whose time has come. *Science* 296, 557–559.
- Weimersheimer R, Canto AJEE, Anaya EGJ, Coba AMA, Millán SF, *et al.* 1997. Frecuencia de anticuerpos contra el virus del síndrome disgenésico y respiratorio en cerdos sacrificados en rastros de México. *Tec Pec Mex* 35, 139-144.

Table 1. Frequency of PRRSV2 positive pigs in Baja by locations and farm.

Location	Sampled farms									Freq*
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Tijuana	2/3	0/3	-	-	-	-	-	-	-	33.3%
SQV	1/1	1/1	1/3	0/1	0/1	0/2	0/2	0/3	0/4	16.6%
Mexicali	2/5	1/5	0/2	0/3	0/4	0/8	-	-	-	11.1%
Ensenada	1/9	0/3	0/4	0/4	0/7	-	-	-	-	3.7%
Tecate	0/6	0/7	-	-	-	-	-	-	-	0.0%
MV	0/3	0/3	-	-	-	-	-	-	-	0.0%

*Frequency

Artículo en revisión como comunicación corta en:

Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú

3.1.2 Presencia de Circovirus Porcino tipo 2 en hatos porcinos de Baja California, México

Presence of Porcine Circovirus type 2 in porcine herds of Baja California, Mexico

Sergio Daniel Gómez Gómez¹, Gilberto López Valencia¹, Francisco Javier Monge Navarro¹, José Carlomán Herrera Ramírez¹, Gerardo Enrique Medina Basulto², Alma Rossana Tamayo Sosa¹, Jonathan Isaac Arauz Cabrera².

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue detectar la presencia de *circovirus* porcino tipo 2 (CVP2) en hatos porcinos de Baja California, México, empleando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se colectaron 97 muestras de sangre de cerdos procedentes de 26 granjas de Baja California. El ADN se extrajo a partir de la capa leucoplaquetaria y para el análisis de PCR, las muestras fueron agrupadas en 19 grupos de 5 muestras y uno de 2 muestras. Se utilizaron cebadores específicos para amplificar un fragmento de 264 pares de bases del ORF2 de PCV2 utilizando como control positivo una vacuna comercial. El fragmento viral se detectó en el 15% (3/20) de los grupos analizados. Este es el primer reporte en el que se evidencia la presencia de *circovirus* Porcino tipo 2 en Baja California. Con el fin de conocer la magnitud del

¹Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California, México.

²Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Baja California, México.

Autor correspondiente: Dr. Gilberto López Valencia, Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California, México. Fracc. Laguna Campestre Carretera San Felipe Km 3.5, Mexicali, Baja California. CP 21386; Tel: 01-686-563-6906; gilbertolopez@uabc.edu.mx

El presente trabajo es parte de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Agropecuarias por parte de Sergio Daniel Gómez Gómez (Universidad Autónoma de Baja California).

problema y establecer medidas de prevención y control es necesario realizar estudios epidemiológicos para determinar la prevalencia y posibles factores de riesgo asociados a la presencia de la enfermedad en los hatos porcinos del estado.

Palabras clave: *circovirus*, detección, México, PCR

ABSTRACT

The objective of this study was to detect the presence of Porcine *circovirus* type 2 (PCV2) in porcine herds of Baja California, Mexico, by PCR technique. We obtained 97 blood samples of pigs in different productive stages from 26 porcine farms distributed across the State. The DNA was extracted from the buffy coat and in order to perform PCR analysis, they were grouped into 19 groups of 5 samples and one more of 2 samples. We used specific primers to amplify an ORF2 fragment of 264 pair base. The viral fragment was detected in 15% (3/20) of the analyzed groups. This is the first report of the presence of PCV2 in Baja California. In order to be aware of the problem and to establish preventive and control measures it is necessary to perform epidemiologic research to determine prevalence and possible risk factors associated to the presence of the antigen in the state porcine herds.

Key words: *circovirus*, detection, Mexico, PCR

INTRODUCCIÓN

El *circovirus* porcino pertenece a la familia *Circoviridae*, presenta una cadena simple de ADN circular de 18 000 nucleótidos, aproximadamente con dos marcos de lectura abierta (ORF) que codifican para la replicasa y la cápside viral (Meng, 2013).

El PCV2 es conocido como un patógeno universal ya que se ha confirmado su presencia en la mayoría de los hatos porcinos del mundo (Baebko et al., 2012). Es un virus ampliamente involucrado en el desarrollo del síndrome multististémico post destete (PMWS) (Blomström et al., 2016), así como en otras enfermedades tales como el complejo de enfermedad respiratoria porcina (PRDC) donde participa principalmente con el virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRSV) y *Mycoplasma hyopneumoniae* (Chae, 2016). A este grupo de padecimientos se les conoce como enfermedades asociadas a

circovirus Porcino (PCVAD) (Anoopraj et al., 2015). La vía más frecuente de transmisión es por la ruta oronasal (Segalés, 2012), diseminándose por todo el organismo y siendo excretado por secreciones orales, respiratorias, orina y heces (Opriessnig et al., 2007). Los signos clínicos más comunes son debilidad, aumento en la tasa de mortalidad o aumento de la frecuencia de signos respiratorios (Opriessnig y Halbur, 2013).

En México existe evidencia de la presencia del PCV2 desde 1973 a través de estudios serológicos retrospectivos (Ramírez-Mendoza et al., 2009), sin embargo, aunque los reportes sobre presencia de este agente viral provienen de las regiones de mayor producción porcina (Bedolla et al., 2018). A la fecha, la presencia de este virus no ha sido reportada en el estado de Baja California. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue detectar la presencia del CVP2 empleando la técnica de PCR a partir de muestras de ADN de cerdos procedentes de hatos porcinos de Baja California.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio transversal por conveniencia entre septiembre de 2016 y agosto de 2017 en las instalaciones de 26 productores de cerdos adscritos al Comité Estatal Sistema Producto Porcino de Baja California. El estudio incluyó 5 granjas de la región de Ensenada donde se colectaron 27 muestras de sangre, 6 granjas Mexicali para un total de 27 muestras, 2 granjas de Tecate colectándose 13 muestras de sangre, 2 granjas de Tijuana para 6 muestras de sangre de sangre así como en los valles de Mexicali (2 granjas para un total de 6 cerdos) y San Quintín (9 granjas para un total de 18 cerdos). En la Figura 1 se muestra la ubicación del Estado de Baja California. Se colectaron un total de 97 muestras de sangre en tubos evacuados con anticoagulante EDTA (BD, Franklin Lakes, New Jersey, EUA) de la vena yugular, siguiendo el procedimiento descrito por Holtgrew-Bohling (2016) de animales clínicamente sanos. Las muestras se almacenaron en refrigeración a 4°C durante 24 h para permitir la sedimentación de los componentes sanguíneos y la formación de la capa leucoplaquetaria de forma natural, colectando por aspiración 200 a 300 µL de la capa leucoplaquetaria, procediendo inmediatamente a la extracción del ADN utilizando los reactivos *PureLink Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN fue

reconstituido en un volumen final de 50 μ L empleando la solución de rehidratación suministrada con los reactivos y se almacenó a -20°C hasta el momento de las pruebas de PCR.

Oligonucleótidos para PCV2

Los oligonucleótidos utilizados para la detección de PCV2 fueron los reportados por Laroche y colaboradores (1999) a partir del ORF2. El oligonucleótido de sentido positivo fue denominado PCV2F con secuencia 5'-TAG GTT AGG GCT GTG GCC TT-3' y el oligonucleótido de sentido negativo fue denominado PV2R con secuencia 5'-CCG CAC CTT CGG ATA TAC TG-3', los cuales producen un producto amplificado de 264 pares de bases (pb). Estos oligonucleótidos fueron sintetizados por ADN Sintético S.A. P.I. de C.V. (Guanajuato, México) y fueron reconstituídos con agua grado biología molecular y diluidas a una concentración de 100 μ M (solución de reserva) y posteriormente a 10 μ M como solución de trabajo. Las soluciones de oligonucleótidos de reserva y de trabajo fueron almacenadas en a -20°C hasta el momento de las pruebas de PCR.

PCR para PCV2

Las muestras se agruparon en 19 grupos de 5 animales y un grupo de 2 animales. Las reacciones de PCR se realizaron empleando una mezcla maestra con un volumen final de 20 μ L que contenía 75 mM Tris-HCl (pH 8.8), 20 mM de sulfato de amonio, 0.01% Tween 20, 1.5 mM de cloruro de magnesio, 200 μ M de dNTPs, 7.5% de DMSO, 1.25 unidades de ADN polimerasa, 1 μ l de cada oligonucleótido y 1 μ l del extracto de ADN obtenido de las muestras de capa leucoplaquetaria. Como control positivo se utilizó un extracto de ADN obtenido a partir de la vacuna comercial Foster[®] PCV (Zoetis) que contiene virus inactivado. Como controles negativos se utilizó mezcla maestra sin ADN template y agua grado biología molecular en tubos separados. La amplificación se realizó en un equipo *Thermo Hybaid PCR Express Bybaid PCYL001 Issue 3 Thermal Cycler HBPX110* aplicando un ciclo inicial de desnaturalización de 5 minutos a 94°C , seguido de 40 ciclos con 1 minuto de desnaturalización a 94°C , 1 minuto de hibridación a 60.0°C y un ciclo final de extensión de 1 minuto segundos a 72°C . El producto amplificado del PCR fue visualizado por electroforesis en gel de agarosa al 3%. Las muestras se consideraron positivas

cuando se formó una banda de ADN amplificado de aproximadamente 264 pares de bases (pb).



Figura 1. Mapa de México mostrando el Estado de Baja California

RESULTADOS

Las pruebas de PCR muestran que 3 de los 20 (15%) conjuntos de muestras resultaron positivos para amplificación de la región ORF2 de CVP2, confirmando la presencia de este virus en el estado de Baja California. Los grupos de muestras que resultaron positivos provenían de todas las regiones muestreadas excepto el Valle de Mexicali.

DISCUSIÓN

Este estudio representa el primer reporte sobre la presencia del CVP2 en hatos porcinos del Estado de Baja California. Es importante señalar que aunque los resultados muestran que la distribución de la enfermedad está generalizada en el estado no fue posible identificar síntomas asociados a enfermedad por CVP2 en los animales muestreados. Este hallazgo coincide con lo reportado por Segalés (2012), donde la infección por CVP2 se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo con infecciones subclínica como la presentación más frecuente. Con respecto a las medidas preventivas primarias, los productores porcinos en Baja California reportaron que no utilizan vacunas contra CVP2 ya la ausencia de signos clínicos no justificaba la instrumentación de un programa de vacunación contra esta enfermedad (Boletín SIVE, 2017). Considerando que la enfermedad está presente en Baja California es necesario

realizar estudios epidemiológicos transversales con el fin determinar la prevalencia, distribución y los posibles factores de riesgo asociados a la enfermedad en los hatos porcinos de la región para identificar la magnitud del problema y poder establecer medidas de prevención y control de la misma.

LITERATURA CITADA

1. **Anoopraj R, Rajkhowa TK, Cherian S, Arya RS, Tomar N, Gupta A, Ray PK, Somvanshi R, Saikumar G. 2015.** Genetic characterization and phylogenetic analysis of PCV2 isolates from India: indications for emergence of natural inter-genotypic recombinants. *Infect Genet Evol* 31:25–32.
2. **Baebko P, Kristensen CS, Larsen LE. 2012.** Porcine *Circovirus* diseases: a review of PMWS. *Transbound Emerg Dis* 59(1):60-67.
3. **Bedolla LF, Trujillo OME, Mendoza ES, Quintero RV, Alonso MR, Ramírez-Mendoza H, Sánchez-Betancourt JI. 2018.** Identification and genotyping of porcine *Circovirus* type II (PCV2) in Mexico. *Virus Dis* 29(3):385-389.
4. **Boletín SIVE Informa 2017. 2017.** CDMX: Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. [Internet], [5 diciembre 2018]. Disponible en: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/boletin-sive-informa-2017>. Accessed 10 October 2018.
5. **Blomström AL, Fossum C, Wallgren P, Berg M. 2016.** Viral metagenomic analysis displays the co-infection situation in healthy and PMWS affected pigs. *PLoS ONE* 11(12):e0166863.
6. **Chae C. 2016.** Porcine respiratory disease complex: Interaction of vaccination and porcine *Circovirus* type 2, porcine reproductive and respiratory virus, and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet J* 212:1-6.
7. **Holtgrew-Bohling K. 2016.** Porcine Clinical Procedures. En: Holtgrew-Bohling K. *Large Animal Clinical Procedures for Veterinary Technicians*, 3a ed. USA: Elsevier Mosby. pp 619-630.
8. **Larochelle R, Antaya M, Morin M, Magar R. 1999.** Typing of porcine *Circovirus* in clinical specimens by multiplex PCR. *J Virol Methods* 80:69-75.
9. **Meng XJ. 2013.** Porcine *Circovirus* type 2 (PCV2): pathogenesis and interaction with the immune system. *Annu Rev Anim Biosci* 1:43-64.
10. **Opriessnig T, Meng XJ, Halbur PG. 2007.** Porcine *Circovirus* type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest* 19(6):591-592.
11. **Opriessnig T, Halbur PG. 2012.** Concurrent infections are important for expression of porcine *Circovirus* associated disease. *Virus Res* 164(1-2):20-32.

12. **Ramírez-Mendoza H, Castillo-Juárez H, Hernández J, Correa P, Segalés J. 2009.** Retrospective serological survey of Porcine *Circovirus*-2 infection in Mexico. *Can J Vet Res* 73:21-24.
13. **Segalés J. 2012.** Porcine *Circovirus* type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res* 164(1-2):10-19.

Immunopathological evaluation of recombinant mycobacterial antigen Hsp65 expressed in *Lactococcus lactis* as a novel vaccine candidate

Herrera Ramírez, J. C.¹; De la Mora, A. Ch.²; De la Mora Valle, A.³; Lopez-Valencia, G.⁴; Hurtado, R. M. B.⁴; Rentería Evangelista, T. B.⁴; Rodríguez Castillo, J. L.¹; Rodríguez Gardea, A.¹; Gómez Gómez, S. D.³ and Medina-Basulto, G. E.^{4*}

¹Ph.D. Student in Veterinary Sciences, Molecular Biology Laboratory, Veterinary Sciences Research Institute, Autonomous University of Baja California, Mexicali, Baja California, 21388, Mexico; ²MSc Student in Veterinary Sciences, Molecular Biology Laboratory, Veterinary Sciences Research Institute, Autonomous University of Baja California, Mexicali, Baja California, 21388, Mexico; ³MSc, Molecular Biology Laboratory, Veterinary Sciences Research Institute, Autonomous University of Baja California, Mexicali, Baja California, 21388, Mexico; ⁴Molecular Biology Laboratory, Veterinary Sciences Research Institute, Autonomous University of Baja California, Mexicali, Baja California, 21388, Mexico

*Correspondence: G. E. Medina-Basulto, Molecular Biology Laboratory, Veterinary Sciences Research Institute, Autonomous University of Baja California, Mexicali, Baja California, 21388, Mexico. E-mail: gerardom@uabc.edu.mx

(Received 7 Oct 2015; revised version 17 Jan 2017; accepted 14 Mar 2017)

Summary

Bovine tuberculosis (TBB) is a zoonotic disease distributed worldwide and is of great importance for public health and the livestock industry. Several experimental vaccines against this disease have been evaluated in recent years, yielding varying results. An example is the Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine, which has been used extensively in humans and tested in cattle showing mixed results related to protection (0-80%) against *Mycobacterium bovis*. In this study, we used the food-grade bacterium *Lactococcus lactis* as an expression system for production of mycobacterial protein Hsp65. For this purpose, the construction of a replicable plasmid in strain NZ9000 *L. lactis* (pVElepr) was conducted, which expressed the *Mycobacterium leprae* Hsp65 antigen, and was recognized by traded anti-Hsp65 antibodies. The strain NZ9000-pVElepr was applied to calves that were negative to tuberculin test and the immune response was monitored. The results showed that immune response was not significantly increased in calves with NZ9000-pVElepr with respect to control groups, and no injury was observed in any lung or lymph of the calves. Finally, this study suggest that the recombinant NZ9000 strain of *L. lactis* may protect against the development of *M. bovis* infection, although studies with longer exposure to this pathogen are necessary to conclude the matter.

Key words: Hsp65, *Lactococcus*, *Mycobacterium leprae*, Vaccination

Introduction

Bovine tuberculosis (TBB) is an infectious and contagious disease caused by *Mycobacterium bovis*, which is a member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex and has an economic impact on dairy cattle in Mexico by reducing the production by 17%: in Mexico, only 28% of the produced milk is pasteurized (NOM-031-ZOO-1995). In dairy cattle herds, such as those located in Tijuana, Baja California, Mexico, TBB is a severe problem due to its high prevalence (16.5%) (according to SAGARPA in 2012), indicating that actions contemplated on Mexican Official Standard NOM-031-ZOO-1995 had been insufficient in reducing this disease in a significant way. Thus, it is necessary to implement several alternatives to achieve the reduction of TBB in a short time. Studies about vaccinations on bovines using a BCG vaccine show a reduction of severity and quantity of injuries ($P > 0.05$) when used in a dose of 5×10^3 and 5×10^6 colony-forming units (CFU) for a later challenge using the *M. bovis* pathogen at a rate of (5×10^3 CFU) (Buddle *et al.*, 1995; Buddle *et al.*, 2003). Meanwhile, Lopez *et al.* (2009) observed that,

when using a BCG vaccine in a dose of 1×10^6 CFU in field conditions, the frequency of cases with TBB on those vaccinated was 9.7% compared with 22.7% on those not vaccinated.

The immunological strategy, as an alternative against several pathogens, is the use of Gram-positive bacteria, food-grade or commensal, particularly those based on the model of lactic acid bacteria (LABs). Some studies showed the possibility to modulate both systemic and mucosal immune response (Bahey-El-Din *et al.*, 2010; Bermúdez-Humarán *et al.*, 2011). Among the group of LABs, *Lactococcus lactis* can be found; its genome has been completely sequenced by Bolontin *et al.* (2001). Additionally, several plasmids had been studied for the expression of heterologous proteins induced by nisin (a grade food natural preserver) and selected antibiotics. Profiling this kind of system provides excellent potential to obtain recombinant grade food live vaccines, with adequate efficiency and extensive use (Nouaille *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2011).

Recombinant expression of the highly preserved chaperonin Hsp65 of *Mycobacterium leprae*, has great potential for a variety of biotechnological, medical and

Friesian breed, males, castrated), derived from a local herd that has been free of TBB for 30 years, were tested with intradermic tuberculin test, and were found to be negative. Three calves were vaccinated with *L. lactis* pSEC/E7 (control group) and three calves were vaccinated with *L. lactis* pVElepr (vaccinated group "V"). Both were vaccinated with a dose of 2×10^6 CFU (one dose intranasal and one dose via the intramuscular pathway on the neck) followed by two boosters at intervals of two weeks using the same dose and route. Two new groups were formed, each having the same conditions as the first two. However, the difference with the previous groups lies in a challenge conducted at month two by the intratracheal pathway with *M. bovis* strain 138 (Martínez-Vidal *et al.*, 2011) in a 1×10^4 CFU dose; thus, forming the challenged control group, "Control + R", and challenged vaccinated group, "V + R", respectively.

Testing

Previously, all animals were tested with double comparative intradermal tuberculin tests conducted at the start of the study (the results of which were negative) under the established rules of the Mexican Official Standard (NOM-031-ZOO-1995) and established protocols of the Bioethics Committee from the IICV/ UABC (Asociación Médica Mundial, 2005). These standards guided everything related to experimentation proceedings on live animals, while considering facilities and appropriate equipment to maintain biosafety standards required by the experiment.

Sample collection

Heparinized and non-coagulant tubes were used for blood sample collection starting at month three, collecting at intervals of 28 days for six months from the coccygeal vein for a total of eight samplings for each animal.

Antibody evaluation

Plates were coated with 10 ng per well with a commercial *M. bovis* recombinant Hsp65 protein (Stressgen, USA) on a carbonate-bicarbonate buffer solution pH = 9.6 (1.53 g/L NaCO₃, 2.93 g/L NaHCO₃, adjusted with 37% hydrochloric acid) at 4°C for 24 h. *Mycobacterium bovis* Hsp65 was used because it shows a 99.81% identity with *M. tuberculosis* Hsp65, and *M. tuberculosis* Hsp65 shows high cross-reactivity with *M. leprae* Hsp65 (Mustafa *et al.*, 1999). The plates were blocked with 200 µL per well of 3% non-fat milk on sterile PBS-T at room temperature. Each serum of the study was added at a rate of 1:100, using 50 µL per well for 2 h at 37°C. For detection of specific antibodies, IgG anti-bovine in mice (SIGMA) was used at 1:20,000 rates for 2 h at 37°C. Fifty µL of a TMB solution (20 ml of pH = 4.0 citrate solution, 100 µL TMB stock solution (0.1 g TMB, 10 ml DMSO)), 10 µL H₂O₂ (30%) was added to each well. The reaction was stopped after 15 min with an acid solution using 50 µL per well of 0.5 M H₂SO₄. Optical density (OD) was read at 450 nm on a

spectrophotometer. Antibodies levels were recorded in duplicate and were determined by subtracting the absorbance at 450 nm of blank values to the values obtained in the samples.

Interferon gamma assay

To determine the interferon gamma assay (γ -IFN), 750 µL of heparinized whole blood was cultured in borosilicate tubes, adding 50 µL of antigen (CSL, Australia) per sample before being incubated at 37°C in high ambient relative humidity for 24 h. The supernatant was collected and the γ -IFN level was measured using the immunoenzymatic assay package BOVIGAM (CSL, Melbourne, Australia).

Postmortem examination

At the end of the study (six months post inoculation), animals were sent to the Federal Inspection slaughterhouse (TIF) for sacrifice and inspection. After the federal inspection, lungs and lymph nodes (retropharyngeal, bronchial and mediastinal) were collected for a second examination in the laboratory. They were stored in biological bags at 4°C and identified with the animal number for transportation. Tissues were sectioned at 0.5-1 cm thickness by means of standard procedures and cut at 4 µm and stained with hematoxylin and Ziehl-Neelsen stains.

Lungs

Pulmonary lobes were examined individually (apical, cardiac and diaphragmatic left lobes and apical, cardiac, diaphragmatic and accessory right lobes). For each lobe, the following scoring system was applied: 0, no visible lesion; 1, no macroscopic lesion but lesion at cutting; 2, <5 macroscopic lesions with <10 mm of diameter; 3, <6 lesions with diameters < than 10 mm; 4, <1 distinctive macroscopic lesion with < than 10 mm of diameter; 5, coalescence macroscopic lesions. Individual lobe scores were added to calculate a pulmonary score (Lyashchenko *et al.*, 2004).

Lymph nodes

The macroscopic severity of the disease observed in lymph nodes was evaluated under the following score system: 0, no necrosis or visible lesion; 1, small focal lesion (1-2 mm in diameter); 2, several small focal lesion or necrotic areas, at least 5 × 5 mm in diameter; 3, multiple necrotic areas at least 5 × 5 mm in diameter distributed along the node, or necrotic areas affecting 5% of the node. The individual score of lymph nodes was added to calculate a lymphatic nodes score. Lymphatic node score and pulmonary score were considered to determine a complete pathological score per animal. The score was established by the same personnel in the slaughterhouse for all animals in the study to insure consistency (Lyashchenko *et al.*, 2004).

Statistical analysis

The statistical difference between humoral and cellular immune responses was estimated with

MINITAB software, where statistical significance was determined at $P < 0.05$. Correlations between immune response and lesions scale grade were estimated by non-parametric analysis (Spearman rank test).

Results

Lactococcus lactis NZ9000 was used to construct "*L. lactis*/pVElepr" (Fig. 1), and was analyzed to determine Hsp65 expression by a Western blot (Fig. 2), showing Hsp65 expression as a band of 70 kDa, not present on the *L. lactis*/pSEC/E7 strain. Also, the expression capacity and antigenic character of the Hsp65 protein expressed on "*L. lactis*/pVElepr" strain was probed.

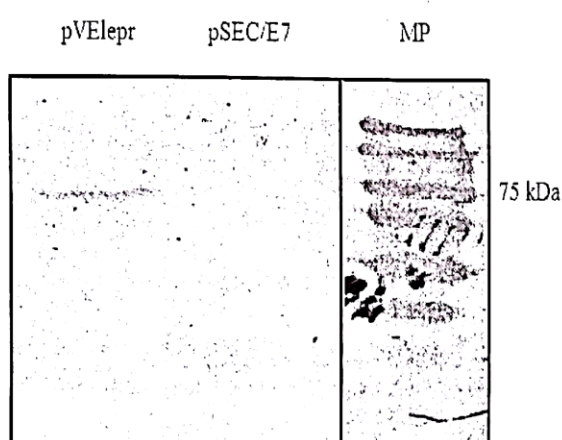


Fig. 2: Antigenic recognition of Hsp65 protein of *Mycobacterium leprae* expressed on NZ9000 strain-pVElepr. *Lactococcus lactis* pSEC/E7 strain (primary plasmid) was used as a negative control. Hsp65 protein was expressed and recognized by anti-Hsp65 antibodies after 1 h post nisin induction. Protein shows approximately 70 kDa of weight

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to measure specific antibodies (anti-Hsp65) by spectrophotometry at 450 nm was made (Fig. 3), which showed no significant statistical difference between the control group and vaccinated group without challenge ($P > 0.05$), with standard deviations of 0.045 and 0.079, respectively. The results for the control group "*L. lactis*/pSEC/E7", and the vaccinated group "*L. lactis*/pVElepr" were both challenged by *M. bovis* strain 138 and showed no significant statistical difference ($P > 0.05$) with standard deviations of 0.101 and 0.093, respectively, although a small activation of the humoral immune response against Hsp65 was observed at the end of study (seven and eight samples). The gamma interferon assay, used to measure cellular immune response during the study, showed no statistical difference between vaccinated and control groups ($P > 0.05$), with a standard deviation of 0.159. The same tendency was observed in Control + R and V + R groups, although comparing those vaccinated with those challenged showed a tendency to maintain a cellular immune response superior to those vaccinated non-

challenged (sampling 6, 7 and 8).

The analysis of macro and microscopic lesions compatible with TBB during slaughter inspection TIF did not show visible lesions. Of the animals in the study, 100% were classified as both pulmonary and lymphatic nodes with a score of 0. Similarly, a microscopic evaluation of tissues did not show any suggestion of an inflammatory process.

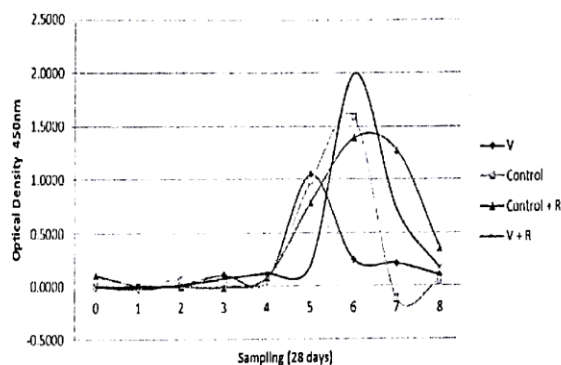


Fig. 3: Measurement of cellular immune response γ -IFN

Discussion

The results obtained in the present study are not as strong as those in which Hsp65-DNA was used as an inductor of innate and acquired immune response on immunized mice and challenged later using 10^5 CFU of *M. tuberculosis* H37Rv intramuscularly. In that study, a statistically significant stimulation of both immune responses ($P < 0.01$) was obtained after i.m. injection (three doses of 100 μ g) and a reduction of CFU quantity ($P < 0.001$) was determined comparing vaccinated group versus non-immunized or challenged control groups (Lowrie *et al.*, 1999; Lima *et al.*, 2003).

This finding may be due to an uninterrupted expression on several organs of the host when the DNA vaccine was applied, which can be a determinant to activate a strong immune response. Similarly, the study differs from the results obtained by Bermúdez-Humaran *et al.* (2011), because they reported that a *L. lactis* strain expressing an antigen against HPV-16 on a mouse model showed an activation of the humoral immune response, and concluded that vaccine result to be prophylactic and therapeutically acceptable. This may be due to specific IgA production induced by the exposition of the mucosae to antigens produced by *L. lactis* resulting in protection against HPV-16 infection, in contrast to the cellular immune response needed to protect against infections such as TBB. In this study, expression of the antigenic Hsp65 protein using "*L. lactis*/pVElepr" as the vector proved to be antigenic by the recognition of specific antibodies anti-Hsp65 (Stressgen, USA) (Fig. 2). Nevertheless, activation of immune response after nasal and intramuscular administration of "*L. lactis*/pVElepr" was not sufficient to observe a significant statistical difference between "*L. lactis*/pVElepr" and "*L. lactis*/pSEC/E7" groups. It was also shown that

expression or exposition of immune system cells to Hsp65 was also insufficient. An unexpected finding was that *L. lactis* NZ9000 strain administration induces a humoral and cellular immune response. and, due to this, it was not possible to establish an immunogenic differentiation between study groups. This may be due to the presence of similar chaperonin to Hsp65 on *L. lactis*, as *groEL* of 60 kDa that is expressed on its surface (Bolontin *et al.*, 2001).

An important aspect in relation to infective dose is that it could appreciate the establishment of infection after performing the tuberculin double comparative test at the end of the study, where all groups were challenged with the field strain *M. bovis* 138. Groups had a positive result after infection and were kept in this immunologic status until the end of the study, as compared with non-challenged animals that had a negative result to the same test (data not shown). This suggests that the infective dose used was not sufficient to induce macroscopic or microscopic lesions on analyzed organs, or that the NZ9000 strain can (by itself) protect against the development of lesions at least in the infective doses used and at the time of post infection in which the experiment was conducted. Finally, we observe the need for a new experiment using the constructed strain in this study, a large number of experimental units, a control group without *L. lactis* NZ900 strain, a superior infective dose and a long-term experimentation interval to evaluate (with higher precision) the protective effectiveness of *L. lactis* NZ9000/pVElepr.

Acknowledgements

The present study was financially supported by the Universidad Autónoma de Baja California, PRODUCE Foundation of Baja California A. C, and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Thanks to researchers from the Universidad Autónoma de Nuevo León, Odila Saucedo and Roberto Montes de Oca for facility plasmids and the NZ9000 strain of *L. lactis*. Thanks also to the veterinarian student, A. Ocegüera, for the contribution to the experimental construction of the plasmids in this study.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests. We gave assurance that neither the submitted materials nor portions of the article have been published previously or are under consideration for publication elsewhere.

References

- Asociación Médica Mundial (2005). Manual de ética médica. Azevedo, MS; Rocha, CS; Electo, N; Pontes, DS; Molfetta, JB; Goncalves, ED; Azevedo, V; Silva, CL and Miyoshi, A (2012). Cytoplasmic and extracellular expression of pharmaceutical-grade mycobacterial 65-kDa heat shock protein in *Lactococcus lactis*. *J. Genet. Mol. Res.*, 11: 1146-1157.
- Bahey-El-Din, M; Gahan, CG and Griffin, BT (2010). *Lactococcus lactis* as a cell factor for delivery of therapeutic proteins. *J. Curr. Gene Ther.* 10: 34-45.
- Bermúdez-Humarán, LG; Langella, P; Miyoshi, A; Gruss, A; Tamez, GR; Montes de Oca-Luna, R and Le, LY (2002). Production of human papillomavirus type 16 E7 protein in *Lactococcus lactis*. *J. App. Environm. Microbiol.*, 68: 917-922.
- Bermúdez-Humarán, LG; Pascale, K; Chatel, JM and Langella, P (2011). *Lactococci* and *Lactobacilli* as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines. *Microb. Cell Fact.* (Suppl. 1), 10: S4.
- Bolontin, A; Wincker, P; Mauger, S; Jaillon, O; Malarme, K; Weissenbach, J; Ehrlich, SD and Sorokin, A (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* spp. *lactis* IL1403. *J. Genome Res.* 11: 731-753.
- Buddle, BM; de Lisle, GW; Pfeiffer, A and Aldwell, FE (1995). Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. *J. Vaccine.* 13: 1123-1130.
- Buddle, BM; Wedlock, DN; Parlanc, NA; Corner, LA; de Lisle, GW and Skinner, MA (2003). Revaccination of neonatal calves with *Mycobacterium bovis* BCG reduces the level of protection against bovine tuberculosis induced by a single vaccination. *J. Infect. Immunol.*, 71: 6411-6419.
- Cortes-Perez, NG; Bermudez-Humarán, LG; Le, LY; Rodriguez-Padilla, C; Gruss, A; Saucedo-Cárdenas, O; Langella, P and Montes-de-Oca, LR (2003). Mice immunization with live *lactococci* displaying a surface anchored HPV-16 E7 oncoprotein. *FEMS Microbiol. Lett.*, 229: 37-42.
- Dieye, Y; Usai, S; Clier, F; Gruss, A and Piard, JC (2001). Design of a protein-targeting system for lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.*, 183: 4157-4166.
- Laemmli, UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *J. Nature.* 227: 680-685.
- Lei, H; Sheng, Z; Ding, Q; Chen, J; Wei, X; Lam, DMK and Xu, Y (2011). Evaluation of oral immunization with recombinant avian influenza virus HA1 displayed on the *Lactococcus lactis* surface and combined with the mucosal adjuvant cholera toxin subunit B. *Clin. Vaccine Immunol.*, 18: 1046-1051.
- Lima, KM; Dos Santos, SA; Santos, RR; Brandão, IT; Rodrigues, JM and Silva, CL (2003). Efficacy of DNA-hsp65 vaccination for tuberculosis varies with method of DNA introduction *in vivo*. *J. Vaccine.* 22: 49-56.
- Lopez-Valencia, G; Renteria-Evangelista, T; Williams, JJ; Licea-Navarro, A; Mora-Valle, A and Medina-Basulto, G (2009). Field evaluation of the protective efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine against bovine tuberculosis. *J. Res. Vet. Sci.* 88: 44-49.
- Lowrie, DB (2006). DNA vaccines for therapy of tuberculosis: where are we now? *J. Vaccine.* 24: 1983-1989.
- Lowrie, DB; Tascon, RE; Bonato, VL; Lima, VM; Faccioli, LH; Stravropoulos, E; Colston, MJ; Hewinson, RG; Moelling, K and Silva, CL (1999). Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *J. Nature.* 400: 269-271.
- Lyashchenko, K; Whelan, OA; Greenwald, R; Pollock, JM; Andersen, P; Hewinson, RG and Vordermeier, HM (2004). Association of tuberculin-boosted antibody responses with pathology and cell-mediated immunity in cattle vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG and

- infected with *M. bovis*. *J. Infect. Immun.*, 72: 2462-2467.
- Martínez-Vidal, C; Hori, S; De la Mora, A; Bermúdez, RM; Rentería, TB; López, G; Galván, LJ and Medina, GE** (2011). VNTR for genotyping of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle slaughtered in Baja California, Mexico. *J. Rev. Mex. Cienc. Pecu.*, 2: 393-401.
- Mustafa, AS; Lundin, KEA; Meloen, RH; Shinnick, TM and Oftung, F** (1999). Identification of promiscuous epitopes from the mycobacterial 65-kilodalton heat shock protein recognized by human CD4⁺ T cells of the *Mycobacterium leprae* memory repertoire. *Infect. Immun.*, 67: 5683-5689.
- NOM-031-ZOO-1995 (NORMA, Oficial Mexicana). Campaña nacional contra la tuberculosis bovina (*Mycobacterium bovis*).
- Nouaille, S; Ribeiro, LA; Miyoshi, A; Pontes, D; Le, LY; Oliveira, SC; Langella, P and Azevedo, V** (2003). Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *J. Genet. Mol. Res.*, 2: 102-111.
- Sambrook, J and Russell, DW** (2001). *Molecular cloning a laboratory manual*. 3rd Edn., New York, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press. PP: 15.35.
- Santos, PD; Pacheco, AMS; Chatel, JM; Langella, P; Azevedo, V and Miyoshi, A** (2011). *Lactococcus lactis* as a live vector: heterologous protein production and DNA delivery systems. *J. Protein Expr. Purif.*, 79: 165-175.
- Thoen, CO; Steele, JH and Gilsdorf, MJ** (2006). *Mycobacterium bovis infection in animals and humans*. 2nd Edn., Iowa, USA, Blackwell Publishing. PP: 34-49.

Prevalence and distribution of intestinal parasites in stray dogs in the northwest area of Mexico

Enrique Trasviña-Muñoz^a, Gilberto López-Valencia^{a*}, Pedro Álvarez Centeno^b, Sergio A. Cueto-González^a, Francisco J. Monge-Navarro^a, Luis Tinoco-Gracia^a, Karla Núñez-Castro^a, Paulina Pérez-Ortiz^a, Gerardo E. Medina-Basulto^a, Alma R. Tamayo-Sosa^a, Daniel Gómez-Gómez^a

ABSTRACT. Zoonotic parasitic infections are a major global public and veterinary health problem and widespread among stray dogs. The objective of this study was to establish the prevalence of intestinal parasites in stray dogs in the urban, rural and coastal areas of Mexicali County in northwest Mexico. In 2014, from January to December, 380 stray dogs were captured. The entire small intestine, cecum and faeces samples were collected and examined by using simple zinc sulfate flotation and Lugol's solution staining. Data were statistically analysed. Overall, about 21.5% of examined dogs were found positive for intestinal parasites. *Toxocara canis* was the most frequent detected parasite, with a prevalence of 7.1%, followed by *Toxascaris leonina* (5.5%), *Cystoisospora* spp. (5.0%), *Taenia* spp. (3.9%) and *Dipylidium caninum* (2.8%). Dogs were more frequently found to be infected with a single genus of intestinal parasite (18.7%) than co-infected (2.8%). Intestinal parasites were more prevalent in samples from the coastal area (25%) than in those from the rural (24.4%) and urban (20.6%) areas, however, only statistical association was found between capture area and specific intestinal parasitic infection. There were significant differences in the prevalence of taeniasis among two age groups ($P<0.01$). A seasonal peak of prevalence for intestinal parasitic infections was found during spring ($P<0.05$), corresponding with a seasonal peak of prevalence of *T. canis* ($P<0.05$). The wide range of isolated parasites indicated that people residing in this area are at risk of exposure to these potentially hazardous zoonotic pathogens.

Key words: toxocaríasis, taeniasis. Mexico, public health.

RESUMEN. Las infecciones zoonóticas parasitarias son un problema global público y para la medicina veterinaria, siendo diseminadas por perros callejeros. El objetivo del estudio fue determinar la prevalencia de parasitosis intestinales en perros callejeros de la zona urbana, rural y costera del municipio de Mexicali, noroeste de México. En 2014, entre enero y diciembre, se capturaron 380 perros. Se colectó el intestino, ciego y heces y se examinaron utilizando flotación con sulfato de zinc y tinción con la solución de Lugol. Los datos fueron analizados estadísticamente. En general, alrededor del 21,5% de los perros examinados fueron positivos a parásitos intestinales. *Toxocara canis* fue el parásito más frecuentemente, con una prevalencia del 7,1%, seguido por *Toxascaris leonina* (5,5%), *Cystoisospora* spp. (5,0%), *Taenia* spp. (3,9%) y *Dipylidium caninum* (2,8%). Los perros fueron más frecuentemente encontrados infectados con un solo género de parásito intestinal (18,7%) que coinfectados (2,8%). Las parasitosis intestinales fueron más prevalentes en muestras de la costa (25%) que del área rural (24,4%) y urbana (20,6%), sin embargo solo se encontró asociación estadística entre el área de captura y las parasitosis intestinales específicas. Hubo diferencias significativas en la prevalencia de taeniasis entre los dos grupos de edad ($P<0,01$). El pico estacional de la prevalencia de infecciones parasitarias intestinales se encontró durante la primavera ($P<0,05$), correspondiendo con el pico estacional de *T. canis* ($P<0,05$). La amplia gama de parásitos aislados indicó que las personas que residen en esta zona están en riesgo de exposición a estos patógenos zoonóticos potencialmente peligrosos.

Palabras clave: toxocaríasis, taeniasis, México, salud pública.

INTRODUCTION

Since humans began to live in close proximity to companion animals, zoonotic diseases have become a major problem for human health (Day *et al* 2012). Dogs can harbor a wide range of intestinal parasites, some of which have a zoonotic potential, such as *Toxocara canis*, *Dipylidium caninum* and *Taenia multiceps* (Weese *et al* 2011). Human parasitic infections typically occur following ingestion of infective eggs from contaminated

water or soil, ingestion of infected meat from the cattle or ingestion of inadequately washed or cooked fruits and vegetables (Lee *et al* 2010). Public concern over canine parasitic diseases has been aggravated by the high and uncontrolled number of stray dogs in urban areas that shed parasite eggs and oocysts, representing a source of infection for humans (Traub *et al* 2005, Martínez-Barbabosa *et al* 2008). Furthermore, dogs infected with *Taenia* species, can also infect livestock leading to the development of cysts in their tissues and being the cause of monetary losses due to the confiscation of infected carcasses in abattoirs (Wondimu *et al* 2011).

In previous studies conducted in the municipality of Mexicali in northwest Mexico, the overall prevalence of parasitic diseases in stray dogs was 66% (Luna *et al* 1981). In 2007, another report showed a 56.1% serologic prevalence of toxocaríasis in domestic dogs (Tinoco-Gracia *et al* 2007^a) and contamination with *Toxocara*

Accepted: 10.03.2017.

^aInstitute for Research in Veterinary Sciences, Autonomous University of Baja California, Baja California, Mexico.

^bMunicipal Animal Control Centre, Municipal Health Services, Mexicali, Baja California, Mexico.

* Corresponding author: G López-Valencia; gilbertolopez@uabc.edu.mx.

canis eggs in 62.5% of soil samples collected from public parks and playgrounds where the presence of domestic and stray dogs was common and frequent (Tinoco-Gracia *et al* 2007^b). Since then, there are no other reports to follow up the prevalence of parasitic diseases in stray dogs from Mexicali. During 2014, the Municipal Animal Control Center (CEMCA) reported a total of 14,368 dogs captured. To control and reduce the prevalence rate of zoonotic parasitic infections, comprehensive data about their epidemiological features are required. Therefore, the present investigation evaluated the prevalence and distribution of intestinal parasites in stray dogs in the different areas of Mexicali, with special attention to potential zoonotic parasites.

MATERIAL AND METHODS

ETHICS STATEMENT

All animal handling procedures were conducted following national code NOM-033-ZOO-1995 and the local regulation for the control of domestic animals (Ayuntamiento de Mexicali 2009). All procedures were also approved by the Institutional Committee for Animal Ethics, represented by the Academic Group of Animal Health and the Academic Group for Diagnosis of Infectious Diseases, both part of the Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (IICV), Universidad Autónoma de Baja California (UABC).

DATA COLLECTION

Sex (male and female), dental age (younger and older than one year of age), size (small, medium and large dogs) and capture zone (urban, rural and coastal area from the municipality of Mexicali) were recorded at the time of sample collection and were used to establish associations with parasitic infections.

SAMPLE SIZE DETERMINATION

Sample size was determined using the formula described by Thrusfield (2007), with a 95% confidence interval. The expected prevalence of intestinal parasitic infections in dogs from Mexicali was 66% (Luna 1981).

$$n = \frac{1.96^2 \times p(1-p)}{d^2}$$

Where:

n = required sample size

p = expected prevalence 66%

d = desired absolute precision 5%

The minimum sample size was 344, but the final sample size was established at 380.

SAMPLE COLLECTION AND PARASITOLOGICAL PROCEDURES

A cross-sectional, epidemiological study was conducted in the Mexicali County from January to December 2014. The city of Mexicali is situated along the state's northern border with California and is the northernmost city in Latin America; it is located at latitude 32°37'40" N and longitude 115°27'16" W. In order to detect and identify intestinal parasites directly into the small intestine, cecum and faeces were collected from stray dogs captured by the CEMCA from three areas of the Mexicali municipality: (1) the urban area of the city of Mexicali City, (2) the rural area of the Mexicali Valley and (3) the coast area of San Felipe in the Sea of Cortez. An average of 32 dogs were randomly selected per month and location with a total of 380 dogs sampled. After the personnel from CEMCA had euthanised the dogs following their approved procedure, dog carcasses were dissected to remove the small intestine and cecum. Stool samples were taken directly from the rectum. Small intestine, cecum and stool samples were placed in plastic bags, identified, stored at 4 °C and sent to the Laboratory of Parasitology in IICV and analysed for the detection and identification of intestinal parasites.

To detect and identify intestinal parasites, the small intestine and cecum were opened longitudinally for examination. Faecal samples were examined for eggs and oocysts by zinc sulfate flotation technique (specific gravity 1.250), and lugol's iodine was added to help in the identification of protozoan cysts and coccidial oocysts (Besné *et al* 2005). Helminths were detected in intestines and feces, however some tapeworms were not detected in faeces but they were detected in the intestine, for this reason eggs per gram (EPG) are not presented and protozoa were identified in stool. Morphological identification of adult parasites, eggs and oocysts were performed as described by Zajac *et al* (2012).

STATISTICAL ANALYSIS

Descriptive statistics indicators were calculated to establish the frequencies of the overall cases of parasitic intestinal infections, for each specific parasite, for single infected and co-infected samples, for capture zone and seasonal trend of parasitic infections. Inferential analysis were performed using Statistix 9® software, Chi square (χ^2) estimation were performed to establish associations between parasitic infections and analysed variables, odds ratio (OR) were also calculated with 95% confidence intervals.

RESULTS

Out of 380 faecal samples analysed for the presence of intestinal parasites, 82 (21.5%) were positive for at least one parasitic species. The prevalence of single

intestinal parasitic infections was 18.7% (71 of 380), being *T. canis* the most frequent parasite observed in this group of animals. In contrast, 2.8% (11 of 380 samples) of dogs were infected by at least two different species of parasites, being *T. canis* and *T. leonina* the most frequent observed co-infection (table 1). The overall prevalence of protozoa and helminths was 5% (19 of 380) and 17.1% (65 of 380), respectively. *T. canis* was the most common helminth (7.1%), followed by *T. leonina* (5.5%), *Taenia* spp. (3.9%) and *Dipylidium caninum* (2.9%). Based on capture area of the dogs, the largest frequency of infection with intestinal parasites was found in the coastal area of San Felipe, with an overall prevalence of 25%. In contrast, the lowest frequency was detected in the urban area of the city of Mexicali, with a prevalence of 20.6% (table 2). However, no significant differences were found between the three different areas and overall prevalence, but statistical association was found between capture area and specific intestinal parasitic infection, as demonstrated

by the presence of *Cystoisospora* spp. only in the urban area ($P<0.05$). Taeniasis showed a higher prevalence in the rural area (14.2%) compared with the urban (2.7%) and coastal areas (0%) ($P<0.001$), with an OR of 5.8 (table 3). In contrast, the coastal area of San Felipe was characterised by a high prevalence of dypilidiasis (20%) ($P<0.001$), as well as a high risk of infection with an OR of 72.5 (table 4). Concerning seasonal trend, only *T. canis* showed a higher occurrence (16.2%) during spring season ($P<0.001$) (table 5). The overall seasonal prevalence of parasitic infections was higher in spring (27.5%) than in summer season (15.4%), with an odds ratio of 2.0, indicating twice the risk of parasitic infections during this season (table 6). No significant differences were found between intestinal parasitic infections and sex and size of dogs. However the variable age showed a significant difference for *Taenia* spp. ($P<0.01$) indicating higher prevalence in dogs older (5.7%) than one year (0%) (table 7).

Table 1. Samples detected with one or two genera of parasites.

Detected parasites	Positives/analysed	Prevalence
Single infection		
<i>Toxocara canis</i>	19/380	5.0%
<i>Toxascaris leonina</i>	12/380	3.1%
<i>Cystoisospora</i> spp.	17/380	4.4%
<i>Taenia</i> spp.	13/380	3.4%
<i>Dipylidium caninum</i>	10/380	2.6%
Subtotal	71/380	18.7%
Co-infection		
<i>Toxocara canis</i> + <i>Toxascaris leonina</i>	6/380	1.5%
<i>Toxocara canis</i> + <i>Taenia</i> spp.	2/380	0.5%
<i>Toxascaris leonina</i> + <i>Cystoisospora canis</i>	2/380	0.5%
<i>Dipylidium caninum</i> + <i>Toxascaris leonina</i>	1/380	0.2%
Subtotal	11/380	2.8%
Total	82/380	21.5%

Table 2. Prevalence by capture zone.

Total (n=380)	Mexicali City (n=291) (%)	Mexicali Valley (n=49) (%)	San Felipe Seaport (n=40) (%)	P
<i>Toxocara canis</i>	7.5	6.1	5	0.80
<i>Toxascaris leonina</i>	6.1	4.0	2.5	0.56
<i>Cystoisospora</i> spp.	6.5	0	0	0.047*
<i>Taenia</i> spp.	2.7	14.2	0	0.0003***
<i>Dipylidium caninum</i>	0.3	4.0	20	0.0000***
Overall prevalence	20.6	24.4	25	0.71

Comparison of overall and specific prevalences by capture zone. Results of χ^2 test.

* $P<0.05$.

** $P<0.01$.

*** $P<0.001$.

Table 3. Magnitude of association between taeniasis and capture zone.

Capture zone	Taenia +	Taenia –	Total	OR	95% IC	P
Mexicali City	8	283	291	1.0	Reference	–
Mexicali Valley	7	42	49	5.8	2.0-17.1	0.0003***
San Felipe	0	40	40	ND	ND	
Total	15	365	380			

Comparison of capture zone by taeniasis cases. Results of χ^2 test and odds ratio estimated with confidence intervals (IC) of 95%.

* $P < 0.05$.
 ** $P < 0.01$.
 *** $P < 0.001$.

Table 4. Magnitude of association between dipylidiasis and capture zone.

Capture zone	Dipylidium +	Dipylidium –	Total	OR	95% IC	P
Mexicali City	1	290	291	1.0	Reference	–
Mexicali Valley	2	47	49	12.3	(1.0-138.8)	0.0096***
San Felipe	8	32	40	72.5	(8.7-598.4)	0.0000***
Total	11	369	380			

Comparison of capture zone by dipylidiasis cases. Results of χ^2 test and odds ratio estimated with confidence intervals (IC) of 95%.

* $P < 0.05$.
 ** $P < 0.01$.
 *** $P < 0.001$.

Table 5. Prevalence by season of the year.

Total (n=380)	Spring (n= 80) (%)	Summer (n=110) (%)	Autumn (n=126) (%)	Winter (n=64) (%)	P
Toxocara canis	16.2	6.3	0.7	9.3	0.0004***
Toxascaris leonina	7.5	1.8	8.7	3.1	0.08
Cystoisospora spp.	8.7	1.8	6.3	3.1	0.12
Taenia spp.	2.5	1.8	3.9	9.3	0.08
Dipylidium caninum	0	3.6	5.5	0	0.053
Overall prevalence	27.5	15.4	24.6	18.7	0.16

Comparison of overall and specific prevalences by season of the year. Results of χ^2 test.

* $P < 0.05$.
 ** $P < 0.01$.
 *** $P < 0.001$.

Table 6. Magnitude of association between season and overall prevalence.

Season	Parasitized	Not parasitized	Total	OR	95% IC	P
Summer	17	93	110	1.0	Reference	–
Autumn	31	95	126	1.7	(0.9-3.4)	0.08
Winter	12	52	64	1.2	(0.5-2.8)	0.57
Spring	22	58	80	2.0	(1.0-4.2)	0.04*
Total	82	298	380			

Comparison of the season of the year by the overall prevalence. Results of χ^2 test and odds ratio estimated with confidence intervals (IC) of 95%.

* $P < 0.05$
 ** $P < 0.01$
 *** $P < 0.001$

Table 7. Prevalence by age.

Total (n=380)	Younger than 1 yr (n=117) (%)	Older than 1 yr (n=263) (%)	P
<i>Toxocara canis</i>	4.2	8.3	0.15
<i>Toxascaris leonina</i>	4.2	6.0	0.47
<i>Cystoisospora</i> spp.	5.9	4.5	0.55
<i>Taenia</i> spp.	0	5.7	0.0084**
<i>Dipylidium caninum</i>	1.7	3.4	0.35
Overall prevalence	16.2	23.9	0.09

Comparison of overall and specific prevalences by age. Results of χ^2 test.

* $P < 0.05$.

** $P < 0.01$.

*** $P < 0.001$.

DISCUSSION

The overall prevalence of intestinal parasitic infections found in this study was 21.5%. Previous studies conducted in Mexico showed some differences in the prevalence of intestinal parasites, such as a prevalence of 78% in stray dogs from Queretaro District (Fernández and Cantó 2002). Furthermore, other countries found higher prevalence of intestinal parasitic infections compared with this study. A study conducted in Spain reported an overall prevalence of 71.3%; while prevalences of 86.8%, 58.5%, 43 to 57.4% and 39.2% were found respectively in Ethiopia, Brazil, Italy and Japan (Martínez-Moreno *et al* 2007, Katagiri and Oliveira 2008, Paulos *et al* 2012, Kimura *et al* 2013, Zanzani *et al* 2014). These differences could be due to the fact that most of the geographic location of Mexicali has a desert climate where temperatures during late spring, summer and early autumn vary from 36 °C to 50 °C with low humidity (Servicio Meteorológico Nacional 2010). In addition to high temperatures, these climate conditions lead to a moisture deficit which may slow or even suppress the development of parasite eggs resulting in lower rate of viability (table 7), making it difficult for parasites to develop and survive in those extreme environmental conditions to produce infection (Polley and Thompson 2009). The most frequently detected parasite in the positive samples (n=82) was *T. canis* with 7.1% of all cases. It has been documented that *T. canis* eggs are very resistant to extreme weather conditions and chemical agents (Trillo-Altamirano *et al* 2003). *T. canis* also was more prevalent during the spring season when the soils are less dry due the climate in that season, having more chances to survive (Treonis and Wall 2005). Additionally, *T. canis* has different routes of infection, such as oral, transplacental, transmammary, and is well known that it can be transmitted by paratenic hosts, which facilitate the perpetuation of that parasite in the ecosystem (Díez-Baños *et al* 1999). The prevalence of *T. canis* found in this study was similar to that reported in a previous study conducted in the State of Yucatan, southeast Mexico, with an overall prevalence

of 7.7% (Rodríguez-Vivas *et al* 2001), but lower than that reported in Queretaro, in the central part of Mexico with a prevalence of 13.9% (Fernández and Cantó 2002), the Distrito Federal, Mexico's national capital city with a prevalence of 14% (Núñez *et al* 2009) and Campeche, also in southeast Mexico with a prevalence of 14.4% (Encalada-Mena *et al* 2011).

Cystoisospora spp. was found only in the urban area of Mexicali. This parasite does not represent a zoonotic risk but it is important for dogs because it can damage the intestinal epithelium, causing liquid diarrhea with or without blood, dehydration, weight loss, vomiting, lethargy and anorexia (Miró-Corrales *et al* 1999). Another important finding in our study was the detection of *D. caninum* in 2.8% of cases. The prevalence of this parasite was higher than that reported in Yucatán (Rodríguez-Vivas *et al* 2001) but lower than in Queretaro (Fernández and Cantó 2002). Dipylidiasis is an important problem for public health, because it can infect young children causing a variety of gastrointestinal disorders (Neafie and Marty 1993). The prevalence of *Taenia* spp. established in 3.9% in this study, was lower than the 5.4% reported in Queretaro (Fernández and Cantó 2002). The presence of *Taenia* spp. transmitted by dogs is important for public health. Larval stages of *Taenia serialis* and *T. multiceps* (King 2005) can form unilocular cysts in the central nervous system, eye, subcutaneous tissue and muscle tissue (Ing *et al* 1998). In this study we have identified an association ($P < 0.05$) between the cases of taeniasis and the capture zone (rural area of Mexicali). A possible explanation for this, is that the rural area of the Mexicali County is a zone characterised by poor sanitary conditions, where dogs lives in close contact with livestock, rodents and lagomorphs, animal species known to harbor *Taenia* spp. serving as intermediary hosts to complete their life cycle (Wccsc *et al* 2011). This finding is particularly important because in the rural area of the Mexicali County many large feedlot operations take place, with over 300,000 heads of cattle being fattened each year to send selected meat cuts to local and international markets (SEFOA, 2016), which can be at risk of being infected by contamination of food or water supplies with *Taenia* spp.

eggs carried by dogs. For example, infection with *Taenia hydatigena* transmitted by dogs can lead to the development of cysts in tissues of the cattle and being the cause of organs, meat or carcass confiscation or condemnation during sanitary inspection at abattoirs, causing monetary losses to producers. (Wondimu *et al* 2011).

No significant differences were detected between parasitic infections and the variables of sex and size of dogs, however, an association ($P<0.05$) was identified between dogs >1 year and taeniasis. The cause for this might be that adult dogs move farther distances for feeding and breeding, giving them great chance to get in contact with material contaminated with eggs or get infected after hunting and feeding from rodents or lagomorphs infected with larval stages of *Taenia spp.* (Ajlouni *et al* 1984).

Dipylidiasis was found associated ($P<0.05$) with presence only in the coastal area of San Felipe, over 100 miles away from urban and rural areas of the municipality and where the mild and more humid climate conditions are more favorable, and intermediary hosts such as the fleas *Ctenocephalides canis*, *Ctenocephalides felix*, *Pulex irritans* and the louse *Trichodectes canis*, can develop and survive to complete the biological cycle of *D. caninum* (Sánchez-Acedo *et al* 1999). Considering the public health implications of dipylidiasis, it is necessary to conduct an epidemiological study in this area to identify and evaluate the impact of the intermediary host for dipylidiasis.

According to the results of this study, it is concluded that one in five stray dogs carried at least one type of intestinal parasite. *Toxocara canis* was the most common parasite found in single infected cases (19/380) and co-infected cases (8/380). Additionally, parasites of importance to public health were identified such as *T. canis*, *T. leonina*, *D. caninum* and *Taenia spp.* *Toxocara canis* was the most frequent parasite detected, which implies a higher risk to the population. Further studies are needed on the impact on the population of Mexico. The rural area of the Mexicali valley is the region with higher risk for taeniasis infections mainly because of the large number of stray dogs living in close proximity with cattle management systems. Infection with *Taenia spp.* in carcasses during *post-mortem* inspection is difficult to achieve, suggesting that an undetermined number of carcasses pass the screening as being free of parasites and the meat is distributed and consumed in both domestic and international wholesale markets, thus increasing the risk of zoonotic transmission of *Taenia spp.* through infected meat. The low level of sensitivity inherent to the sanitary *post-mortem* examination (Abuiser *et al* 2006), along with the lower rates of detection and official reporting of this type of parasite at local slaughterhouses and TIF abattoirs, generate an area of opportunity for the introduction and instrumentation of preventive medicine strategies in dogs and cattle that allows to reduce the risk of transmission to the human.

To control and reduce the problem of zoonotic intestinal parasitic infections both public and veterinary health

services should work together, and animal ownership laws should be implemented in Mexico with severe fines for people who do not comply with them, in order to reduce the problem of stray dogs and intestinal parasitic zoonoses.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is part of the requisites to obtain the grade of Doctor en Ciencias Agropecuarias of the present first author (Universidad Autónoma de Baja California). We thank the Animal Control Municipal Centre of Mexicali and students Priscila Nataly Ríos López and Rocío Yazmín Cazares from the Autonomous University of Baja California for their collaboration in this work.

REFERENCES

- Abuiser S, Epe C, Schnieder T, Klein G, Kuhne M. 2006. Visual diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis during meat inspection: Is it unequivocal?. *Parasitol Res* 99, 405-409.
- Ajlouni AQ, Saliba EK, Disi AM. 1984. Intestinal cestodes of stray dogs in Jordan. *Zeitschrift für Parasitenkd* 70, 203-210.
- Ayuntamiento de Mexicali, México. 2009. Reglamento para el control de los animales domésticos del municipio de Mexicali, Baja California. *Periódico Oficial del Estado de Baja California*.
- Besn  MA, Figueroa CJA, Quiroz RH, Ramírez GA, Ramos ME. 2005. *Manual de Prácticas de laboratorio de parasitología*. 1  ed. UNAM. Ciudad de México, México.
- Day JM, Breitschwerdt E, Cleaveland S, Karkare U, Khanna C, *et al*. 2012. Surveillance of zoonotic infectious disease transmitted by small companion animals. *Emerg Infect Dis* 18, 2-10.
- Díez-Baños P, Díez-Baños N, Morondo-Pelayo MP. 1999. Parasitosis del perro y el gato: nematodosis. En: Cordero del Campillo M, Rojo-Vázquez FA, Fernández-Martínez AR, Hernández-Rodríguez S, López-Cozar IN, *et al* (eds). *Parasitología veterinaria*. 1  ed. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, España, Pp 636-638.
- Encalada-Mena LA, Duarte-Ubaldo EI, Vargaz-Maga a JJ, García-Ramírez MJ, Medina-Hernández RE. 2011. Prevalencia de parásitos gastroent ricos de c nidos en la ciudad de Esc rcega, Campeche, México. *Tr pico H medo* 27, 209-217.
- Fernández-Campos F, Cant -Alarc n GJ. 2002. Intestinal helminth frequency in stray dogs sacrificed in the City of Queretaro, in the State of Queretaro, in Mexico. *Vet México* 33, 247-253.
- Ing MB, Schantz PM, Turner JA. 1998. Human coenurosis in North America: case reports and review. *Clin Infect Dis* 27, 519-523.
- Katagiri S, Oliveira-Sequeira TC. 2008. Prevalence of dog intestinal parasites and risk perception of zoonotic infection by dog owners in S o Paulo State, Brazil. *Zoonoses Public Health* 55, 406-413.
- Kimura A, Morishima Y, Nagahama S, Horikoshi T, Edagawa A, *et al*. 2013. A coprological survey of intestinal helminthes in stray dogs captured in Osaka Prefecture, Japan. *J Vet Med Sci* 75, 1409-1411.
- King CH. 2005. Cestodes (tapeworms). In: Mandell L, Bennett JE, Dolin R. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia, USA, Pp 3290-3293.
- Lee AC, Schantz PM, Kazacos KR, Montgomery SP, Bowman DD. 2010. Epidemiologic and zoonotic aspects of ascariid infections in dogs and cats. *Trends Parasitol* 23, 155-161.
- Luna D. 1981. Estudio parasitológico realizado en los perros sacrificados en el Centro Antirr bico de Mexicali, Baja California, durante los meses de mayo y junio de 1981. *Tesis Maestría*. Instituto de Investigación en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California, México.
- Martínez-Barbabosa I, Gutiérrez-Cárdenas EM, Alpizar-Sosa EA, Pimental-Lastra R de J. 2008. Contaminación parasitaria en heces de perros, recolectadas en calles de la ciudad de San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México. *Vet Mex* 39, 173-180.

- Martínez-Moreno FJ, Hernández S, López-Cobos E, Becerra C, Acosta J, et al. 2007. Estimation of canine intestinal parasites in Córdoba (Spain) and their risk to public health. *Vet Parasitol* 143, 7-13.
- Miró-Corales G, Sánchez-Acedo C, Quílez J, del Cacho E. 1999. Parasitosis del perro y el gato: coccidiosis sensu lato, amebosis y balandisiosis. En: Cordero del Campillo M, Rojo-Vázquez FA, Fernández-Martínez AR, Hernández-Rodríguez S, López-Cozar IN, et al (eds). *Parasitología veterinaria*. 1ª ed. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, España, Pp 615-617.
- Neafie RC, Marty AM. 1993. Unusual infections in humans. *Clin Microbiol Rev* 6, 34-56.
- Núñez-Romero C, García-Contreras A del C, Mendoza-Martínez GD, Trillo-Corona NC, Rarmírez-Durán N. 2009. Contaminación por *Toxocara* spp. en parques de Tulyehualco, México. *Rev Cient* 19, 253-256.
- Paulos D, Addis M, Fromsa A, Mekibib B. 2012. Prevalence of gastrointestinal helminthes among dogs and owners perception about zoonotic dog parasites in Hawassa Town, Ethiopia. *J Public Heal Epidemiol* 4, 205-209.
- Polley L, Thompson RC. 2009. Parasite zoonoses and climate change: molecular tools for tracking shilling boundaries. *Trends Parasitol* 25, 285-291.
- Rodríguez-Vivas RI, Cob-Galera LA, Domínguez-Alpizar JL. 2001. Frecuencia de parásitos gastrointestinales en animales domésticos diagnosticados en Yucatán, México. *Rev Biomed* 12, 19-25.
- Sánchez-Acedo C, Quílez J, del Cacho E. 1999. Parasitosis del perro y el gato: cestodosis. En: Cordero del Campillo M, Rojo-Vázquez FA, Fernández-Martínez A R, Hernández-Rodríguez S, López-Cozar IN, Díez-Baños P, Quiroz-Romero H, Carvalho-Varela M. *Parasitología veterinaria*. 1ª ed. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, España, Pp 629-631.
- SEFOA, Secretaría de Fomento Agropecuario. 2016. *Cuaderno Estadístico Pecuario de Baja California 2011-2015*. Secretaría de Fomento Agropecuario, Mexicali, Baja California, México.
- Servicio Meteorológico Nacional. 2010. Condiciones normales climatológicas: Estado de Baja California, Mexicali. Servicio Meteorológico Nacional, México.
- Thrusfield M. 2007. Surveys. In: *Veterinary Epidemiology*. 3rd ed. Blackwell Science, Iowa, USA, Pp 233.
- Tinoco-Gracia L, Barreras-Serrano A, López-Valencia G, Tamayo-Sosa AR. 2007^a. Seroprevalence and risk factors associated with larva migrans of *Toxocara canis* in dogs from Mexicali Baja California, Mexico. *J Anim Vet Adv* 6, 198-202.
- Tinoco-Gracia L, Barreras-Serrano A, López-Valencia G, Tamayo-Sosa AR, Rivera-Henry M, et al. 2007^b. Frequency of *Toxocara canis* eggs in public parks of the urban area of Mexicali, B.C., Mexico. *J Anim Vet Adv* 6, 430-434.
- Traub RJ, Robertson ID, Irwin PJ, Mencke N, Thompson RC. 2005. Canine gastrointestinal parasitic zoonoses in India. *Trends Parasitol* 21, 42-48.
- Treonis MA, Wall DH. 2005. Soil nematodes and desiccation survival in the extreme arid environment of the Antarctic dry valleys. *Integr Comp Biol* 45, 741-750.
- Trillo-Altamirano M del P, Carrasco AJ, Cabrera R. 2003. Prevalencia de helmintos enteroparásitos zoonóticos y factores asociados en *Canis familiaris* en una zona urbana de la ciudad de Ica, Perú. *Parasitol Latinoam* 58, 136-141.
- Weese JS, Peregrine AS, Anderson MFC, Fulford MB. 2011. Parasitic diseases. In: Weese JS, Fulford MB. *Companion Animal Zoonoses*. 1st ed. Blackwell Science, Iowa, USA.
- Wondimu A, Abera D, Hailu Y. 2011. A study on the prevalence, distribution and economic importance of *Cysticercus tenuicollis* in visceral organs of small ruminants slaughtered at an abattoir in Ethiopia. *Vet Med Anim Heal* 3, 67-74.
- Zajac AM, Conboy GA, Greiner EC, Smith SA, Snowden KF. 2012. Fecal examination for the diagnosis of parasitism. In: *Veterinary Clinical Parasitology*. 8th ed. Blackwell Science, Iowa, USA.
- Zanzani SA, Gazzonis AL, Scarpa P, Berrilli F, Manfredi MT. 2014. Intestinal parasites of owned dogs and cats from metropolitan and micropolitan areas: prevalence, zoonotic risks, and pet owner awareness in northern Italy. *Biomed Res Int* 2014, 1-10.

3.3 Colaboración en artículos por publicar

3.3.1 Prevalence and geographical distribution of *Nosema apis* and *Nosema cerenae* in apiaries of Northwest Mexico using a duplex Real-Time PCR with melting-curve analysis.

Francisco Javier Monge-Navarro, Sergio Arturo Cueto-González, Gilberto López-Valencia, Carolina Orozco-Cabrera, **Sergio Daniel Gómez-Gómez**, Katty Moreno-Torres, Kelvin Orlando Espinoza-Blandón, José Guadalupe Guerrero-Velázquez, Laura Elena Silva Paz, Enrique Trasviña-Muñoz.

En revisión en: *Journal of Apicultural Research*.

3.3.2 Development and analytical validation of an enzyme-linked immunosorbent assay based on baculovirus recombinant LipL32protein antigen for the accurate detection of canine leptospirosis

Francisco Javier Monge-Navarro, Carolina Orozco-Cabrera, Gilberto López-Valencia, Sergio Arturo Cueto-González, José Guadalupe Guerrero-Velázquez, Katty Moreno-Torres, Kelvin Orlando Espinoza-Blandón, Nohemí Castro-Del Campo, Soila Maribel Gaxiola-Machado, **Sergio Daniel Gómez-Gómez**, Enrique Trasviña-Muñoz, Cynthia Torres-Guzmán.

En revisión en: *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*.

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES GENERALES

- ✓ Nuestro estudio demostró por primera vez la presencia del Virus Reproductivo y Respiratorio Porcino tipo 2 y de Circovirus Porcino tipo 2 en Baja California.
- ✓ Ambos virus se encuentran ampliamente distribuidos a lo largo de todo el Estado, no obstante la falta de signología reproductiva y/o respiratoria en los hatos estudiados.
- ✓ Es necesario complementar con diferentes estudios epidemiológicos que nos permitan conocer la magnitud del problema así como diseñar las estrategias necesarias para limitar la diseminación de los patógenos.
- ✓ Es deseable la actualización de la normatividad con respecto a estas enfermedades en territorio nacional.