

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Informe de conclusión del Servicio Social

**“AISLAMIENTO DEL VIRUS DE PRRS EN SUERO Y CORDÓN UMBILICAL DE
CERDOS UTILIZANDO LA LÍNEA CELULAR PK-15”**

Presentador del Servicio Social:

MORALES VILLASANA ANYA AURORA

Asesor interno:



Dr. Héctor Óscar Orozco Gregorio

Ced. Prof. 11192421

Asesor externo:



Dr. Miguel González Lozano

Ced. Prof. 7625797

Lugar de realización: **Laboratorio de Vacunología y Constatación de la Facultad Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM y el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.**

Fecha de iniciación y terminación: **Del 04 de diciembre del 2022 al 04 de junio del 2023**

AGRADECIMIENTOS

Expreso gran agradecimiento a mi asesor interno el Dr. Héctor Óscar Orozco Gregorio por inducirme en el mundo de la producción porcina al trasmitirme todo su conocimiento y experiencia.

Mi gratitud se extiende al Dr. José Alberto Cano Buendía por que al abrirme las puertas de su laboratorio y su dedicación docente descubrí una de mis pasiones. Sus constantes enseñanzas fueron los pilares fundamentales para esta investigación donde me incentivó a trabajar con empeño, a lograr mis metas y que los errores son parte de la vida. Gracias por ser mi constante apoyo en este camino de aprendizaje.

Mi sincera gratitud a mi asesor externo el Dr. Miguel González Lozano por su guía y acompañamiento en este mundo completamente desconocido para mi, confiar en mis habilidades y ser totalmente empático a través de su sabiduría.

A mi compañera, Samantha Haydee Corona Bedoya porque sin su apoyo, motivación constante e irradiación de alegría no hubiera disfrutado tanto este camino a lo largo de la investigación.

Índice

I. INTRODUCCIÓN	5
II. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	5
III. HIPÓTESIS	6
IV. OBJETIVOS	6
General	6
Específicos	6
V. META	7
VI. MARCO TEÓRICO	7
Características del virus y generalidades su genoma	7
Especies afectadas y mecanismo de acción del virus sobre célula huésped	8
Transmisión del virus y signos clínicos	10
Detección del virus de PRRS con RT-PCR	11
Aislamiento de virus de PRRS	12
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	13
Localización y obtención de muestras	13
Toma de muestras sanguíneas	14
Toma de muestra del cordón umbilical de lechones con madre positivas a vPRRS	15
Obtención de RNA con Trizol LS Reagent	16
RT-PCR	17
Cultivo de células PK-15 y aislamiento del virus de PRRS	18
VIII. RESULTADOS	19
Muestras obtenidas	19
RNA obtenido	20
RT-PCR	20
Cultivo de células PK-15 y aislamiento del virus de PRRS	23

IX. DISCUSIÓN	24
X. CONCLUSIÓN	25
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
XII. ANEXO	33

I. INTRODUCCIÓN

El Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) fue descrito en Estados Unidos en 1987 (An et al., 2020; Espinoza & Velásquez, 2021; Gómez-Gómez et al., 2021; Maricruz López-Heydeck et al., 2015; Meléndez et al., 2021; Quezada-Fraide et al., 2021), y después se reportó en otras partes del mundo (Li et al., 2016; Rodríguez-Prieto et al., 2013). En México se reportó en unos ejemplares importados de Estados Unidos y Canadá alrededor de 1994; donde se mencionaba que las cerdas presentaban cuadros reproductivos y mortalidad de sus productos (Aguilar-Trejo et al., 2020; Gómez-Gómez et al., 2021). El síndrome fue descrito a nivel clínico, epidemiológico y productivo, en estados como: Guanajuato, Veracruz, Estado de México y Puebla, mismos estados en los que se realizó el aislamiento del agente etiológico del PRRS (Aguilar-Trejo et al., 2020). Actualmente es una de las patologías infecciosas con mayor impacto económico en las producciones porcinas a nivel mundial (Li et al., 2022), alcanzando pérdidas desde 698,000 euros hasta 664 millones de dólares, y 69 % de mortalidad de lechones en maternidad (Li et al., 2022; Martín-Valls et al., 2022; Meléndez et al., 2021; Quezada-Fraide et al., 2021; Raev et al., 2020). Por lo antes mencionado el objetivo general del estudio fue realizar la identificación del virus de PRRS mediante RT-PCR a partir de suero y cordones umbilicales de cerdos, lo cual se realizó a partir de tres etapas importantes del servicio social: 1) el entrenamiento en laboratorio para cultivo celular de la línea celular PK-15, 2) realización de una estancia en la unidad de producción porcina para las tomas de muestras de suero y cordones umbilicales y 3) práctica para el procesamiento de las muestras y obtención de resultados.

II. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

El síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) es una de las patologías con mayor impacto económico alrededor de las producciones, por lo que ha existido la necesidad de implementar el diagnóstico temprano del virus de PRRS (Li et al., 2022).

Actualmente uno de los métodos más utilizados para la detección es el aislamiento viral, el cual es dependiente de la implementación de cultivos en líneas celulares (Xia et al., 2022)

tales como macrófagos alveolares pulmonares (PAM), PK15 (proveniente de riñón porcino), MARC-145 (proveniente de riñón de mono) y CHO-K1 (aislado de ovario de hembra adulta de hámster) (Yim-Im et al., 2021) las que son susceptibles a la infección por el virus del PRRS (vPRRS) tras la introducción y expresión aproximadamente de 9 proteínas receptoras CD163, sulfato de heparina (HS), CD151, sialoadhesina (Sn), vimentina, molécula de adhesión intracelular 3 (ICAM-3) no asociada a integrina, específica de células dendríticas (DC) (DC-SIGN), Siglec-10 (lectina 10 unida al ácido siálico), miosina no muscular de cadena pesada 9 (MYH9) y proteína de choque térmico miembro 8 (HSPA8); éstas permitirán la unión, internalización y liberación del genoma viral dentro de la célula infectada (Ye et al., 2022).

El uso de la línea celular PK-15 ha cobrado gran relevancia debido a que se ha demostrado que al diseñar nuevas variantes que actúan para varios receptores tales como: células PK15^{Sn-CD163} (que expresan de manera estable tanto Sn como CD163) y las células PK15^{S10-CD163}, se encuentran relacionadas estrechamente con el fenotipo de los macrófagos objetivo [macrófagos porcinos alveolares] y son más adecuadas para el aislamiento de vPRRS en comparación de líneas celulares que expresan Sn de forma estable como MARC-145/MARC-145^{Sn} (Delrue et al., 2010; Xie et al., 2021).

III. HIPÓTESIS

Las momias y abortos de cerdas gestantes se deberán a la presencia/infección del virus de PRRS

IV. OBJETIVOS

General

Realizar el diagnóstico viral en suero y cordón umbilical de cerdas con momias y abortos positivas a PRRS por la RT-PCR

Específicos

- Tomar muestras de sangre de cerdas con momias y abortos
- Purificar el RNA de las muestras de suero sanguíneo de cerdas con momias y abortos

- Realizar RT-PCR de las muestras de sueros sanguíneos de cerdas con momias y abortos
- Desarrollar el aislamiento de PRRSV de cerdas con momias y abortos a través de cordones umbilicales de sus productos en la línea celular PK-15

V. META

- Detectar el virus de PRRS proveniente de cerdas con momias y abortos a través de RT-PCR
- Aislar el virus de PRRS proveniente de cerdas gestantes positivas en RT-PCR

VI. MARCO TEÓRICO

Características del virus y generalidades su genoma

El agente causal del PRRS es un virus envuelto conocido por formar parte de la familia *Arteriviridae*, género *Arterivirus*, orden *Nidovirales* (An et al., 2020; Rodríguez-Prieto et al., 2013); su genoma se encuentra compuesto por una cadena sencilla de ARN en sentido positivo (Aguilar-Trejo et al., 2020; An et al., 2020) con 9 a 11 marcos de lectura que van desde 5' con una región corta no traducible (UTR) seguida de ORF1a, ORF1b, ORF2a, ORF2b, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6, ORF7 hasta el extremo 3' con UTR más una cola de poli A (An et al., 2020; Kim et al., 2022; Liu et al., 2018; Maricruz López-Heydeck et al., 2015). Los marcos de lectura abierto 1 (ORF1a y ORF1b) se consideran parte de proteínas no estructurales, abarcan el 75% del tamaño del genoma, poseen funciones de proteólisis en actividades como transcripción y replicación viral, y codifican poliproteínas con distintas funciones siendo una de ellas, la ARN polimerasa (Kim et al., 2022). Por otro lado, los ORF 2a, 2b y 3 a 7 codifican para las glicoproteínas estructurales (GP) como GP3, GP4 y GP5 por parte de ORF2a; mientras que 2b codifica para las proteínas no glicosiladas tales como E, M (membranales) y N (nucleocápside). ORF5 por su parte, codifica para la glicoproteína más grande de la envoltura viral (o glicoproteína de cápside) compuesta por aproximadamente 200 aminoácidos, lo que permite la adherencia del virus a macrófagos (Wang et al., 2020). Mientras que ORF7, presenta una proteína conocida como N, la cual se considera la más

inmunogénica y es la que idealmente se utiliza para pruebas serológicas en el diagnóstico de cerdos infectados con PRRSV (Kim et al., 2022; Maricruz López-Heydeck et al., 2015; Rodríguez-Prieto et al., 2013; J. Wang et al., 2020).

El PRRS se encuentra clasificado según su variabilidad en sus secuencias genómicas en tipo I o Norteamericano, representado por la cepa prototipo Lelystad; y tipo II o Europeo (prototipo de cepa VR-2332), de los cuales se reporta un aproximado de 60% de similitudes a nivel nucleótido (An et al., 2020; Duerlinger et al., 2022; Gómez-Gómez et al., 2021; Liu et al., 2018; Maricruz López-Heydeck et al., 2015; Quezada-Fraide et al., 2021; Raev et al., 2020; Rodríguez-Prieto et al., 2013; Saade et al., 2020; Wang et al., 2020). A pesar de lo antes mencionado, existen diversas variaciones en cuanto a la genética de las cepas lo que conlleva a obtener dificultades al momento de realizar la síntesis de vacunas y diagnóstico del vPRRS (Maricruz López-Heydeck et al., 2015).

Especies afectadas y mecanismo de acción del virus sobre célula huésped

Los porcinos son la especie mayormente afectada por el vPRRS, que puede afectar a cerdos de todas las edades, sin embargo, se ha visualizado un incremento de infección en animales jóvenes (Gómez-Gómez et al., 2021); así como también se ha descrito una mayor tendencia en sistemas tecnificados contra producciones de traspatio, ello debido al incremento de la población animal, movilización de animales y uso de inseminación artificial (Amarilla et al., 2016; Maricruz López-Heydeck et al., 2015; Rodríguez-Prieto et al., 2013). En la actualidad no se conoce del todo la interacción entre las células del hospedero con el virus, pero se sabe que las células blanco son los macrófagos alveolares porcinos; también se ha descrito la replicación viral en macrófagos intersticiales e intravasculares pulmonares, además de subpoblaciones de macrófagos en tonsilas, nódulos linfáticos y bazo, macrófagos intravasculares de la placenta, cordón umbilical y células dendríticas (Amarilla et al., 2016). Por otro lado, se conoce que el receptor primario para vPRRS es el CD163, que es el determinante de la susceptibilidad de la célula al agente viral (Amarilla et al., 2016).

Los mecanismos de infección conocidos del vPRRS son: el reordenamiento de las membranas del huésped para establecer complejos de replicación viral, síntesis y expresión de ARN guía (gRNA), transcripción de RNA subgenómico (sgRNA) para la expresión eficiente de proteínas estructurales, al mismo tiempo que la capacidad única de producir vPRRS aberrante conocidos como heteróclitos. A su vez, se cree que el sitio donde se realiza la replicación viral son las vesículas perinucleares de doble membrana (DMV) situadas en el retículo endoplásmico (Kappes & Faaberg, 2015).

El vPRRS puede atravesar la barrera transplacentaria debido a que tanto en el endometrio como en la placenta se encuentran presentes macrófagos que expresan receptores afines a PRRSV como son la Sn y CD163; además de localizarse en órganos y tejidos de embriones y fetos en diferentes días de gestación tales como: días 20-35, 50-60, 70-80 y del día 80-114 (Guidoni et al., 2022; Karniychuk & Nauwynck, 2013). El mecanismo de acción del PRRSV en la vía maternal-fetal inicia con la replicación del agente viral dentro de monocitos de los vasos sanguíneos endometriales y la extravasación de estos hacia el endometrio (**Figura 1A**); posteriormente, ocurre la replicación viral dentro de macrófagos endometriales donde el virus de PRRS ocasiona apoptosis de las células que conforman al epitelio endometrial, una vez que se da la muerte programada de dichas células el virus puede ingresar al epitelio uterino y al trofoblasto (**Figura 1B**). Por consecuencia, el PRRSV logra replicarse dentro de macrófagos placentarios fetales y alcanza los órganos fetales a través de la circulación umbilical (**Figura 1C y 1D**); ocasionando degeneración total de la placenta en donde se replicó el virus, y posiblemente en estructuras adyacentes (**Figura 1E y 1F**) (Guidoni et al., 2022; Karniychuk & Nauwynck, 2013).

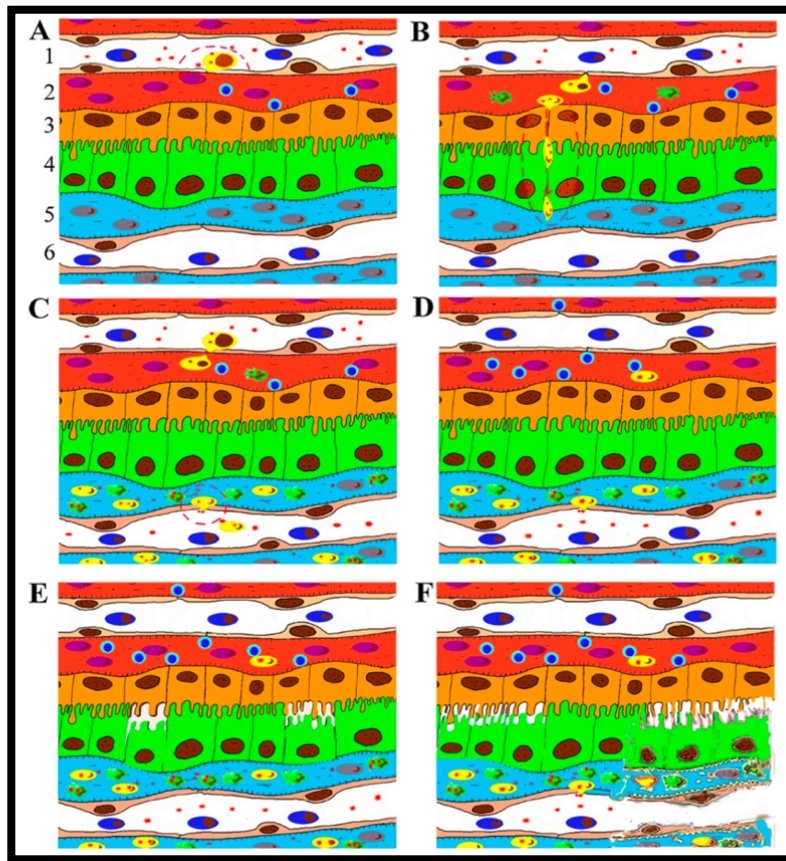


Figura 1. Eventos durante la infección viral de PRRS en la vía maternal-fetal. 1) Vaso sanguíneo materno. 2) Tejido conectivo endometrial. 3) Epitelio uterino. 4) Trofoblasto. 5) Mesénquima placentaria fetal. 6) Vaso sanguíneo fetal (Karniychuk & Nauwynck, 2013).

Transmisión del virus y signos clínicos

El virus puede ser transmitido por diferentes rutas, de manera directa e incluso vía venérea, ello se debe a que se encuentra presente dentro de secreciones y excreciones de porcinos infectados (Duerlinger et al., 2022; Gómez-Gómez et al., 2021; Rodríguez-Prieto et al., 2013). El vPRRS suele ingresar vía oronasal y genital abarcando los epitelios nasales y tonsilares, posteriormente se introduce hasta macrófagos pulmonares y endometrio uterino (Amarilla et al., 2016; Maricruz López-Heydeck et al., 2015). Todo el mecanismo molecular y la replicación suele durar poco tiempo, ya que puede identificarse el antígeno viral dentro de 6-12 horas post-infección en el citoplasma de las células infectadas (Amarilla et al., 2016).

La infección puede dividirse en dos tiempos o fases: la inicial, denominada, infección aguda, donde se visualiza una viremia de 9-15 días, que en animales jóvenes puede durar de 28 a 35 días y se pueden observar signos como anorexia, letargo, pirexia, taquipnea, disnea, hiperemia cutánea con extremidades cianóticas (Quezada-Fraide et al., 2021). Posteriormente se da la infección crónica, que comprende una ausencia de viremia, sin embargo, persiste el virus dentro del organismo animal y puede ser aislado de órganos linfoides secundarios hasta 300 días post-infección. Dependiendo el grado de virulencia que posea el virus, en mayor o en menor intensidad, puede producir neumonía, miocarditis, encefalitis, rinitis, vasculitis, linfadenopatías, entre otros signos. La eliminación del virus se da principalmente mediante orina, semen, secreciones mamarias, transplacentarias, excremento y saliva (Amarilla et al., 2016; Quezada-Fraide et al., 2021). Los signos clínicos de PRRS son variables entre hatos abarcando desde signos devastadores con alta mortalidad hasta asintomáticos, influenciado ello por las diferencias de virulencia que hay entre tipos de vPRRS, en este sentido, los que se registran comúnmente son abortos tardíos, fetos momificados, lechones nacidos muertos o débiles, anorexia, fiebre, cianosis, crecimiento reducido y problemas del sistema respiratorio específicamente post-destete en lechones (Aguilar-Trejo et al., 2020; Duerlinger et al., 2022; Gómez-Gómez et al., 2021; P. Li et al., 2022; Martín-Valls et al., 2022; Rodríguez-Prieto et al., 2013; Vergara et al., 2016).

Detección del virus de PRRS con RT-PCR

Actualmente, el método para el diagnóstico de vPRRS se da a través del uso de la reacción de la cadena de polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) (Caserta et al., 2023; Henao-Díaz et al., 2020; Zhang et al., 2018), ya que posee mayor sensibilidad, rapidez y precisión que otras técnicas de diagnóstico como la inmunohistoquímica (Maracruz López-Heydeck et al., 2015). Además el uso de RT-PCR ayuda a detectar la fase aguda del vPRRS, favorece a conocer la cantidad de RNA viral en las muestras y se permite conocer la severidad de la infección (Chae et al., 2023). La prueba se puede realizar en muestras de suero sanguíneo y fluidos orales, entre otros (Rawal et al., 2022). En la RT-PCR, a diferencia de la PCR convencional, el proceso comienza a partir de ácido ribonucleico mensajero (RNAm) del

vPRRS, el cual por efecto de la enzima transcriptasa reversa es convertido a una molécula de ácido desoxirribonucleico complementario (DNAC); con el objetivo de duplicar las partículas virales en millones de copias (Tamay de Dios et al., 2013). Los elementos que se necesitan para la RT-PCR son: el DNAC, la enzima (Taq DNA polimerasa), oligonucleótidos o primers, desoxirribonucleótidos trifosfatados o dNTPs (adenina, timina, citosina y guanina), magnesio, buffer y agua; los elementos antes mencionados participan en tres etapas principales: 1) desnaturalización, 2) hibridación y 3) extensión (María & Mellado, 2020). En la etapa de desnaturalización, las hebras de DNA son separadas y sometidas a temperatura de 95°C por 30 segundos (templado). En la segunda etapa, hibridación, los primers se alinean al extremo 3' de la hebra antes separada y se hibridan con su secuencia complementaria (complejo templado-primers); para esto es importante que la temperatura sea de 50-60°C. Finalmente, en la extensión, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers, agrega dNTPs complementarios para crear hebras completas de DNA (dirección 5' a 3') a temperatura de 72°C (Taq polimerasa funcional) y como resultado al final del ciclo se obtendrán amplicones (María & Mellado, 2020; Tamay de Dios et al., 2013).

Aislamiento de virus de PRRS

Las muestras que comúnmente se toman para el aislamiento de vPRRS son de suero sanguíneo y fluidos orales en individuos adultos, mientras que en lechones en años recientes se toman segmentos de cordón umbilical (Espinoza & Velásquez, 2021). El aislamiento del vPRRS puede llevarse a cabo a partir de cultivos celulares de macrófagos alveolares de pulmones (PAM) (OIE, 2021) y MARC-145 (línea celular de riñón de mono) (Zimmerman, 2019); además se ha demostrado que distintas líneas celulares tales como BHK21, PK-15 y CHO-K1, pueden volverse susceptibles a la infección por este agente etiológico tras la introducción y expresión de al menos 9 proteínas receptoras CD163, sulfato de heparina (HS), CD151, sialoadhesina (Sn), vimentina, molécula de adhesión intracelular 3 (ICAM-3) no asociada a integrina, específica de células dendríticas (DC) (DC-SIGN), miosina no muscular de cadena pesada9 (MYH9) y proteína de choque térmico miembro 8 (HSPA8); las que tendrán un rol importante en la unión, internalización y liberación del genoma viral dentro de la célula infectada (Ye et al., 2022). Según Xie et al., (2021), las líneas celulares

PK-15, que expresan sialoadhesina y antígeno CD163 (PK-15^{Sn-CD163} y PK-15^{S10-CD163}), son la más estables para el aislamiento viral del PRRS ya que los PAM tienen limitantes para poder aprovecharse, por ejemplo, que los cerdos a muestrear deben tener un buen estado sanitario y deben contar con menos de 8 semanas de edad (Ye et al., 2022).

Las células PK-15 (provenientes de riñón porcino) suelen procesarse en cultivos enriquecidos con aminoácidos esenciales para su desarrollo (Wang et al., 2013; Yin et al., 2020). Yin et al., (2020) realizaron el cultivo de células PK-15 en un medio de Eagle modificado por Dulbecco' s suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 50 U/ml de penicilina y 50 µ/ml de estreptomina; además, las células fueron mantenidas a una temperatura de 37°C en una cámara humidificadora con 5% de dióxido de carbono. Por otro lado, Wang et al., (2013) en su estudio cultivaron líneas celulares de PK-15 con la ayuda de un medio mínimo esencial (MEM) suplementado con 10% de FBS y 1% de antibiótico antimicótico. Una vez realizado el cultivo, para determinar si las células PK-15 pueden expresar CD163 estable para vPRRS, las células PK-15 generadas se deben infectar con las distintas cepas del virus y deben controlarse mediante la observación de efectos citopáticos post-infección (CPE), los que pueden visualizarse hasta 48 h después de la infección (Wang et al., 2013).

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

Localización y obtención de muestras

La toma de muestras de sueros y cordones umbilicales de cerdos evaluados se llevó a cabo en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la UNAM, localizado en Jilotepec Estado de México, la cual se encuentra al Norte de Tepeji del Río, Hidalgo, y al Este de Chapa de Mota, Estado de México. El protocolo fue previamente aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales (CICUA) para asegurar y verificar el cuidado, el adecuado nivel de bienestar y uso justificado de los animales (**Anexo 1**). La unidad de producción se caracteriza por ser de ciclo completo, sistema todo dentro-todo fuera y un flujo de producción de 8 partos por semana. De la piara, fueron seleccionadas 24 cerdas (12

gestantes y 12 paridas) de la línea Yorkshire-Landrace múltiparas, las que resultaron positivas previamente al virus de PRRS de acuerdo con los resultados obtenidos del monitoreo serológico de la granja realizado en octubre del 2022. Durante la toma de muestras las hembras se encontraban dentro del área de maternidad, que cuenta con un sistema de ventilación manual, iluminación natural y artificial, además de temperatura entre 18°C y 26°C (principalmente al momento del parto).

Toma de muestras sanguíneas

La toma de muestras sanguíneas fue realizada en las 24 hembras a partir de la inmovilización en cuadripedestación con ayuda de un manejador que utilizó una cuerda atada en la zona del maxilar superior a un punto de anclaje, provocando el movimiento nulo ocasionado por dolor a la sujeción. Antes de iniciar con la técnica de punción, se colocaron guantes de látex y se realizó la asepsia y antisepsia del área. Inicialmente se localizó el surco formado entre la punta del esternón y el hombro del animal; posteriormente se introdujo una aguja de calibre 18G 1_{1/2} en ángulo de 90° dirigiéndola de acuerdo con la trayectoria de la vena yugular externa del lado derecho del cuello de la hembra (**Figura 3**).



Figura 3. Inmovilización de la cerda para la extracción de la muestra sanguínea proveniente de vena yugular externa.

Los 5 ml de muestras sanguíneas obtenidas de cada cerda fueron depositados en tubos amarillos con gel separador de suero BD Vacutainer (Cat no. 367986, USA). Posteriormente la sangre completa fue centrifugada a 1.500-2.000 r.p.m. por 3 minutos a temperatura ambiente con la finalidad de conseguir la separación completa de suero; y se colocaron en microtubos de 2 ml para su almacenamiento, los cuales se conservaron a 4°C para su transporte.

Toma de muestra del cordón umbilical de lechones con madre positivas a vPRRS

Se seleccionaron al azar dos lechones nacidos vivos de cada hembra de los que se obtuvieron los cordones umbilicales. Las muestras de cordón umbilical fueron tomadas al inicio del parto posterior a la limpieza y secado del lechón, evitando el contacto del cordón umbilical con el suelo o superficies y minimizar su contaminación (**Figura 4**). Con ayuda de guantes estériles se procedió a realizar la ligadura de los cordones umbilicales y se cortó un segmento de aproximadamente 3 cm (por lechón) con distancia de 0.5 cm proximal al lechón recién nacido. Los segmentos fueron colocados en tubos BD de transporte viral universal con solución salina equilibrada de Hanks modificada y enriquecida con vancomicina y anfotericina B de 3 ml con medio de conservación viral, rotulados y colocados en refrigeración 4°C (**Figura 5**).



Figura 4. Sujeción del lechón recién nacido previo al corte del cordón umbilical.

Las muestras de sueros sanguíneos y cordones umbilicales fueron transportadas para ser trabajadas en el Laboratorio de Vacunología y Constatación perteneciente al Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.



Figura 5. Almacenamiento de cordón umbilical en tubo con medio de conservación viral de 3 ml.

Obtención de RNA con Trizol LS Reagent

Para el proceso de obtención de RNA fue necesario modificar las muestras de tejido de estado sólido a líquido, donde se tomaron segmentos de cordones umbilicales de un centímetro, los cuales se maceraron con ayuda de un mortero, pistilo y 200 μ L de PBS 1x estéril (NaCl: 137mM, KCl: 2.7 mM, Na_2HPO_4 : 10 mM, KH_2PO_4); se colocaron cada uno de ellos en un tubo de 2 ml para centrifugar a 4,000 rpm a 4°C por 5 minutos y se almacenaron los sobrenadantes a -70°C.

Una vez obtenidos los sobrenadantes provenientes de cordones umbilicales, se inició con la purificación del RNA del vPRRS, para la que se colocaron 250 μ L de muestra en un tubo de 2 ml además de 1 ml de Trizol (Ambion, Cat. No. 10296028) agitando con un vortex y se dejaron incubando por 5 min a temperatura ambiente. Al observar las muestras se presentaba grasa en cada una de ellas, por lo que se centrifugaron a 12,000 g por cinco minutos a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Posteriormente, se añadió a cada tubo 200 μ L de cloroformo, se agitaron con ayuda del vortex, se incubaron por 3 minutos a temperatura

ambiente y se centrifugaron por 15 minutos a 12,000 g a 4°C con el objetivo de obtener una fase acuosa e incolora, la cual se transfirió a otro tubo. Después se añadieron 500 µL de isopropanol y se incubaron a 4°C por 10 minutos; se centrifugó a 12,000 g por 10 minutos a 4°C. Como resultado se obtuvo un pellet y el sobrenadante se tiró. Luego, se resuspendió el pellet en un 1 ml de etanol al 75%, se homogeneizó con ayuda del vortex y se centrifugó nuevamente a 12,000 g por cinco minutos a 4°C. Se tiró el sobrenadante y se secaron los tubos por 5 minutos dejándolos abiertos para que el etanol al 75% restante se evaporara. A continuación, se resuspendieron los pellets con 20 µL de agua libre de RNAsa y incubó en un termoblock a 55°C por 10 minutos. Finalmente, se guardaron los tubos con RNA a -70°C hasta su uso posterior. Para corroborar la presencia de RNA se utilizó un espectofotómetro (NanoDrop 1000, USA), en el cual se colocaron 2 µL de RNA por cada muestra a analizar. Para evaluar el nivel de pureza del RNA se visualizó el resultado de la relación 260/280 según el espectofotómetro lo indicó.

RT-PCR

Se utilizaron el termociclador PikoReal-96 (Thermo PikoReal 96, No. Serie. PR09661500419, Finlandia), el programa PikoReal software versión 2.2 para el procesamiento de los resultados y el Kit para RT-PCR de PRRS (ADIAVET, Cat. No ADI132-100). El protocolo del software fue programado a un volumen de 15 µL, y los parámetros utilizados fueron de 45°C por 10 minutos y luego 95°C por 10 minutos (ambos para el proceso de retrotranscripción) para posteriormente realizar 45 ciclos de 95°C por 30 segundos y 45°C por 1 minuto. Se utilizó una placa de 96 pozos donde se colocaron 4 µL de RNA de cada muestra y 16 µL de solución A5 a 4°C en cada pozo; añadiéndose también el control Norteamericano. Se taparon los pozos con film transparente adherente y se eliminaron las burbujas de cada pozo. Finalmente, se colocó la placa dentro del termociclador y se corrió el programa.

Cultivo de células PK-15 y aislamiento del virus de PRRS

Para el cultivo de la línea celular PK-15 se utilizó PBS con pH 7.4 a 25°C, medio de Eagle modificado por Dulbecco's con 4.5 g/L glucosa, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 50 U/ml de Penicilina y 50 µ/ml de Estreptomina (SIGMA, Cat. No. 10-013-CV) a temperatura de 25°C; además de tripsina 1x al 0.25% (Corning, Cat. No. 25-050-CI) a 20°C. Para mantener las células libres de contaminantes o patógenos el proceso se llevó a cabo dentro de una campana de flujo laminar con limpieza previa con etanol al 70%. Se descongeló el tubo de 2 ml con células PK-15 a temperatura de 37°C para centrifugación a 3500 rpm por 3 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se visualizó el pellet celular en la punta del tubo. Dentro de la cámara de flujo laminar con micropipeta se cambió el medio, donde se añadió 1 ml y se realizó un movimiento de pipeteo para soltar las células al medio nuevo. Posteriormente, se colocó el medio dentro de una botella T25 para crecimiento celular, se agregaron 5 ml de medio y se mantuvieron en incubación a 37°C y 5% de CO₂ (Sanyo CO₂ Incubator, Modelo MCO-19 A/C, Japón). Se visualizaron los niveles de confluencia celular en las 24 y 72 horas posteriores.

A la botella T25 de cultivo celular se le agregó 750 µL de tripsina con el fin de liberar las células de las paredes de la botella, después se dejó reposar por 5 minutos y se visualizó al microscopio para corroborar dicha separación. Posteriormente, se agregaron 10 ml de PBS con pH 7.4 a temperatura ambiente para neutralizar el efecto de la tripsina; con ayuda de pipetas de 10 ml y pipetero (Scilogex Levo Plus Pipette Filler No. YP182AG000179) se agregaron 15 ml de la botella T25 a un tubo Falcon de 20 ml. Se centrifugaron las células a 3000 rpm por 5 minutos a 25°C. Al visualizar el pellet celular se tiró la solución PBS y con movimientos firmes en la punta del tubo disolver el pellet en el líquido restante. Se colocaron 10 µL en un tubo Eppendorf de 1.5 ml además de la adición de 90 µL de azul de tripan 0.4% (Gibco, Cat. No. 1520-061) (dilución 1:10); se colocaron 12 µL en la cámara de Neubauer (OptikLabor, Cat. No. 1100000) para realizar el conteo celular. Se contaron el número de

células de dos cuadrantes superiores y dos inferiores y se realizó el cálculo con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{número de células}}{\text{área de conteo (mm}^2\text{)} * \text{profundidad de la cámara (mm)} * \text{dilución}} = \text{número de células por } \mu\text{L}$$

VIII. RESULTADOS

Muestras obtenidas

Se obtuvieron 21 muestras de sueros sanguíneos de hembras gestantes, de las que nueve se encontraban dentro del área de maternidad próximas al parto. De ellas tres presentaron momificaciones y 2 presentaron 1 aborto (**Figura 6**). De las tres cerdas que presentaron momias y abortos al parto se recolectaron nueve muestras de cordones umbilicales.



Figura 6. Lechones nacidos muertos con diferentes etapas de momificación: inicial y parcial.

RNA obtenido

Los valores indicativos de pureza 260/280 en las muestras de RNA de suero sanguíneo y cordones umbilicales se muestran en el **Cuadro 1**. Las muestras UC3, UC5 y UC7 se consideran dentro de la clasificación como “pureza aceptable”.

ID	Tipo de muestra	Concentración de RNA (ng/uL)	Relación 260/280
A15	Suero	16.5	1.37
0507	Suero	29.6	1.47
69991	Suero	40.6	1.47
UC1	Cordón umbilical	220.6	1.65
UC2	Cordón umbilical	85.2	1.58
UC3	Cordón umbilical	116.9	1.70
UC4	Cordón umbilical	134.2	1.68
UC5	Cordón umbilical	132.5	1.71
UC6	Cordón umbilical	123.8	1.67
UC7	Cordón umbilical	143.1	1.72

Cuadro 1. Valores de las medidas de absorbancia del RNA obtenidos en el NanoDrop 1000.

RT-PCR

De las 21 cerdas evaluadas, 5 resultaron positivas a vPRRS mediante el uso de RT-PCR con muestras de suero, las cuales se identificaron como A1, A2, A3, B1 y B3. Los umbrales de ciclos (Ct) obtenidos fueron: A1= 5.65, A2= 10.97, A3= 10.86, B1= 10.36 y B3= 4.56 (**Figura 7**). Mientras que las muestras restantes no lograron amplificar, a excepción de la muestra control denominada como F4 con Ct de 1.24 (**Figura 8**). Del procesamiento de 12 cordones umbilicales de lechones, 5 resultaron positivos a RT-PCR, estas se identificaron como: UC1, UC2, UC3, UC7 y UC9. Los umbrales de ciclos obtenidos fueron: UC1= 14, UC2=12.82, UC3=11.73, UC7=13.55 y UC9=14.92 (**Figura 9**).

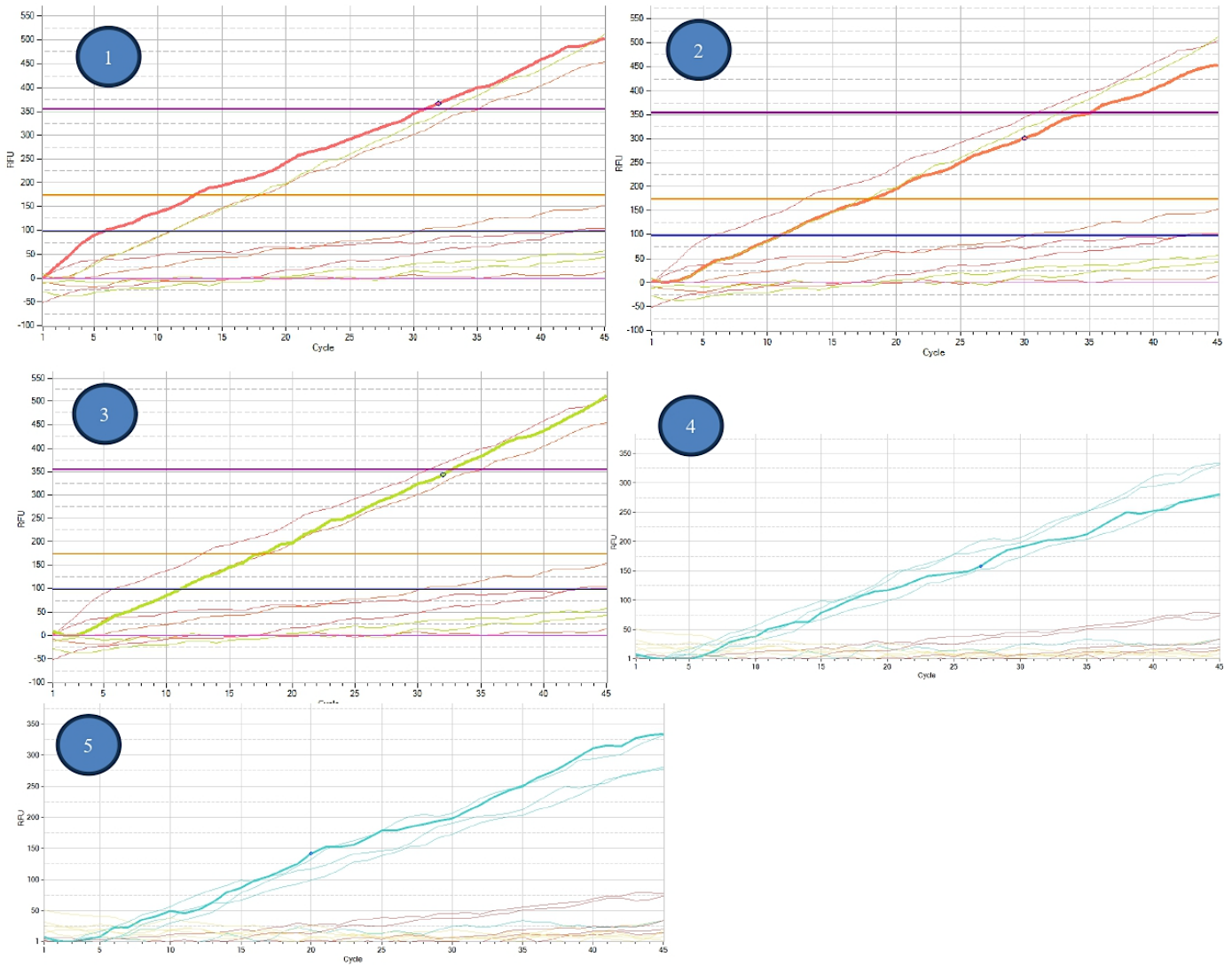


Figura 8. Gráficas de amplificación de muestras de sueros sanguíneos positivas a PRRSV. 1) Muestra A1 (línea roja), 2) muestra A2 (línea naranja), 3) muestra A3 (línea verde), 4) muestra B1 (línea aqua) y 5) muestra B3 (línea aqua).

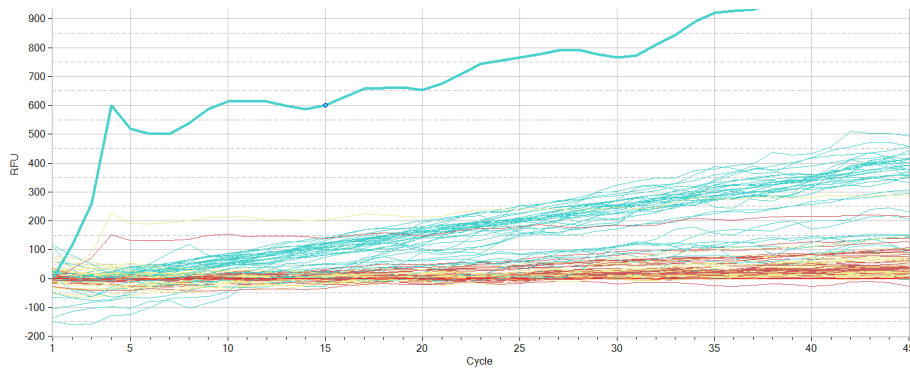


Figura 9. Gráfica de amplificación de muestras negativas con muestra control F4

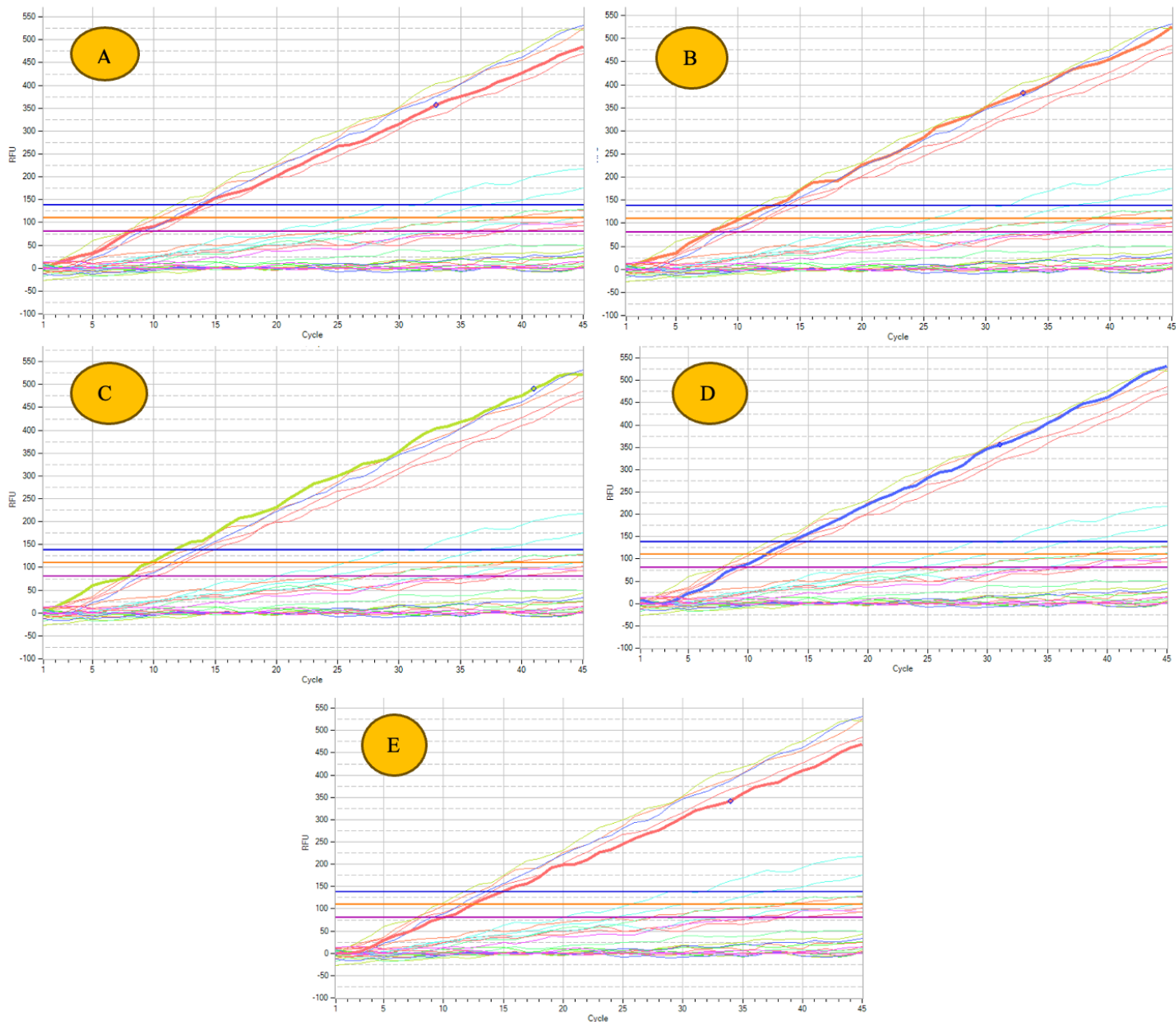


Figura 10. Graficas de amplificación de muestras procesadas de cordón umbilical positivas a PRRSV.
 A) Muestra UC1 (línea roja), B) muestra UC2 (línea naranja), C) muestra UC3 (línea verde), D) muestra UC7 (línea azul rey) y E) muestra UC9 (línea roja).

Cultivo de células PK-15 y aislamiento del virus de PRRS

Dos semanas después del inicio del cultivo celular se realizó el conteo celular, donde se contabilizaron 2.6×10^5 células PK-15. Sin embargo, al paso de los días se visualizaron células con aspecto oscuro y flotando en el medio DMEM, signos característicos de muerte celular. Por lo antes mencionando, el aislamiento del vPPRS no se logró concretar (**Figura 10**).

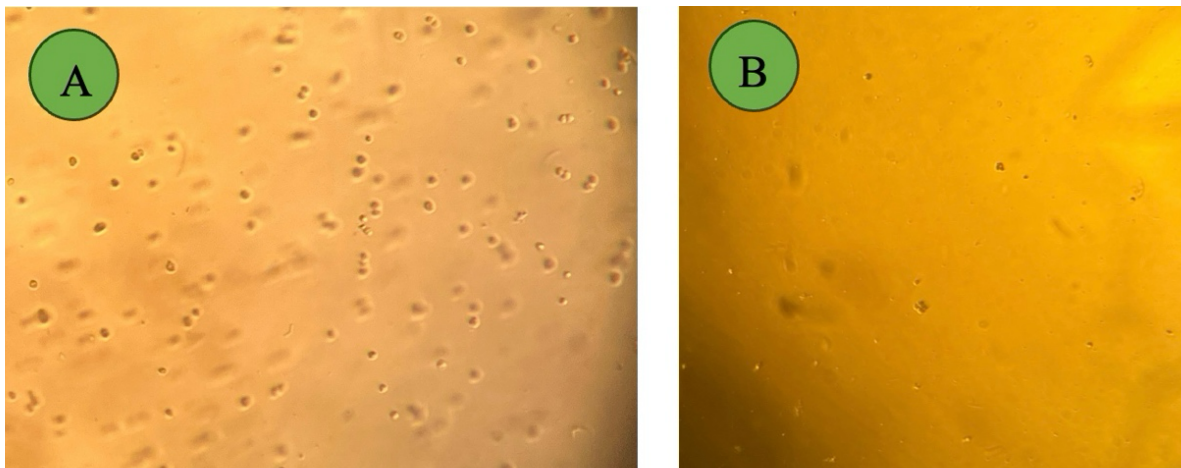


Figura 10. A) Imagen tomada el 3 de Abril del 2024 con presencia de células PK-15 dentro del medio DMEM, B) Imagen tomada el 15 de Abril del 2024 con evidente muerte celular.

IX. DISCUSIÓN

El agente viral del síndrome respiratorio y reproductivo porcino es uno de los patógenos con mayor relevancia económica a nivel mundial (Kappes & Faaberg, 2015; Kim et al., 2022; Li et al., 2016; Raev et al., 2020), por lo que un diagnóstico según la etapa de la enfermedad (aguda o crónica) en la que se encuentran los individuos mejoraría la detección del vPRRS; esto concuerda con Henao-Díaz et al., (2020), quienes a través de su estudio mencionan que los métodos de diagnóstico óptimos para detectar el PRRS en fase aguda es la RT-PCR y en fase crónica el ELISA. Las técnicas de diagnóstico antes mencionadas, se han utilizado por diferentes investigadores, especialmente la RT-PCR, la cual según López-Heydeck et al., (2015) tiene de ventaja la obtención de un 100% de sensibilidad y especificidad en muestras de suero. En el presente estudio únicamente se utilizó la RT-PCR y se visualizó que el 24% de las muestras de suero fueron positivas a vPRRS, lo que de acuerdo a Henao-Díaz et al., (2020) las cerdas se encontraban aproximadamente entre el día 3 y 50 de post-exposición al virus.

Las muestras utilizadas para el diagnóstico de vPRRS, en esta investigación fueron de suero sanguíneo de cerdas gestantes y cordones umbilicales de lechones de dichas hembras, ello debido a que con este tipo de muestras existe mayor sensibilidad a la detección por RT-PCR, así como mayor facilidad a la obtención. Ello concuerda con López et al., (2020) donde reportan que el uso de suero sanguíneo para el diagnóstico de vPRRS ofrece aproximadamente un 95% de sensibilidad a la detección a través de la RT-PCR en cerdos en etapa aguda, la cual se denomina viremia inicial. Por otro lado, contrastando el estudio presente, Chae et al., (2023) describen que la muestra de sangre completa para diagnóstico de vPRRS mediante RT-PCR es el método más poderoso y simple de realizar.

Al obtener resultados positivos en la RT-PCR de las muestras procesadas de cordones umbilicales, se comprueba el paso del vPRRS de la madre al embrión y la confirmación de la hipótesis planteada; tal y como lo describen Martin-Valls et al., (2018) quienes en su investigación corroboraron con efectividad la entrada transplacentaria del vPRRS, y

reportaron que debido a ello, el cordón umbilical de lechones con madres positivas, son una buena alternativa para el muestreo y detección del mismo.

A su vez, el presente estudio es sustentado por Karniychuk et al., (2013) donde a través de su investigación no sólo concluyen que el virus de PRRS se replica e ingresa por medio de la vía materno-fetal durante la gestación tardía afectando los órganos de los embriones, sino que destacan la causa de la capacidad del virus de ingresar por este medio, y también explican que la determinante es gracias a la abundante presencia de macrófagos con receptores CD163 y Sn presentes en órganos internos fetales, favoreciendo así la infección viral del producto.

El aislamiento del vPRRS en este estudio no fue realizado debido a la muerte de la línea celular PK-15 del cultivo trabajado, el cual pudo ocasionarse a causa del manejo o a la falta de las condiciones necesarias para la proliferación celular tales como la temperatura, pH, y que coincidió con que el tanque de dióxido de carbono se vació, entre otros, ello ha sido descrito previamente por Freshney (2006) en su recopilación de principios de cultivo celular. Sin embargo, este obstáculo abre la posibilidad a continuar con la misma línea de investigación para realizar el aislamiento del virus de PRRS presente en los animales evaluados, así como un análisis filogenético para poder determinar las similitudes genéticas de RNA que presenta el vPRRS detectado.

X. CONCLUSIÓN

La detección del vPRRS es uno de los puntos clave para el abordaje de esta patología de manera temprana, sin embargo, el diagnóstico es escaso en México debido a que la mayoría de las alertas de infección por vPRRS son poco visibles. Por lo antes mencionado, sería importante que las producciones porcinas alrededor del país además de realizar el diagnóstico rutinario de PRRS a través de RT-PCR y ELISA, agregaran un protocolo con acciones que eviten la entrada del agente viral, en el que se incluya un historial del número de lechones nacidos muertos y la relación con la salud de la madre. Así como la realización del diagnóstico de vPRRS a nuevos individuos que ingresen a la producción y detección de vPRRS en semen utilizado para inseminación artificial, entre otras acciones. Ello ayudaría a visualizar la entrada del virus a la producción y el diagnóstico temprano del PRRS. A su vez,

al lograrse la implementación rutinaria de vPRRS en las producciones, idealmente debería realizarse el aislamiento viral para poder identificar exactamente la cepa y el linaje al que pertenece el virus, y con ello poder desarrollar vacunas o tratamientos específicos que puedan combatir la infección viral de dicha producción.

Finalmente, concluyo este trabajo de investigación con la dicha de haber tenido la oportunidad de profundizar más en el síndrome porcino más complejo y común a nivel mundial. Ello a través de un proceso integral como eMVZ desde el ámbito teórico al práctico, donde además tuve la oportunidad de realizar una estancia en una unidad de producción porcina para vivir el manejo diario de porcinos en diferentes etapas. Desde mi punto de vista, la investigación de problemas potenciales de la actualidad, no sólo se refiere a la lectura y escritura del tema, si no al adentrarse por completo en el problema y justo esa fue la experiencia que viví en mi servicio social, dándome una grata experiencia.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar-Trejo, C. M., Luna-Nevárez, G., Reyna-Granados, J. R., Zamorano-Algandar, R., Romo-Rubio, J. A., Sánchez-Castro, M. Á., Enns, R. M., Speidel, S. E., Thomas, M. G., & Luna-Nevárez, P. (2020). Polymorphisms associated with the number of live-born piglets in sows infected with the PRRS virus in southern Sonora Mexico. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, *11*(3), 828–847. <https://doi.org/10.22319/RMCP.V11I3.5002>
- Amarilla, S., Avalos, A., Suarez, M., Marecos, E., & González, E. (2016). PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME (PRRS): EPIDEMIOLOGY, SYMPTOMS AND LESIONS. *Compendio de Ciencias Veterinarias*, *5*(2), 38–46. <https://doi.org/10.18004/compend.cienc.vet.2015.05.02.38-46>
- An, T. Q., Li, J. N., Su, C. M., & Yoo, D. (2020). Molecular and Cellular Mechanisms for PRRSV Pathogenesis and Host Response to Infection. In *Virus Research* (Vol. 286). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.197980>
- Caserta, L. C., Zhang, J., Piñeyro, P., & Diel, D. G. (2023). Rapid genotyping of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) using MinION nanopore sequencing. *PLOS ONE*, *18*(5), e0282767. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282767>
- Chae, H., Roh, H. S., Jo, Y. M., Kim, W. G., Chae, J. B., Shin, S. U., & Kang, J. W. (2023). Development of a one-step reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction assay for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *PLoS ONE*, *18*(10 October). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0293042>
- Delrue, I., Van Gorp, H., Van Doorselaere, J., Delputte, P. L., & Nauwynck, H. J. (2010). Susceptible cell lines for the production of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by stable transfection of sialoadhesin and CD163. In *BMC Biotechnology* (Vol. 10). <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/10/48>
- Duerlinger, S., Knecht, C., Sawyer, S., Balka, G., Zaruba, M., Ruenenapf, T., Kraft, C., Rathkjen, P. H., & Ladinig, A. (2022). Efficacy of a Modified Live Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus 1 (PRRSV-1) Vaccine against

Experimental Infection with PRRSV AUT15-33 in Weaned Piglets. *Vaccines*, 10(6).
<https://doi.org/10.3390/vaccines10060934>

Espinoza, A. C., & Velásquez, M. R. (2021). Porcine reproductive and respiratory syndrome: A review of the etiological agent and its influence on the current behaviour of the disease. In *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru* (Vol. 32, Issue 1). Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
<https://doi.org/10.15381/RIVEP.V32I1.19645>

Freshney, R. I. (2006). *Basic Principles of Cell Culture*.

Gómez-Gómez, S. D., López-Valencia, G., Herrera-Ramírez, J. C., Trasviña-Muñoz, E., Monge-Navarro, F. J., Moreno-Torres, K., García-Reynoso, I. C., Medina-Basulto, G. E., & Cabanillas-Gámez, M. A. (2021). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome in porcine herds of Baja California, Mexico. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 12(4), 1317–1325. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v12i4.5778>

Guidoni, P. B., Pasternak, J. A., Hamonic, G., MacPhee, D. J., & Harding, J. C. S. (2022). Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus 2 on tight junction gene expression at the maternal-fetal interface. *Theriogenology*, 184, 162–170.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.03.011>

Henao-Diaz, A., Ji, J., Giménez-Lirola, L., Baum, D. H., & Zimmerman, J. (2020). Understanding and interpreting PRRSV diagnostics in the context of “disease transition stages.” *Research in Veterinary Science*, 131, 173–176.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.04.023>

Kappes, M. A., & Faaberg, K. S. (2015). PRRSV structure, replication and recombination: Origin of phenotype and genotype diversity. In *Virology* (Vols. 479–480, pp. 475–486). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.012>

Karniychuk, U. U., & Nauwynck, H. J. (2013). Pathogenesis and prevention of placental and transplacental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. In *Veterinary Research* (Vol. 44, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-95>

Kim, S. C., Moon, S. H., Jeong, C. G., Park, G. S., Park, J. Y., Jeoung, H. Y., Shin, G. E., Ko, M. K., Kim, S. H., Lee, K. K., Cho, H. S., & Kim, W. Il. (2022). Whole-genome sequencing and genetic characteristics of representative porcine reproductive and

- respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in Korea. *Virology Journal*, 19(1).
<https://doi.org/10.1186/s12985-022-01790-6>
- Li, P., Shen, Y., Wang, T., Li, J., Li, Y., Zhao, Y., Liu, S., Li, B., Liu, M., & Meng, F. (2022). Epidemiological survey of PRRS and genetic variation analysis of the ORF5 gene in Shandong Province, 2020–2021. *Frontiers in Veterinary Science*, 9.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2022.987667>
- Li, Z., He, Y., Xu, X., Leng, X., Li, S., Wen, Y., Wang, F., Xia, M., Cheng, S., & Wu, H. (2016). Pathological and immunological characteristics of piglets infected experimentally with a HP-PRRSV TJ strain. *BMC Veterinary Research*, 12(1).
<https://doi.org/10.1186/s12917-016-0854-x>
- Liu, Y., Li, J., Yang, J., Zeng, H., Guo, L., Ren, S., Sun, W., Chen, Z., Cong, X., Shi, J., Chen, L., Yijun, D., Li, J., Wang, J., Wu, J., & Yu, J. (2018). Emergence of Different Recombinant Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses, China. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22494-4>
- López, W. A., Zimmerman, J. J., Gauger, P. C., Harmon, K. M., Bradner, L., Zhang, M., Giménez-Lirola, L., Ramirez, A., Cano, J. P., & Linhares, D. C. L. (2020). Practical aspects of PRRSV RNA detection in processing fluids collected in commercial swine farms. *Preventive Veterinary Medicine*, 180.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105021>
- María, O., & Mellado, D. (2020). Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. In *Septiembre* (Vol. 2020).
- Maricruz López-Heydeck, S., Alejandro Alonso-Morales, R., Mendieta-Zerón, H., & Carlos Vázquez-Chagoyán, J. (2015). Síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PRRS). Revisión Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). Review. In *PRRS*. *REVISIÓN Rev Mex Cienc Pecu* (Vol. 6, Issue 1).
- Martín-Valls, G. E., Mortensen, P., Clilvert, H., Li, Y., Cortey, M., Sno, M., Barna, T., Terré, M., Guerra, N., & Mateu, E. (2022). The use of a whole inactivated PRRS virus vaccine administered in sows and impact on maternally derived immunity and timing of PRRS virus infection in piglets. *Veterinary Record Open*, 9(1). <https://doi.org/10.1002/vro2.34>

- Meléndez, R., Guzmán, M., Jiménez, C., Piche, M., Jiménez, E., León, B., Cordero, J. M., Ramirez-Carvajal, L., Uribe, A., Van Nes, A., Stegeman, A., Vernooij, H., & Romero-Zúñiga, J. J. (2021). Seroprevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on swine farms in a tropical country of the Middle Americas: the case of Costa Rica. *Tropical Animal Health and Production*, 53(4). <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02799-9>
- Quezada-Fraide, E. A., Peñuelas-Rivas, C. G., Moysén-Albarrán, F. S., Trujillo-Ortega, M. E., & Martínez-Castañeda, F. E. (2021). Productive performance and costs of swine farms with different PRRS virus vaccination protocols. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 12(1), 205–216. <https://doi.org/10.22319/RMCP.V12I1.5377>
- Raev, S., Yuzhakov, A., Bulgakov, A., Kostina, L., Gerasianinov, A., Verkhovsky, O., Zaberezhny, A., & Aliper, T. (2020). An outbreak of a respiratory disorder at a russian swine farm associated with the co-circulation of PRRSV1 and PRRSV2. *Viruses*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/v12101169>
- Rawal, G., Yim-Im, W., Chamba, F., Smith, C., Okones, J., Francisco, C., & Zhang, J. (2022). Development and validation of a reverse transcription real-time PCR assay for specific detection of PRRSGard vaccine-like virus. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(3), 1212–1226. <https://doi.org/10.1111/tbed.14084>
- Rodríguez-Prieto, V., Kukielka, D., Martínez-López, B., de las Heras, A. I., Barasona, J. Á., Gortázar, C., Sánchez-Vizcaíno, J. M., & Vicente, J. (2013). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in wild boar and Iberian pigs in south-central Spain. *European Journal of Wildlife Research*, 59(6), 859–867. <https://doi.org/10.1007/s10344-013-0739-2>
- Saade, G., Ménard, D., Hervet, C., Renson, P., Hue, E., Zhu, J., Dubreil, L., Paillot, R., Pronost, S., Bourry, O., Simon, G., Dupont, J., Bertho, N., & Meurens, F. (2020). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus interferes with swine influenza a virus infection of epithelial cells. *Vaccines*, 8(3), 1–22. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030508>

- Tamay de Dios L, Ibarra C, & Velasquillo C. (2013). *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real* (Vol. 2). www.medigraphic.org.mx
www.medigraphic.com/rid
www.medigraphic.org.mx
- Vergara, C. V., Vilca, J. V., & Cerga, M. L. (2016). Porcine reproductive respiratory syndrome: Presentation in time and effect on reproductive parameters and productive. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 27(4), 813–821. <https://doi.org/10.15381/rivep.v27i4.12569>
- Wang, J., Lin, S., Quan, D., Wang, H., Huang, J., Wang, Y., Ren, T., Ouyang, K., Chen, Y., Huang, W., Luo, T., & Wei, Z. (2020). Full Genomic Analysis of New Variants of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Revealed Multiple Recombination Events Between Different Lineages and Sublineages. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00603>
- Wang, X., Wei, R., Li, Q., Liu, H., Huang, B., Gao, J., Mu, Y., Wang, C., Hsu, W. H., Hiscox, J. A., & Zhou, E. M. (2013). PK-15 cells transfected with porcine CD163 by PiggyBac transposon system are susceptible to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Virological Methods*, 193(2), 383–390. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.06.035>
- Xia, W., Chen, Y., Ding, X., Liu, X., Lu, H., Guo, C., Zhang, H., Wu, Z., Huang, J., Fan, Z., Yu, S., Sun, H., Zhu, S., & Wu, Z. (2022). Rapid and Visual Detection of Type 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus by Real-Time Fluorescence-Based Reverse Transcription Recombinase-Aided Amplification. *Viruses*, 14(11). <https://doi.org/10.3390/v14112526>
- Xie, J., Vereecke, N., Theuns, S., Oh, D., Vanderheijden, N., Trus, I., Sauer, J., Vyt, P., Bonckaert, C., Lalonde, C., Provost, C., Gagnon, C. A., & Nauwynck, H. (2021). Comparison of primary virus isolation in pulmonary alveolar macrophages and four different continuous cell lines for type 1 and type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccines*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/vaccines9060594>
- Ye, N., Wang, B., Feng, W., Tang, D., & Zeng, Z. (2022a). PRRS virus receptors and an alternative pathway for viral invasion. In *Virus Research* (Vol. 320). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198885>

- Ye, N., Wang, B., Feng, W., Tang, D., & Zeng, Z. (2022b). PRRS virus receptors and an alternative pathway for viral invasion. *Virus Research*, 320, 198885. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198885>
- Yim-Im, W., Huang, H., Park, J., Wang, C., Calzada, G., Gauger, P., Harmon, K., Main, R., & Zhang, J. (2021). Comparison of ZMAC and MARC-145 cell lines for improving porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolation from clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 59(3). <https://doi.org/10.1128/JCM.01757-20>
- Yin, M., Hu, D., Li, P., Kong, L., Ning, H., Yue, F., Jiang, J., & Wang, X. (2020). Cloning and identification of PK15 cells for enhanced replication of classical swine fever virus. *Journal of Veterinary Research (Poland)*, 64(1), 9–14. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2020-0020>
- Zhang, Y. T., Guo, X. Q., Callahan, J. D., Yuan, G. L., Zhang, G. H., Chen, Y., Zhang, H. B., Pulscher, L. A., Lu, J. H., & Gray, G. C. (2018). Field evaluation of two commercial RT-rtPCR assays for porcine reproductive and respiratory syndrome virus detection using sera from ill and healthy pigs, China. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 30(6), 848–854. <https://doi.org/10.1177/1040638718800357>

XII. ANEXO

Anexo 1. Dictamen de protocolo aprobado ante el CICUA.



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales



DICTAMEN			
PRIMERA REVISIÓN	FECHA: 22.02.2024	# PROTOCOLO: 150	PROTOCOLO: INVESTIGACIÓN
INTERNO			
TÍTULO	AISLAMIENTO DEL VIRUS DE PRRS EN SUERO Y CORDÓN UMBILICAL DE CERDOS UTILIZANDO LA LÍNEA CELULAR PK-15		
RESPONSABLE:	Miguel González Lozano		
ADSCRIPCIÓN:	Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP), FMVZ, UNAM		
DONDE SE REALIZARÁ EL ESTUDIO:	Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP) y Laboratorio de Constatación y Vacunología FMVZ y Zootecnia UNAM		
Teléfonos de contacto:	5518380613 5583990143	Correo electrónico:	2183068815@alumnos.xoc.uam.mx migueglozano@yahoo.com.mx
Dudas acerca del protocolo:			
RECOMENDACIONES			
DICTAMEN:	APROBADO		

A t e n t a m e n t e
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, 22 de febrero del 2024

MVZ Sara Caballero Chacón
Coordinadora interna CICUA

MVZ Sara Claudia Herrera García
Secretaria del CICUA

Circuito Exterior, Ciudad Universitaria. Coyoacán 04510. México, D.F.
correo-e: cicua.fmvz.unam@gmail.com